

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”

FACOLTÀ DI INGEGNERIA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DEI MATERIALI

E DELLA PRODUZIONE

DOTTORATO DI RICERCA IN INGEGNERIA DEI MATERIALI E DELLE STRUTTURE

BIOMATERIALI

XX CICLO

SCAFFOLD PER LA RIGENERAZIONE DEL TESSUTO CARTILAGINEO

Coordinatore: Prof. D. Acierno

Candidato: Ing. Biagio Esposito

Tutor: Prof. L. Ambrosio

A Giovanni, Rosa, Maria, Dario...

Indice

INDICE	pag 3
OBIETTIVI	pag 4
INTRODUZIONE AL LAVORO DI TESI	pag 5
INGEGNERIA DEI TESSUTI	pag 7
ANATOMIA DEL GINOCCHIO	pag 40
<i>PARTE I: REALIZZAZIONE DI SCAFFOLD CON TECNOLOGIE CONVENZIONALI</i>	
INTRODUZIONE	pag 57
PREPARAZIONE DEI SUBSTRATI	pag 78
VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE DEI MATERIALI	pag 88
RISULTATI E DISCUSSIONE	pag 100
<i>PARTE II: REALIZZAZIONE DI SCAFFOLD CON TECNOLOGIE NON CONVENZIONALI</i>	
INTRODUZIONE	pag 129
MATERIALI E METODI	pag 131
VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE DEI MATERIALI	pag 144
RISULTATI E DISCUSSIONE	pag 160
BIBLIOGRAFIA	pag. 172
RINGRAZIAMENTI	pag. 180

OBIETTIVI

L'approccio tradizionale nel recupero delle funzioni fisiologiche d'organi e tessuti danneggiati attraverso il trapianto di protesi artificiali presenta dei limiti intrinseci che, nonostante i notevoli progressi circa il recupero d'alcune funzioni, sembrano insuperabili. Il motivo principale di queste difficoltà sta in un'ipotesi di fondo piuttosto debole, nel voler cioè sostituire una parte di un complessissimo sistema vivente con un sistema artificiale inevitabilmente più semplificato. Da ciò si comprendono i problemi legati alla risposta dell'organismo alla presenza di corpi estranei, di fatto, mai completamente risolvibili. Il progresso degli ultimi anni, soprattutto la ricerca di nuovi materiali, ha comunque portato a dei risultati apprezzabili, in alcuni campi più che in altri, soprattutto se si considera che comunque, con questo approccio, è possibile migliorare notevolmente la qualità della vita di molte persone, o avere apprezzabili risultati limitatamente nel tempo.

INTRODUZIONE AL LAVORO DI TESI

La costante ricerca dell'uomo di migliorare il proprio stato e, in particolar modo, la propria salute ha portato nel corso dei secoli, partendo dagli egizi, alla nascita e allo sviluppo della scienza medica che, se nella Grecia di "Ippocrate" era frutto di speculazione filosofica e nel medioevo appannaggio esclusivo degli erboristi, verso la fine del XVII secolo entra a far parte a pieno titolo delle nascenti discipline empiriche. Da questo momento cominciano a svilupparsi, le varie scienze sperimentali; sembra quasi che la conoscenza debba essere divisa in settori e segmentata in tanti campi di studio nettamente indipendenti e tra loro non confrontabili. Tuttavia, con il passare degli anni e con l'approfondirsi delle conoscenze in ciascun campo gli studiosi d'ogni materia si rendono conto che le varie SCIENZE inevitabilmente confluiscono e così la CHIMICA, la FISICA, la MATEMATICA, la BIOLOGIA, la MEDICINA, l'INGEGNERIA, ed altre si avvicinano e talvolta confluiscono generando nuovi campi di STUDIO; un esempio di questo processo di riunificazione di materie, un tempo considerate nettamente indipendenti, è l'ingegneria dei TESSUTI.

Alla fine del XX secolo diventa realizzabile ciò che i medici di tutto il mondo avevano fino a quel momento creduto impossibile: diventa possibile il TRAPIANTO d'organi. Il trapianto però presuppone che oltre ad un ricevente in cui impiantare l'organo sano a sostituzione di uno malato, vi sia anche un DONATORE al quale espianarlo.

Fino a qualche anno fa, talvolta, l'unica speranza per un malato di sopravvivere era che qualcun altro morisse e donasse i suoi organi.

Per tentare di porre in qualche modo rimedio a questo annoso problema nasce l'ingegneria dei tessuti che si prefigge lo scopo di creare ex novo il tessuto da impiantare utilizzando cellule del paziente stesso scavalcando, in questo modo, anche l'ostacolo posto al trapianto dalla risposta immunitaria inevitabilmente scatenata dall'impianto d'organi eterologhi (rigetto).

L'ingegneria dei tessuti, come suddetto, nasce dalla confluenza di Medicina, Biologia ed Ingegneria. Uno sviluppo soddisfacente di questa nuova disciplina richiede un continuo interscambio di conoscenze ed una stretta collaborazione tra le parti realizzabili attraverso l'inevitabile conoscenza: dei processi alla base della crescita cellulare, dei materiali e delle strutture utilizzabili, e delle leggi fisiche a cui il corpo umano obbedisce.

A tale scopo l'INGEGNERIA si è occupata della ricerca di nuovi materiali con determinate caratteristiche.

La ricerca nel campo dei biomateriali produce ogni anno lo sviluppo di nuove soluzioni per soddisfare, in maniera specifica, le singole esigenze legate alle numerose patologie che colpiscono i tessuti naturali. Accanto a ciò, la stessa concezione di biomateriale subisce continue evoluzioni: la letteratura odierna, infatti, definisce come tali, quei materiali che stimolano la ricrescita del tessuto con cui vengono a contatto e non più la sola assenza di una risposta negativa come conseguenza del contatto. Per soddisfare tali esigenze è indispensabile guardare, in maniera sempre più attenta e mirata, le strutture naturali nel tentativo di comprendere la loro organizzazione ed attività funzionale per poi operare la scelta dei materiali da utilizzare. Tali materiali, oltre che biocompatibili, nel senso accennato prima, devono avere un comportamento meccanico adeguato per soddisfare l'esigenza di compatibilità funzionale.

Nel presente lavoro si intendono seguire due approcci nella realizzazione di substrati polimerici (*scaffold*) per la rigenerazione del tessuto cartilagineo, attraverso due distinte fasi di ricerca.

In una prima fase (I), utilizzando la tecnica convenzionale di *solvent casting/salt leaching* con *freeze drying*, sono stati realizzati scaffold in policaprolattone (PCL) ed un estere benzilico dell'acido ialuronico (HYAFF-11) per la rigenerazione del menisco, che successivamente sono stati caratterizzati attraverso un'analisi morfologica e diverse prove meccaniche. In questa stessa fase sono stati testati meccanicamente anche costrutti cellularizzati e campioni prelevati da materiale espantato.

Nella seconda fase (II), invece, sono stati realizzati scaffold in policaprolattone (PCL), per la rigenerazione del menisco, utilizzando una tecnologia non convenzionale di prototipazione rapida (RP), *3D Fiber Deposition*. E' stata, infine, condotta una preliminare caratterizzazione morfologica e meccanica delle strutture tridimensionali ottenute, per valutare l'idoneità della tecnologia usata per la realizzazione di tali sistemi.

INGEGNERIA DEI TESSUTI

L'ingegneria tessutale è stata definita nel 1998 come “*una tecnica interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di comprendere le relazioni fondamentali fra struttura e funzioni nei tessuti sani e malati dei mammiferi e di sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorarne le funzioni*”. Rappresenta un settore di crescente interesse medico ed industriale ed è caratterizzata da una elevata interdisciplinarietà: in essa convergono contributi differenti, ma estremamente significativi, della scienza dei materiali, della bioingegneria, delle biotecnologie, della biologia molecolare e della medicina.

Il particolare approccio fornito dall'ingegneria tessutale differisce sostanzialmente dalle tradizionali tecniche di trapianto per il fatto che i tessuti ingegnerizzati, in caso di successo, si integrano con quelli del paziente, apportando in tal modo un contributo specifico e duraturo alla cura dello stato patologico, senza richiedere debilitanti e costosi trattamenti farmacologici.

Strutture polimeriche per l'ingegneria dei tessuti o “scaffold”

La prima fase della costruzione di un tessuto ingegnerizzato comincia con la progettazione e la costruzione di una struttura polimerica, nota con il nome di *scaffold*, che faccia da substrato alla crescita delle cellule che daranno origine al nuovo tessuto.

Le caratteristiche peculiari che un *biomateriale* deve possedere affinché possa essere processato come *scaffold* si possono riassumere nella lista seguente:

- . deve essere biodegradabile e biocompatibile, possedere proprietà fisiche e meccaniche confrontabili con quelle del tessuto da sostituire;
- . deve produrre cataboliti atossici e promuovere l'adesione e la mobilizzazione cellulare;
- . deve essere riconoscibile e rimodellabile dalle cellule tessutali e dagli enzimi della matrice extracellulare (ECM);
- . deve essere angiogenico e suturabile ed essere caratterizzato da bassa trombogenicità e immunogenicità.

Gli *scaffold* non sono dunque supporti meccanici passivi, ma partecipano attivamente alla ricostruzione dei tessuti; essi provvedono alla stabilità meccanica della struttura, necessaria per l'organizzazione tridimensionale delle cellule che si devono sviluppare fino alla formazione del tessuto. Mentre il tessuto si forma, il materiale polimerico viene assorbito dalle cellule ospiti con una velocità di degradazione uguale a quella di biosintesi cellulare.

I requisiti che gli *scaffold* devono possedere sono:

- . porosità elevata e tridimensionale con rete di pori interconnessi che permettere la crescita cellulare, il trasporto dei nutrienti e l'eliminazione dei cataboliti;
- . velocità di degradazione e di riassorbimento controllabile e proporzionale alla crescita del tessuto;
- . superficie chimicamente adatta all'adesione, alla proliferazione e alla differenziazione delle cellule;
- . proprietà meccaniche il più possibile simili a quelle dei tessuti che si trovano nel sito d'impianto;
- . riproducibilità in forme e dimensioni differenti;
- . diametro dei pori opportuno (compreso tra 200 e 500 μm).

Queste proprietà dipendono da due livelli di organizzazione del materiale di cui lo scaffold è composto:

- . livello *microscopico*: le proprietà chimiche *superficiali* determinano l'adesione, la proliferazione cellulare e l'interazione con le proteine che regolano la risposta immunitaria dell'organismo, per cui si richiede un buon rapporto area di superficie/volume;
- . livello *macroscopico*: le proprietà *strutturali* nel complesso determinano le risposte meccaniche, quali elasticità, resistenza alla compressione, capacità di trasmettere carichi.

È importante evidenziare che la distribuzione dei pori, in scaffold polimerici tridimensionali, deve essere opportunamente elevata per evitare la presenza di regioni non vascolarizzate e ottimizzare il trasporto dei nutrienti e dei prodotti del metabolismo cellulare.

Materiali utilizzati per la realizzazione degli scaffold

Premessa

La conoscenza dell'organizzazione dei componenti principali e cellulari dei tessuti, permette di definire le caratteristiche che sono desiderabili in una struttura polimerica di supporto per cellule trapiantate. Un aspetto importante è legato al tipo di materiale utilizzato per fabbricare lo *scaffold*. Si definiscono *biomateriali* i materiali di origine naturale o sintetica usati per dirigere, integrare o sostituire le funzioni degli organismi viventi del corpo umano. Nel corso degli anni sono state proposte varie definizioni del termine biomateriali [1]. Una delle più innovative, descrive i biomateriali come “materiali sintetici o naturali usati, in contatto con tessuti, sangue, e fluidi biologici, come protesi, per scopi diagnostici, terapeutici e per stoccaggi, senza effetti negativi per l'organismo e i suoi componenti”.

Tutti i materiali artificiali che sono semplicemente in contatto con la pelle, come gli apparecchi per l'udito o gli arti artificiali, non sono inclusi nella definizione di biomateriale, perché la pelle agisce come una barriera. I progressi nell'ingegneria tessutale continuano tuttora, grazie al lavoro sinergico di ricercatori appartenenti a vari settori delle scienze, come biologi, medici, ingegneri, chimici e fisici. Grazie a tali sforzi, aumenta progressivamente la conoscenza delle interazioni tra i tessuti umani e i materiali adoperati a contatto con essi. E' a tale proposito che sono stati conati i termini “biocompatibilità” e “biomateriale”. La proprietà di biocompatibilità è la capacità di un materiale di svolgere la sua funzione per una specifica applicazione biomedica, senza provocare la risposta avversa dell'organismo ospitante. I biomateriali sono materiali biocompatibili. Wintermantel e Mayer hanno distinto tra biocompatibilità superficiale e strutturale di un impianto.

La biocompatibilità superficiale indica che le caratteristiche superficiali chimiche, biologiche e fisiche (inclusa la morfologia della superficie) garantiscono una ottima integrazione della superficie dell'impianto con il tessuto ospite. La biocompatibilità strutturale, invece, indica il perfetto adattamento dell'impianto con le caratteristiche meccaniche del tessuto ospite. La scelta del biomateriale più adatto ad una certa applicazione deve tenere conto della sua biocompatibilità, meccanica e strutturale, con i tessuti. L'integrazione ottimale dell'impianto nell'organismo è garantita dalla biocompatibilità strutturale e superficiale della struttura. Il successo di un biomateriale all'interno del corpo dipende da molti fattori, come le proprietà del materiale, il suo *design* e la sua biocompatibilità, e da altre condizioni che non sono sotto il controllo degli ingegneri, come la tecnica usata dal chirurgo, lo stato di salute del paziente e le attività del paziente

stesso. L'attività di ricerca si è focalizzata anche sulla possibilità di realizzare *scaffold* bioattivi, cioè capaci non solo di svolgere la loro azione di supporto, ma anche di rilasciare sostanze in grado di stimolare la rigenerazione dei tessuti.

Conoscenze provenienti dal settore dei polimeri e dal settore farmaceutico, sono state indispensabili per lo sviluppo di differenti metodologie per la produzione di sistemi a rilascio controllato di tipo nano o microparticellare. In particolare, le nano e micro particelle di cui sopra, possono essere incorporate all'interno degli *scaffold* che acquistano così un ruolo biologicamente attivo ai fini della rigenerazione del nuovo tessuto.

Classi di materiali comunemente adoperate nell'Ingegneria Tissutale

I materiali usati si raggruppare in:

- ♦ *metalli;*
- ♦ *ceramiche;*
- ♦ *polimeri;*
- ♦ *compositi.*

I metalli e le leghe più comunemente usate come biomateriali includono l'oro, il tantalio, l'acciaio inossidabile, le leghe di Ti e quelle Co-Cr. L'idrossiapatite, i vetri bioattivi, il carbonio, l'allumina, l'ossido di zirconio e di titanio sono esempi di ceramiche biocompatibili. Un'ampia varietà di polimeri sintetici e biologici sono stati usati come materiali di supporto o *scaffold*, molti dei quali sono riportati in tabella 1. I polimeri sono molto usati nel settore biomedico in quanto sono disponibili in una gamma di composizioni, proprietà, e forme (solidi, fibre, tessuti, film e gel) e possono facilmente essere modellati in forme e strutture complesse.

La tabella seguente distingue tra polimeri non biodegradabili e biodegradabili.

<i>Polimeri non biodegradabili</i>	<i>Applicazioni</i>
Polidimetilsilossano (PDMS)	Protesi per seno e parti genitali, cateteri, rilascio di farmaci, valvole cardiache, applicazioni ortopediche, strutture tubolari
Ceramiche	Tessuti ossei

Poliuretani (PU)	Cuore artificiale, apparecchiature di aiuto ai ventricoli, cateteri, palloni intraortici, rivestimento di ferite
Politetrafluoroetilene (PTFE)	Valvole cardiache, impianti vascolari, cateteri, suture
Polietilene (PE)	Anche artificiali, cateteri, siringhe, strutture tubolari
Polisulfone	Valvole cardiache, cuore artificiale
Policarbonato (PC)	Lenti a contatto dure
Poli(metil metacrilato) (PMMA)	Cementi ossei, fissazione di fratture, lenti intraoculari, dentiere
Poli(2-idrossietilmetacrilato) (PHEMA)	Rilascio controllato di farmaci, lenti a contatto, cateteri, rivestimenti, organi artificiali
Poliacrilonitrile (PAN)	Membrane per emodialisi
Poliammidi (nylon)	Membrane per emodialisi, suture
Poli(etilentereftalato) (Dacron)	Impianti vascolari
Polipropilene (PP)	Strutture valvolari, suture
Poli(etilene-co-vinil acetato)	Strutture tubolari, sacchetti per il sangue
Polistirene (PS)	Strutture per il rilascio di farmaci
Poli(vinil pirrolidone) (PVP)	Sostanza inerte nel plasma sanguigno
Poli(vinil alcool) (PVA)	Applicazioni dentali, ricostruzione di tessuti, <i>scaffold</i> bioartificiali

<i>Polimeri biodegradabili</i>	<i>Applicazioni</i>
Poli(acidoL-lattico), Poli(acido glicolico), poli(lattide-co glicolide) (PLLA, PGA, PLGA)	Rilascio controllato di farmaci, suture, <i>scaffold</i> di vario tipo.
Collagene	Pelle artificiale, emostasi, <i>scaffold</i>
GAGs (ialuronano)	Ricostruzione dei tessuti, trattamento di ferite
Chitosano	<i>Scaffold</i> , inibitore della coagulazione, incapsulamento di cellule, membrane,
Poliidrossialcanoati (PHA)	Rilascio controllato di farmaci, suture, pelle Artificiale
Poli(ϵ -caprolattone) (PCL)	<i>Scaffold</i> , impianti contraccettivi, rilascio di farmaci, prodotti chirurgici

Tabella 1. Polimeri per uso biomedico.

I polimeri non biodegradabili devono resistere all'attacco cellulare, ed è indispensabile che essi non producano sottoprodotti in grado di compromettere la funzionalità dell'impianto stesso. Generalmente i materiali non biodegradabili trovano un'applicazione limitata nella produzione di scaffold essendo la loro permanenza nel corpo estremamente elevata, e di conseguenza potrebbero influire sul rimodellamento ottimale del tessuto a tempi lunghi.

I campi della ricerca scientifica finalizzati alla progettazione e alla realizzazione di *scaffold* tridimensionali sono principalmente indirizzati verso l'uso di polimeri biodegradabili. Esempi di polimeri biodegradabili utilizzati già da tempo per applicazioni nell'ingegneria tessutale sono l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA) ed i copolimeri acido lattico-glicolico (PLGA) e (PLLA-PDLA). Si tratta di poliesteri biodegradabili, approvati dalla *Food and Drug*

Administration per usi nel campo delle suture, rilascio controllato di farmaci e tessuti di supporto chirurgico.

La degradazione degli impianti biorisorbibili segue un modello prevedibile, in linea generale. Il tasso di degradazione dipende dal peso molecolare di partenza del polimero e dal suo aspetto cristallino, dalla composizione e dalla porosità dell'impianto e da altri fattori, come le condizioni di carico e la vascolarizzazione locale. Nel processo di degradazione, prima vi è una perdita di peso molecolare, seguita dalla perdita di forza e infine dalla perdita di massa. La fase iniziale della degradazione è di natura chimica. Il processo biologico e la rimozione dell'impianto avvengono più tardi [23][24][25].

A causa di questo tipo di degradazione, tali materiali perdono la forza funzionale molto prima di essere completamente riassorbiti.

La fase iniziale di degradazione è quella di idrolisi. Le molecole dell'acqua penetrano nel materiale impiantato provocando la scissione dei legami molecolari monomerici. Questa condizione porta alla scissione delle catene lunghe di polimeri in catene più corte, riducendo il peso molecolare complessivo. Tale processo è influenzato dalla porosità dell'impianto [26][27]. La bassa porosità incrementa l'autocatalisi dell'impianto, poiché la lenta clearance dei prodotti di degradazione dall'interno dei materiali conduce a un incremento dell'acidità e a una scissione molecolare più rapida. All'idrolisi è legato il rilascio di monomeri, differenti a seconda dei polimeri o copolimeri interessati. Nel nostro caso i prodotti di tale reazione chimica sono l'acido lattico e l'acido glicolico, rispettivamente per il PLA e il PGA.

Il PGA e il PLA hanno caratteristiche molto differenti. Infatti, il primo è uno dei polimeri più usati per la produzione di *scaffold*; a causa della sua natura idrofila, il PGA degrada rapidamente in soluzioni acquose o *in vivo* e perde la sua integrità meccanica in un intervallo di tempo pari a 2-4 settimane. Il PLA, invece, ha una struttura chimica (è un semicristallino) che lo rende più idrofobo e più resistente all'idrolisi: occorrono mesi o anni perché le strutture in PLA perdano la loro integrità meccanica sia in condizioni *in vivo*, sia *in vitro*. Per ottenere velocità di degradazione intermedie, sono stati sintetizzati vari tipi di copolimeri dell'acido lattico e dall'acido glicolico.

È interessante evidenziare che alcuni aspetti relativi ai suddetti copolimeri.

L'acido lattico è una piccola molecola idrofobica a tre atomi di carbonio, che gioca un ruolo importante nella produzione di energia cellulare. Per l'asimmetria della molecola, ha una configurazione sia destrogira (D) sia levogira (L). La forma D è prodotta rapidamente, ma l'isomero-L è la forma biologicamente attiva. L'acido lattico L polimerizzato viene detto poli-L-

acido lattico (PLLA). Il copolimero di forma D (poli-D-acido lattico) viene detto PDLA. Le proprietà meccaniche e di degradazione di questi due enantiomeri differiscono in modo significativo, essendo il PLLA più cristallino e il PDLA più amorfo [28]. L'acido poliglicolico, invece, viene sintetizzato da una polimerizzazione ad anello aperto dal glicolide. È una molecola dura, spessa, cristallina., la cui forma autorinforzata è più rigida di altri polimeri utilizzati per scopi clinici [29].

Tutti i poliesteri lineari alifatici basati su acido lattico e acido glicolico sono poli(α -idrossiacidi). Ci sono poliesteri alifatici lineari basati sui poli(ω -idrossiacidi): i più noti sono il policaprolattone (PCL), il poli(β -idrossibutirrato) (PHB), il poli(β -idrossivalerato) (PHV) e i copolimeri PHB/PHV.

Il policaprolattone (PCL) è un altro esempio di poliesteri alifatico lineare molto usato nell'Ingegneria Tessutale. La velocità di degradazione del PCL è molto lenta, pertanto il PCL è adatto per impianti a lungo termine e nel settore del rilascio di farmaci.

Il PHB e PHV appartengono alla famiglia dei poli(idrossialcanoati) e sono prodotti principalmente da alcuni gruppi di microrganismi procariotici come lo *Pseudomonas oleovorans* e l'*Alcaligenes eutrophus*, attraverso le biotecnologie. Il PHB e PHV sono la principale riserva di energia e di carbonio per tali microrganismi, e sono prodotti quando i nutrienti nell'ambiente sono presenti in eccesso rispetto al fabbisogno. In particolare, se prodotti naturalmente, sono stereochimicamente puri e isotattici, nel caso in cui, invece, essi vengano sintetizzati in laboratorio perdono la stereoregolarità. Si tratta di polimeri a basso impatto ambientale, in quanto prodotti da acido propionico e glucosio, e completamente degradabili ad acqua, biogas, biomassa. Nell'ambiente sono biodegradabili grazie all'azione di enzimi, mentre all'interno degli organismi la loro biodegradabilità è messa in discussione: il PHB ad alto peso molecolare e le fibre a base di PHB/PHV non degradano *in vivo* o *in vitro* durante i primi sei mesi.

La degradabilità del PHB può essere accelerata tramite irradiazione con raggi γ o copolimerizzazione con PHV.

Polifosfoesteri, polifosfazeni, polianidridi e poliortoesteri, in passato usati soprattutto nel settore del rilascio controllato di farmaci, sono stati recentemente adoperati per applicazioni nell'Ingegneria Tissutale.

Anche polimeri naturali, come le proteine e i polisaccaridi, sono comunemente usati nella produzione di *scaffold*, seppur presentano alcuni svantaggi.

Il collagene, ad esempio, che è una proteina fibrosa adoperato soprattutto per la rigenerazione di tessuti *soft* nonché uno dei maggiori componenti della matrice extracellulare, potrebbe presentare diversi svantaggi, quali: potenziale trasmissione patogena, possibile antigenicità, scarsa maneggiabilità, deboli proprietà meccaniche e biodegradabilità difficilmente controllabile.

Un'altra categoria di proteine naturali, è la seta, materiale non degradabile, ma che può degradare *in vivo* attraverso meccanismo enzimatico; possiede inoltre una scarsa biocompatibilità, che può essere però ovviata tramite modificazioni chimiche.

Oltre a macromolecole naturali pure, estratte da animali o piante, sono stati usati per produrre *scaffold* materiali della matrice extracellulare processati (decellularizzati). Un esempio è la sottomucosa intestinale piccola (SIS), che è composta da collagene di tipo 1, GAGs, e alcuni fattori di crescita. Allo stesso modo, altri tessuti decellularizzati, come le valvole cardiache porcine o la pelle umana, sono stati usati nell'Ingegneria Tessutale. L'applicazione di tali tessuti decellularizzati, tuttavia, pone i problemi delle possibili trasmissioni patogene e della reazione immunitaria.

La tabella 2 riassume tutte le caratteristiche del materiale che guidano ad una sua scelta accurata per una specifica applicazione biomedica.

<i>Fattori</i>	<i>Descrizione</i>		
	Caratteristiche chimiche/ biologiche	Caratteristiche fisiche	Caratteristiche meccaniche/ strutturali
Proprietà di primo livello del materiale	Composizione chimica	Densità	Modulo elastico Rapporto di Poisson Resistenza a trazione Resistenza a compressione
Proprietà di secondo livello del materiale	Adesione	Topografia superficiale	Durezza Modulo di taglio Resistenza a sforzi di taglio Modulo a flessione Resistenza a flessione

Specifiche funzionali richieste	Bio-funzionale (adesione cellulare, non trombogenico, etc.) Bioinerte (non-tossico, non-irritante, non-cancerogeno, etc) Bioattivo Biostabile (resistente a corrosione, idrolisi, ossidazione, etc) Biodegradabile	Forma (solido poroso, rivestimento, film fibra, polvere, rete) Geometria Coefficiente di espansione termica Conduttività elettrica Colore, estetica Indice di rifrazione Opacità o Traslucenza	Rigidità Comportamento a frattura Resistenza a fatica Resistenza a <i>creep</i> Resistenza a frizione ed erosione Forza di adesione Resistenza a impatto Resistenza ad abrasione
Processi di fabbricazione	Riproducibilità, qualità, sterilizzabilità		
Caratteristiche dell'organismo ospitante	Tessuto, organo, sesso, età, specie, razza, condizioni di salute, attività, risposta sistemica		
Procedura medica/chirurgica, periodo di applicazione/uso			
Costo			

Tabella 2. Requisiti dei materiali per uso biomedico.

Progettazione di scaffold: le basi

Gli obiettivi da raggiungere, nella realizzazione di uno scaffold, sono:

- 1) ottenere una struttura con proprietà di resistenza meccanica appropriate (caratteristica macroscopica);
- 2) assicurare una morfologia (porosità e interconnessione) tale da permettere l'adesione di cellule ed un adeguato volume che ne consenta la crescita, la proliferazione e facili spostamenti relativi (caratteristiche microscopiche).

Tali proprietà, inoltre, devono essere garantite per tutto il periodo di formazione del tessuto ma variando nel tempo, degradandosi man mano che si rafforzano quelle intrinseche del nuovo tessuto.

Il primo obiettivo dipende dalla struttura macroscopica dello scaffold, quindi dalle proprietà meccaniche del materiale scelto per la costruzione. Poiché esse devono emulare quelle del tessuto specifico che rimpiazzerà, ricerche e studi sono stati condotti quasi esclusivamente su quei tessuti di cui si conoscono con precisione le proprietà meccaniche come le ossa, la cartilagine, i tendini; questi, infatti, avendo il compito di sopportare i carichi delle varie parti del corpo e regolarne i movimenti e le interazioni relative, sono facilmente caratterizzabili da grandezze meccaniche quali forze, tensioni, deformazioni ed elasticità.

La struttura microscopica del materiale, invece, è fondamentale per il raggiungimento del secondo obiettivo, attraverso la realizzazione di una porosità che dia il miglior rapporto *area di superficie/volume* possibile. I pori sono realizzati da diverse sostanze o processi chimico-fisici detti *porogeni*: da essi dipende la loro forma, grandezza e interconnettività, che sono i parametri che ottimizzano la proliferazione cellulare e il successo dell'impianto in vivo del nuovo tessuto. Quanto detto viene perseguito anche attraverso l'ottimizzazione di un altro parametro di fondamentale interesse: il *tempo di degradazione* dello scaffold.

Come si vedrà, sono proprio queste le caratteristiche che si intende migliorare con le nuove tecnologie di produzione.

La strategia più comunemente utilizzata prevede la successione di differenti step:

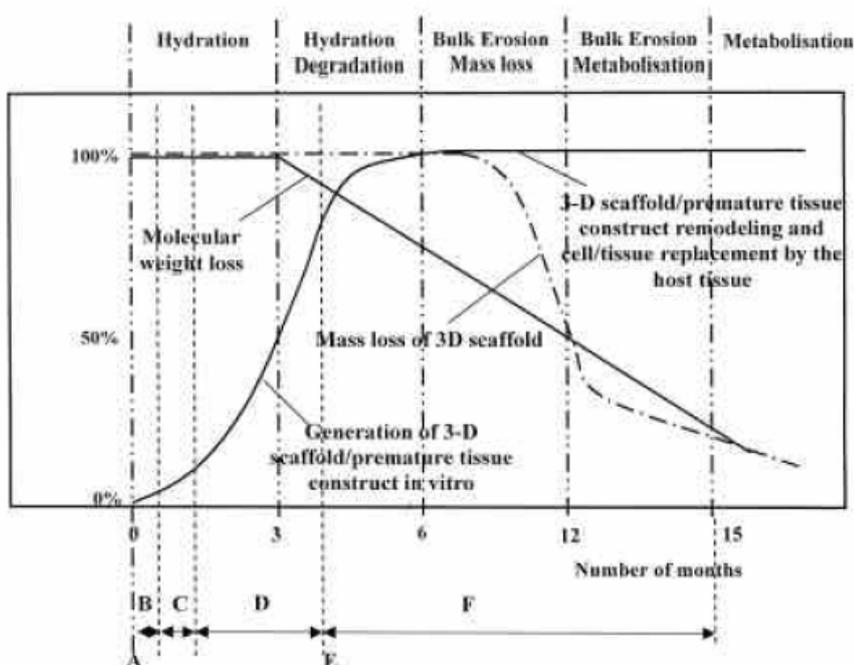


Figura 1. Andamento della perdita di peso molecolare e di massa dello scaffold

- A) Fabbricazione dello scaffold bioassorbibile.
- B) Semina statica delle cellule (es. osteoblasti) in disco di Petri.
- C) Crescita di nuovo tessuto primario in sistema dinamico di coltura.
- D) Crescita di tessuto maturo in ambiente fisiologico riprodotto mediante l'utilizzo di bioreattori.
- E) Impianto chirurgico.
- F) Assimilazione e rimodellamento del tessuto.

Tecniche utilizzate per la realizzazione di scaffold

Le tecnologie che possono essere utilizzate per la fabbricazione di *scaffold* polimerici per applicazioni nel campo dell'Ingegneria Tessutale sono molteplici e possono essere suddivise in due grandi categorie.

La prima è rappresentata dalle tecniche convenzionali, le quali permettono la realizzazione di substrati 3D biodegradabili, ma non consentono la formazione di un *network* di pori sufficientemente interconnesso.

La seconda categoria comprende le tecniche non convenzionali di prototipazione rapida (o *solid freeform fabrication*), che essendo interfacciate da un PC, consentono di ottenere strutture con pori interconnessi e facilmente riproducibili.

Principali tecniche convenzionali

Tecnologia tessile

Le tecnologie tessili sono volte a sfruttare la possibilità di creare maglie porose attraverso vari intrecci di fibre. Le strutture ottenute grazie all'impiego di questa tecnica possono avere comportamenti elastici anisotropi, tipici dei materiali biologici.

L'architettura delle maglie è definita da diversi organi di disposizione degli anelli formati dagli intrecci (fig.1-2). La maglia a trama singola (o *coerente*), la più semplice, si sostiene perché formata da un unico filo intrecciato più volte: l'orientazione delle fibre e la distribuzione dei pori, così, sono definite durante la manipolazione del filo e la fase in cui l'architettura assume la sua forma definitiva (cioè nel momento in cui aderisce al sito d'impianto), anche in casi di grandi deformazioni.

La porosità, quindi, è di due tipi, una definita dallo spazio interno ad ogni anello e un'altra dalla distanza tra i filamenti. Inoltre si può introdurre un terzo tipo di porosità assemblando più strati di maglie intrecciate.

In questo caso occorre considerare due casi tipici:

- . una maglia *woven* con una densità abbastanza elevata da prevenire le interpenetrazioni degli strati; in tal modo non è possibile formare ulteriori pori sovrapponendo strati indipendenti;
- . una maglia *nonwoven* con una densità abbastanza bassa da permettere le interpenetrazioni di alcuni strati; così il poro centrale di un anello è attraversato dai filamenti di un altro strato. Incrementando l'impacchettamento degli strati si ha una distribuzione delle distanze fra le fibre più omogenea, e quindi una più omogenea distribuzione della dimensione dei pori.

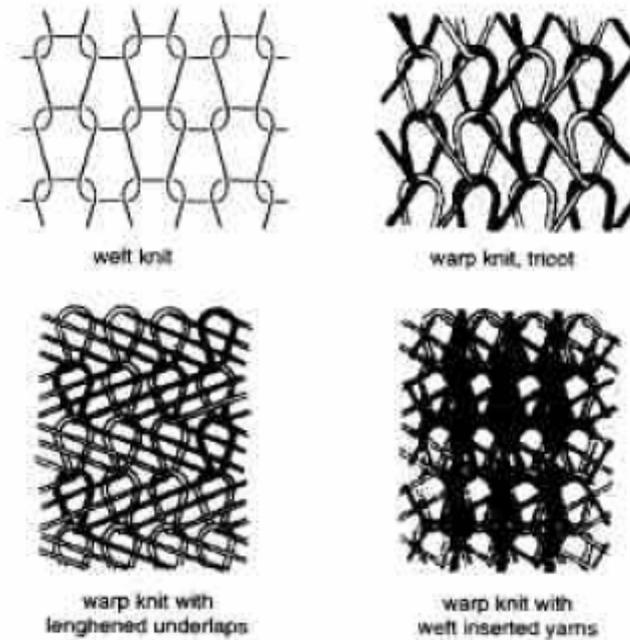


Figura 2. Diversi tipi di maglie ottenute intrecciando uno, due o tre filamenti.

Le immagini si riferiscono ad un singolo strato.

Queste strutture possono essere disegnate in varie e complesse forme perché non contengono fibre vincolate a mantenere una posizione rettilinea né intrecci vincolati da nodi.

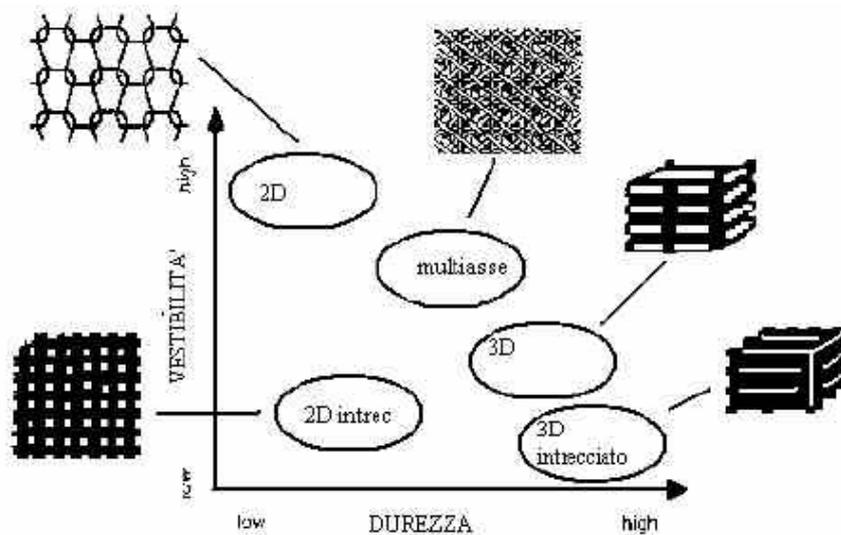


Figura 3. Durezza e vestibilità in funzione della tipologia della maglia.

La presente tecnica di fabbricazione è stata applicata nella realizzazione dei primi modelli di pelle artificiale, sfruttando la maggiore rivestibilità (capacità di ricoprire una superficie) di queste maglie in architetture bidimensionali anziché tridimensionali (fig. 3). Successivamente è stata sperimentata anche la rigenerazione di cellule muscolari: anche se non si è riusciti a rigenerare parti di muscoli con appropriate proprietà meccaniche, si è comunque dimostrato che le fibre di PGA permettevano una buona proliferazione cellulare (fig. 4).

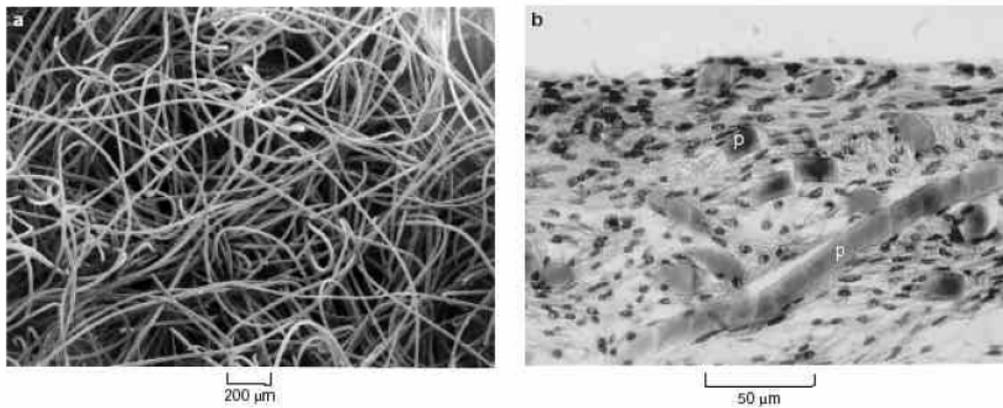


Figura 4. (a) Micrografia elettronica di fibre di PGA. ; (b) Fotomicrografia di una sezione trasversale di una parte di tessuto muscolare ottenuto impiantandocellule su uno scaffold ottenuto con fibre di PGA. Sono visibili fibre di PGA in degradazione (p).

Le prime realizzazioni di questo tipo erano basate su materiali metallici, con i quali si può ottenere un aumento della durezza al crescere del numero di intrecci.

Proprio per risolvere questo problema si è fatto uso per la prima volta di materiali compositi: impregnando, infatti, le maglie con una matrice polimerica (PGA con PLLA o PLGA) si è ottenuto un drastico cambiamento delle proprietà meccaniche, poiché restringendo i movimenti relativi delle fibre si ha un comportamento in termini di tensioni e deformazioni, determinato principalmente dalla loro orientazione. Si sono ottenuti così scaffold con porosità fino al 97%, rapporti area di superficie/volume fino a $0.05 \mu\text{m}^{-1}$ e resistenza a carichi di 100 Pa.

Solidi cellulari

Per ottenere buoni risultati, non solo in termini di porosità ma anche in termini di proprietà meccaniche, sono state sviluppate tecniche che consentono di realizzare matrici porose, note come *solidi cellulari*, utilizzando polimeri biodegradabili.

Ciascuna di queste tecniche è articolata generalmente in tre fasi:

1. inclusione di una sostanza porogena in una matrice polimerica discontinua;
2. processo che porti alla creazione di una matrice continua attorno ai porogeni dispersi;
3. lisciviazione dei porogeni dalla matrice per creare uno scaffold macroporoso.

Queste le tecnologie più comuni per la fabbricazione di scaffold:

~ Extrusion with blowing agents

Una prima tecnica usata per ottenere strutture porose è l'estrusione di un polimero attraverso l'uso dei cosiddetti *blowing agents* (BA), cioè sostanze che rilasciano dei gas che, decomponendosi, danno origine ai pori tra le fibre polimeriche. A seconda del tipo di BA utilizzato si possono avere pori, scarsamente interconnessi, le cui dimensioni variano da a 50 a 500 μm e una porosità massima del 50%.

~ Solvent casting/Particulate leaching

Tale procedura è composta da quattro step fondamentali:

- . Aggiunta di particelle setacciate di Sali, in genere NaCl, ad una soluzione polimerica (tipicamente in cloroformio o cloruro di metile);
- . Allontanamento del solvente per evaporazione (*solvent casting*);
- . Riscaldamento del composito polimero/porogeno al di sopra della temperatura di fusione del polimero per assicurare la fusione totale dei cristalli di polimero formati nella step precedente;
- . Eliminazione delle particelle saline per estrazione con acqua.

La porosità ottenuta dipende dall'ammontare del sale disciolto in soluzione, mentre la dimensione dei pori può essere regolata mediante la dimensione delle particelle di sale. Tra gli svantaggi della tecnica vanno citati l'uso di solventi organici, il tempo piuttosto lungo per l'evaporazione del solvente (da giorni a settimane), la limitazione a strutture relativamente sottili, l'irregolarità dei pori e l'insufficiente interconnettività.

Per questi motivi risulta poco adatta alla produzione di scaffold da impiegare per la ricostruzione di tessuti diversi da quello osseo.

~ Gas foaming

La tecnica di *gas foaming* consiste nel creare una miscela di particelle di polimeri porogeni e, comprimendola, ottenere una miscela solida discontinua. Questa viene esposta ad elevate pressioni di anidride carbonica, fino al raggiungimento dell'equilibrio; successivamente si induce un repentino abbassamento della pressione al di sotto di quella atmosferica che, favorendo una forte instabilità termodinamica nel polimero, porta alla crescita di nuclei o bolle di gas (CO_2). Le dimensioni di tali celle sono comprese in un range di 100-500 μm . Tale fenomeno permette al

polimero di formare una schiuma in cui le sue particelle originarie si fondono insieme a formare una matrice continua intorno ai porogeni rimasti dispersi, che vengono poi lisciviati in un solvente. Questo tipo di processo determina normalmente la formazione di una struttura a pori chiusi o con scarsa interconnessione la quale risulta determinata da come il polimero crea la schiuma.

Le tecniche di *solvent casting* e *gas foaming* permettono di realizzare scaffold con porosità rispettivamente del 60-70% e 50-60%, con proprietà meccaniche variabili a seconda della concentrazione delle particelle usate come porogeni; poiché, però, i porogeni sono dispersi, l'interconnessione dei pori che si ottiene nello scaffold finale non è controllabile. Le immagini di microscopia elettronica riportate evidenziano le differenze di porosità ed interconnessione dei pori stessi.

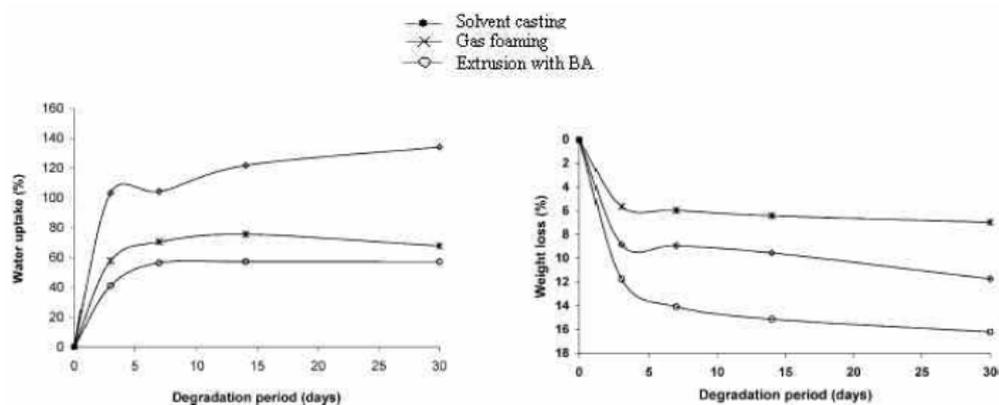


Figura 5. Il primo grafico riporta l'assorbimento d'acqua durante il periodo di degradazione, il secondo la perdita di peso, ognuno per le diverse tecnologie di produzione dello scaffold di SCA.

Gli scaffold ottenuti con il *solvent casting* hanno il riassorbimento d'acqua più elevato (più del 100% dopo pochi giorni dall'immersione nel mezzo di degradazione), che suggerisce la migliore porosità ed interconnettività raggiunti con questo metodo (fig.5).

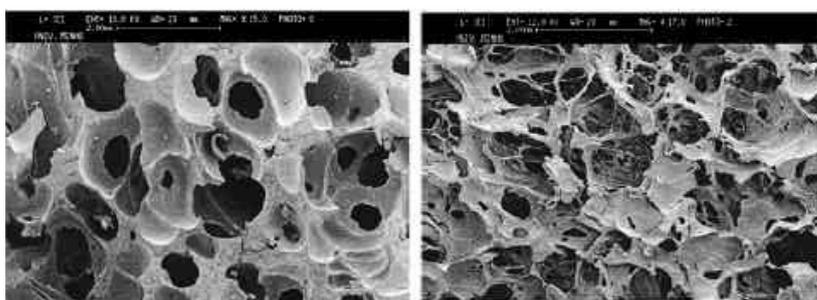


Figura 6. Scaffold di SCA ottenuti per estrusione con different percentuali di BA.

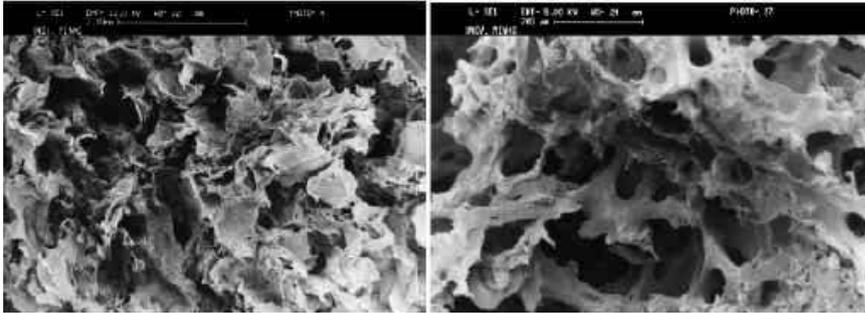


Figura7. Scaffold ottenuti, rispettivamente, con le tecniche gas foaming e solvent casting.

~ Fiber bonding

Attraverso tale tecnica si costruiscono delle strutture tridimensionali porose legando fisicamente delle fibre disposte in maniera adiacente. Le modalità possibili, con cui si genera il bonding, sono diverse.

Una tecnica prevede l'immersione di fibre di PGA in una soluzione di PLLA, seguita da evaporazione del solvente; in questo modo rimane un network di PLLA e PGA che viene riscaldato al di sopra della temperatura di fusione del PGA in modo da unire insieme le fibre nei loro punti di giunzione. Quindi il PLLA viene dissolto in un solvente (non solvente per il PGA) in modo da generare uno scaffold poroso di PGA. Un'altra possibile modalità consiste nello sciogliere il PLLA o il PGA in un solvente opportuno (generalmente cloroformio, in cui il PGA non si scioglie), atomizzare e spruzzare la soluzione su una mesh costituita da fibre adiacenti di PGA. Facendo evaporare il solvente (per liofilizzazione) si ottiene una struttura in cui le fibre di PGA sono intimamente legate tra loro.

~ Emulsion freeze-drying method

La tecnica di *emulsion freeze-drying* permette di ottenere scaffold con porosità superiore al 90%, pori di dimensione media compresa tra 15 e 35 μm e dimensione massima intorno ai 200 μm , e strutture fortemente interconnesse.

Tale tecnica prevede una emulsione, una stabilizzazione della stessa a bassa temperatura ed una liofilizzazione. I migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando, come materiali base per i supporti, poliesteri alifatici.

~ Polymer-solvent phase separation

La *phase separation* è rappresentativa di una categoria di tecniche realizzative che prevedono l'uso come agenti porogeni, non di sostanze specifiche, ma di fenomeni termofisici i quali, regolati ad opportune velocità, sono in grado di generare i vuoti desiderati.

Queste permettono di ottenere risultati in termini quantitativi e qualitativi del tutto simili a quelle precedenti, lasciando irrisolto il problema di non riuscire a programmare dimensione e distribuzione dei pori.

È possibile distinguere tra diversi processi che danno luogo a separazione di fase, anche se, fra questi, i più comunemente utilizzati sono i seguenti:

- . *Precipitazione per immersione in un non-solvente (NIPS)*: è la tecnica che è stata usata per la prima volta da Loeb e Sourirajan e consiste nell'immersione (*dipping*) della soluzione polimerica, sotto forma di membrana piana o fibra cava, in un bagno di coagulazione contenente il non-solvente del polimero o una soluzione di esso. Il polimero precipita per effetto dell'ingresso del non-solvente e della contemporanea uscita del solvente.
- . *Precipitazione in fase vapore*: in questo caso, il non-solvente si trova in fase vapore e da essa penetra nella soluzione polimerica. Se il solvente (che si trova in fase liquida) è molto volatile, l'ambiente viene saturato con il solvente stesso per evitare la sua evaporazione dalla soluzione, cosa che porterebbe alla formazione di una struttura molto più densa di quella desiderata.
- . *Precipitazione per evaporazione controllata*: il polimero viene disciolto in una miscela contenente un solvente ed un non solvente (quest'ultimo meno volatile del primo); una volta evaporato il solvente, per effetto del cambiamento di composizione della soluzione, il polimero precipita.
- . *Precipitazione indotta termicamente (TIPS) e per diffusione (DIPS)*: con la prima tecnica si induce un peggioramento del potere solvente variando la temperatura della soluzione ; con la seconda, invece, il potere solvente viene modificato della diffusione in soluzione di un non-solvente. Dopo la separazione il solvente e l'eventuale non-solvente presenti vengono rimossi per estrazione, evaporazione o sublimazione. Tipicamente il meccanismo di separazione di fase può essere di smiscelazione liquido-liquido ("*liquid-liquid phase separation*") che genera una fase ricca in polimero ed una ricca in solvente. La crescita e coalescenza della fase povera in polimero provoca la formazione di una struttura porosa. D'altro canto quando la temperatura è sufficientemente bassa da consentire il congelamento del solvente, il meccanismo di separazione di fase sarà di miscelazione solido-liquido ("*solid-liquid phase separation*"), che forma solvente solido e fasi

polimeriche concentrate. Dopo la rimozione del solvente liquido o congelato dalla soluzione miscelata, lo spazio rimanente sarà costituito da vuoti (pori). Ovviamente, l'architettura porosa generatasi nello stato di separazione di fase deve essere accuratamente preservata. Per questo si utilizzano generalmente tecniche di sublimazione (*freeze-drying*); infatti, un aumento della temperatura per favorire l'evaporazione del solvente tramite evaporazione potrebbe generare una rimiscelazione della soluzione o una fusione della soluzione congelata, determinando una distruzione della soluzione porosa. Uno dei vantaggi di questa tecnica è che si possono ottenere strutture con diversa porosità variando opportunamente parametri cinetici e termodinamici. Con questa tecnologia sono state realizzate membrane microporose ottime per la filtrazione, ma con diametro dei pori troppo piccolo (circa 10 μm) per la semina delle cellule; sono stati comunque preparati *scaffold* variando opportunamente i parametri in modo da ottenere strutture macroporose idonee per la rigenerazione dei tessuti.

Principali tecniche non convenzionali o di “prototipazione rapida”

I metodi di fabbricazione tradizionali hanno il grande limite di non poter permettere la realizzazione di scaffold con strutture microscopiche e macroscopiche predefinite né controllate. Questi obiettivi sembrano attualmente meglio perseguibili grazie allo sviluppo delle recenti tecnologie basate su sistemi di elaborazione automatica delle immagini (CAD, *computer-aided design*) e fabbricazione assistita dal calcolatore (CAM, *computer-aided manufacturing*). In campo clinico, infatti, sono disponibili immagini accurate delle parti interne del corpo (tessuti e organi) grazie alla risonanza magnetica (MRI) e alla tomografia computerizzata (TAC): queste possono essere elaborate con tecnologie denominate *Rapid Prototyping* (RP) o *Solid Freeform Fabrication* (SFF), che consentono di predefinire al calcolatore la forma, sia microscopica che macroscopica, dello scaffold in modo tale da ottenere un prodotto finito dalla forma desiderata.

Lo sviluppo delle suddette tecnologie di elaborazione computerizzata di immagini (CAD/CAM) ha apportato le sue innovazioni anche nel campo dell'ingegneria tissutale definendo la cosiddetta *Computer-aided Tissue Engineering* (CATE).

Quest'ultima può essere classificata in tre categorie principali, in base alla tipologia di problemi per cui viene applicata:

1. modellazione anatomica dei tessuti assistita dal calcolatore;
2. classificazione dei tessuti assistita dal calcolatore;
3. impianto dei tessuti assistito dal calcolatore.

Lo sviluppo della CATE si basa sulla possibilità di realizzare immagini per riprodurre organi e parti anatomiche sia interne che esterne attraverso la tomografia assiale computerizzata (TAC) e la risonanza magnetica nucleare (MRI).

La TAC produce una stratificazione assiale dell'oggetto in esame e, sovrapponendo i vari strati, ne descrive il volume; un raggio X penetra nell' oggetto ruotandovi intorno, e la sua luminosità, che varia in base all' angolazione con cui penetra l' oggetto stesso, viene captata da una serie di sensori. Ogni proiezione ottenuta in questo modo crea una immagine stratificata che il computer elabora in una serie di piccoli elementi di immagine (pixel). Ciascun pixel in tal modo rappresenta una piccola parte di volume (voxel) del tessuto: così ricombinando i vari pixel si ottiene la ricostruzione tridimensionale della parte anatomica analizzata.

Questo è l' unico modo di ottenere un dimensionamento non distruttivo sia delle superficie interne che di quelle esterne.

L'uso della TAC, tuttavia, è limitato dal fatto che sfrutta un'alta dose di radiazioni che possono essere nocive per la salute dell' organismo.

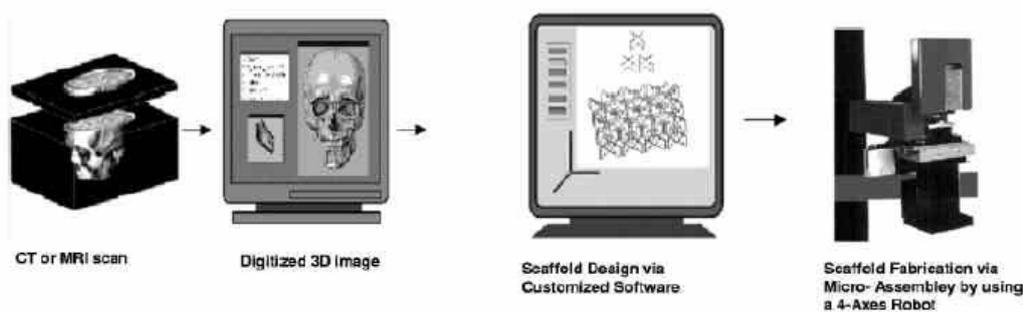


Figura 8. Schematizzazione della la logica di fabbricazione di uno scaffold su cui si basano i sistemi di rapid prototyping (RP).

La MRI si basa sullo stesso principio di ricostruzione delle immagini della TAC, ma usa radiazioni in forma di radio-onde, che comportano rischi molto minori di quelle ionizzanti, ottenendo ricostruzioni con una maggiore risoluzione ma con l'inconveniente di dover tenere il paziente in posizione immobile per lungo tempo.

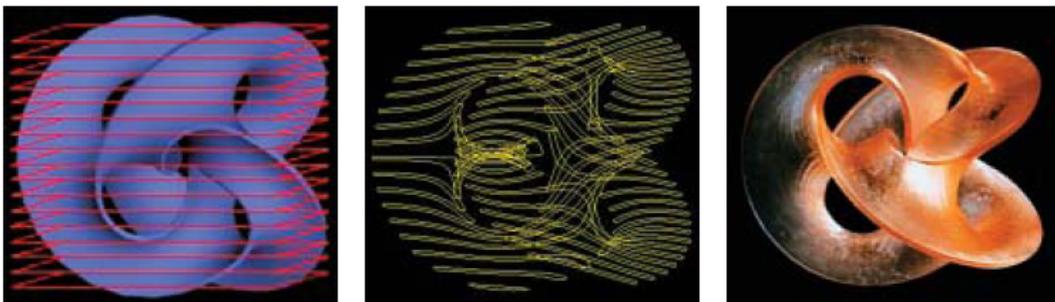


Figura 9. Slicing di un modello CAD tridimensionale (a) al fine di ottenere una serie di sezioni trasversali (b) che possono essere fabbricate una dopo l'altra in successione mediante metodologia additiva (c).

Per le prime due applicazioni citate (modellazione e classificazione), le immagini ottenute con questi due strumenti vengono analizzate in base a modelli numerici e geometrici per ricostruire virtualmente le caratteristiche anatomiche dei tessuti, sia per una corretta classificazione che, nel caso di traumi, per una più accurata diagnosi.

Per la terza applicazione, cioè l'impianto di tessuti, essendo basato sulla realizzazione di uno scaffold adeguato, si sfrutta il fatto che le tecniche RP si basano proprio sulla costruzione degli oggetti strato per strato; le immagini ottenute da TAC e MRI (che sfruttano lo stesso principio), quindi, una volta digitalizzate sono facilmente convertibili in un formato di dati analizzabili da elaboratori CAD/CAM che guidano i sistemi RP attraverso appositi software di controllo numerico del computer.

Il vantaggio di combinare i due sistemi è quello di ottenere la ricostruzione di oggetti fisici che danno un'idea più realistica delle proprietà d'interesse rispetto a quelli ottenuti attraverso la semplice riproduzione sullo schermo.

Le tecniche di prototipazione rapida consistono in una serie di sistemi che, prescindendo dalla complessità costruttiva dell'oggetto, lo riproducono con tecniche additive (*layer by layer*), partendo da una sua definizione matematica ed utilizzando processi rapidi, flessibili ed altamente automatizzati.

Alcune delle più note diffuse tecniche di RP verranno brevemente descritte, evidenziandone le particolarità e le problematiche.

~ Laminated object manufacturing

Una prima tecnica RP è la fabbricazione di oggetti laminati (LOM, *laminated object manufacturing*), in cui si ricostruisce una struttura tridimensionale analizzando le sue sezioni trasversali.

Questi profili laminati vengono tagliati da un laser di CO₂ (fig. 10) e poi rilegati sotto pressione e ad alte temperature.

Il prototipo viene realizzato lamina su lamina, isolando tutte le parti esterne ad esse che poi verranno rimosse al termine del processo.

Con questa tecnica quindi si riesce ad ottenere la forma macroscopica desiderata, ma non una porosità controllabile a livello più interno.

In questo modo si sono realizzati scaffold ceramici per la ricostruzione ossea biocompatibili ma non biodegradabili.

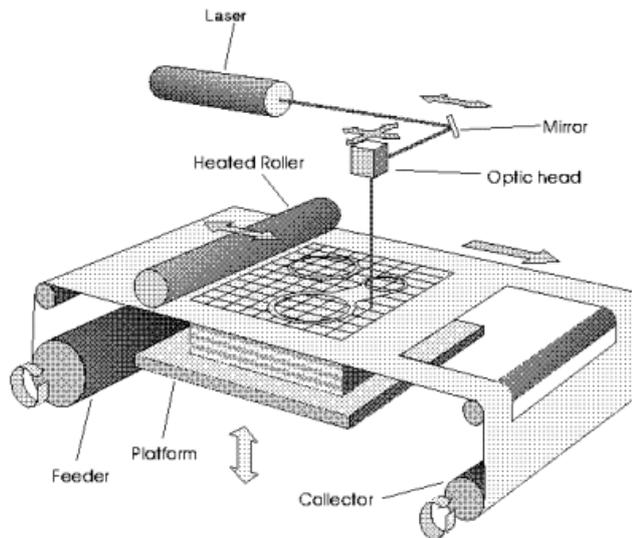


Figura 10. Schematizzazione di un dispositivo per LOM.

~ Stereolithography

Il principio di questo metodo è basato sulla polimerizzazione di una resina di fotopolimeri, innescata dall'energia di una radiazione elettromagnetica a cui sono sensibili. Le resine di fotopolimeri sono miscele di monomeri a basso peso molecolare capaci di reagire fra loro e formare lunghe catene solide di polimeri se attivati da un' energia radiante compresa in uno specifico range di lunghezze d'onda [4]. Esistono due macchinari RP basati sulla fotopolimerizzazione: uno usa un laser (fig. 11) mentre l' altro usa lampade schermate.

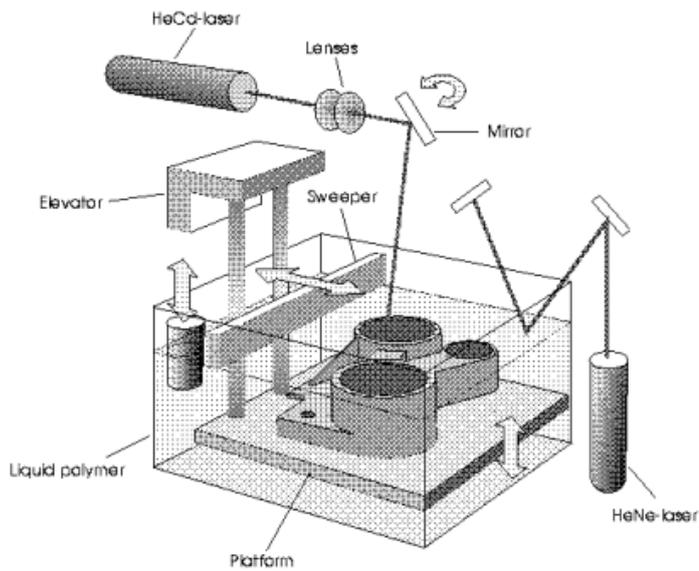


Figura 11. Schematizzazione di un dispositivo per SLA.

Nel primo sistema si usa un raggio laser deflesso per irradiare un sottile strato di polimero posto sulla superficie di un recipiente pieno di resine di fotopolimeri; l'area irradiata del fotopolimero reagisce chimicamente con il contenuto sottostante generando un solido. Il secondo sistema differisce dal primo perché non irradia la superficie punto a punto, come il laser, ma l'intera area del polimero nello stesso istante. Entrambi i sistemi vengono collegati ad un sistema di scansione che permette l'elaborazione grafica computerizzata dei dati ricavati dai solidi e la conseguente realizzazione attraverso una tecnica detta *stereolitografia*.

Utilizzando la prima tecnica sono stati realizzati scaffold per la ricostruzione ossea con una porosità dal 70% al 95% e controllo delle caratteristiche microscopiche fino a $70\ \mu\text{m}$, ma il suo uso è fortemente limitato dal fatto che si riescono a realizzare prodotti di massimo $35\ \text{mm}^3$ e non è applicabile ad altri tipi di materiali quali metalli, ceramiche o altri compositi.

~ *Solid Ground Curing*

La tecnica di *Solid Ground Curing* (SGC), utilizzata per la prima volta da Cubital, risulta, in qualche modo, simile alla stereolitografia (*Stereolithography*) in quanto entrambe sfruttano le proprietà dei polimeri fotosensibili.

A differenza di quest'ultima però, la SGC produce un intero strato di materiale per volta. La filosofia di funzionamento dell'SGC si articola in diverse fasi.

Un apposito software genera una sezione che viene utilizzata per produrre, su un supporto di vetro, una maschera che riproduce in negativo la sezione stessa (il principio sfruttato è analogo a quello della deposizione del toner nei processi di fotocopiatura).

Il supporto di vetro viene posto al di sopra di uno strato di resina depositato poco prima ed illuminato da una lampada ad ultravioletti; in questo modo si solidificano contemporaneamente tutti i punti della sezione da costruire.

Successivamente la parte di resina non polimerizzata viene aspirata e sull'intera superficie viene deposto uno strato di cera liquida che immediatamente dopo verrà solidificata impiegando una piastra raffreddata.

A questo punto, lo strato costituito da cera e resina solidificate viene fresato per ottenere una sezione di spessore costante.

L'elevatore, infine, si abbassa di una quantità pari allo spessore della sezione costruita, il supporto di vetro viene pulito, un sottile strato di fotopolimero viene deposto sull'elevatore ed il processo riprende fino al completamento del prototipo. Al termine si ha a disposizione un blocco compatto di cera e resina solidificata, il lavaggio finale con soluzione acquosa di acido citrico permette l'asportazione della cera e l'estrazione del pezzo.

I materiali impiegati sono resine analoghe a quelle utilizzate per la stereolitografia; inoltre è possibile usare resine ad alta viscosità che garantiscono un basso coefficiente di ritiro.

In figura 12 si riporta una rappresentazione schematica del processo SGC.

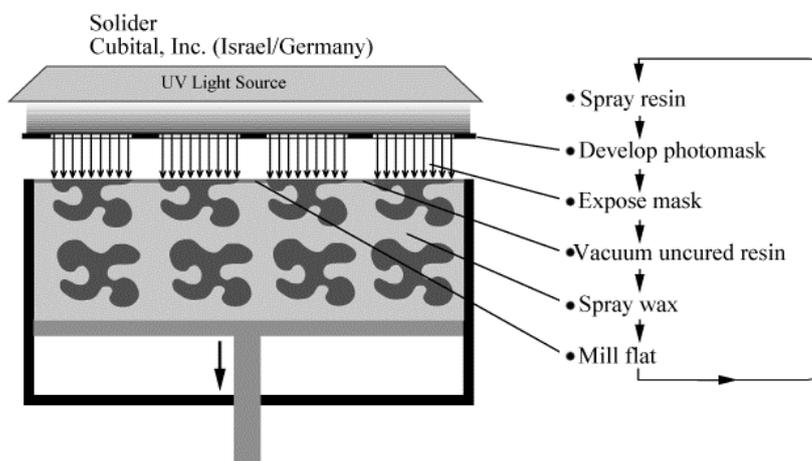


Figura 12. Rappresentazione schematica del processo SGC

~ Fused Deposition Modeling

La FDM utilizza sostanze espellenti controllate dalla temperatura per estrarre filamenti di materiale termoplastico e depositarli su una piattaforma secondo un processo di lavorazione a strati.

Ogni filamento è manipolato da due rulli e un pistone; una volta finito uno strato la piattaforma si abbassa per depositarne un' altro.

Il percorso di deposizione e i parametri di ogni strato dipendono dal materiale utilizzato, dalle condizioni di fabbricazione, dall'applicazione cui è destinato l'oggetto e anche dalle scelte del progettista (l'apparecchiatura del processo è illustrata in figura 13).

I parametri di riempimento di ogni strato dipendono dai precedenti input del software con cui si è stratificato il modello, dalla velocità della testina e dei rulli, dallo spazio fra gli strati e dalla direzione di deposizione usata nel singolo strato (che può essere reticolata in direzione X e in direzione Y, lungo il contorno o una combinazione di entrambi).

La direzione di deposizione è caratterizzata da un angolo tipico che va da 0° a 180° rispetto all'asse X; la larghezza dei filamenti è controllata sia dai parametri del flusso ad una temperatura fissata sulla superficie del materiale, sia dalla grandezza della punta del dispositivo.

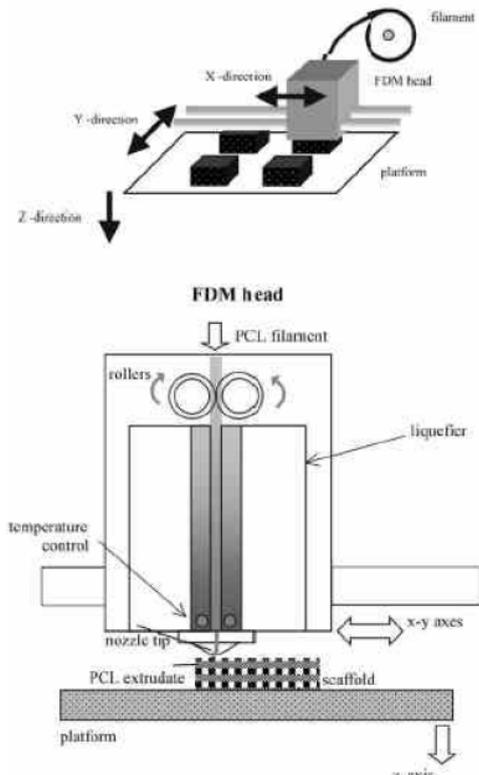


Figura 13. Apparecchiatura del processo di FDM.

Il tipico materiale usato in questo processo è il poly-ε-caprolattone, con una bassa temperatura di fusione (60 °C), una temperatura di decomposizione di 350 °C (mentre per i polimeri tradizionali è compresa fra 235-255 °C), forze di tensione di 16 MPa , modulo elastico di 500 MPa e massimo allungamento dell' 80%. Queste proprietà ne fanno uno dei materiali più flessibili e facilmente manipolabili disponibile in commercio. L'ottimizzazione di un processo di FDM comprende complesse interazioni fra hardware, software, algoritmi di controllo numerico e proprietà del materiale. Per quanto riguarda i parametri che regolano le proprietà del materiale e dell'hardware, studi preliminari [5] hanno dimostrato che la temperatura di fusione e la modalità di formazione del filamento influenzano direttamente il flusso del materiale nella fabbricazione di modelli porosi. Per questo l'ottimizzazione dei parametri per il PCL è stata focalizzata, in primo luogo, sia sulla temperatura di fusione sia sulla velocità dei rulli (raggio del solco circa 5 mm). Usando una bassa velocità della testina di 6.35 mm/s si determina la velocità minima dei rulli che consente di ottenere valori specifici del diametro di uscita per avere un flusso a volume costante. Questi dati vengono variati iterativamente in base alla spessore della punta del dispositivo per ottenere la larghezza del filamento depositato desiderato. La realizzazione della struttura tridimensionale avviene facendo elaborare ad un apposito software CAD il modello della forma geometrica finale che si vuole ottenere; esso stabilisce i parametri della stratificazione che verrà poi eseguita dal macchinario. Con questa tecnica sono stati realizzati scaffold con porosità del 61% che, impiantati in vivo, hanno dimostrato una buona proliferazione cellulare completata entro quattro settimane di coltura. La FDM oltre a permettere un' alta riproducibilità dei prodotti proprio perché basata sull'elaborazione al computer, ha il vantaggio di non richiedere alcun solvente nella trattazione del materiale, di controllare facilmente le caratteristiche microscopiche dello scaffold fino a circa 100 μm, ma ha lo svantaggio di trattare il materiale ad alta temperatura (quindi è applicabile ad un numero limitato di polimeri).

~ Selective Laser Sintering

Il processo di sinterizzazione laser selettiva (SLS) è una delle tecniche di prototipazione rapida maggiormente efficace e versatile tra quelle attualmente utilizzate [6].

Progettata da Carl Deckard per la sua tesi di master all'università del Texas, la tecnica SLS è stata brevettata nel 1989. In questa tecnica un raggio laser viene indirizzato su uno strato sottile di polvere termoplastica precedentemente compattata mediante lo scorrimento di un rullo. La polvere è sorretta da una base semovibile che strato dopo strato si abbassa favorendo la deposizione di nuova polvere e la conseguente fabbricazione di nuovi strati dell'oggetto su quelli precedentemente realizzati.

Il processo si ripete fino a quando non sia stato realizzato l'oggetto nella sua interezza con spessori di deposizione variabili tra 0.05 e 2 mm. La polvere in eccesso strato dopo strato aiuta a sorreggere l'oggetto in costruzione impedendone ogni deformazione geometrica. Il calore sprigionato dal raggio laser provoca una microfusione localizzata delle particelle di polvere sotto la guida di un preciso sistema di scansione. Il laser a CO₂ utilizzato, con potenza variabile fra 25 e 50 W, viene utilizzato per provocare la fusione localizzata della polvere e permettere quindi la sinterizzazione.

La camera di fabbricazione è isolata ermeticamente dall'ambiente circostante e mantenuta ad una temperatura appena al di sotto del punto di fusione della polvere polimerica. In questo modo il calore sviluppato dal fascio laser deve provocare un aumento minimo di temperatura per ottenere la sinterizzazione velocizzando enormemente il processo. Nella camera, inoltre, si mantiene un'atmosfera controllata, mediante azoto, al fine di evitare il rischio di esplosioni dovute alla elevata presenza di polvere. Una volta che l'oggetto è stato realizzato nella sua interezza, il pistone viene completamente sollevato per permettere il recupero dello stesso. La polvere in eccesso, non sinterizzata, viene soffiata mediante aria compressa e poi possono essere effettuati i trattamenti di finitura manuale. Nella SLS non sono necessari supporti per l'oggetto in costruzione dato che la polvere non sinterizzata fornisce un sostegno sia per i sottosquadri che per le parti a sbalzo. Questo consente di risparmiare una notevole quantità di tempo nella finitura manuale dell'oggetto rispetto ad altre tecnologie SFF. Gli oggetti realizzati mediante SLS non richiedono post-trattamenti ma proprio perché derivanti da un processo di sinterizzazione sono porosi. Per particolari applicazioni, quindi, sarà necessario infiltrare l'oggetto realizzato con altre tipologie di materiale per migliorarne la consistenza meccanica.

Nella figura 14 è rappresentata la struttura interna di una macchina per SLS.

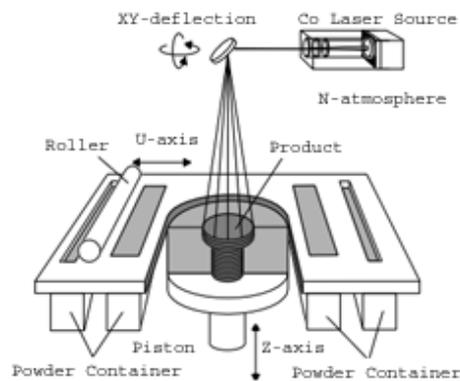


Figura 14. Rappresentazione della struttura interna di una macchina per SLS.

I pezzi finiti si realizzano mediante tecnica additiva partendo da progetti CAD esportati in un formato compatibile con la macchina chiamato STL (*Standard Triangulation Language*) utilizzando polveri termoplastiche come materie prime. Il formato industriale STL è una rappresentazione superficiale dell'oggetto da realizzare che consiste di una lista di facce triangolari tra loro propriamente connesse. La materia prima sviluppata per la tecnologia SLS è una polvere di natura polimerica con una dimensione media delle particelle di circa 50 µm.

I vantaggi legati all'utilizzo di tecnologie SLS sono i seguenti: processo veloce ed economico, realizzazione di pezzi durevoli e funzionali con dimensioni e livello di complessità anche elevati. Inoltre, mediante SLS è anche possibile realizzare piccole produzioni in serie attraverso un unico processo di fabbricazione.

E' possibile ottenere vari livelli di finitura superficiale, così come è possibile sterilizzare i pezzi finiti in autoclave. Inoltre, la tecnologia SLS consente l'utilizzo di molti materiali differenti, con caratteristiche prossime ai materiali termoplastici.

Per esempio polycarbonato, poliammide e poliammide rinforzata mediante particelle vetrose.

~ *Tree-dimensional printing*

La tecnica di *tree-dimensional printing* (3DP) è un processo che produce i componenti attraverso getti di solvente sui vari strati del materiale in polvere.

In primo luogo si distribuisce uno strato di polvere su un apposito piano e lo si analizza con un algoritmo numerico digitale che ne crea un modello utilizzabile dal computer.

Usando una tecnologia simile alla stampa a getto d' inchiostro (fig.15) si inietta un materiale legante sulla polvere e la miscela viene pressata da un pistone in modo da potervi sovrapporre un nuovo strato di polvere, finché si completa la struttura tridimensionale desiderata.

Il getto delle goccioline leganti crea degli aggregati sferici dei due materiali che, strato dopo strato, si addensano fino a dare la struttura solida finale. La densità dell'impacchettamento delle particelle di polvere ha un'influenza diretta sulle proprietà meccaniche finali della struttura.

Il vantaggio principale di questa tecnica è che è praticabile a temperatura ambiente, quindi sia le cellule che eventuali fattori di crescita possono essere incorporati nello scaffold senza il rischio di essere resi inattivi da solventi tossici, semplicemente scegliendo opportune sostanze leganti (per esempio a base di acqua).

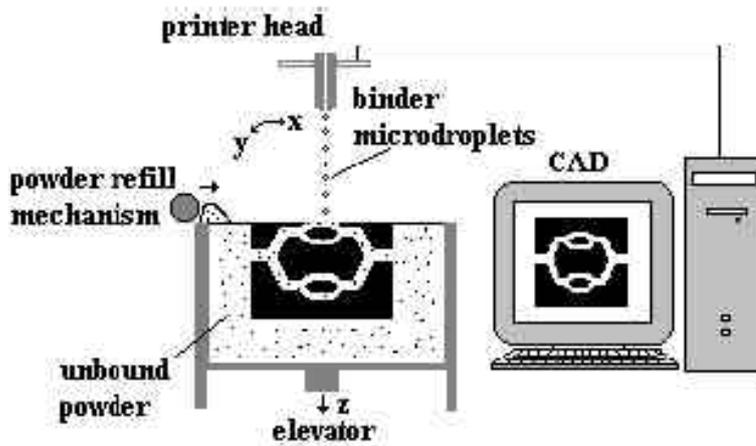


Figura 15. Diagramma schematico del sistema 3D-printing

~ Tree-dimensional bioplotting

Il 3DBiploter è uno strumento capace di muoversi lungo gli assi x, y e z; è costituita da una testa di un estrusore dalla quale è possibile tirare fuori materiale liquido o pastoso (generalmente con una bassa o modesta viscosità) servendosi di un sistema ad aria compressa.

Inoltre, la suddetta può essere opportunamente portata a temperatura richiesta.

Il materiale estruso solidifica non appena entra in contatto con il substrato o con lo strato inferiore.

Di seguito, in figura 16, è riportato lo schema esemplificativo dello strumento sopra descritto.

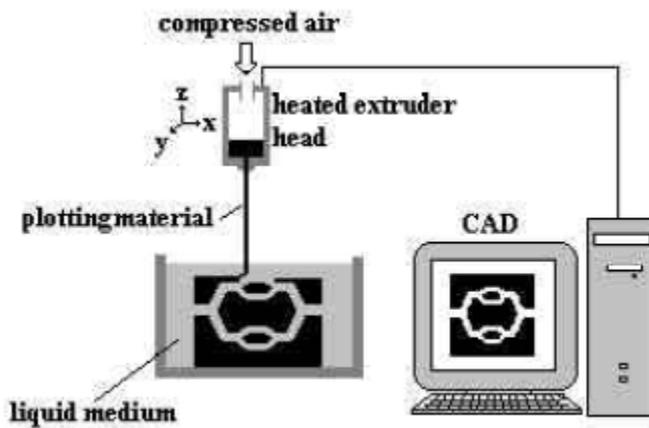


Figura 16. Diagramma schematico del sistema 3D-bioplotter

~ Fiber deposition

Le convenzionali tecniche di fabbricazione di scaffold non sono sufficientemente adatte al controllo della struttura dello scaffold e alla modulazione delle proprietà meccaniche.

Con tale tecnica di deposizione di fibre (3DF) è possibile ottenere strutture caratterizzate da un'interconnettività ottimale tra i pori (100%), i quali possono differenziarsi per forma e dimensioni.

Gli scaffold sono realizzati strato su strato (*layer by layer*) tramite deposizione di un polimero sia su un supporto che in soluzione, quindi è possibile determinare la sequenza di sovrapposizione delle fibre. Cambiandone il diametro, la spaziatura, l'orientazione e lo spessore degli strati si possono modulare le proprietà meccaniche.

Per quanto detto il fiber deposition può essere considerato un'evoluzione del 3D plotter: la sua tecnologia permette infatti di lavorare con polimeri altamente viscosi come ad esempio il policaprolattone (PCL), poliestere alifatico biodegradabile.

Il 3DF è essenzialmente una tecnica di deposizione di fuso: la macchina (*bioplotter*) è costituita da una cartuccia con all'interno una siringa, entrambe di natura metallica, contenente il polimero.

Nel caso del policaprolattone, per arrivare a fusione, bisogna raggiungere una temperatura di 60°. La siringa è connessa con la pressione fornita da una bombola, e attraverso il needle, cioè dall'aghetto, riusciamo a deporre le fibre.

Per cui i parametri in gioco da tenere sotto controllo sono: temperatura, pressione e velocità di deposizione del fuso.

Lo schema di processo è illustrato nella figura sottostante (fig. 17).

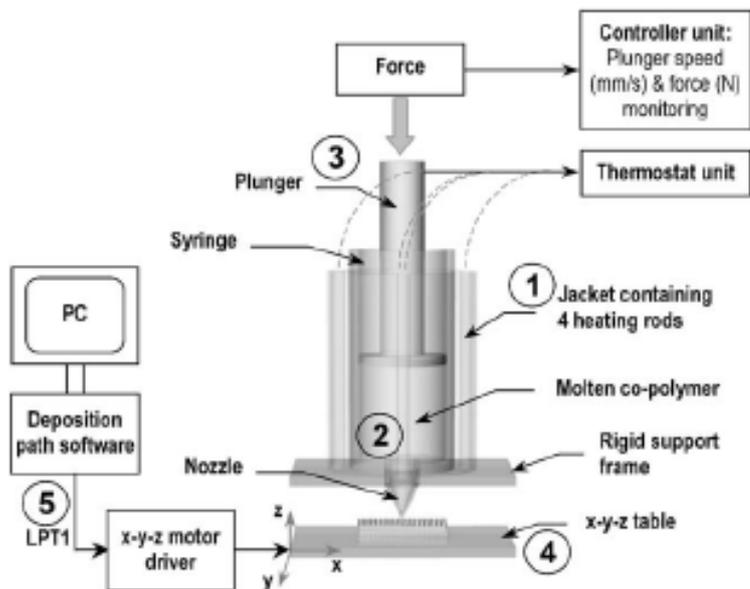


Figura 17. Il 3D fibre deposition devince è costituito da 5 componenti principali:

- (1) rivestimento esterno termostatico utile al controllo dell'innalzamento della temperatura;
- (2) una unità costituita da una siringa ed un ago (needle) la quale serve per “plottare” il co-polimero fuso;
- (3) una plancia di controllo dell'emissione del polimero;
- (4) supporto metallico per la deposizione delle fibre;
- (5) unità di controllo che, tramite un pc, coordina la deposizione delle fibre sul supporto

ANATOMIA DEL GINOCCHIO

Ginocchio

Tra le caratteristiche che contraddistinguono la specie umana riveste senz'altro notevole importanza la capacità di mantenere la posizione eretta e di svolgere movimenti fluidi e rapidi ad esempio la corsa. Queste capacità vengono principalmente conferite dalla conformazione del nostro sistema locomotore nell'ambito del quale si rivela indispensabile per alcune funzioni essenziali l'articolazione del ginocchio.

Il ginocchio è un'articolazione¹ mobile (per contiguità o diartrosi²), del tipo ginglimo angolare³ al quale prendono parte il femore, la rotula e la tibia (tre delle ossa che compongono l'arto inferiore).

Il femore è l'osso più lungo del corpo umano, è costituito da un corpo (diafisi) e due estremità (epifisi) delle quali quella distale⁴ termina con due voluminose prominenze ossee dette rispettivamente condilo laterale e condilo mediale del femore. Tra i due condili è scavata la fossa intercondiloidea che si prolunga anteriormente nella troclea femorale (o faccia rotulea).

La tibia è posta più in basso del femore e occupa il lato mediale⁵ della gamba; la sua estremità prossimale (che entra a far parte dell'articolazione del ginocchio) è formata da due condili (emipiatti tibiali) uno mediale e l'altro laterale, ciascuno dei quali presenta un cavità poco accentuata (detta cavità glenoidea) necessaria all'articolazione col rispettivo condilo femorale. Tra le due cavità glenoidee si solleva l'eminanza intercondiloidea (o spina tibiale).

¹ Sito ove due ossa adiacenti si collegano e vengono per lo più classificate in: articolazioni per continuità o sinartrosi e articolazioni per contiguità o diartrosi.

² Ogni diartrosi possiede le seguenti caratteristiche: i capi ossei sono tra loro separati; sono tenuti insieme da un manicotto fibroso "la capsula articolare"; la capsula è rivestita esternamente dalla "membrana sinoviale"; le superfici ossee articolari sono ricoperte da "cartilagine articolare". Lo spazio potenziale tra le due ossa (cavità articolare) è circondato dalla membrana sinoviale e dalla cartilagine articolare. Vi è inoltre una piccola quantità di fluido (liquido sinoviale) tra le estremità delle ossa.

³ Questo tipo di articolazione è anche detto a "troclea" o a "cerniera", sono dette a ginglimo angolare in quanto permettono solo movimenti angolari su un solo asse

⁴ I termini prossimale e distale vogliono specificare quella parti dell'arto rispettivamente più prossime o più distanti dall'attacco dell'arto al tronco.

⁵ Una struttura corporea situata più vicina di un'altra al piano sagittale mediano è detta "mediale" rispetto all'altra che è detta "laterale".

La rotula (o patella) è in osso corto e sesamoide⁶ (che è incluso in un tendine, in questo caso quello del quadricipite) che sporge sotto la cute e ha una forma triangolare ad angoli smussati con la base rivolta verso l'alto e l'apice in basso.

Nel formare il ginocchio il femore interviene con i condili (laterale e mediale) cui si contrappongono le cavità glenoidee tibiali; anteriormente a queste strutture, accostandosi alla troclea femorale, si pone la rotula compresa nel legamento rotuleo (una pertinenza del tendine del quadricipite). Le tre ossa sono poi riunite tra di loro per mezzo di una capsula fibrosa che si inserisce posteriormente al femore ed in avanti ai condili tibiali. La parte anteriore della capsula è molto sottile e lassa e permette che si determini un vasto "sacca" della sinoviale che si solleva poi tra il femore e la faccia posteriore del quadricipite.

L'articolazione del ginocchio infine è completata dalla presenza di diversi importanti legamenti⁷ tra cui: rotuleo, collaterali, popliteo obliquo, popliteo arcuato, crociati.

La già ben descritta anatomia dell'articolazione del ginocchio si complica ulteriormente se si passa ad analizzare i molteplici aspetti funzionali di questa struttura. Tra i diversi segmenti scheletrici che la compongono infatti se ne annoverano alcuni con funzioni portante, altri con funzione dinamica volta alla trasmissione della forze muscolari indispensabili per lo svolgimento di movimenti attivi dell'articolazione stessa, ed altri (segmenti) ancora con funzione stabilizzatrice.

Analizzando le diverse funzioni nel dettaglio si può asserire che:

- La funzione portante è assolta dai due condili e dai due emipiatti tibiali.
- La funzione dinamica è svolta dalla rotula, dalla troclea (o gola femorale), dalla tuberosità anteriore della tibia l'estremità prossimale della tibia.
- La funzione stabilizzatrice è assolta dall'incisura intercondiloidea femorale, l'eminenzia intercondiloidea (o spina della tibia), i due epicondili, il margine supero-mediale della tibia e la testa del perone.

Naturalmente sia le parti che hanno funzioni dinamiche, sia quelle a funzione stabilizzatrice non sopportano direttamente il peso del corpo e la risposta del suolo a questo.

⁶ Sono noduli di tessuto osseo che si sviluppano nei tendini dei muscoli.

⁷ Ispessimenti della capsula articolare.

I due condili femorali sono formazioni articolari unite anteriormente in alto dalla troclea femorale ma che poi si dividono divenendo quasi elementi articolari indipendenti. I due condili non sono perfettamente uguali, infatti quello laterale è più voluminoso, ma quello mediale scende più in basso. Esso è diretto col suo asse verticale maggiormente verso l'esterno mentre quello mediale prosegue più dritto verso il basso, ed infine posteriormente il condilo laterale diverge maggiormente dal piano sagittale del femore⁸. I Condili femorali presentano in sezione frontale una forma approssimativamente semicilindrica che conferisce loro una considerevole resistenza strutturale. Nel piano sagittale la forma dei condili femorali è più complessa, il loro contorno presenta inizialmente una curva brevissima a raggio piuttosto corto poi si continua in basso e posteriormente in alto con una curva a raggio sempre più corto (da 40 mm a 16 mm), per finire così bruscamente nella parte terminale della corticale posteriore della metafisi. Quindi si capisce che il movimento di flessione-estensione del ginocchio non è un movimento di rotazione che si svolge lungo un asse centrale di rotazione ma lungo una serie di centri istantanei di rotazione, vale a dire lungo un asse eccentrico che è situato posteriormente a quello che dovrebbe essere grosso modo il centro volumetrico della massa epifisaria.

L'emipiatto tibiale esterno è leggermente più ampio trasversalmente ed anche meno esteso sagittalmente, quindi la sua circonferenza esterna si avvicina grossolanamente ad una forma semicircolare mentre il suo margine mediale è leggermente ondulato.

L'emipiatto mediale è leggermente più lungo (in senso sagittale) ma è meno ampio trasversalmente rispetto a quello esterno; la sua superficie assume una forma semiovoidale. L'emipiatto tibiale mediale presenta una concavità più pronunciata di quella dell'emipiatto laterale.

Dalla descrizione della conformazione dei due condili femorali e dei due emipiatti tibiali risulta evidente che non vi è una congruenza reale tra le superfici dei condili femorali e quelle corrispondenti degli emipiatti tibiali ed è per questo che la congruenza viene prontamente assicurata dalla presenza di due strutture fibrocartilaginee, i **menischi**.

⁸ Nella posizione eretta il baricentro cade a tre centimetri davanti della seconda vertebra sacrale. Qui si incontrano tre piani: il "piano mediano" (o piano sagittale), il "piano orizzontale" (o trasversale) ed il "piano frontale".

Menischi

I menischi visti dall'alto si presentano come due mezzi anelli. Il menisco laterale largo circa 10 mm e spesso circa 8 mm descrive un cerchio quasi completo interrotto solo in corrispondenza della spina tibiale (paragonato ad una "O"); il menisco mediale è interrotto in corrispondenza della spina tibiale per oltre un quarto della circonferenza ed è paragonato ad una "C".

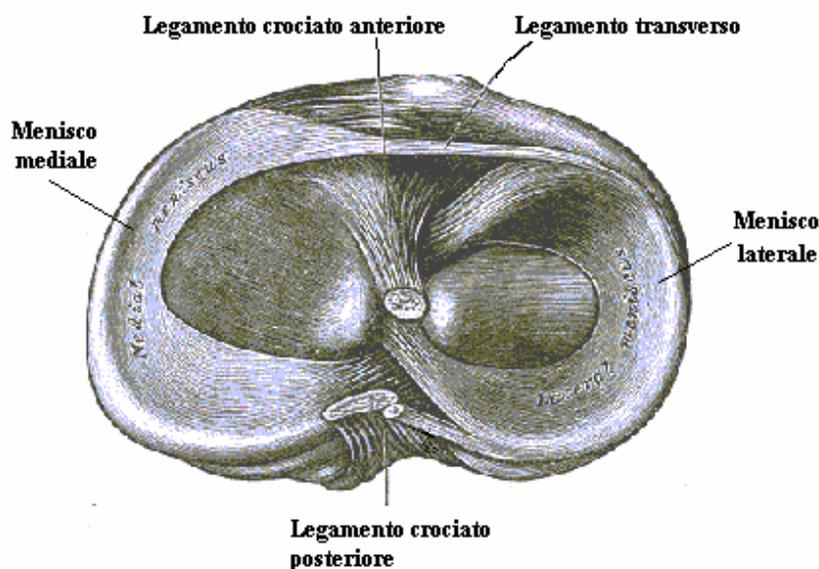


Figura 1 Vista dall'alto del piatto tibiale destro con i due menischi

Nel piano frontale essi appaiono come due cunei fibrocartilaginei, di consistenza elastica, inseriti tra i condili femorali e gli emipiatti tibiali.

Nella parte più interna presentano una struttura cartilaginea priva di vasi sanguigni, poco deformabile, destinata a sopportare le forze di pressione. Nella loro parte periferica presentano invece una struttura fibroelastica abbondantemente vascolarizzata e innervata, ben deformabile alle sollecitazioni di trazione.

I menischi sono collegati alla capsula in corrispondenza della loro porzione periferica e alla superficie prespinale e retrospinale della tibia.

In particolare il menisco mediale è inserito per tutta la sua lunghezza nella capsula articolare menisco-tibiale che corrisponde a quella che è detta "articolazione

coronaria". Il corno anteriore del menisco è saldamente ancorato al piatto tibiale e le fibre posteriori si fondono con il legamento trasverso, che unisce i corni anteriori dei due menischi.

Il menisco laterale si attacca col suo corno anteriore immediatamente avanti alla spina della tibia e al lato esterno del legamento crociato anteriore e col corno posteriore sul tubercolo interno della spina tibiale.

I due menischi sono riuniti anteriormente da una piccola banderella a direzione trasversale, legamento jugale, larga 3-4 mm, lunga 4-5 cm, ricoperta da una massa celluloadiposa (batuffolo adiposo anteriore del ginocchio)

Struttura del menisco

Il menisco è una struttura fibrocartilaginea in cui è presente un complesso di fibre collagene con cellule sparse responsabili della sintesi e della conservazione della matrice extracellulare; queste cellule sono di due tipi:

- Fusiformi, poste sulla superficie,
- Ovoidali poste nel resto del menisco.

La superficie, ad una prima analisi, sembra liscia ma, se si analizza al microscopio elettronico, si nota la presenza di irregolarità (solchi e spigoli).

Il menisco è composto per il 72% da acqua, il 22% da collagene, lo 0.8% da proteoglicani, e per la restante parte da elettroliti e glicoproteine; tale composizione può variare con l'età.

Il collagene è il maggiore responsabile del comportamento a tensione del menisco; i proteoglicani, sotto pressione, sono in grado di allontanare l'acqua precedentemente assorbita (swelling), sono perciò responsabili del comportamento a compressione del menisco.

Le fibre collagene che compongono la matrice extracellulare sono organizzate in tre strati:

- Superficiale in cui le fibre sono disposte irregolarmente;
- Centrale in cui le fibre sono disposte irregolarmente, ma lungo il perimetro sono orientate radialmente;
- Inferiore in cui le fibre sono orientate circonferenzialmente e radialmente.

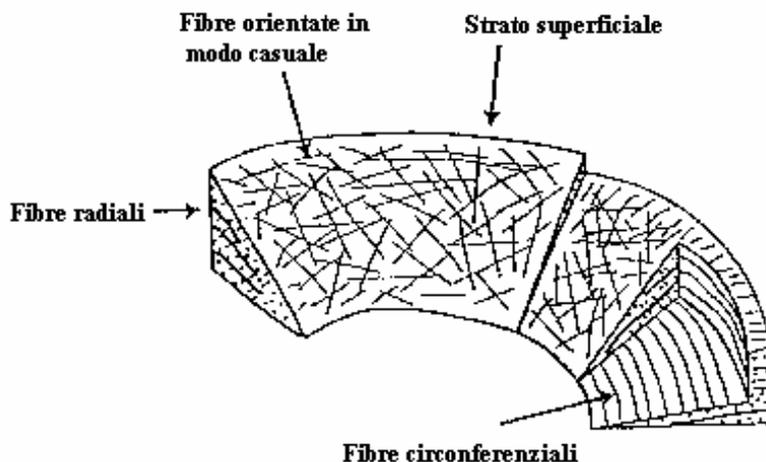


Figura 2. Distribuzione delle fibre di collagene

I menischi del ginocchio sono delle strutture relativamente avascolari; ci sono piccoli capillari, limitati alla zona periferica, ed accompagnati da fibre nervose. Studi anatomici hanno dimostrato che il grado di penetrazione vascolare varia dal 10% al 30% dell'ampiezza nel menisco mediale e dal 10% al 25% dell'ampiezza nel menisco laterale.

Collagene

Le sostanze chimiche costitutive delle fibre collagene sono proteine filamentose lunghe circa 280nm dette tropocollagene che si associano testa-coda e parallelamente. Le fibre collagene sono la categoria di fibre più abbondante nel tessuto connettivo ordinario, sono di colorito bianco, ed appaiono come lunghi filamenti dallo spessore variabile tra 1 e 12 μm (Fasci di fibrille di spessore 0,2-0,3 μm tenute insieme da materiale amorfo); esse sono flessibili ma poco estensibili offrendo quindi una grande resistenza a trazione.

Come si è già detto le molecole costitutive sono denominate tropocollagene sono proteine filamentose di lunghezza 280nm, di spessore 1,4nm e PM 300000 Dalton. Alla T corporea queste molecole polimerizzano formando fibrille. Le molecole di tropocollagene sono formate a loro volta da tre catene peptidiche (dette catene α) con configurazione elicoidale ed avvolte a spirale l'una sull'altra (collegate tra loro da

legami covalenti e ponti idrogeno); a seconda delle catene α coinvolte possiamo avere la formazione di vari tipi di collagene (I, II, III, etc.). Nella tabella seguente sono indicati i cinque principali tipi di collagene:

Tipo	Distribuzione	Caratteristiche
I	Osso, tendine, pelle, dentina, connettivi	Forma fibre spesse con bande periodiche.
II	Cartilagine ialina, nucleo polposo, corpo vitreo	Forma fibre sottili con bande periodiche meno evidenti.
III	Fibre reticolari, tessuto reticolare, pelle, muscolo liscio	Forma fibre argilofile di molti organi.
IV	Membrane basali	Forma reticolato fibrillare privo di bande.
V	Membrane basali, matrice extracellulare	Forma sottili rivestimenti pericellulari.

La formazione delle fibre collagene avviene in due fasi:

1. Sintesi delle unità macromolecolari (protocollagene) e trasporto all'esterno della cellula.
2. Polimerizzazione delle molecole di tropocollagene per formare le fibrille (matrice amorfa del tessuto connettivo)
3. Le fibrille si raccolgono in fasci ondulati, assumendo l'aspetto di tipiche fibre collagene.

Proteoglicani

I proteoglicani sono grossi complessi proteico-polisaccaridici; che sono formati dall'unione di proteine e glicosaminoglicani (GAG). I GAG sono i costituenti chimici più importanti della matrice amorfa: sono lunghi polimeri derivati da zuccheri (l'acido D-glucuronico) e gli amino-zuccheri (glucosamina e galattosamina); la maggior parte dei GAG sono molto gelatinosi e sono responsabili della viscosità della matrice amorfa.

I proteoglicani appaiono costituiti da un asse centrale (catena peptidica), sulla quale vi sono innestate molecole più corte (molecole polisaccaridiche). L'asse centrale ha una lunghezza variabile 100-300 nm ed è privo, ad una estremità, di catene laterali.

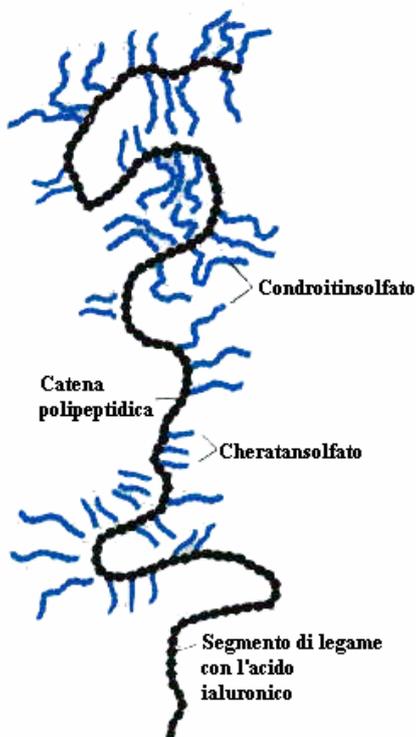


Figura 3. Disegno raffigurante la struttura generale dei proteoglicani

Gli aggregati di proteoglicani sono formati da un filamento centrale (acido ialuronico) dal quale si irradiano lateralmente molti monomeri di proteoglicani.

I proteoglicani quando sono aggregati formano una complicata rete tridimensionale che occupa un volume molto maggiore di quello dei suoi componenti molecolari “volume escluso” (che contiene, oltre alla molecola, acqua ed elettroliti).

La resistenza alla compressione della sostanza amorfa dipende (oltre che dalle fibre collagene) in larga misura dal “volume escluso” occupato dai proteoglicani.

Nel menisco i proteoglicani sono immobilizzati da una rete di fibre collagene ed in virtù della loro conformazione, rendono il tessuto capace di resistere a grosse compressioni; tale meccanismo è accentuato dal fatto che le molecole di proteoglicani risultano compresse di circa il 20% del valore naturale del loro “volume escluso” in soluzione⁹.

Studi recenti sulle proprietà in flusso di soluzioni di proteoglicani hanno dimostrato, inoltre, che essi sono capaci di formare networks elastici in grado di immagazzinare energia.

Ci sono interazioni tra collagene e proteoglicani che rendono il tessuto del menisco come un solido rinforzato con fibre capace di resistere a compressione, trazione e shear.

Movimenti del menisco

Durante la flessione del ginocchio, partendo dalla posizione di massima estensione, i menischi tendono a spostarsi posteriormente, tuttavia tale movimento non è simmetrico; alla completa flessione del ginocchio il menisco esterno (laterale) arretra il doppio di quello interno (mediale). Il menisco laterale subisce uno spostamento di circa 11,2 mm; mentre quello mediale subisce uno spostamento di circa 5,1 mm.

I fattori che influenzano lo spostamento possono essere passivi e attivi:

- Il fattore passivo è dato dalla presenza dei condili femorali che spingono posteriormente i menischi per mezzo di un semplice meccanismo di compressione.
- Il fattore attivo è dato dalle connessioni con la rotula che durante la flessione fanno spostare posteriormente i menischi.

⁹ Donald C. Fithian, Michael A. Kelly and Van C. Mow “Material properties and structure-function relationships in the menisci”, Clinical orthopaedics and related research

Anche nei movimenti di rotazione i menischi si spostano: nella rotazione esterna della tibia rispetto al femore il menisco interno si sposta posteriormente ed il menisco esterno si sposta anteriormente; nella rotazione interna avviene il contrario.

I movimenti che avvengono durante la rotazione assiale sono legati alla presenza passiva dei condili femorali e, in piccola parte, alle connessioni menisco-rotulee.

Funzioni del menisco

Le funzioni che il menisco è chiamato a svolgere sono le seguenti:

- Trasmissione delle forze
- Assorbimento delle sollecitazioni intermittenti
- Lubrificazione articolare

Trasmissione delle forze:

I menischi sono in grado di sopportare grandi carichi e le aree di contatto all'interno del ginocchio cambiano con la rotazione e la flessione. Il 50% del carico in compressione dell'articolazione del ginocchio è trasmesso attraverso il menisco in estensione, mentre a 90° di flessione è trasmesso circa l'85% del carico. Tale trasmissione di forze è dovuta alla forma dei menischi (semi-luna) che converte la forza di compressione del femore al vettore radiale che tende a spingere il menisco al di fuori dell'articolazione (evenienza impossibile a causa della presenza dell'inserzione del menisco sulla capsula articolare). La forza radiale allarga le fibre collagene in direzione circonferenziale incontrando la resistenza delle inserzioni dei corni meniscali sulla tibia. In questo modo, la componente radiale della forza di carico è bilanciata dalla tensione sviluppata dalle fibre collagene orientate circonferenzialmente.

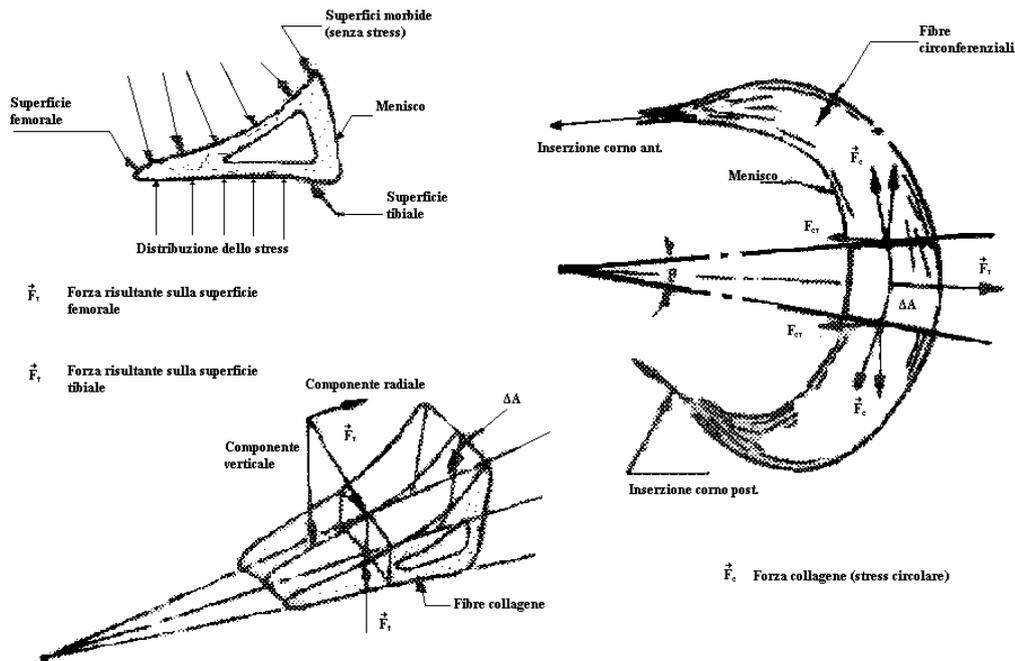


Figura 4. Diagramma delle forze che agiscono sul menisco

Assorbimento delle sollecitazioni intermittenti:

Tali sollecitazioni sono prodotte durante il cammino e sono propagate dal piede al ginocchio.

Gli studi relativi a questo tipo di funzione sono stati realizzati analizzando ginocchi con e senza menischi. È stato dimostrato che il tessuto meniscale, morbido e viscoelastico, è in grado di attenuare le onde d'urto; e che, nei ginocchi con i menischi, la capacità d'attenuazione di queste forze è superiore del 20%.

Lubrificazione articolare:

Altra funzione caratteristica dei menischi è la partecipazione alla lubrificazione articolare. Esistono due tipi di lubrificazione:

- L'interfaccia
- Il film fluido

Nell'interfaccia esiste uno strato di molecole lubrificanti che è assorbito su ogni superficie evitando il diretto contatto superficie-superficie, riducendo così l'usura.

Il film fluido evita il contatto superficie-superficie. Esistono due tipi di lubrificazione con “film fluido”: il primo, idrodinamico, in cui le superfici di carico contrapposte si muovono tangenzialmente tra loro, il secondo, “con film a pressione”, in cui le superfici si muovono perpendicolarmente tra loro. Se le superfici di carico possono essere deformate dall’azione idrodinamica o dal “film a pressione” si parla di elastoidrodinamica e ne deriva una vantaggiosa deformazione che aumenta le aree di contatto.

Quando nell’articolazione sono presenti carichi elevati di lunga durata e bassa velocità, è presente una lubrificazione del primo tipo, mentre con carichi minori, non costanti e veloci, è presente una lubrificazione con film fluido elastoidrodinamica.

Patologie del menisco

Si possono verificare sia isolatamente sia in associazione a lesioni capsulo-legamentose, a seconda delle diverse modalità del trauma. Lesioni del menisco sono molto frequenti (rappresentano i 2/3 di tutte le lesioni interne del ginocchio). Sono maggiormente esposti a queste lesioni gli adulti di sesso maschile che, per ragioni professionali, sottopongono il ginocchio a un notevole impegno dinamico (calcianti, minatori, pavimentatori, etc.).

Le lesioni vengono spesso classificate in base alla sede della lacerazione rispetto alla vascolarizzazione del menisco, ed in base alla “configurazione vascolare” delle superfici centrali e periferiche della rottura.

- La lesione rossa-rossa, ha una vascolarizzazione funzionale sul lato capsulare e meniscale della lesione, ovviamente, ha la migliore prognosi.
- La lesione rosso-bianca, ha un’attiva vascolarizzazione periferica, questa lesione per poter guarire dovrebbe avere una sufficiente vascolarizzazione ad opera di una proliferazione fibrovascolare.
- La lesione bianca-bianca, è una lesione meniscale in una zona completamente avascolare; non ha apporto di sangue, e perciò in teoria, non può guarire. Con lo scopo di estendere il livello di riparazione a queste aree avascolari, sono state messe a punto delle tecniche che apportano una vascolarizzazione a questa lesione di tipo bianca-bianca.

Il menisco mediale che è più spesso traumatizzato, viene leso con questo meccanismo: ginocchio in semiflessione (posizione di maggiore mobilità dei menischi), gamba forzatamente portata in abduzione e rotazione esterna: in questa

posizione il menisco interno è spostato verso il centro dell'articolazione in modo che il suo margine più spesso viene a trovarsi sotto la parte più sporgente del condilo; se in questo istante l'individuo poggia con tutto il peso del corpo sul suo arto il menisco può rimanere schiacciato. D'altra parte, lesione del menisco si può avere ogni volta che viene a mancare il sincronismo tra il movimento di flessione (o di estensione) brusca del ginocchio ed il movimento di scivolamento della cartilagine semilunare che sollevandosi a guisa di tenda sulla superficie del condilo femorale non fa in tempo a seguirlo passivamente e il menisco rimane schiacciato (più frequente nelle attività che obbligano a lavorare a lungo accovacciati).

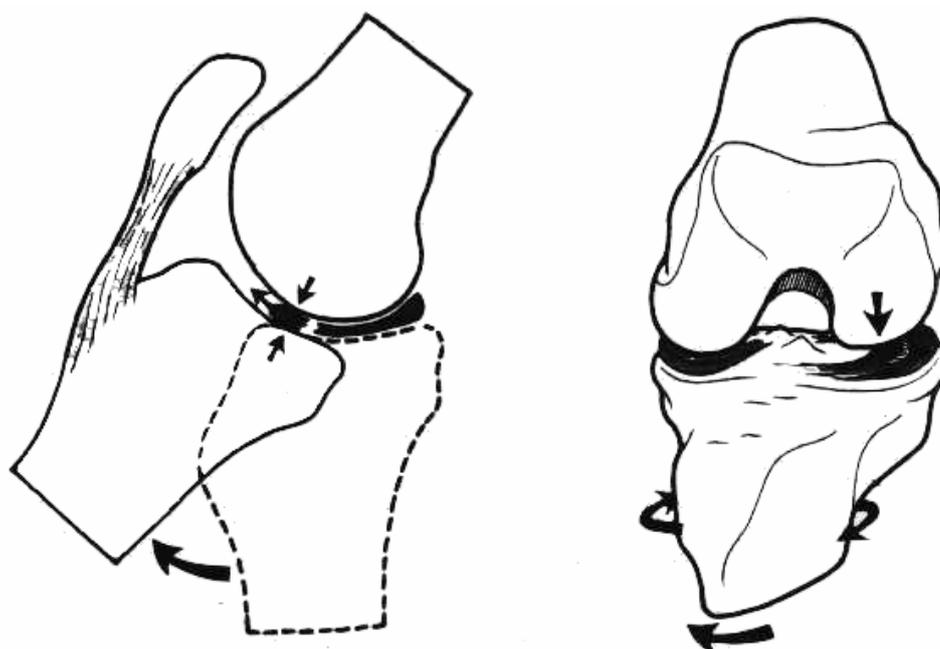


Figura 5. Meccanismo di lesione del menisco

A seconda della localizzazione del trauma varia il tipo di lesione a cui è soggetto il menisco; si evidenziano perciò diversi tipi di lesione se il trauma interessa il menisco mediale (o interno) o quello laterale (esterno):

- Nel menisco interno è interessato prevalentemente il corno posteriore, generalmente a livello del triangolo d'appoggio.

La lesione consiste in una fissurazione longitudinale. A volte, con il ripetersi di altri anche più modesti traumi, tale fissurazione si prolunga progressivamente dall'indietro in avanti fino ad isolare un grosso frammento semilunare (si può

verificare anche in un unico trauma): rottura a “manico di secchio”. Il frammento può dislocarsi nella gola intercondiloidea, oppure restare incarcerato tra condilo femorale e piatto tibiale determinando, nell’uno e nell’altro caso, un blocco articolare.

Più raramente, il “manico di secchio” si interrompe trasversalmente dando origine a due banderette libere in cavità articolare responsabili di blocchi articolari transitori.

Talvolta può verificarsi la disinserzione della porzione periferica del menisco dalla capsula articolare.

- Nel menisco esterno si tratta in genere di rotture trasversali, che dal margine libero, si prolungano verso il paramenisco. Meno frequenti sono le rotture del corno posteriore (simili a quelle del menisco interno).

A lungo andare, la cartilagine di rivestimento dei condili femorali nei punti corrispondenti alla rottura meniscale, presenta delle alterazioni da disturbi meccanici, punto di partenza di lesioni preartrosiche.

Terapia del menisco

La cura per la frattura del menisco è rappresentata dalla meniscectomia (asportazione del menisco), che può essere selettiva o totale; e dalla meniscopessi.

- Meniscectomia selettiva, da effettuarsi per via artroscopica; essa comprende:
 - La meniscectomia parziale della sola parte interrotta ed instabile del menisco leso.
 - La meniscectomia subtotale, condotta tra paramenisco e triangolo d’appoggio, onde garantire l’integrità del muro meniscale e quindi conservare il più possibile la stabilità capsulare.

- Meniscectomia totale, è di indicazione specifica nelle rotture del menisco esterno associate a degenerazione cistica, ed è estesa a gran parte del menisco. Questo intervento permette infatti di evitare ulteriori lesioni traumatiche a carico della residua porzione meniscale in degenerazione cistica.

- La meniscopessi, eseguibile per via artroscopica, consiste nella sutura del menisco alle strutture capsulari; è indicata quando non c'è rottura del menisco, bensì la disinserzione dalla capsula del muro meniscale (abbondantemente vascolarizzato e quindi in grado di cicatrizzare).

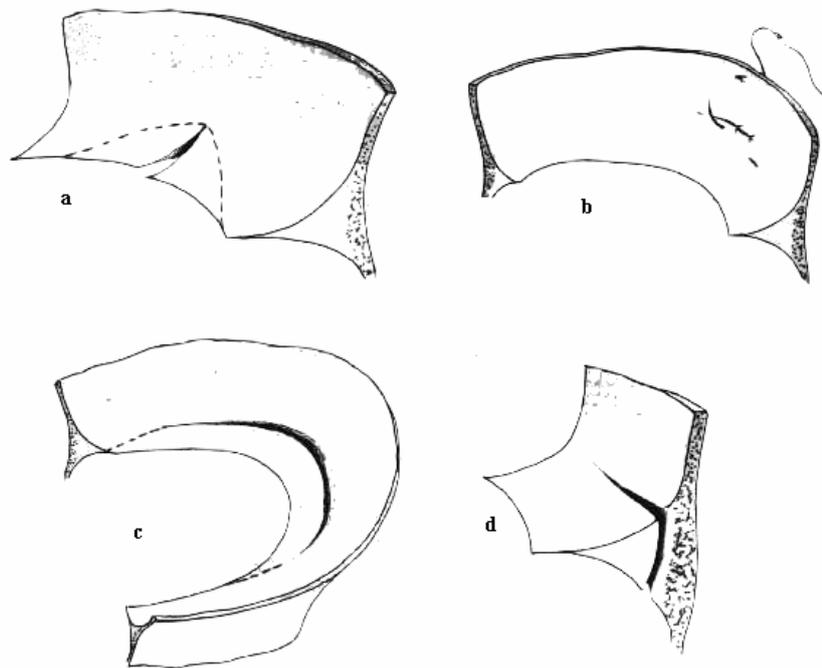


Figura 6. Esempi di trattamento della lesione del menisco: a)meniscectomia, b)meniscopessi; c)meniscectomia parziale, d)meniscectomia subtotale

La meniscectomia, sia totale che parziale, porta a degli effetti negativi; infatti, in seguito ad una meniscectomia, si ha un ridotta area di contatto tra le articolazioni, ciò altera la distribuzione della pressione sull'articolazione con conseguente aumento dello stress e con la presenza di aree ad alta pressione soprattutto nel piatto tibiale.

Questo porta ad una progressiva degenerazione artrosica articolare, proporzionale alla quantità di menisco rimosso.

In seguito a queste osservazioni si è cercato di limitare il più possibile gli interventi di meniscectomia totale; ma nei casi in cui essa si riveli indispensabile si è cercato di ristabilire con appositi sistemi quella che è la funzione del menisco. I metodi usati sono diversi, alcuni sono di seguito citati:

- Trapianto del menisco: tale metodo alla lunga si è rivelato il migliore; però ci sono problemi legati al rigetto.

- Menisco di collagene: scopo di tale sistema è la ricrescita del tessuto. I problemi di rigetto sono in parte superati, infatti, il collagene viene preventivamente devitalizzato in modo che non possano nascere risposte immunitarie. Però tale trattamento porta ad una variazione delle proprietà meccaniche del tessuto, che non sono più quelle del tessuto vivente

- Menisco di poliuretano: questi sistemi sono realizzati con materiali sintetici (i poliuretani). Hanno buone proprietà meccaniche; però durante la degradazione in vivo possono liberare sostanze dannose alla vita cellulare.

L'approccio che si intende seguire, in questo lavoro, è quello di creare una struttura completamente biorisorbibile¹⁰; costituita da polimeri naturali che durante la loro degradazione danno origine a molecole non velenose (in particolare già presenti nella matrice extracellulare).

¹⁰ Tale struttura dopo un certo periodo di tempo sarà degradata completamente e al suo posto si sarà rigenerato il menisco

Parte I

Realizzazione di scaffold con tecnologie convenzionali

INTRODUZIONE

In tale tesi si intende utilizzare l'approccio di "tissue engineering" per la riparazione e rigenerazione del menisco danneggiato in seguito a traumi e/o patologie che ne hanno compromesso il funzionamento, come si è già detto la cura di questi è finora rappresentata dalla sola meniscectomia (totale o parziale). Inoltre si ha la cicatrizzazione e la formazione di nuovo tessuto solo se il danno è localizzato nella zona rossa-rossa¹¹. L'obbiettivo consiste nella realizzazione di sistemi di sostegno per la ricrescita cellulare (scaffolds), che possano permettere la ricrescita del tessuto meniscale.

In particolare un tale sistema deve essere progettato in modo tale che il suo parziale assorbimento coincida con la progressiva ricrescita del tessuto che si intende ricostruire; in altre parole la progressiva variazione della morfologia e riduzione delle proprietà meccaniche dello scaffolds deve essere accompagnata dal progressivo rimodellamento della struttura e conseguente aumento delle proprietà meccaniche dovuto dalla rigenerazione del neotessuto; quindi nella fase di progetto bisogna modulare i tempi di degradazione dello scaffolds in modo da ottenere le proprietà strutturali simili a quelle del tessuto ingegnerizzato¹² altrimenti si potrebbero avere delle ripercussioni sul giusto funzionamento del sistema.

Oltre alla definizione di materiali e tecnologie appropriate, la morfologia dei substrati, con particolare riferimento ai pori e relativa distribuzione, rappresenta un parametro essenziale durante la fase di progettazione degli scaffold.

I pori, infatti, saranno riempiti di cellule e su di essi le cellule incominceranno a proliferare sino alla completa ricostruzione del tessuto. Inoltre, è stato dimostrato che

¹¹ Parte periferica del menisco che presenta una certa vascolarizzazione

¹² Rappresenta l'unione di scaffolds e cellule

la porosità rappresenta un fattore importante nella determinazione della risposta cellulare; essa non controlla solo la crescita del tessuto ma influenza anche la differenziazione del nuovo tessuto influenzandone la formazione.

La porosità è caratterizzata da tre parametri:

- Volume libero: parte del volume complessivo del sistema lasciato vuoto, il rapporto tra volume libero e volume totale mi dà una valutazione del grado di porosità. L'importanza del volume libero è stata osservata dopo il trapianto, infatti, si è osservato che si è avuta la più piccola risposta infiammatoria con impianti che presentavano un volume libero inferiore del 10%¹³.

- Il grado di interconnessione dei pori. La permeabilità è essenziale poiché permette alle sostanze nutritive di arrivare alle cellule presenti sul supporto tridimensionale.

- Dimensioni: distribuzione dei diametri dei pori all'interno della struttura. Per quanto riguarda la dimensione dei pori si è visto che per una buona ricrescita del tessuto meniscale occorrono sistemi che presentano dei pori con diametro compreso tra 250-500 μm .

Un aspetto fondamentale è la scelta dei materiali i quali dovranno essere, ovviamente, biocompatibili. Tali materiali potranno essere sintetici naturali o compositi, permanenti o biodegradabili. Essi combinati con le cellule daranno origine al tessuto ingegnerizzato. Una caratteristica importante di questi materiali è che la loro struttura può essere progettata secondo le specifiche esigenze. Scopo dell'ingegneria dei tessuti è comprendere le caratteristiche da conferire a questi materiali per avere i risultati desiderati.

I materiali utilizzati sono denominati *biomateriali*, ossia una sostanza adoperata nella costruzione di un dispositivo medico, che presenti un punto o una superficie di contatto con un tessuto vivente.

¹³ Ideale per la ricrescita del tessuto meniscale. Vedi "Porous Implants for Knee Joint Meniscus Reconstruction: A Preliminary Study on the Role of Pore Sizes in Ingrowth and Differentiation of Fibrocartilage", Jan Klompmaker, Henk W. B. Jansen, René P. H. Veth, Hans K. L. Nielsen, Jaqueline H. de Groot & Albert J. Pennings, *Clinical Materials* 14 (1993) 1-11.

I biomateriali sono principalmente utilizzati per fabbricare organi artificiali e protesi; possono, quindi, essere applicati all'interno dell'organismo (valvole cardiache, protesi vascolari, articolari ecc.) o all'esterno di esso, in contatto diretto con i tessuti viventi (protesi dentarie, pelle artificiale, suture).

Di fondamentale importanza sono le caratteristiche chimico-fisiche dei materiali impiegati, in quanto esse ne determinano il successo nello specifico campo d'applicazione: tali caratteristiche sono determinate dalla struttura dei materiali stessi.

La progettazione di un organo artificiale o di una protesi, ha come obiettivo la creazione di un dispositivo che riproduca le funzioni, le prestazioni e talvolta la morfologia di un organo o di un tessuto vivente. Tutto ciò comporta, in ogni caso, una riduzione dei gradi di libertà associati al progetto, poiché gli stessi dipendono rigidamente dalla funzionalità.

I vincoli, determinati in fase di progetto, sono in numero considerevolmente elevato e la loro natura non è del tutto nota al progettista, in quanto le conoscenze relative all'anatomia e alla fisiologia di un organo sono spesso limitate sia per qualità sia per quantità ed inoltre le caratteristiche funzionali ed anatomiche variano da un individuo ad un altro. Idealmente, si potrebbe pensare di progettare e costruire un organo o un tessuto artificiale che soddisfacesse alle necessità e alle esigenze del singolo individuo e la forma e le dimensioni corrispondessero a quelle dell'organo o del tessuto da sostituire. Infatti, ciò che avviene sempre più spesso è la realizzazione di dispositivi artificiali in serie apportando modifiche alla forma ed alle dimensioni al fine di adattarli alle diverse taglie dei pazienti. Da queste produzioni in serie, sono escluse le protesi dentarie e le correzioni estetiche che sono specifiche per ciascun soggetto.

La molecola di un polimero è costituita dall'unione di un gran numero di unità semplici dette monomeri tramite reazioni di polimerizzazione.

I polimeri possono essere classificati in base ai seguenti criteri:

1. ai meccanismi di polimerizzazione, che si distinguono in poliaddizione (con reazioni a catena) e policondensazione (con meccanismo a stadi);
2. al peso molecolare M , che è definito come il peso molecolare del monomero moltiplicato per il grado di polimerizzazione (definito come il numero di unità monomeriche che costituiscono la macromolecola);
3. alla struttura delle catene, che può essere lineare, ramificata e reticolata;
4. alla cristallinità;
5. alle proprietà termomeccaniche;
6. alle strutture dei copolimeri.

Il meccanismo di poliaddizione è possibile in presenza di doppi e tripli legami tra atomi di carbonio, infatti, i monomeri sono resi attivi dalla rottura dei legami multipli. Tale processo avviene in tre fasi: una d'inizio, una d'accrescimento ed una di terminazione. La reazione è attivata per mezzo di calore, di luce o attraverso una sostanza chimica. Le caratteristiche della poliaddizione sono l'assenza di altri prodotti di reazione, un veloce aumento del peso molecolare e la presenza nel prodotto di reazione di un monomero la cui concentrazione diminuisce progressivamente durante la reazione.

La polimerizzazione per condensazione, invece, avviene quando si ottengono prodotti secondari come acqua, metanolo, cloruro di sodio e acido cloridrico che devono sempre essere eliminati.

I polimeri con catena lineare o ramificata hanno proprietà meccaniche inferiori rispetto ai polimeri reticolati.

Essi sono legati da legami di Van der Waals che consentono lo scorrimento delle catene e caratterizzano il comportamento viscoelastico del materiale. Invece, nei polimeri reticolati la massa del polimero è assimilabile ad una sola macromolecola tridimensionale che ha maggiore rigidità e proprietà meccaniche.

Più macromolecole polimeriche possono formare una struttura simile ad un gomito a più fili. Le proprietà viscoelastiche dei materiali macromolecolari dipendono da questa conformazione, infatti, sono possibili distensioni elastiche di singole macromolecole e scorrimenti viscosi di alcune molecole rispetto alle altre.

I materiali polimerici possono mostrare una certa cristallinità, infatti, sono in grado di disporsi secondo una struttura ordinata in cui una molecola può appartenere a più celle o a più cristalli. Il grado di cristallinità è definito come il rapporto percentuale del peso della sostanza nello stato cristallino rispetto al peso totale e può variare da zero a poche unità: un maggiore grado di cristallinità determina un più grande impacchettamento della macromolecola con conseguente aumento della densità. Si hanno inoltre aumento di rigidità, minore coefficiente d'attrito, migliore resistenza all'usura, maggiore durezza e più grande resistenza al *creep*.

I polimeri sono classificabili in materiali termoplastici e termoindurenti, i primi sono a catena lineare o ramificata e i secondi invece sono a catena reticolata.

Per i materiali amorfi all'aumentare della temperatura si osservano due transizioni corrispondenti a due successivi intervalli di temperatura: la prima in prossimità della temperatura di transizione vetrosa T_g , durante la quale il materiale diventa vetroso o gommoso; la seconda in prossimità della temperatura di rammollimento T_r , separa un polimero gommoso da uno liquido.

Polimeri con una T_g particolarmente bassa si comportano come gomme a temperatura ambiente, hanno modesta rigidità, ma sopportano grandi deformazioni.

Polimeri con T_g elevate sono invece vetrosi, rigidi, fragili e scarsamente deformabili.

Inoltre, in genere i polimeri possono essere costituiti da due o differenti monomeri che conferiscono proprietà diverse e sono detti copolimeri. Questi sono classificabili in copolimeri casuali o random, copolimeri alternati, a segmenti o a blocchi ad innesto.

Nella realizzazione della struttura polimerica di supporto sulla quale si ricreerà il tessuto, risultano fondamentali quattro passaggi:

1. la scelta del polimero;
2. la caratterizzazione del polimero;
3. la tecnica di realizzazione della struttura;
4. lo studio delle interazioni struttura/cellule.

Per la scelta del polimero bisogna soddisfare le seguenti specifiche:

1. biodegradabilità, ossia progettato per essere eliminato dall'organismo tramite i normali processi metabolici senza influire negativamente su di esso;
2. biocompatibilità, ossia rispetto dell'ambiente biologico in cui sarà impiantato, il polimero deve in ogni caso avere una certa *attività* con lo scopo di facilitare l'adesione, la riproduzione ed eventualmente la differenziazione cellulare e in generale l'integrazione totale dell'impianto senza tuttavia innescare una risposta infiammatoria da parte dell'organismo;
3. sia riconosciuto dai recettori cellulari;
4. interagisca con le altre molecole della matrice extracellulare;
5. deve essere metabolizzato per via cellulare;
6. abbia un tempo di degradazione sufficientemente lungo, ma non eccessivo;
7. il materiale non deve essere tossico;
8. proprietà meccaniche, ossia deve avere stabilità meccanica per un tempo adeguato, in modo da mantenere la struttura tridimensionale richiesta per coltivare il tessuto da rigenerare e rendere più semplice l'impianto;
9. riproducibilità, ossia mirando ad un uso clinico diffuso e quindi ad un'industrializzazione del processo, sia il biomateriale sia la struttura devono essere riproducibili con un metodo di realizzazione facilmente controllabile, per evitare che mutazioni o contaminazioni della struttura di supporto causino l'insuccesso della coltura;

10. facilità di sterilizzazione è fondamentale, per evitare contaminazioni e quindi la morte del tessuto coltivato, quindi il materiale deve essere facilmente sterilizzabile ed i processi di sterilizzazione non devono modificare la struttura;

11. proprietà chimico-fisiche adeguate per garantire le funzioni cellulari, (porosità, idrofilicità, area superficiale e carica superficiale).

I polimeri per le strutture di supporto possono essere *sintetici* o *biologici*.

I polimeri *sintetici* più usati in questo settore sono i *biodegradabili*, i quali, sotto l'azione aggressiva dei fluidi interni dell'organismo, si decompongono e vengono riassorbiti. Tuttavia, bisogna valutare attentamente l'eventuale *tossicità dei monomeri* liberati durante la degradazione del materiale ed i tempi di riassorbimento, che devono essere almeno pari a quelli di rigenerazione del tessuto per mantenere le proprietà meccaniche e la struttura nel transitorio.

Generalmente, i polimeri utilizzati sono poliesteri, nei quali l'estere è un legame covalente polare molto reattivo (C-O) che può essere spezzato per idrolisi con formazione di un acido ed un alcol.

I più usati sono l'*acido polilattico (PLA)*, il *policaprolattone (PCL)*, l'*acido poliglicolico (PGA)* e i loro copolimeri.

PLA	PGA	PCL	HYAFF-11
Idrofobico	Idrofobico	Idrofobico	Meno idrofobico
Buone proprietà meccaniche	Degrada lentamente	Ottima permeabilità	Rilascia acido
Si degrada in 4 settimane		Degrada lentamente	ialuronico

Tabella 1 Caratteristiche del PLA, PGA e PCL.

I polimeri *biologici* sono meno resistenti di quelli sintetici, sia dal punto di vista meccanico sia da quello chimico, sono meno stabili e più costosi; costituiscono, però, un terreno ideale per la ricrescita cellulare offrendo maggiori garanzie di atossicità ma anche d'adesione cellulare e quindi di successo. I più usati sono il *collagene*, la *fibrina* e l'*acido ialuronico*.

Tuttavia, i materiali sintetici presentano dei vantaggi rispetto quelli di origine biologica. Infatti, si ha un maggiore controllo sulle proprietà meccaniche ed inoltre quelli biologici possono indurre reazioni immunologiche.

Un approccio ottimale alla scelta del biomateriale adatto all'ingegneria tissutale potrebbe essere l'uso di compositi di due o più polimeri, biologici e sintetici, in modo da ottenere una struttura con le proprietà meccaniche, fisiche, chimiche e biologiche ideali per l'applicazione prevista.

Una volta formulata un'ipotesi sul materiale più adatto, bisogna farne una opportuna *caratterizzazione*, ossia una sperimentazione finalizzata a verificare la conformità della nostra scelta alle *specifiche* iniziali.

Polimeri utilizzati

I polimeri possono essere modellati in forme differenti, come fibre, tessuti, pellicole, barre e liquidi viscosi o possono formare materiali compositi in veste di matrice o di riempitivo.

Di seguito si descriveranno quelli che sono i polimeri maggiormente utilizzati nella tissue engineering:

PGA

L'acido poliglicolico (PGA) è un polimero totalmente riassorbibile sintetico introdotto nel 1960 come filo da sutura (Dexon, Davis and Geck, USA).

Esso è il più semplice lineare poliesteri alifatico. Il monomero glycolide è sintetizzato dalla demineralizzazione dell'acido glicolico.

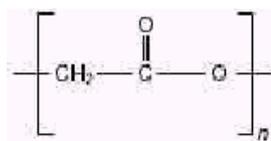


Figura 1. Acido gli colico.

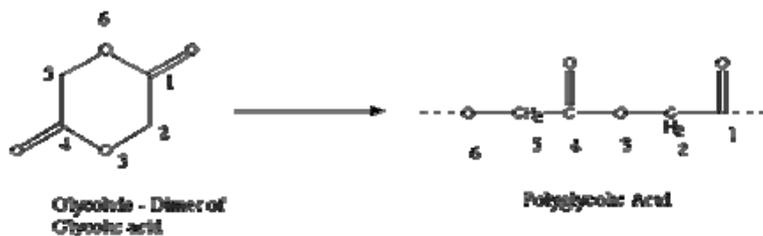


Figura 2. Struttura chimica dell'acido poliglicolico.

Il PGA è altamente cristallino (45-55%) con un'elevata temperatura di fusione (220-225°C) ed una temperatura di transizione vetrosa 35-40°C.

Questo elevato grado di cristallizzazione fa sì che esso non sia solubile in molti solventi organici.

Le fibre di PGA esibiscono uno sforzo a rottura ed un modulo elastico troppo elevati per poter essere usate come fili da sutura. Tali fili da sutura mostrano un decadimento della resistenza a trazione di circa il 50% dopo 2 settimane e del 100% dopo 4.

Spesso il glycolide viene copolimerizzato con altri monomeri in modo da ridurre la rigidità delle risultanti fibre.

Polimero	Temperatura di fusione [°C]	Temperatura di transizione vetrosa [°C]	Modulo [GPa]	Tempo di degradazione [mesi]
PGA	225 - 230	35 - 40	7.0	6 - 12

Tabella 1. Proprietà dell'acido poliglicolico.

PLA

Il PLA o polylactide è preparato dal diestere ciclico dell'acido lattico (lactide) tramite apertura dell'anello come mostrato di seguito

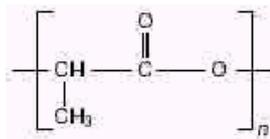


Figura 3. Acido polilattico.

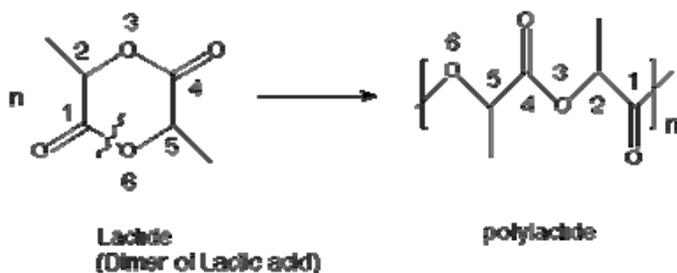


Figura 4. Struttura chimica del PLA.

Esso esiste sotto forma di due isomeri L-lattico (le fibre hanno elevata cristallinità) e DL-lattico (le fibre sono amorfe).

L-lattico cristallino è più resistente alla degradazione idrolitica rispetto all'amorfo DL-lattico. Inoltre il L-PLA viene preferito per le applicazioni meccaniche (come le suture) e per dispositivi ortopedici.

Il PLA è idrofobico, ma meno del PGA, quindi l'idrolisi richiede più tempo.

Il tempo necessario al riassorbimento del poly-L-lactide è relativamente lungo e dipende dalla qualità del polimero, dalle condizioni di processo, dal sito d'inserimento e dalle dimensioni fisiche dell'impianto. Nel caso del poly-L-lactide puro (bone plates) attaccato al femore di una pecora dopo quattro anni si ha una riduzione delle proprietà meccaniche ma con una perdita di massa ridotta.

L'esposizione dell'acido polilattico ai raggi gamma provoca una riduzione del peso molecolare.

Il poly(ethyleneterephthalate) o Dacron (PET), sotto forma di fibre o tessuti viene utilizzato come rinforzo per i polimeri, mimando la struttura del menisco. Tuttavia tali fibre non sono biodegradabili, quindi è necessario cercare delle alternative fra i materiali biodegradabili (ad esempio il PLA). Inoltre, esso si differenzia dalle poliesteri (per le quali le proprietà meccaniche in seguito alla sterilizzazione con raggi gamma decrescono) in quanto resiste ai raggi gamma.

Polymer	Resomer R206	Resomer R208	Resomer L206	Resomer L210
Nature	DL-PLA Amorphous	DL-PLA Amorphous	L-PLA Semicrystalline	L-PLA Semicrystalline
Mn	50,000	136,000	60,000	130,000
Mw	105,000	250,000	120,000	380,000
Mw/Mn	2.1	1.85	2	2.77
Tg (°C)	50	52	51	65
Tm (°C)	—	—	169	171
Crystallinity (%)	0	0	70	70
Inherent Viscosity (dL/g)	1.0	2.0	1.0	3.6

Tabella 2. Proprietà chimico-fisiche del PLA.

PCL

Il poli-ε-caprolattone (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, negli ultimi anni, la *tissue regeneration* per la realizzazione di sistemi sostitutivi del tessuto osseo naturale. Un così ampio e diversificato insieme d'impieghi è legittimato dalle caratteristiche chimiche e fisiche del polimero del tutto particolari accompagnate da acclerate doti di

biocompatibilità, indispensabili per la riuscita della generica applicazione in campo biomedico.

Il poly(ϵ -caprolactone) è un polimero semi-cristallino poliesteri alifatico, sintetico, non tossico, biodegradabile (degrada più lentamente del PGA e PLLA) ed idrofobico. Rispetto ad altre poliesteri, come il PLLA (acido polilattico) e PGA (acido poliglicolico), il PCL manifesta proprietà meccaniche più scadenti.

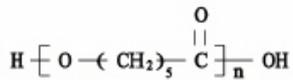


Figura 5. Formula di struttura del PCL.

Esso è sintetizzato dall' ϵ -caprolactone come mostrato di seguito:

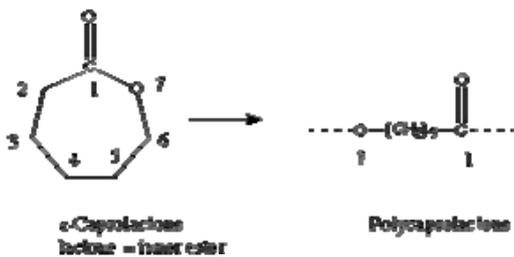


Figura 6. Struttura chimica del PCL.

Da un punto di vista chimico il policaprolattone presenta, nella sua formula chimica, atomi d'ossigeno lungo la catena principale che sono interessati da processi d'idrolisi, il che fa auspicare la possibile degradazione in vivo di tale materiale.

Il PCL è un polimero semi-cristallino ed in vivo viene degradato molto lentamente sia da micro-organismi sia tramite idrolisi e come unico metabolita rilascia l'acido ϵ -hydroxycaproic. Si ha un'idrolisi non-enzimatica dell'estere, seguita dalla frammentazione e dal rilascio di oligomeri. Questi ultimi vengono poi digeriti dai macrofagi.

A supporto di tali considerazioni, alcuni studi hanno dimostrato che a seguito del processo di degradazione in vivo, tale polimero secerne prodotti non tossici facilmente eliminati dall'organismo.

Da un'analisi sperimentale è stato riscontrato, inoltre, che le regioni amorfe risultano essere degradate prima rispetto quelle cristalline.

Il tempo 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, si riduce a poco meno di sei mesi.

La sterilizzazione, generalmente, viene eseguita con ossido d'etilene, il quale, tuttavia, è altamente tossico, oppure tramite irraggiamento con raggi gamma. Questa ultima procedura è spesso sconsigliata in quanto provoca la degradazione del polimero.

Il PCL spesso è utilizzato come copolimero insieme al L-lactide, in modo da modularne le proprietà meccaniche e la velocità di degradazione.

In alternativa, per modulare la velocità di degradazione vengono aggiunti dei plasticizzanti che, tuttavia, alterano le proprietà meccaniche (riduzione della rigidità).

Un aspetto significativo nella scelta di un polimero è la valutazione del peso molecolare che modifica in maniera rilevante le sue proprietà meccaniche.

Nella scelta di un polimero particolare interesse va posto nell'osservare le sue temperature caratteristiche:

- la temperatura di transizione vetrosa (T_g), al di sopra della quale si ha lo scorrimento a corto raggio delle catene polimeriche (per il PCL è di circa -60°C);
- la temperatura di fusione (T_m), oltre la quale si ha lo scorrimento a lungo raggio delle catene polimeriche (per il PCL è compresa tra 58 e 65°C);
- la temperatura di decomposizione (T_d), oltre la quale si ha la decomposizione termica del polimero (per il PCL è di circa 350°C).

Di seguito è riportata una lista parziale di alcuni solventi del PCL:

1. methylene chloride;
2. tetrahydrofuran;
3. ethyl acetate;
4. chloroform;
5. hexafluoroisopropanol;
6. acetone.

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

Esso è un polimero molto versatile in quanto mostra un'elevata propensione a formare miscele compatibili con una grande varietà di polimeri. Infatti, esso viene copolimerizzato facilmente con

monomeri quali l'ossido d'etilene, il cloroprene e il metilmetacrilato al fine di realizzare composti in grado di presentare oltre ai requisiti di biocompatibilità ampiamente documentati in letteratura proprietà meccaniche di una certa entità.

Il principale limite del policaprolattone, infatti, risiede proprio nelle proprietà meccaniche piuttosto esigue (resistenza a compressione pari a 1.58MPa e resistenza a trazione pari a 20.7 - 42MPa).

Proprietà	Condizioni	Valore
Viscosità intrinseca	Diluizione infinita	0.9[cm ³ /g]
Entalpia di polimerizzazione	25°C, 1 atm	-28.8[kJ/mol]
Entropia di polimerizzazione	25°C, 1 atm	-53.9[kJ/mol]
Energia libera di Gibbs	25°C, 1 atm	-12.8[kJ/mol]
Grado di cristallinità	DSC	69 %
Cella unitaria	X ray diffraction	Ortorombica
Numero di coordinazione	--	4
Densità	X ray diffraction	1.094 – 1.200[g/cm ³]
Elongazione	--	700 %
Transizione vetrosa T _g	DSC	201°K
Temperatura di Fusione T _f	DSC	331°K
Calore di fusione ΔH _f	DSC	8.9[kJ/mol]

Tabella 3. Proprietà fisiche salienti del PCL

ACIDO IALURONICO

Aspetti generali

L'acido ialuronico è un polimero d'origine naturale, più precisamente un polisaccaride, isolato per la prima volta nel 1934 da Meyer e Palmer dall'umor vitreo bovino.

L'acido ialuronico è il costituente di tutti tessuti connettivi soffici degli organismi superiori, del liquido sinoviale, della pelle e del cordone ombelicale, sintetizzato da streptococchi.

I tessuti connettivi contengono il 63% d'acqua, il 32% di collagene e l'1% di acido ialuronico. La concentrazione di acido ialuronico, invece, cresce nel caso della pelle e del cordone ombelicale dove si trova con una frazione del 5%.

Da un punto di vista chimico l'acido ialuronico è un polisaccaride lineare composto dall'alternanza di acido D-glucuronico e residui di N-acetilglucosammina legati da legami glicosidici β 1-3 e β 1-4.

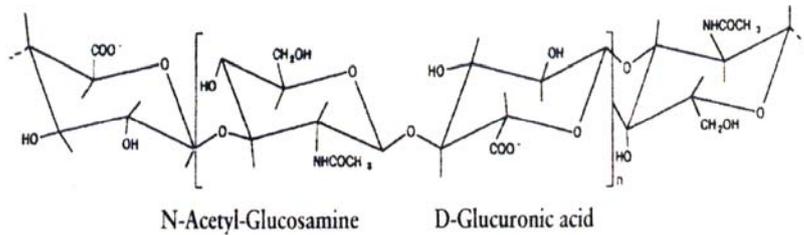


Figura 7. Molecola dell'acido ialuronico.

Può essere naturalmente degradato per ialuronidasi lisosomale: la molecola, quando si degrada per ialuronidasi, lascia tracce di oligosaccaridi che sono successivamente metabolizzati sottoforma di monomeri.

L'acido ialuronico è l'unico polisaccaride che è sintetizzato nella membrana cellulare e poi trasportato nella membrana extracellulare, dove avviene la crescita delle catene, raggiungendo un peso molecolare compreso fra i 3 e i 5×10^5 u.m.a, ma se i tessuti dove esso è contenuto s'infiammano, sia la massa sia la sua concentrazione, diminuiscono.

Una delle principali proprietà di questa sostanza è la sua elevata viscosità, che dipende dal suo grado di polimerizzazione, dalla sua conformazione tridimensionale e dalla sua capacità di legare acqua.

La maggior parte delle cellule del corpo ha la capacità di sintetizzare acido ialuronico durante alcune fasi del loro ciclo vitale. In particolare, esso è sintetizzato dalla membrana cellulare, venendo direttamente espulso nella matrice extra cellulare.

Fin dalla sua scoperta, si è posta l'attenzione sulle possibili applicazioni biomediche dell'acido ialuronico altamente purificato e numerosi studi hanno dimostrato che esso, isolato da varie fonti, ha sempre la stessa struttura.

Grazie alle sue proprietà igroscopiche, reologiche e viscoelastiche, l'acido ialuronico può influenzare le funzioni cellulari modificandone il macro e micro-ambiente circostante, mediante le sue complesse interazioni con le cellule e con gli altri componenti della matrice extracellulare. Inoltre, esso ed i suoi oligosaccaridi possono direttamente influenzare le funzioni cellulari mediante legami con recettori specifici.

Ruolo biologico dell'acido ialuronico

Si è osservato che esso gioca un ruolo vitale in molti processi biologici come l'idratazione dei tessuti, l'organizzazione dei proteoglicani, la differenziazione cellulare e l'angiogenesi. L'acido ialuronico è presente nei tessuti articolari e nel liquido sinoviale dove assicura le normali funzioni reologiche, da tale punto di vista, la sua forma idratata, ha un comportamento viscoelastico non-newtoniano, anche se esso (tale comportamento) può variare al variare del peso molecolare.

1. Sviluppo: esso si trova in abbondanza nel tessuto embrionico dove influenza la differenziazione cellulare e facilita la proliferazione cellulare (acido ialuronico a basso peso molecolare)[51,54].
2. Comportamento cellulare: influenza molti aspetti della vita cellulare quali la mobilità, la fagocitosi, l'adesione ed il distacco.
3. Funzione strutturale: rappresenta l'elemento principale dei proteoglicani. Esso forma anche associazioni con collagene, fibrina ed altre molecole della matrice extracellulare. La risposta iniziale ad un danno tissutale prevede la formazione di una matrice temporanea estremamente ricca in acido ialuronico e fibrina, che supporta la migrazione di fibroblasti e cellule endoteliali nell'area della lesione. Sia che l'acido ialuronico sia legato a cellule o a componenti della matrice extracellulare, la sua natura idrofilica crea un ambiente favorevole alla migrazione delle cellule.
4. Angiogenesi¹⁴: è stato dimostrato che l'acido ialuronico ad alto peso molecolare ha un'attività inibitoria sull'angiogenesi. D'altra parte, gli oligosaccaridi dell'acido ialuronico a basso peso molecolare hanno dimostrato un notevole effetto angiogenetico in una serie di modelli sperimentali, oltre a stimolare la produzione di collagene da parte delle cellule endoteliali. Gli oligosaccaridi dell'acido ialuronico possono influenzare la funzione delle cellule endoteliali [54].

¹⁴ Processo tramite il quale si forma una rete di vasi sanguigni.

Metabolismo dell'acido ialuronico

La degradazione dell'acido ialuronico avviene mediante tre enzimi: ialuronidasi, β -D-glucuronidasi e β -N-acetil-esosaminidasi. Di questi il primo ricopre un ruolo maggiore, poiché regola la velocità di reazione e l'attacco degli altri due enzimi. I prodotti finali della degradazione sono l'acido D-glucuronico e del N-acetil-glucosamina. In seguito, l'acido glucuronico viene convertito in pentosio, mentre l'N-acetil-glucosamina può essere riusato per la sintesi di nuovi glicoconjugati o convertito in fruttosio.

Ruolo nella riparazione tissutale

Molti dei processi biologici mediati dall'acido ialuronico sono fondamentali nella riparazione tissutale e nella guarigione delle ferite. I tessuti in rigenerazione sono ricchi in acido ialuronico. L'acido ialuronico contribuisce ad una grande varietà di funzioni cellulari essenziali per la riparazione dei tessuti: la risposta all'infiammazione, la migrazione cellulare, la proliferazione cellulare e l'organizzazione della matrice extracellulare.

L'acido ialuronico ha sicuramente un ruolo molteplice nella mediazione dei processi che portano alla riparazione tissutale. Una delle sue caratteristiche più peculiari è che le sue funzioni biologiche possano essere attribuite sia alle sue caratteristiche fisico-chimiche che a interazioni specifiche con le cellule e con la matrice extracellulare. Durante gli ultimi anni, l'uso di questo polisaccaride nella forma altamente purificata è diventata pratica corrente nella medicina; esempi d'applicazioni con buoni risultati sono: il trapianto corneale, il trattamento della cataratta, quello delle malattie vitroretiniche e la perforazione del timpano. Gli effetti migliori si evidenziano nell'eccellente cicatrizzazione del tessuto danneggiato.

L'acido ialuronico potrebbe certamente trovare maggiori campi d'applicazione in medicina se non fosse per le sue caratteristiche fisiche e biologiche. Infatti, esso nella relativa forma purificata, ha una buona solubilità in acqua, è velocemente riassorbito e rimane relativamente poco tempo sul tessuto da curare. Per questo motivo, sono stati fatti parecchi tentativi con lo scopo di ottenere una struttura solida più stabile; senza modificare quelle che sono le sue proprietà di materiale inerte (che non genera nessuna risposta infiammatoria).

Per migliorare la stabilità di questo polimero si ricorre ad una esterificazione¹⁵, con tipi differenti di alcool, del gruppo carbossilico libero dell'acido glucuronico (che si trova lungo la catena dell'acido

¹⁵ Gli acidi carbossilici reagiscono con gli alcoli per dare gli esteri; questa reazione di condensazione è nota come "esterificazione".

ialuronico). Il polimero così ottenuto viene denominato HYAFF. Questa modifica chimica comporta una diminuzione dei gruppi idrofili e un aumento dei componenti idrofobi. Una vasta varietà di polimeri con differenti proprietà chimico-fisiche può essere generata cambiando il tipo di gruppo introdotto nell'esterificazione (derivante dall'alcol che si usa) o il limite dell'esterificazione (percentuale dei gruppi carbossilici esterificati). In questo modo, di conseguenza, risulta alterato anche il processo di degradazione e conseguentemente il tempo impiegato per degradare.

Anche se l'HA è ampiamente adoperato in molti differenti campi, il suo utilizzo è tuttavia limitato dal fatto che lo ialurone non modificato esiste soltanto sottoforma d'idrogel ed ha un tempo di residenza basso. Si è, quindi, cercato un suo derivato che mantenga la biocompatibilità della molecola originaria ma che ne alteri le caratteristiche in modo da poter estendere il range d'applicazioni biomediche riguardanti soprattutto processi di riparazione tissutale.

ESTERE DELL'ACIDO IALURONICO (HYAFF)

Le reazioni chimiche sfruttate al momento per realizzare una forma modificata e stabile dell'acido ialuronico sono di due tipi: reazioni di crosslinking e di coupling.

Nella maggior parte dei casi, il sistema adoperato è quello del crosslinking per alterare le proprietà chimico-fisiche, mentre il coupling è preferito quando è necessario alterare le caratteristiche biologiche.

Esiste, però, una particolare tecnologia d'esterificazione che permette di modificare le proprietà chimico-fisiche dell'acido ialuronico attraverso le reazioni di coupling.

Le reazioni di crosslinking favoriscono la creazione di un reticolato tra le catene polimeriche attraverso la formazione di ponti atomici, o, alternativamente, attraverso la condensazione di specifici gruppi funzionali dell'acido ialuronico. Alcuni aspetti fondamentali come il profilo viscoelastico e le proprietà di gelificazione possono essere migliorati attraverso questo tipo di reazioni.

Se paragonate all'acido ialuronico non modificato, le molecole così sintetizzate mostrano un tempo di permanenza nel corpo maggiore e questo permette un'estensione delle applicazioni biomediche.

Le reazioni di crosslinking differiscono le une dalle altre per il tipo di agente adoperato che può essere di varia natura (catena lineare o aromatica, reattività, etc.).

Le reazioni di coupling apportano modifiche di specifici gruppi funzionali (COO-, -OH, -NHCOCH₃) che hanno, come risultato, due effetti in particolare:

1. significative alterazioni delle proprietà biologiche del materiale di partenza;

- nel caso d'esterificazione con particolari gruppi funzionali, fondamentali alterazioni delle proprietà chimico-fisiche del polimero.

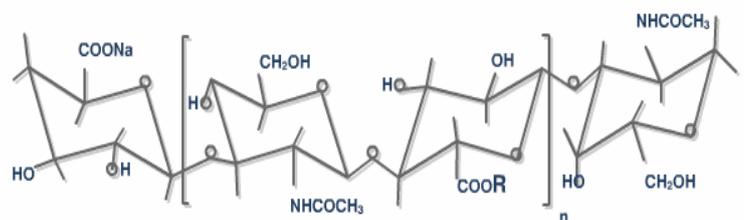
Mediante le reazioni d'esterificazione del gruppo carbossilico dell'acido ialuronico grazie all'utilizzo di vari alcool (aromatici, lineari, cicloalifatici ed eterociclici) terapeuticamente attivi ed inattivi, si ottengono una serie d'idrogeli.

Tali reazioni consentono l'attaccamento di alcoli aromatici o lineari o di alcoli attivi a livello farmaceutico come corticosteroidi.

Questi derivati semi-sintetici, HYAFF (FIDIA Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy), hanno proprietà chimico-fisiche sensibilmente differenti da quelle di acido ialuronico di partenza, variando a seconda dell'alcool usato e del grado d'esterificazione. In questo modo possiamo combinare le caratteristiche positive del materiale di partenza con quelle ottenute in base allo specifico processo impiegato.

La sintesi dell'HYAFF si ha a partire da acido ialuronico altamente purificato, ottenuto dalla cresta del gallo, con un meccanismo a due stadi:

- preparazione di un sale ammonio quaternario dell'acido ialuronico;
- reazione con un agente esterificante in un solvente aprotico a temperatura controllata.



R = H

acido ialuronico

R = CH₂ - CH₃

estere etilico (HYAFF-7)

R = (CH₂)₁₁ - CH₃

estere dodecilico (HYAFF-73)

R =

estere benzilico (HYAFF-11)

R = + (CH₂)₁₁ - CH₃

HYAFF-11 dodecilico

R = + (CH₂)₁₅ - CH₃

HYAFF-11 esadodecilico

Figura 8. Struttura degli esteri dell'acido ialuronico.

La reazione procede attraverso un meccanismo di sostituzione nucleofila al carbonio acilico (si forma un legame covalente tra l'acido ialuronico e il gruppo alchilico, liberando un sale quaternario ed uno ione alogeno). La velocità di reazione dipende dal tipo di alcool usato, dalla temperatura e dal solvente impiegato.

Gli alcoli usati in questa reazione possono appartenere a varie classi (alifatici, ciclici, aromatici, etc.), ottenendo la sintesi di diversi tipi di HYAFF che manifestano differenti proprietà chimico-fisiche; inoltre va notato che le proprietà chimico-fisiche dipendono anche dal grado d'esterificazione. Si è visto, infatti, che aumentando il grado d'esterificazione diminuisce la solubilità in acqua¹⁶, con un'esterificazione del 25% tutti gli HYAFF sono solubili in acqua; inoltre la solubilità varia anche a seconda dell'alcool usato, in particolare si è visto che l'HYAFF-7 (alcool etilico) è più solubile dell'HYAFF-11 (alcool benzilico).

La capacità di riassorbimento dei biomateriali a base di HYAFF è dipendente dal tipo d'estere e dal grado d'esterificazione.

La parziale esterificazione è anche causa di una minore o maggiore predisposizione all'assorbimento d'acqua in funzione dell'impacchettamento molecolare. La reazione d'esterificazione è stechiometrica ed il grado d'esterificazione (che può andare da 0 a 100 in percentuale) dipende dalla quantità d'agenti alchilanti aggiunta ed è dato dal rapporto del numero di gruppi carbossilici reagiti rispetto a quello non reagito.

Alla fine del processo, i gruppi carbossilici non reattivi sono presenti come sale sodio.

Gli esteri derivanti sono denominati con la sigla HYAFF seguita da un'estensione che identifica il tipo d'estere ed il grado d'esterificazione e differiscono tra loro per il sostituente del gruppo carbossilico del monomero n-simo.

L'estere dell'acido ialuronico può essere facilmente processato per estrusione in solventi organici per produrre fibre o sottili membrane, può essere liofilizzata per ottenere spugne, o essere trattata con processi d'essiccamento, estrazione ed evaporazione per produrre microsfele degradabili in qualche settimana; inoltre, le fibre di HYAFF possono essere prodotte in forma: di garze, di corde o di materiali non tessuti (strutturati). Inoltre, il loro utilizzo consente di creare, per un tempo rilevante, un ambiente intercellulare ricco di acido ialuronico.

¹⁶ Provato con alcool etilici, benzilici e propilici ma si pensa che valga per tutti gli alcoli che presentano una catena idrofoba.

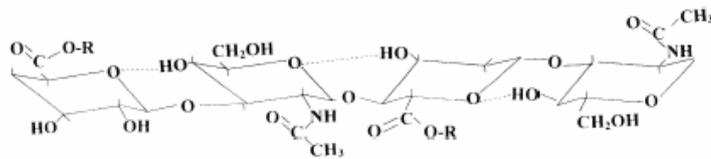


Figura 9. Struttura di un estere dell'acido ialuronico. Se R è alcool benzilico, si ha l'HYAFF-11.

Tra i molteplici tipi, per questo lavoro è stato utilizzato l'HYAFF-11. Esso è ottenuto dalla completa esterificazione dell'acido ialuronico da parte di gruppi benzilici. Il grado d'esterificazione determina la solubilità in acqua del polimero, nel senso che un'esterificazione più spinta produce un gel meno solubile e quindi l'HYAFF-11 è completamente insolubile in acqua.

Sull'HYAFF-11 sono state condotte analisi termiche in modo da caratterizzare la composizione chimica del materiale. La stabilità termica di un campione e del suo contenuto d'acqua sono valutati attraverso la DSC (differential scanning calorimetry) e la TGA (thermogravimetry analysis): i termogrammi ottenuti con la DSC mostrano un picco endotermico a 90°C associato alla perdita d'acqua, l'area del picco dipende dalla quantità d'acqua contenuta nel campione che è determinata dalla TGA ed è pari al 3.1%.

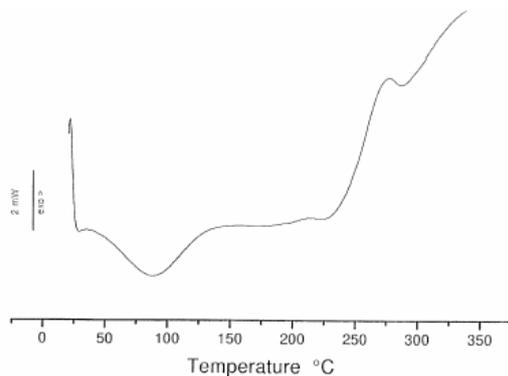


Figura 10. Diagramma DSC dell'HYAFF-11.

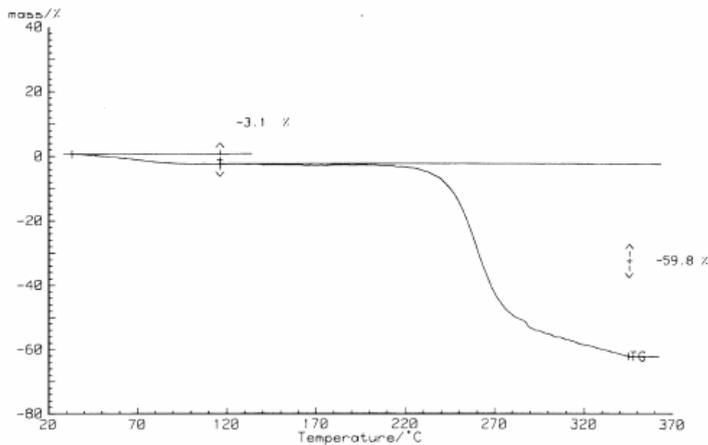


Fig. 3. Thermogravimetric analysis.

Figura 11. Diagramma TGA dell'HYAFF-11.

Ad alte temperature (240°C), si osserva un comportamento esotermico con un'entalpia di 140.4J/g dovuto alla degradazione del campione come confermato anche dalla perdita di peso mostrata dalla curva termogravimetrica. Inoltre, nel range di scansione non si osserva nessuna temperatura di transizione vetrosa.

Degradazione

La via metabolica attraverso cui avviene la degradazione dell'HYAFF è stata studiata sia in vitro che in vivo. E' stato dimostrato che la degradazione avviene attraverso un meccanismo in due tempi, con la seguente sequenza d'eventi:

1. Liberazione di alcol benzilico (HYAFF-11)
2. Liberazione di acido ialuronico solubile

Queste due molecole, una volta liberate nel tessuto, vanno incontro a due distinte vie di degradazione.

L'alcol benzilico viene ossidato nel fegato ad acido benzoico e poi coniugato con glicina per produrre acido ippurico, che viene escreto nelle urine.

L'acido ialuronico viene dapprima degradato per via enzimatica grazie a specifici enzimi per la degradazione dell'acido ialuronico. 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 e vengono degradati a livello epatico in acqua ed anidride carbonica. In vitro si è osservato

che mentre l'HYAFF-11 p75¹⁷ spontaneamente in 1-2 settimane, ci vuole circa un mese per l'HYAFF-11 p100¹⁸, ciò dimostra che i gruppi introdotti con l'esterificazione proteggono l'acido ialuronico dalla degradazione.

Dagli studi eseguiti risulta che l'HYAFF-11 è biologicamente sicuro (la valutazione della citotossicità indica piccoli o non significativi effetti sulle cellule) ed ha effetti positivi sul comportamento delle cellule. Quanto detto ed il fatto che esso sia biodegradabile (con tempi in parte controllabili), lo rende molto interessante nel campo della riparazione e ricostruzione dei tessuti.

Studi specifici sulla biodegradazione dell'HYAFF in vivo, dopo impianto sottocutaneo, intraperitoneale e dorso-lombare hanno notato 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 indicano che il primo step del processo di degradazione di HYAFF-11 è il rilascio di alcol benzilico.

L'HYAFF-11 p75 HE è quello che degrada più velocemente poi c'è l'HYAFF-7 ed infine l'HYAFF-11; i tempi di degradazione, inoltre, sono influenzati dalla conformazione fisica del prodotto e dal posto in cui questo viene impiantato.

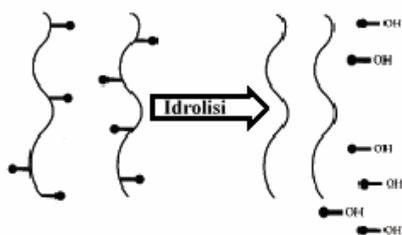


Figura 12. Degradazione dell'HYAFF-11 per idrolisi.

¹⁷ HYAFF11 con un grado di esterificazione del 75%

¹⁸ HYAFF11 con un grado di esterificazione del 100%

PREPARAZIONE DEI SUBSTRATI

Realizzazione degli scaffold

I materiali che si intendono usare per la realizzazione degli scaffold sono HYAFF11, che essendo un estere dell'acido ialuronico manifesta buone proprietà di interazione biologica, e il PCL che ha migliori proprietà meccaniche e tempi di degradazione più lunghi.

Nella prima fase del progetto, nella realizzazione degli scaffold per la ricostruzione del menisco, sono stati usati i seguenti materiali:

1. HYAFF-11 p100, ossia l'estere dell'acido ialuronico ottenuto dalla reazione con l'alcool benzilico, ma con un grado d'esterificazione del 100%;
2. Policaprolattone (PCL), poliesteri alifatici (peso molecolare 65.000uma);
3. Polietilenglicole 400 (PEG), usato come plasticizzante della matrice.

La tecnica utilizzata per realizzare tali strutture è il "solvent casting con salt leaching". Si parte da una miscela di HYAFF-11 e PCL nel rapporto in peso voluto. Tale miscela viene sciolta in dimetilsolfossido (DMSO). L'HYAFF-11 si solubilizza bene in DMSO, anche a temperatura ambiente. Il PCL, invece, nelle stesse condizioni (stesso solvente e temperatura) non viene solvatato e quindi è necessario incrementare la temperatura. Per questo motivo, il sistema costituito dai polimeri ed il solvente è stato posto su un agitatore magnetico che consente di mantenere in agitazione la miscela (nella provetta, insieme alla miscela è presente anche un magnete) ed anche di controllare la temperatura grazie ad una resistenza elettrica.

Per questo motivo, durante la miscelazione, si procede a temperatura ambiente se si prepara un substrato di solo HYAFF-11, mentre se è presente anche il PCL si opera ad una temperatura di circa 50°C.

Dopo un tempo variabile da alcune ore ad un giorno, dipendente dalla temperatura raggiunta nella fase di miscelazione e dalla composizione della miscela di partenza, si raggiunge la completa solubilizzazione dei componenti.

La soluzione così ottenuta, a questo punto, viene miscelata con un'opportuna quantità di sale (NaCl). Il sale è stato preventivamente setacciato in modo da avere un certo range di dimensione dei grani. In particolare si usano grani di sale le cui dimensioni cadono nel range di 212-300µm oppure in quello di 300-500µm.

Quando il sale e la soluzione risultano ben omogeneizzati, si versa l'impasto così ottenuto in appositi stampi di varia forma e dimensione. Tale fase risulta influenzata dalla quantità di sale aggiunta e dalla dimensione dei grani. Infatti, riducendo la quantità di sale, il sistema si presenta più fluido e quindi risulta più facile la sua sistemazione negli stampi.

Una volta colato l'impasto nello stampo, si procede all'allontanamento prima del solvente e poi del sale (senza rimuovere i provini dallo stampo).

Gli stampi sono stati prima immersi in una soluzione di alcool etilico¹ e PEG in modo da rimuovere il DMSO. La soluzione di alcool etilico e PEG è stata cambiata tutti i giorni per circa una settimana. Il PEG è stato introdotto come plasticizzante. Successivamente, si procede all'eliminazione del sale immergendo gli stampi in una soluzione di acqua bidistillata e PEG, anche in questo caso cambiando la soluzione ogni giorno per una settimana.

A questo punto i provini sono stati rimossi dagli stampi mostrando solo un piccolissimo ritiro strutturale trascurabile ai fini del progetto del substrato. Lo step finale del processo consiste nella rimozione dell'acqua.

Per far ciò si è ricorso a due metodi:

1. essiccazione, ponendo gli scaffold in una stufa a vuoto alla temperatura di circa 37°C per circa un giorno, per permettere l'evaporazione dell'acqua;
2. liofilizzazione, ossia congelare le strutture, ponendole nel congelatore Thermo Forma -86C ULT Freezer alla temperatura di -80°C per circa cinque ore e poi metterle sotto vuoto, in modo da far sublimare il ghiaccio.

Inizialmente è stato usato il processo d'essiccazione, tuttavia spesso le strutture collassano durante la rimozione dell'acqua, con conseguente riduzione della porosità, rendendo i substrati inutilizzabili. Per ovviare a questo inconveniente si è pensato di adottare il metodo della liofilizzazione. Con questa tecnica si riesce a bloccare la struttura e ad evitare il collassamento strutturale.

Il substrato risulta così pronto per essere sterilizzato e quindi usato per la coltura cellulare (in vitro e in vivo).

Tuttavia, con il processo di produzione descritto finora si sono presentate una serie di problematiche. Inoltre, le strutture realizzate, nonostante presentino una buona biocompatibilità, non hanno le necessarie proprietà meccaniche.

Di seguito è riportato un elenco delle problematiche riscontrate nella preparazione degli scaffold:

1. rimuovere l'acqua senza provocare il collasso della struttura;
2. impedire la formazione dello strato superficiale compatto;

¹ L'alcool etilico favorisce l'allontanamento del DMSO.

3. i pori devono essere interconnessi;
4. mantenere il PCL in soluzione nel DMSO anche a temperatura ambiente;
5. ridurre la fragilità degli scaffold HYAFF/PCL;
6. migliorare le proprietà meccaniche, soprattutto l'elasticità;
7. rinforzare i meniscus device nella direzione circonferenziale senza provocare la delaminazione della struttura (l'interposizione del tessuto provoca una discontinuità nella struttura che, insieme alle sollecitazioni meccaniche agenti dopo la suturazione, provoca la delaminazione).

Il primo problema incontrato è stato l'individuazione dei solventi utilizzabili per entrambi i polimeri, sapendo che per l'HYAFF-11 i principali solventi sono l'etanolo (EtOH) ed il DMSO, dove quest'ultimo è un solvente anche per il PCL.

Tuttavia, aumentando la concentrazione del policaprolattone in modo da incrementare le proprietà meccaniche, a temperatura ambiente, esso tende a precipitare. Per questo motivo è stata effettuata una ricerca d'altri solventi o miscele di solventi che co-solubilizzino a temperatura ambiente entrambi i polimeri (in modo da non avere una precipitazione frazionata), che non solubilizzino l'agente poroforo, che non rendano la viscosità della soluzione troppo bassa e che non inibiscano la coesività della soluzione verso i sali.

Oltre alla ricerca di solventi sono stati ricercati anche eventuali sali cosolubilizzanti.

Probabili cause della precipitazione dei prodotti in fase di miscela sono:

1. la temperatura troppo bassa;
2. il rapporto PCL/HYAFF-11;
3. l'assorbimento d'umidità;
4. la diminuzione della concentrazione di DMSO.

Inoltre, è molto importante stabilire il rapporto PCL/HYAFF-11 più opportuno: troppo HYAFF-11 riduce le proprietà meccaniche del composto, mentre troppo PCL abbatte la fisiologia dell'HYAFF-11.

Successivamente sono state realizzate delle strutture partendo da soluzioni in cui l'HYAFF-11 è in fase eterogenea. Per questo scopo si è preferito lavorare, anziché con l'HYAFF-11 p100, con l'HYAFF-11 p75 HE che è meno idrofobo.

Poiché la velocità di degradazione dell'HYAFF-11 p75 HE è maggiore di quello dell'HYAFF-11 p100, per modulare tale proprietà sono state realizzate anche strutture con un quantitativo di HYAFF-11 suddiviso equamente fra l'HYAFF-11 p75 HE e l'HYAFF-11 p100.

Per avere i due (PCL – HYAFF-11 p75 HE) o tre polimeri (PCL - HYAFF-11 p75 HE – HYAFF-11 p100) in fase eterogenea, il primo problema affrontato è stato l'individuazione di un solvente o di una miscela di solventi che soddisfi i seguenti requisiti:

1. deve solubilizzare il PCL;
2. non deve solubilizzare l'HYAFF-11;
3. non deve rendere la viscosità della soluzione troppo bassa ed inibire la coesività della soluzione verso i sali;
4. non deve solubilizzare i tre sali utilizzati (cloruro di sodio, bicarbonato ed acido citrico);
5. non deve solubilizzare le fibre impiegate per rinforzare la struttura;
6. il quantitativo d'etanolo usato per impedire la solubilizzazione delle fibre di PLA nella miscela THF(tetraidrofurano)-DMSO non deve impedire la stratificazione.

Inoltre è necessario:

1. ridurre il rapporto tra i polimeri e l'agente poroforo (sale);
2. considerare la sottrazione di una minima percentuale della miscela di solventi da parte del sale e dell'HYAFF-11;
3. determinare il rapporto PCL/HYAFF-11 ottimale;
4. aumentare l'elasticità a compressione della struttura;
5. incrementare la resistenza a trazione;
6. migliorare la saturabilità;
7. determinare la concentrazione ottimale: troppo bassa fa perdere coesività in fase di preparazione della pasta;
8. che i pori siano interconnessi;
9. prestare attenzione ai lavaggi, in quanto la struttura si disgrega se posta subito in acqua;
10. rimuovere l'acqua.

Per risolvere i problemi elencati sia per il blending chimico sia per la fase eterogenea sono state seguite diverse strade.

Nel primo caso, il nostro primo obiettivo è stato innanzitutto riuscire a mantenere il PCL e l'HYAFF-11 in soluzione a temperatura ambiente, senza avere la precipitazione separata dei due polimeri (HYAFF-11 e PCL). Per far ciò sono stati analizzati possibili solventi o miscele di solventi per entrambi i polimeri ed il loro comportamento con l'aggiunta di sali co-solubilizzanti.

Tra i solventi si è scelto di utilizzare il THF in quanto molto volatile e miscibile in acqua e di conseguenza facilmente rimovibile tramite i lavaggi. Esso, tuttavia, contiene sostanze stabilizzanti che potrebbero restare intrappolate nella struttura e non è noto l'effetto che queste potrebbero avere sulle colture cellulari.

L'altro problema consiste nell'ottenere uno scaffold con un'elevata porosità. Affinché i pori siano interconnessi è necessario utilizzare alte percentuali di sale in modo da lavorare a confluenza, ma ciò comporta il decremento delle proprietà meccaniche delle strutture. Tuttavia, è possibile risolvere il problema utilizzando una percentuale di NaCl minore, sfruttando lo sviluppo di anidride carbonica tramite la reazione chimica del bicarbonato di sodio con l'acido citrico. In questo modo le pareti dei pori risultano più spesse e l'anidride carbonica interconnette i pori aprendo le pareti. Per questo motivo viene utilizzata una miscela di sali che in contatto con l'acqua genera anidride carbonica. Tale miscela è costituita da cloruro di sodio, bicarbonato di sodio con un'opportuna granulometria ed acido citrico.

Per sfruttare al meglio le proprietà meccaniche del policaprolattone mantenendo la presenza dell'HYAFF-11 sono state realizzate delle strutture in fase eterogenea.

Partendo dalle conoscenze acquisite sull'HYAFF-11, nella realizzazione dei campioni è stato utilizzato l'HYAFF-11 p75 HE, il quale è meno idrofobico dell'HYAFF-11 p100, da luogo alla formazione di scaffold più elastici a compressione ed inoltre degradando incrementa sempre più la porosità

In questa seconda fase del progetto, nella realizzazione di scaffold per la ricostruzione del menisco sono stati usati i seguenti materiali:

1. HYAFF-11 p100, ossia l'estere dell'acido ialuronico ottenuto dalla reazione con l'alcool benzilico, ma con un grado d'esterificazione del 100%;
2. HYAFF-11 p75 HE ossia sempre un estere benzilico dell'acido ialuronico, ma con un grado d'esterificazione del 75%;
3. Policaprolattone (PCL) con peso molecolare 65.000uma;
4. polilattico (PLA) sotto forma di fibre e rete;

Anche per tali strutture la tecnica utilizzata è il "solvent casting con salt leaching". I polimeri vengono sciolti in una miscela di solventi tale da solvare i componenti a temperatura ambiente. Il sistema costituito dai polimeri e dai solventi è stato posto in una provetta e messo in agitazione mediante una pala elicoidale, fornendo calore per accelerare la solubilizzazione.

Nel caso del blending chimico, anche in questa fase, si parte da una miscela di HYAFF-11 p100 e PCL nel rapporto in peso voluto.

Successivamente, la soluzione ottenuta viene miscelata con un'opportuna quantità di sali (NaCl, NaHCO₃ e acido citrico) con una prestabilita granulometria. I sali sono stati preventivamente setacciati in modo da avere un certo range di dimensione dei grani. In particolare si usano grani di sale le cui dimensioni giungono fino a 400µm.

Quando il sale e la soluzione risultano ben omogeneizzati, si procede a versare l'impasto così ottenuto in appositi stampi di varia forma e dimensione. Tale fase risulta influenzata dalla quantità di sale aggiunta e dalla dimensione dei grani. Infatti, riducendo la quantità di sale, il sistema si presenta più fluido e quindi risulta più facile la sua sistemazione negli stampi. Una volta colato l'impasto nello stampo, si procede alla rimozione sia del solvente sia del sale.

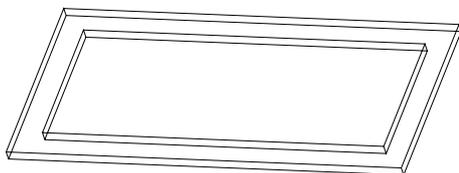


Figura 1 Stampo a porta diapositiva di dimensioni 150x50x5mm.

I lavaggi sono stati effettuati in acqua distillata cambiandola quotidianamente per circa una settimana.

Lo step finale del processo consiste nella rimozione dell'acqua. Ciò è stato ottenuto liofilizzando le strutture. Successivamente, alcune strutture sono state sterilizzate mediante raggi gamma.

Con tale tecnica sono state realizzate le tipologie di substrati riportate di seguito.

Le strutture prodotte si differenziano per la procedura, le quantità relative dei singoli componenti ed anche per il tipo di rinforzo introdotto. Sono state realizzate differenti tipologie di scaffold riportate di seguito:

- 1) BC PCL/HYAFF-11 65/35;
- 2) BC PCL/HYAFF-11 70/30;
- 3) BF-1 (PCL/HYAFF-11 p75 HE 70/30) ed una concentrazione di PCL di 500mg/ml;
- 4) BF-2 (PCL/HYAFF-11 p75 HE 80/20);
- 5) BF-2 CO-PP (PCL/HYAFF-11 p75 HE 80/20 con fibre di polypropylene);
- 6) BF-1 CO-PLA (PCL/HYAFF-11 p75 HE 70/30 con fibre di polylactic);
- 7) BF-2 con il 29% di etanolo (EtOH);
- 8) BF-3 (80% di PCL, 10% di HYAFF-11 p100 e 10% di HYAFF-11 p75 HE);
- 9) BF-2 con il 9.8% di EtOH;
- 10) BF-1 (PCL/HYAFF-11 p75 HE 70/30) ed una concentrazione di PCL di 294mg/ml;
- 11) BF-4 (70% di PCL, 15% di HYAFF-11 p100 e 15% di HYAFF-11 p75 HE);
- 12) BF-1 CO-PLA con 9.8% di EtOH;
- 13) BF-1 CO-PET (PCL/HYAFF-11 p75 HE 70/30 con fibre di PET).

1) Gli scaffold BC PCL/HYAFF-11 65/35 sono stati ottenuti miscelando una soluzione di PCL con una di HYAFF-11 p100 ed una miscela di sali (93.8% di NaCl con granulometria $212\div 300\mu\text{m}$, 3.5% di NaHCO_3 con granulometria $140\div 400\mu\text{m}$ e 2.7% di acido citrico con granulometria inferiore a $200\mu\text{m}$), con un rapporto in peso di 65/35 per i polimeri e di 0.13 per i polimeri ed i sali.

Il PCL è stato solubilizzato con una miscela di solventi costituita dal THF (tetrahydrofuran) e dal DMSO (dimethylsulfoxide) in rapporto 50/50, ottenendo una soluzione con una concentrazione di 500mg/ml, mentre l'HYAFF-11 p100 è stato disciolto tramite DMSO, ottenendo una soluzione con una concentrazione di 180mg/ml.

La miscelazione è avvenuta in controllo di temperatura a circa 50°C , in modo da accelerare la solubilizzazione ed evitare la precipitazione dei polimeri. Il mescolamento è stato eseguito in un mescolatore meccanico, mantenendo una temperatura di circa 50°C . Successivamente, l'impasto così preparato è stato posto in uno stampo di dimensioni interne $150\times 50\times 5\text{mm}$.

Le strutture realizzate sono state immediatamente poste in una soluzione etanolo/acqua 70/30 per circa 5 giorni per rimuovere i solventi, il NaCl ed attivare la reazione fra il NaHCO_3 e l'acido citrico con produzione d'anidride carbonica e conseguente aumento della porosità e dell'interconnessione. Infine, per essiccare gli scaffold, questi sono stati liofilizzati con un liofilizzatore Edwards.

2) Gli scaffold BC PCL/HYAFF-11 70/30 sono stati ottenuti seguendo la stessa procedura descritta in precedenza con un rapporto PCL/HYAFF-11 di 70/30 ed una temperatura di circa 45°C .

3) I BF-1 sono stati ricavati miscelando in un mescolatore meccanico la soluzione di PCL con la polvere di HYAFF-11 p75 HE con un rapporto PCL/HYAFF-11 p75 HE 70/30 ed una miscela sali con una composizione identica a quella usata per gli scaffold descritti prima. Il rapporto fra i polimeri ed i sali è di 1/10. Il PCL è stato solubilizzato in una soluzione di THF/DMSO 80/20, con una concentrazione di PCL di 500mg/ml, mantenendo una temperatura di 45°C per accelerare la solvatazione. L'HYAFF-11 p75 HE è presente in fase eterogenea, in quanto insolubile nella soluzione THF/DMSO. La stratificazione è avvenuta in uno stampo di dimensioni $150\times 50\times 5\text{mm}$.

Successivamente, prima di porre le strutture in acqua distillata, queste sono state lasciate per circa 24 ore in aria. Dopo un giorno dall'immissione in acqua, gli scaffold sono stati trattati termicamente riscaldando l'acqua fino a 40°C per 5 ore. I campioni sono stati ulteriormente lavati per altri 5 giorni cambiando l'acqua quotidianamente e poi sono stati immersi in una soluzione EtOH/acqua 70/30 per ridurre la carica batterica. Infine, sono stati effettuati dei lavaggi in acqua per rimuovere l'etanolo prima di procedere alla liofilizzazione ed alla successiva sterilizzazione con raggi γ (2.5 Mrad).

4) Gli scaffold BF2 sono stati ottenuti allo stesso modo del BF-1 ma con un rapporto PCL/HYAFF-11 p75 HE 80/20. I restanti parametri (miscela di solventi, percentuale di sali, procedura di preparazione, stratificazione, lavaggio, essiccazione e sterilizzazione) sono i medesimi descritti al punto 3.

5) I BF2 CO-PP sono stati ottenuti con le stesse percentuali e metodologia delle strutture BF2, con il 4% in peso di fibre di PP 2.2dTex lunghe circa 4cm disperse. Le successive fasi di lavaggio, essiccazione e sterilizzazione sono identiche a quelle descritte al punto 3.

6) Gli scaffold BF-1 CO-PLA sono stati ottenuti allo stesso modo del BF-1 con il 5% in peso di fibre di PLA 75dTex lunghe circa 2cm. Per evitare la solubilizzazione delle fibre, essendo queste solubili nel sistema THF-DMSO, è stato aggiunto il 29.4% di EtOH alla miscela di solventi (51% di THF, 19.6% di DMSO e 29.4% di EtOH). L'etanolo inibisce la solubilizzazione del PLA, anche se in questo modo abbiamo difficoltà nella fase di stratificazione in quanto il tempo di coagulo è sensibilmente ridotto. Le successive fasi di lavaggio, essiccazione e sterilizzazione sono identiche a quelle descritte al punto 3.

7) Sono state realizzate anche delle strutture porose BF-2 con il 29% of EtOH con la stessa procedura del punto 4, utilizzando la stessa miscela di solventi degli scaffold BF-1 CO-PLA. La rimozione dei solventi, del sale e dell'acqua e la successiva sterilizzazione avviene allo stesso modo del punto 3.

8) Gli scaffold BF-3 sono stati ottenuti mescolando la soluzione di PCL con la polvere di HYAFF-11 p100 e quella di HYAFF-11 p75 HE (80% di PCL, 10% di HYAFF-11 p100 e 10% di HYAFF-11 p75 HE) ed infine la miscela di sali con gli stessi rapporti e granulometrie. Il PCL è stato solvatato in una miscela di solventi costituita dal 70.6% di THF, 19.6% di DMSO e 9.8% di EtOH. La percentuale d'etanolo è stata ridotta in modo da migliorare la lavorabilità durante la stratificazione. La rimozione dei solventi, del sale e dell'acqua e la successiva sterilizzazione avviene allo stesso modo del punto 3.

9) Sono state realizzate delle strutture BF-2 con il 9.8% di EtOH per indagare sulle variazioni connesse alla riduzione della percentuale d'etanolo. Il rapporto PCL/HYAFF-11 p75 HE è sempre lo stesso definito al punto 4 ed anche la procedura è invariata, mentre la composizione della miscela di solventi è identica a quella del punto 8. I sali impiegati e le successive procedure per il lavaggio, l'essiccazione e la sterilizzazione sono identici a quelli già descritti.

10) Gli scaffold BF-1 lotto 017/04 e lotto 017/04 sono stati ottenuti miscelando la soluzione di PCL con la polvere di HYAFF-11 p75 HE con un rapporto PCL/HYAFF-11 p75 HE di 70/30 e la miscela di sali. La solubilizzazione del PCL è stata ottenuta utilizzando la stessa miscela di solventi

del punto 3 ma con una concentrazione di PCL di 294mg/ml. Il rapporto in peso tra i polimeri ed i sali è sempre 1/10. La procedura è la stessa già descritta, ma, per accelerare la solvatazione, la provetta contenente il PCL ed i solventi è stata parzialmente immersa in acqua ad una temperatura iniziale di 40°C. Le percentuali e la granulometria dei sali sono invariate. Il lavaggio per la rimozione dei solventi e del sale è invariato, ma dopo la prima liofilizzazione è stato eseguito un coating attuando cicli di vuoto e recupero a pressione atmosferica con una soluzione di acido ialuronico (idrofillico) con una concentrazione di 8mg/ml per favorire l'idratazione e l'adesione cellulare. Successivamente le strutture sono state nuovamente liofilizzate ed infine sterilizzate con raggi γ (2.5 Mrad).



Figure 2. Scaffold BF-1 lotto 017/04.

11) Gli scaffold BF-4 lotto 019/04 e lotto 022/04 sono stati ottenuti con gli stessi componenti del punto 8, ma con le seguenti percentuali relative: 70% di PCL, 15% di HYAFF-11 p75 HE e 15% di HYAFF-11 p100. La concentrazione di PCL ed il rapporto fra i polimeri ed i sali sono gli stessi del BF-1 lotto 017/04. La miscela dei solventi e dei sali e le procedure di preparazione, di lavaggio, di liofilizzazione, coating e sterilizzazione sono le stesse del BF-1 lotto 017/04.

12) Le strutture BF-1 CO-PLA lotto 025/04 e lotto 028/04 sono state ottenute allo stesso modo del BF-1 lotto 017/04 ma con una diversa composizione della miscela di solventi: 70.5% di THF, 19.7% di DMSO e 9.8% di EtOH. La preparazione è stata effettuata secondo la metodologia descritta al punto 10, con la stessa composizione di sali, aggiungendo il 5% in peso di fibre di PLA 83/24dTex lunghe circa 2cm. Il lavaggio, la doppia liofilizzazione ed il coating sono stati eseguiti allo stesso modo del BF-1 lotto 017/04.

13) Gli scaffold BF-1 CO-PET lotto 029/04 e lotto 031/04 sono stati preparati allo stesso modo di quelli BF-1 lotto 017/04 aggiungendo durante il mescolamento il 4% in peso di fibre di PET HT 550/200dTex lunghe circa 2cm. La stratificazione, il lavaggio, la doppia liofilizzazione ed il coating con acido ialuronico sono stati eseguiti allo stesso modo del BF-1 lotto 017/04.

Film compatti

Inoltre, sono stati realizzati anche dei film compatti per caratterizzare meccanicamente il materiale tramite test a trazione.

In particolare si sono preparati film con la seguente composizione:

- 1) HYAFF-11;
- 2) HYAFF-11/PCL

1) Tale film è stato ottenuto sciogliendo l'HYAFF-11 in DMSO con l'aiuto di un agitatore magnetico a temperatura ambiente. Appena raggiunta la completa miscelazione, la soluzione è stata versata su un apposito stampo. Questo è costituito da una lastra di vetro con un distanziatore di 1mm sui bordi che, dopo aver versato la soluzione, viene chiuso con un'altra lastra di vetro delle stesse dimensioni. In questo modo si ottiene un film con uno spessore di 1mm. L'intero sistema (polimero e stampo) è stato successivamente immerso in alcool etilico per allontanare il DMSO. Prima di poter essere testato tale film polimerico deve essere essiccato. Questa fase è critica in quanto il polimero tende a ritirarsi. Per evitare questa contrazione si è utilizzato un eccesso di PEG 400 e l'essiccazione è stata condotta in modo graduale, senza rimuovere il campione dallo stampo.

2) La preparazione di tale film è simile a quella usata per preparare il film di solo HYAFF-11, però la composizione della miscela di partenza in questo caso è: 95% di HYAFF-11 e 5% di PCL 5%. Inoltre, tale miscela viene solubilizzata dal DMSO su un agitatore magnetico che in questo caso si trova alla temperatura di circa 40°C, mentre per le fasi successive il processo è lo stesso di quello descritto prima.

VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE DEI MATERIALI

Analisi al 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 (fig.1) 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.

Lo strumento è corredato, inoltre, di un'unità d'elaborazione che permette l'assegnazione delle informazioni necessarie all'esecuzione della prova e gli spostamenti lungo la superficie del campione.

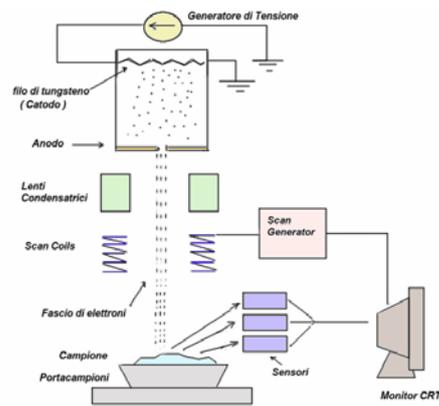


Figura 1 . Schematizzazione dell'architettura del SEM.

Le strutture realizzate, dopo essere state metallizzate e portate in condizioni di vuoto spinto, sono state osservate al microscopio a scansione elettronica (SEM) Mod Leica 420, al fine di verificare l'effettiva presenza dei pori e valutarne le dimensioni medie.

Analisi microtomografica (microCT)

Per analizzare la porosità delle strutture realizzate sono state eseguite delle osservazioni al microtomografo SKYSCAN 1072.

Il microtomografo è un'apparecchiatura in grado di acquisire immagini stratificate (*Slices*) di un oggetto che vengono poi elaborate da un calcolatore tramite opportuni software ed assemblate in modo da ricostruire l'oggetto nelle tre dimensioni.

Il grado di precisione della ricostruzione è strettamente connesso all'impostazione dei parametri d'acquisizione e di quelli d'elaborazione. Tipicamente la risoluzione spaziale dei CT-scanner è nel range 1-2.5mm. Il micro-CT incrementa la risoluzione spaziale di sette o otto ordini di grandezza, in termini di volume. Nel caso dello SKYSCAN 1072, che è il modello impiegato in questa analisi, la risoluzione spaziale è di 5 μ m.

L'aspetto più interessante della microtomografia è che si possono ottenere informazioni molto dettagliate sulla struttura senza danneggiarla. Per questa ragione viene classificata come una tecnica "non distruttiva" [13].

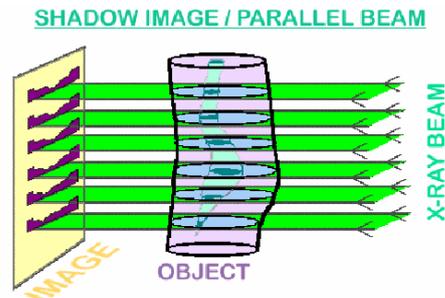


Figura 2. Immagini di un oggetto ottenute tramite un fascio di raggi paralleli tra loro.

Il fascio di raggi X incidente sull'oggetto genera una proiezione 2D. Nella figura 38 è illustrato il caso più semplice in cui i raggi sono paralleli; in realtà i fasci di raggi X impiegati sono divergenti, ma, ad una certa distanza, questi possono essere assunti approssimativamente paralleli.

La ricostruzione avviene facendo ruotare l'oggetto ed acquisendo le successive proiezioni. Terminata tale fase, il software assembla ciascuna immagine in modo da costruire slices sottili bidimensionali dalle quali, in seguito, tramite opportuno programma è possibile ricostruire l'intero oggetto.

In fase d'acquisizione è fondamentale impostare parametri quali la tensione e la corrente in modo da riuscire a visualizzare il campione. Modificando opportunamente i parametri è possibile, nel caso di provini composti di più parti, visualizzare alcuni elementi piuttosto che altri.

Lo SKYSCAN 1072 è una macchina dalla struttura compatta che combina un sistema *X-ray shadow microscopic* con un computer fornito di software per ricostruzioni tomografiche. Esso è costituito da un *X-ray microfocuse tube* con generatore ad alto voltaggio, una camera d'alloggiamento per il campione con controllo di precisione della posizione, una telecamera CCD ed un computer per l'acquisizione ed elaborazione. Nella figura 39 è illustrato lo schema del micro-CT SKYSCAN 1072.

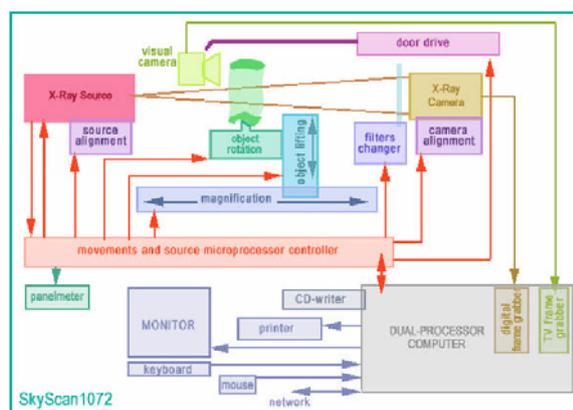


Figura 3. Schema del micro-CT SKYSCAN 1072.

Proprietà termiche

Tutti i materiali, siano essi polimeri o solidi, al variare della temperatura subiscono delle trasformazioni (passaggi di stato) che provocano un sensibile cambiamento nelle loro caratteristiche fisiche e chimiche (nel caso si raggiunga la temperatura di degradazione); ad esempio un polimero che viene riscaldato ad una temperatura maggiore di quella di transizione vetrosa² passa da uno stato vetroso ad uno gommoso di conseguenza perde le proprietà meccaniche che aveva ad una temperatura inferiore a quella di transizione vetrosa (prima era fragile poi diventa duttile). Quindi nel progetto di un substrato per la ricrescita dei tessuti è importante conoscere il comportamento del materiale usato nell'intervallo di temperatura in cui tale struttura si troverà ad operare. Un tipo d'analisi termica che consente di avere diverse informazioni in merito al comportamento termico di un materiale è la *calorimetria differenziale a scansione* (DSC).

¹ La temperatura di transizione vetrosa è quella temperatura oltre la quale una catena polimerica si muove con una certa facilità. Passando dal rigido stato vetroso al soffice stato gommoso.

Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

Il D.S.C. (Differential Scanning Calorimeter - Calorimetro Differenziale a Scansione) è uno strumento d'analisi che misura la differenza tra il flusso di calore fornito al campione analizzato e quello ceduto ad un campione di riferimento. All'interno della cella campione ed in quella di riferimento sono contenuti, in apposite capsule d'alluminio, il materiale da testare e quello di riferimento. Le capsule, a loro volta, sono immerse in un flusso d'azoto a pressione costante, che garantisce un coefficiente di scambio termico costante ed evita fenomeni di tipo ossidativo. L'apparecchiatura è fornita di un programmatore di temperatura ed il sistema di controllo verifica che la temperatura delle due celle sia la stessa e che quella media del campione e del riferimento coincida con la medesima indicata dal programmatore. La temperatura delle due celle è letta da altrettante resistenze di platino (in altre parole una per cella), la cui resistività varia con la temperatura; due ulteriori resistenze consentono di riscaldare le due celle e di mantenere costante la temperatura durante il funzionamento.

Il D.S.C. consente, quindi, di misurare il flusso termico netto fornito al campione rispetto al riferimento in funzione della temperatura; l'area sottesa dal termogramma rappresenta il calore complessivamente fornito durante il processo, ossia le variazioni energetiche del polimero esaminato. Le variazioni strutturali subite dal polimero sono sempre accompagnate da effetti energetici in modo da avere grafici caratteristici per transizioni vetrose, fusioni e cristallizzazioni.

Con questo metodo possono essere studiati:

1. la Tg (temperatura di transizione vetrosa) di materiali amorfi e semicristallini;
2. la cristallizzazione di polimeri semicristallini;
3. la purezza del materiale ed identificare eventuali elementi incogniti;
4. la capacità termica C_p ;
5. il calore specifico;
6. il calore latente di fusione.

Gli apparati DSC si distinguono in due tipi.

1. **heat flow DSC** (strumenti a flusso di calore) in cui un crogiolino contenente il campione C ed uno vuoto di riferimento R vengono posti all'interno della camera di misura, su una lastra sensibile caratterizzata da una resistenza nota. Questa lastra determina il flusso di calore dalla parete ai crogiolini con C e R. S'instaura una differenza di temperatura ΔT fra i due crogiolini dovuta alle differenti capacità e conducibilità termiche di C e R.
2. **power compensation DSC** (strumenti a compensazione di calore) in cui i crogiolini con C e R sono isolati, ciascuno di essi ha il proprio elemento riscaldante ed il sensore di temperatura, vengono riscaldati in modo differenziato e la differenza di temperatura ΔT è

uguale a zero. Un esempio di strumento a compensazione di calore è riportato nella figura sottostante.



Figura 4 Schema di funzionamento di un DSC a compensazione di calore.

I grafici ottenuti sono uguali, anche se gli strumenti sono diversi e avranno sull'asse delle ordinate la temperatura e sull'asse delle ascisse la differenza di calore rispetto ad una data temperatura (dQ/dT).

Il DSC è una tecnica relativa, infatti, gli strumenti devono essere calibrati con degli standard noti. Lo zinco viene impiegato sia per posizionare la scala di temperatura sia per quantificare il flusso di calore scambiato. L'andamento dello spettro DSC in funzione della temperatura può essere compreso con l'ausilio delle seguenti considerazioni.

Prima di una transizione la differenza d'energia tra campione e riferimento al variare di T è costante (parte *A* della figura 54); non appena il campione subisce una transizione, il riscaldatore del campione deve fornire ulteriore energia nel caso endotermico o minore nel caso esotermico per mantenere coincidenti la temperatura del campione e del riferimento.

I polimeri amorfi si possono trovare in tre stati fisici diversi: vetroso, gommoso, viscofluido. Nello stato vetroso si hanno movimenti vibrazionali degli atomi attorno alle posizioni d'equilibrio. Nello stato gommoso si possono avere vibrazioni di torsione delle unità macromolecolari e le catene sono rese relativamente flessibili. Nello stato viscofluido si ha elevata mobilità delle catene che assumono conformazioni disordinate. Il passaggio dallo stato vetroso a quello gommoso è denominato transizione vetrosa ed è caratterizzata da un flusso nel tracciato DSC in corrispondenza della T_g , dovuto ad una modesta variazione nella capacità termica in funzione di T (temperatura).

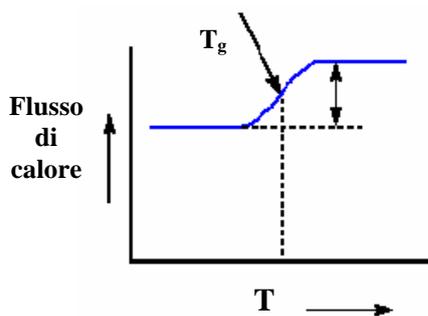


Figura 5. Materiale con una transizione del secondo ordine.

Durante una prova di DSC essenzialmente si misura il flusso di calore assorbito dal polimero rispetto alla temperatura. Otteniamo il calore specifico dividendo quello fornito per l'aumento di temperatura ottenuto. Tuttavia le curve DSC non duplicano esattamente la funzione calore specifico, ma sono influenzate da fattori connessi sia al tipo d'apparato (fattori strumentali quali velocità di riscaldamento, capacità termiche del portacampioni e termocoppia) sia alla natura fisica e chimica del campione utilizzato (per esempio dimensione del campione, storia termica del campione, ecc.); grande attenzione deve quindi essere riposta nella standardizzazione del metodo e nella determinazione dei fattori che possono alterare la curva.

Nella figura sottostante è riportato un generico tracciato DSC con indicate tutte le possibili temperature caratteristiche che possono essere evidenziate da un tale sistema d'indagine; ovviamente una tale situazione difficilmente è visibile in un diagramma DSC, infatti ci sono ad esempio polimeri completamente amorfi che non mostrano alcuna cristallizzazione.

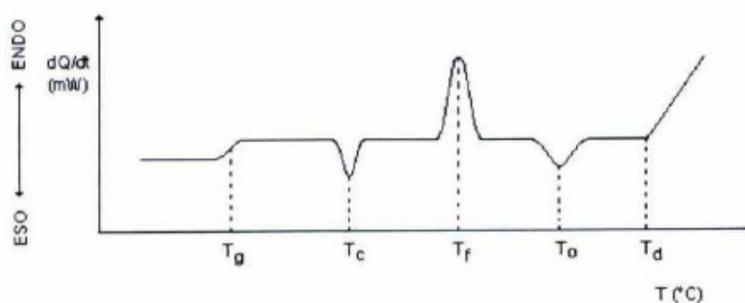


Figura 6 Generico grafico DSC.

Nel grafico generico sono riportate:

1. la T_g , temperatura di transizione vetrosa;
2. la T_c , temperatura di cristallizzazione;
3. la T_m , temperatura di fusione;
4. la T_o , temperatura di ossidazione;
5. la T_d , temperatura di decomposizione alla quale si ha la rottura dei legami covalenti tra gli atomi del polimero.

La convenzione endotermica (endo) e esotermica (eso) è arbitraria, quindi i picchi in un generico grafico possono essere rivolti verso l'alto o verso il basso, tuttavia diventa indispensabile indicare sul grafico la convenzione utilizzata

Assorbimento d'acqua

Un'altra importante caratteristica dei materiali è la loro capacità di assorbire acqua e di conservarla al loro interno. Però tale proprietà a seconda del materiale, può provocare un miglioramento od un peggioramento delle sue proprietà meccaniche.

Nel caso del tissue engineering va osservato, che i sistemi ingegnerizzati (trapiantati nell'uomo) saranno immersi in una soluzione fisiologica prima del trapianto e quindi è necessario conoscere come il materiale si comporta all'assorbimento (soprattutto quanto tempo impiega a raggiungere la condizione d'equilibrio). Tale fenomeno fisico è responsabile del trasporto delle sostanze nutritive alle cellule situate all'interno della struttura.

Il materiale, per valutare tale proprietà, viene posto in acqua e si osserva dopo quanto tempo il sistema raggiunge l'equilibrio usando bilance sufficientemente sensibili. Contemporaneamente si valuta se il materiale subisce particolari trasformazioni che possano incidere sul corretto funzionamento del sistema.

Alla base del fenomeno dell'assorbimento c'è il concetto di diffusione di un liquido in un solido (trasporto di massa).

Diffusività

Nel 1855 Fick osservò come, a parità di temperatura, di sostanza diffondente e di solvente, la massa di sale che diffonde attraverso una determinata interfaccia è direttamente proporzionale al gradiente di concentrazione (attraverso la superficie), all'area della superficie ed alla durata del fenomeno osservato. Infine, osservò che tale flusso è sempre diretto dalle regioni a concentrazione maggiore verso quelle a concentrazione minore. Da questo formulò l'espressione chiamata I legge di Fick:

$$\mathbf{J}_A = -D\nabla c_A,$$

dove \mathbf{J}_A è il flusso molare, c_A è la concentrazione molare della specie A in miscela, D il coefficiente di diffusione (o diffusività), con il simbolo ∇c_A (nabla) si indica il gradiente di un campo scalare³.

Questa legge stabilisce che la specie A diffonde (in altre parole si muove relativamente alla miscela) nella direzione della diminuzione della sua frazione molare.

Così scritta, la legge di Fick non si limita semplicemente a formalizzare il fenomeno, ma separa le grandezze fisiche che in esso variano da quelle che rimangono costanti in ragione delle condizioni sperimentali che sono state imposte. D'altra parte, com'è facile intuire, la temperatura, il tipo di soluto e quello di solvente sono parametri fisici molto importanti per il fenomeno in esame. In

³ In coordinate rettangolari si ha: $\nabla c_A = \mathbf{i} \frac{\partial c_A}{\partial x} + \mathbf{j} \frac{\partial c_A}{\partial y} + \mathbf{k} \frac{\partial c_A}{\partial z}$, dove \mathbf{i} , \mathbf{j} e \mathbf{k} sono i versori degli assi coordinati.

realtà, la legge di Fick, scritta in questa forma, tiene conto anche di questi fattori; infatti, al variare di una o più di queste grandezze fisiche varia la costante di proporzionalità D . Infatti, D dipende dalla temperatura, dal tipo di soluto e di solvente (parametro fenomenologico).

La prima legge di Fick non è sufficiente per risolvere completamente tutti i problemi di diffusione. Infatti, basta notare che il flusso diffusionale può modificare il gradiente di concentrazione che spesso è conseguentemente funzione del tempo.

Una seconda relazione interessante dalla quale si ricava la dipendenza della concentrazione dal tempo, si ottiene ricordando che deve essere sempre rispettato il principio della conservazione della massa. Ciò può essere espresso con una relazione che impone che la variazione di concentrazione della sostanza in un volumetto infinitesimo, aperto agli scambi di materia, sia identica alla differenza tra i flussi entrante ed uscente nel medesimo elemento di volume, a patto che non vi sia produzione della specie considerata all'interno del volumetto stesso (assenza di reazioni).

$$\frac{\partial c_A}{\partial t} = D \nabla^2 c_A$$

Tale relazione⁴ si ottiene sostituendo nell'equazione di bilancio materiale (nelle ipotesi precedentemente indicate):

$$\frac{\partial c_A}{\partial t} = -\nabla \cdot \mathbf{J}_A.$$

I metodi sperimentali per la misura del coefficiente di diffusione differiscono principalmente in base alle condizioni al contorno del fenomeno studiato oltre che alle procedure analitiche seguite. L'interpretazione dei risultati è, però semplificata nel caso in cui le condizioni al contorno siano tali da permettere di trovare una soluzione formale (analitica) dell'equazione differenziale di Fick.

I vari processi possono quindi essere classificati come fenomeni di diffusione libera, ristretta ed in condizione di stato stazionario⁵.

1. Diffusione libera: avviene all'interfaccia soluto-solvente in una colonna verticale e può continuare finché non avviene un cambiamento di concentrazione al capo estremo della colonna di solvente. Nelle procedure di misura relative alla diffusione libera è di primaria importanza disporre d'interfacce iniziali soluto-solvente quanto più nette possibile e di grandi rapporti tra le lunghezze della colonna di soluto e quella di solvente; a questo scopo sono state sviluppate varie tecniche chimico-fisiche.

⁴ In coordinate rettangolari si ha: $\nabla^2 c_A = \frac{\partial^2 c_A}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c_A}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c_A}{\partial z^2}$

⁵ La specificazione del tipo di processo permette inoltre di scegliere la procedura sperimentale adatta alla misura del particolare coefficiente di diffusione coinvolto anche in ragione della precisione richiesta.

2. Diffusione ristretta: si attua dopo una diffusione libera, quando interviene il primo cambiamento di concentrazione all'estremo opposto della colonna di solvente. In caso di diffusione ristretta lineare, la presenza delle strutture di confinamento (pareti), che la caratterizza, può dare origine anche a fenomeni diffusivi di tipo non lineare, per i quali non è più valida la legge di Fick, ma, se i confinamenti sono sufficientemente "larghi", la legge di Fick continua a valere.
3. Diffusione in stato stazionario: in questo caso la concentrazione è mantenuta costante ai due capi con opportuni accorgimenti e, dopo un tempo sufficientemente lungo, si stabilisce un flusso stazionario costante ed una distribuzione di concentrazione a gradiente costante. Condizioni al contorno di questo tipo offrono molti vantaggi nell'interpretazione dei risultati. Infatti, se il flusso J ed il gradiente di concentrazione sono misurabili sperimentalmente, D può essere calcolato dalla prima legge di Fick e non occorre integrare l'equazione della seconda legge, essendo stata eliminata ogni dipendenza dal tempo.

Prove meccaniche su scaffold

Macchine di prova

Per caratterizzare meccanicamente le strutture realizzate, le prove sono state eseguite su due differenti macchine :

- INSTRON 4204;
- ENDURATEC ELF 3200 Series.

L'INSTRON 4204 (fig.7) è una macchina elettromeccanica a viti di manovra per la quale la sollecitazione viene applicata tramite una traversa mobile.



Figura 7. *Macchina di prova elettromeccanica, INSTRON 4204.*

Essa è costituita principalmente da tre parti:

- un'attrezzatura per l'applicazione del carico ed il fissaggio del provino;
- un sistema elettronico di controllo e di visualizzazione dei parametri meccanici durante la prova;
- un calcolatore per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati.

La prima è rappresentata da un montante al quale è associata una traversa che è in grado di muoversi solo verticalmente con una velocità impostata che determina quella d'applicazione della sollecitazione. Inoltre, ad essa è connessa una cella di carico che misura la forza agente sui provini. Il sistema di controllo, oltre a visualizzare i valori di carico e di deformazione, controlla anche che la traversa si muova secondo i parametri imposti.

Prima dell'inizio di qualsiasi test, è necessario effettuare il riconoscimento e il bilanciamento della cella di carico e l'azzeramento dello spostamento.

L'ultima parte è rappresentata dal computer, il quale, mediante un opportuno software, consente d'impostare i parametri della prova e di gestire le operazioni d'avviamento e d'interruzione della stessa. Il calcolatore, durante il test, memorizza i dati di carico e deformazione e, al suo termine, fornisce un file in formato numerico per le successive elaborazioni.

Tale macchina viene utilizzata per effettuare test statici sulle strutture.



Figura 8. Macchina di prova elettromagnetica, ENDURATEC ELF 3200 Series BOSE.

L'ENDURATEC ELF 3200 Series BOSE (fig.8) è anch'essa costituita fondamentalmente dalle tre parti descritte per l'INSTRON 4204 con le medesime funzioni:

- un'attrezzatura per l'applicazione del carico ed il fissaggio del provino;
- un sistema elettronico di controllo e di visualizzazione dei parametri meccanici durante la prova;
- un calcolatore per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati.

Tuttavia, essa è una macchina elettromagnetica dalla struttura più complessa. Il carico non è più applicato per mezzo di una traversa mobile, bensì mediante un attuatore al quale sono consentiti solo movimenti verticali (è monoassiale).

A differenza della macchina descritta prima essa consente di eseguire prove dinamiche ad alta frequenza, fino a 200Hz (limite imposto dal software).

Prove statiche di trazione

Al fine di valutarne le proprietà meccaniche, sono state eseguite prove statiche di trazione su scaffold BF-1 non sterilizzati.

Non essendo possibile ottenere la tipica geometria ad osso di cane sono stati utilizzati provini a sezione rettangolare non standardizzati caratterizzati da un'area della sezione trasversale pari a 55 mm² e da un tratto utile di lunghezza 40mm.

Le prove sono state condotte alla velocità di 10mm/min, utilizzando la macchina di prova INSTRON 4204 con una cella di carico di 100N.

Inoltre, al fine di studiare gli effetti della sterilizzazione su di essi, prove analoghe sono state condotte su scaffold sterilizzati mediante raggi γ .

Prove meccaniche su espanti

Gli scaffold sagomati secondo forma di menischi mediali sono stati impiantati in esemplari adulti di pecora (Austria). Gli animali soggetti alla sostituzione totale del menisco mediale sono stati suddivisi in due categorie: una, comprendente gli esemplari il cui menisco è stato sostituito mediante scaffold cellularizzati con condrociti autologhi (*cell seeded*); una seconda categoria, comprendente gli esemplari i cui menischi sono stati sostituiti da scaffold non cellularizzati (*cell free*). Dopo circa sedici settimane dall'impianto, sono stati espantati campioni di tessuto ricresciuto e sottoposti, poi, a caratterizzazione meccanica.

Prove statiche e dinamico-meccaniche di trazione

Sono state effettuate prove statiche e dinamico-meccaniche di trazione su:

- campioni prelevati da menischi di pecora espantati da articolazioni che non avevano subito alcun tipo di intervento chirurgico (*non operated control*).

- campioni prelevati da menischi di pecora, non trattati chirurgicamente, espantati da articolazioni precedentemente sottoposte ad artrotomia e biopsia (*sham control*).
- campioni di tessuto ricresciuto a seguito dell'impianto nell' articolazione degli animali di costrutti cellularizzati (*cell seeded*) e non (*cell free*).

Da tali campioni, prelevati dalle regioni anteriore e posteriore, sono stati ritagliati lungo la direzione circonferenziale dei provini di 0.2 mm di spessore, 3.4 mm di larghezza e 13 mm di lunghezza.



(a)

(b)



(c)

(d)

Figura9. Immagini di espanti: (a) non operated control, (b) sham control, (c), tessuto ricresciuto in costrutti cellularizzati (c) e non (d).

Le prove statiche sono state svolte ad una velocità di deformazione pari a $10\% \text{ min}^{-1}$, mentre le prove dinamico-meccaniche sono state effettuate imponendo uno sforzo variabile con legge sinusoidale con un'ampiezza dinamica dell'1%, coprendo il range di frequenze che va da 0.1 a 10 Hz.

La distanza fra le morse impostata è pari a 7mm.

Le prove sono state condotte in soluzione fisiologica ad una temperatura di $37 \pm 0.5 \text{ } ^\circ\text{C}$, utilizzando l' EnduraTEC ELF 3200 Sries.

Il comportamento dinamico dei campioni, i quali sono stati condizionati meccanicamente prima di ciascuna prova, può essere descritto dal modulo conservativo o elastico (E'), dal modulo dissipativo o viscoso (E'') e dal fattore $\tan\delta$, calcolati tramite le relazioni:

$$E' = (\sigma_0/\varepsilon_0) \cos\delta$$

$$E'' = (\sigma_0/\varepsilon_0) \sin\delta$$

$$\tan\delta = E''/E'$$

Dove δ rappresenta lo sfasamento tra i segnali di input (sforzo) e di output (deformazione), mentre, σ_0 ed ε_0 indicano, rispettivamente, le ampiezze dello sforzo e della deformazione.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Analisi morfologica

Sono state analizzate al SEM le strutture BF-2 CO-PP liofilizzato una volta, BF-2 CO-PP liofilizzato una volta e sterilizzato con raggi γ , BF-1 CO-PLA liofilizzato una volta, BF-1 CO-PLA liofilizzato una volta e sterilizzato con raggi γ , BF-1 lot. 017-04, BF-4 lot. 019-04, BF-1 CO-PLA lot. 025-04 e BF-1 CO-PET lot. 029-04.

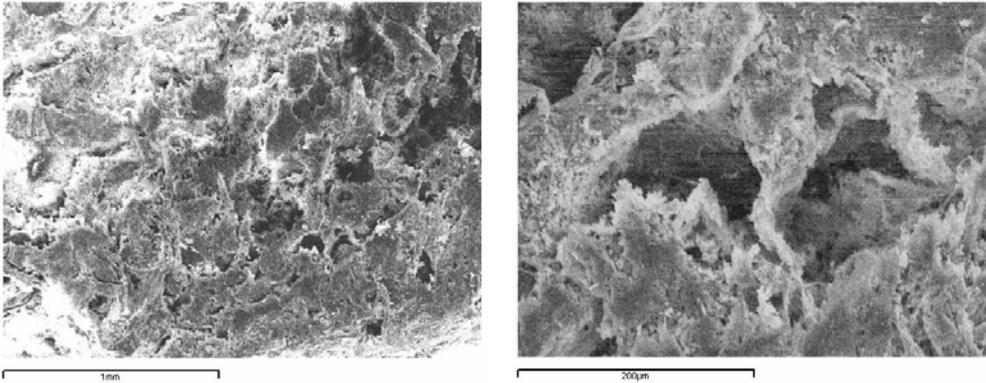


Figura 1. BF-2 CO-PP liofilizzato una volta.

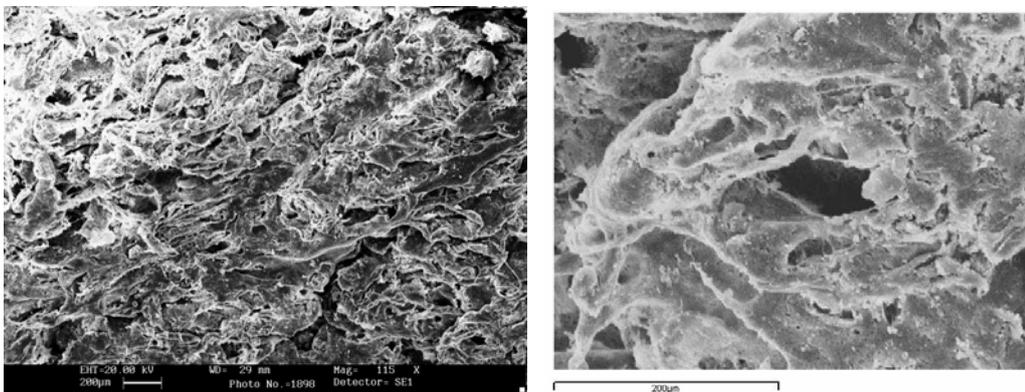


Figura 2. BF-2 CO-PP liofilizzato una volta e sterilizzato con raggi γ .

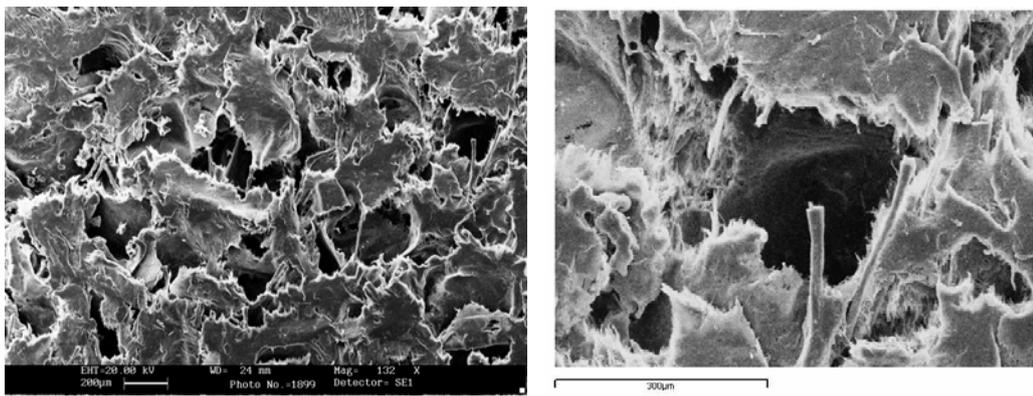


Figure 3. BF-1 CO-PLA liofilizzato una volta.

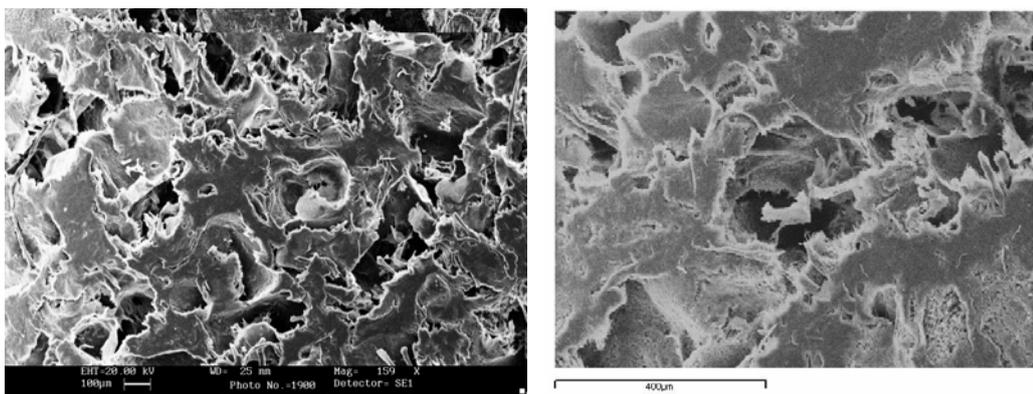


Figura 4. BF-1 CO-PLA liofilizzato una volta e sterilizzato con raggi γ .

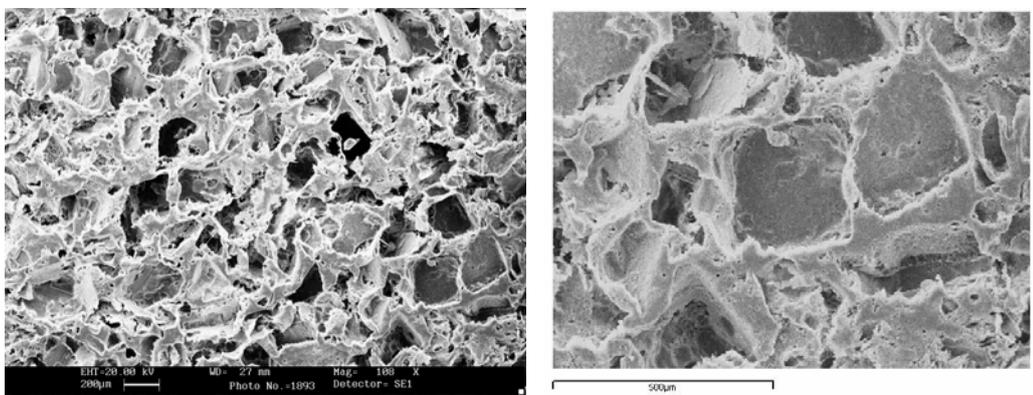


Figura 5 BF-1 lot. 017-04.

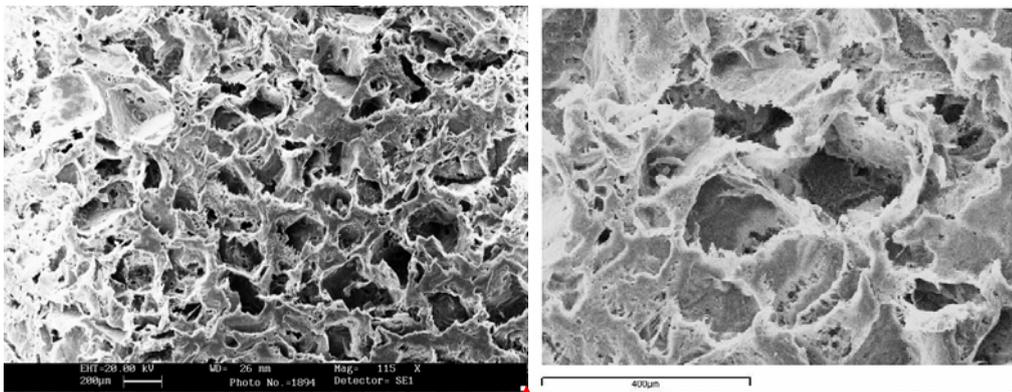


Figura 6. BF-4 lot. 019-04.

Formattato: Inglese (Regno Unito)

Formattato: Inglese (Regno Unito)

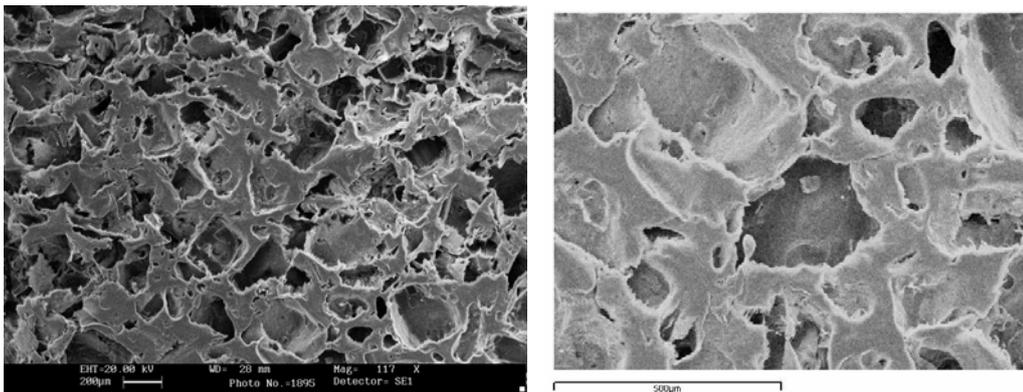


Figura 7. BF-1 CO-PLA lot. 025-04.

Formattato: Inglese (Regno Unito)

Formattato: Tipo di carattere: Corsivo, Inglese (Regno Unito)

Formattato: Inglese (Regno Unito)

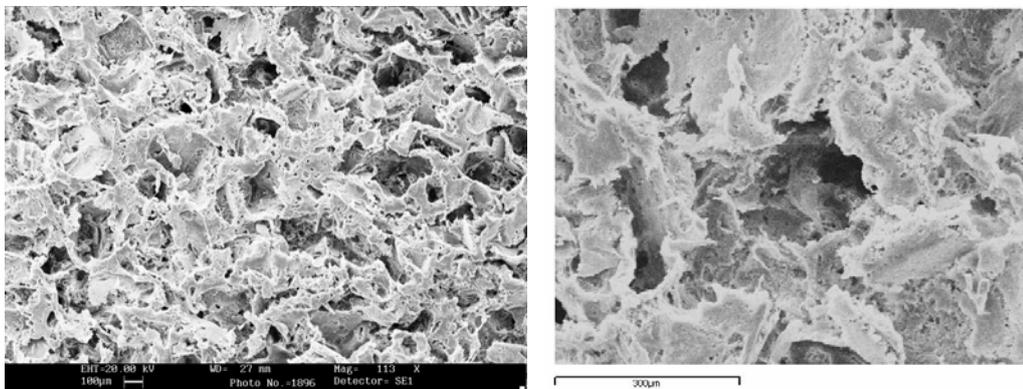


Figura 8. BF-1 CO-PET lot. 029-04.

Formattato: Inglese (Regno Unito)

Da queste ultime immagini si riscontra che il materiale appare altamente poroso con pori interconnessi ed un diametro medio dei pori di circa 250µm. Gli scaffold hanno un'ampia area superficiale che consente l'adesione cellulare e promuove la crescita del tessuto. Dopo la prova di

compressione, lo spessore dello scaffold diminuisce e la morfologia del campione BF-1 è stata nuovamente analizzata in modo da valutare la variazione della dimensione dei pori.

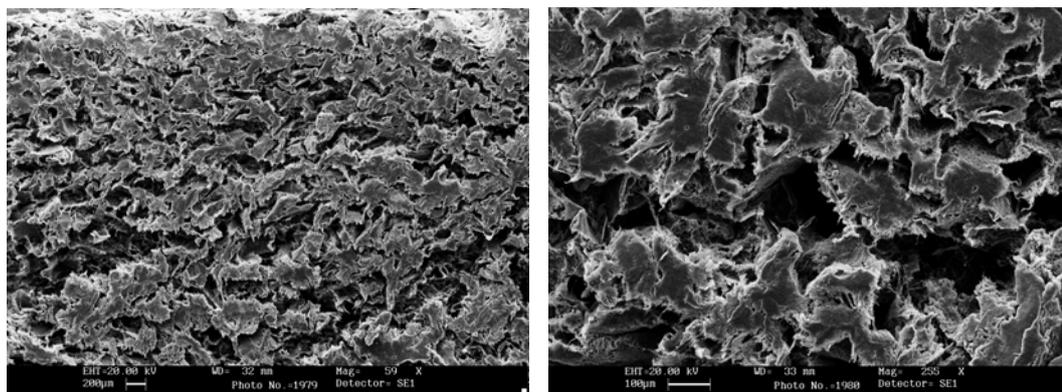


Figure 9. BF-1 lot. 017-04 dopo compressione.

Tali immagini mostrano un diametro medio dei pori di circa 200µm, che è ancora sufficiente per la crescita cellulare.

Microtomografia

Per analizzare la porosità delle strutture realizzate BF-1 sono state eseguite delle osservazioni al microtomografo SKYSCAN 1072. Di seguito sono riportate alcune immagini significative.

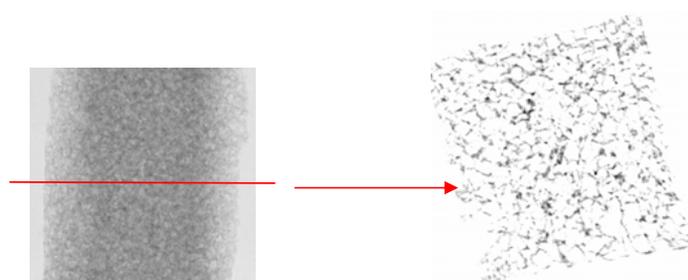


Figura 10. Sezione dello scaffold BF-1 ottenuta al microtomografo.

Da queste immagini è evidente l'elevata porosità della struttura e l'interconnessione dei pori.

Tramite il software Ant della SKYSCAN, partendo dalle immagini delle sezioni dello scaffold, è stata ricostruita un'immagine 3D della struttura.

Inoltre, con lo stesso programma, è stata eseguita anche una ricostruzione 3D però asportando una porzione in modo da visualizzare la struttura interna e soprattutto la porosità e l'interconnessione dei pori.

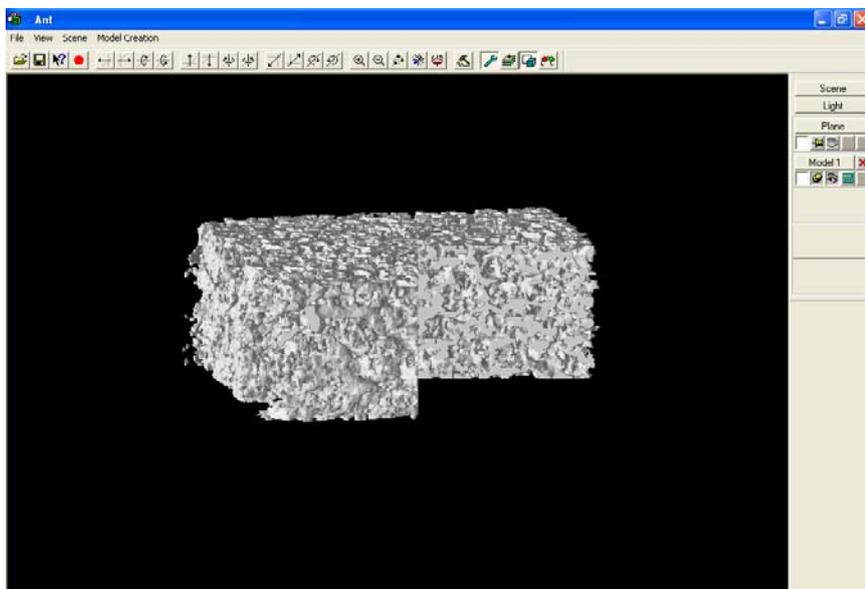


Figura 11. Ricostruzione 3D dello scaffold BF-1 al quale è stata rimossa una porzione.

Tramite il software CTAn sono stati valutati alcuni parametri significativi relativi alla porosità della struttura BF-1.

Questo programma ci ha consentito di valutare aspetti importanti necessari a caratterizzare gli scaffold.

Il volume totale V_{tot} è dato dalla somma del volume del solido V_s e quello del vuoto V_v :

$$V_{tot} = V_s + V_v .$$

Il volume specifico v è definito come rapporto fra il volume totale ed il volume del solido:

$$v = V_{tot} / V_s .$$

L'indice dei vuoti e è definito come rapporto fra il volume dei vuoti ed il volume del solido:

$$e = V_v / V_s .$$

Infine, la porosità P è definita come il rapporto tra il volume dei vuoti ed il volume totale:

$$P = V_v / V_{tot} .$$

Nel nostro caso tramite il software CTAn sono stati ottenuti i seguenti valori:

$$V_{tot} = 22.36mm^3 ;$$

$$V_s = 7.12mm^3;$$

$$V_v = 15.24mm^3;$$

$$v = 3.14;$$

$$e = 2.14;$$

$$P = 0.68 \rightarrow 68\%.$$

Analisi al microtomografo dei device rinforzati con la rete e con le fibre orientate

Inoltre, sono state osservate al micro-CT anche i device meniscali sia con rete sia con fibre orientate. Di seguito sono riportati i risultati di tali analisi sulle strutture rinforzate con la rete di PET.

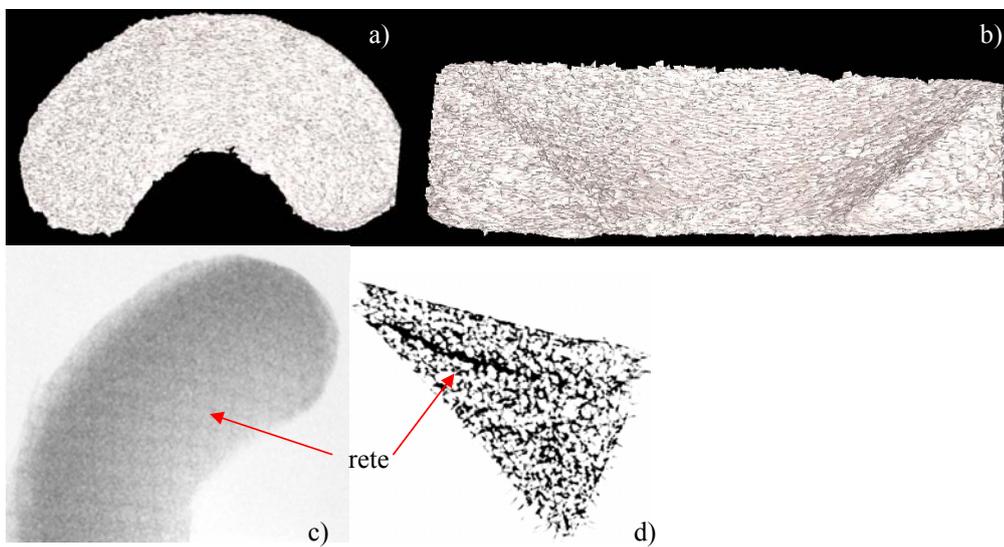


Figura 12 Ricostruzione al microtomografo di un device di menisco laterale con rete (figure a e b) e localizzazione in esso del rinforzo (figure c e d).

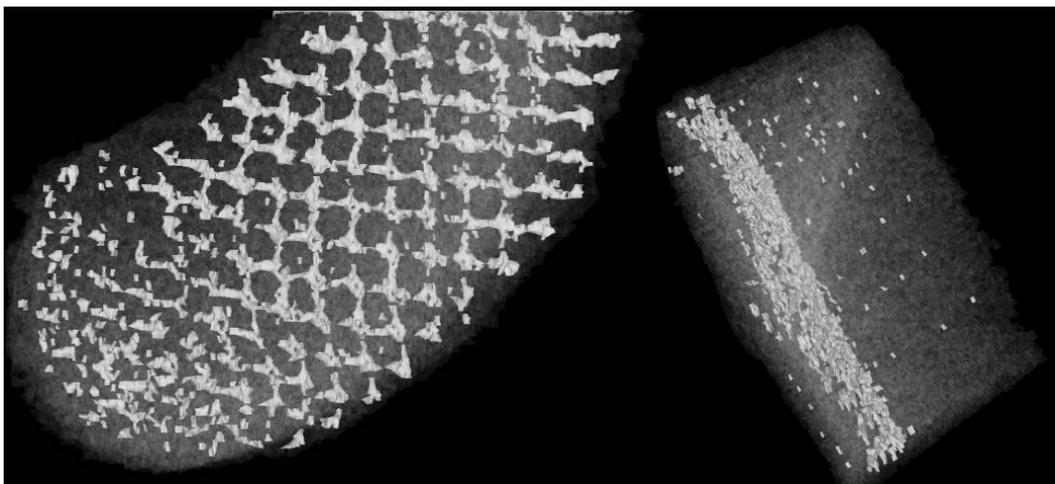


Figura 13. Ricostruzione al microtomografo di un device di menisco laterale con rete.

Da queste immagini si evidenzia la presenza della rete interna e la sua disposizione all'interno della struttura.

Analisi microtomografica di un menisco mediale di pecora e degli scaffold meniscali

E' stata analizzata al microtomografo anche la struttura di un menisco mediale di pecora precedentemente espantato per meglio determinarne la geometria e quindi realizzare uno stampo con forma e dimensioni più prossime a quelle fisiologiche.

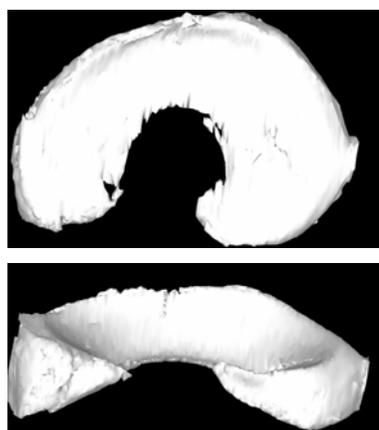


Figura 14. Ricostruzione tridimensionale del menisco mediale di pecora.

I disegni 3D dei menischi sono stati ricostruiti partendo dalla serie di sezioni parallele tramite il software ANT della SKYSCAN. In fase d'elaborazione delle immagini fornite dal microtomografo sono stati generati dei file *dicom*. Questi, a loro volta, sono stati rielaborati con il software Materialise MIMICS in modo da ottenere file *igs* i quali contengono informazioni sul contorno del menisco e sono a loro volta convertibili in un formato compatibile con il software di gestione della fresa a controllo numerico (proLight) utilizzata per la realizzazione degli stampi in teflon.

E' stata, infine, eseguita un'ulteriore tomografia sugli scaffold a forma di menisco realizzati per essere testati *in vivo*.

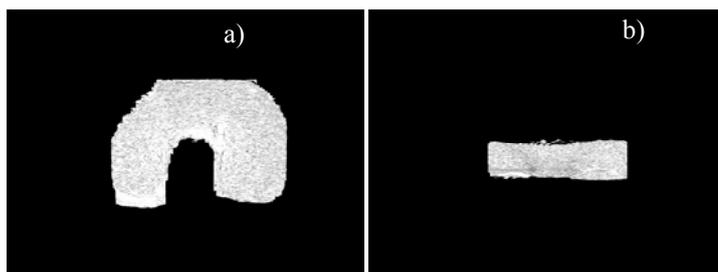


Figura 15. Ricostruzione tridimensionale di uno scaffold di menisco mediale.

DSC

Le analisi calorimetriche sono state eseguite sulle strutture BF-1 e BF-4 mediante il DSC 2920 DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETER TA INSTRUMENTS, utilizzando capsule non ermetiche d'alluminio.

Prima di condurre il test vero e proprio è necessario eseguire un "equilibrate" a 0°C con flusso d'azoto.

Gli scaffold BF-1 e BF-4 sono stati analizzati termicamente eseguendo uno scan da 10 a 300°C con una velocità di 10°C/min.

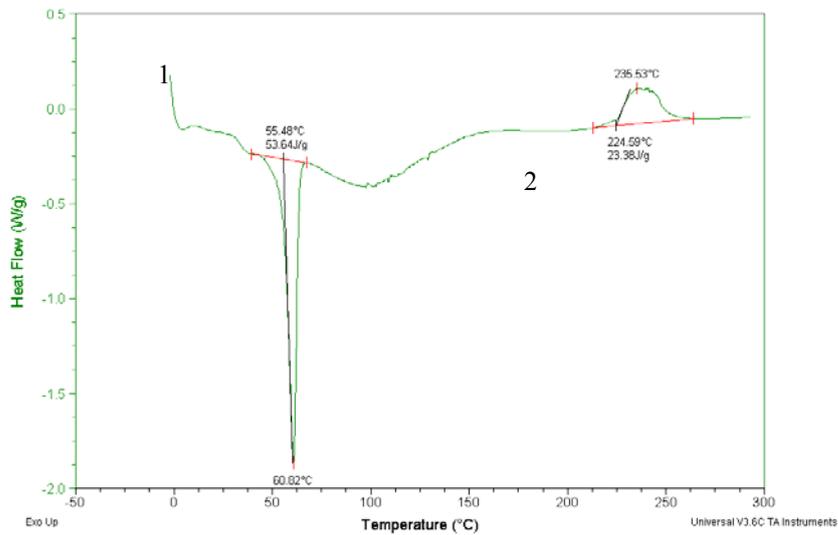


Figura 16. DSC dello scaffold BF-1.

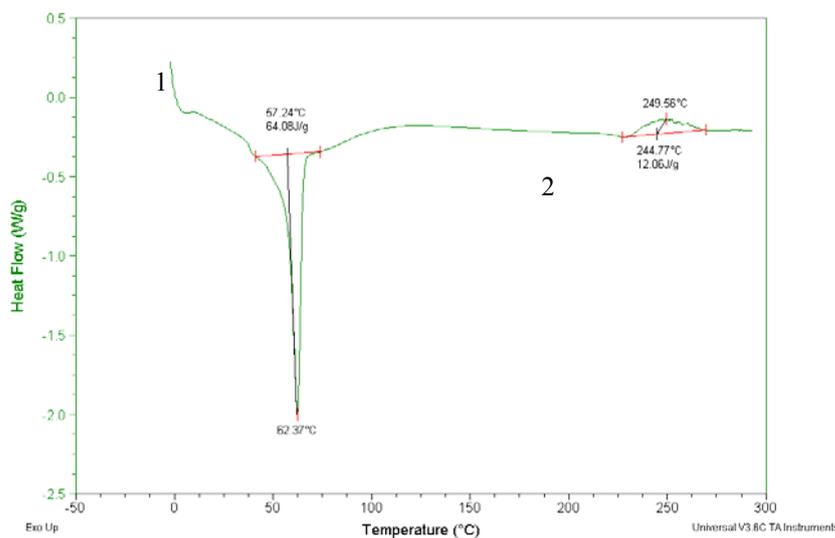


Figura 17. DSC dello scaffold BF-4.

Tutti i grafici mostrano un picco endotermico tra i 50 ed i 60°C dovuto alla fusione del PCL. I termogrammi ottenuti con la DSC esibiscono, inoltre, un altro picco endotermico a circa 90°C associato alla perdita d'acqua, mentre la sua area (del picco) dipende dalla quantità d'acqua contenuta nel campione. Infine, ad alte temperature (circa 240°C), si osserva un comportamento esotermico con un'entalpia variabile da caso a caso dovuto alla degradazione dello HYAFF-11. Nella seguente tabella sono riportati i valori d'entalpia ΔH e temperatura T relativi agli scaffold BF-1 e BF-4.

BF-1	ΔH [J/g]	T [°C]
1	53.64	55.48
2	23.38	235.53
BF-4		
1	64.08	57.24
2	12.06	249.56

Tabella 1. Valori d'entalpia e temperatura per gli scaffold BF-1 e BF-4.

Tra il BF-1 ed il BF-4 si riscontra una diversa ampiezza del picco esotermico dovuto alla contemporanea presenza dell'estere totale dell'acido ialuronico. Inoltre, nel range di scansione non si osserva nessuna temperatura di transizione vetrosa.

Assorbimento

Tale prova è stata condotta sui seguenti provini: BF-1, BF-4, BF-1 CO-PLA e BF-1 CO-PET sterilizzati e non.

Tali test sono stati eseguiti in accordo alle norme UNI EN ISO 62 e ASTM D570, per ciò che concerne la caratterizzazione dei provini, i metodi di misura e l'espressione dei dati. Questi provini sono stati immersi in acqua bidistillata e pesati ad intervalli di tempo prestabiliti. Prima di essere pesati, i provini sono stati asciugati con un panno assorbente per eliminare tracce d'acqua superficiale.

L'incremento percentuale d'acqua è dato dalla relazione seguente

$$\frac{m_i - m_0}{m_0} \cdot 100,$$

dove m_i rappresenta la massa al generico istante i mentre m_0 quella all'istante iniziale.

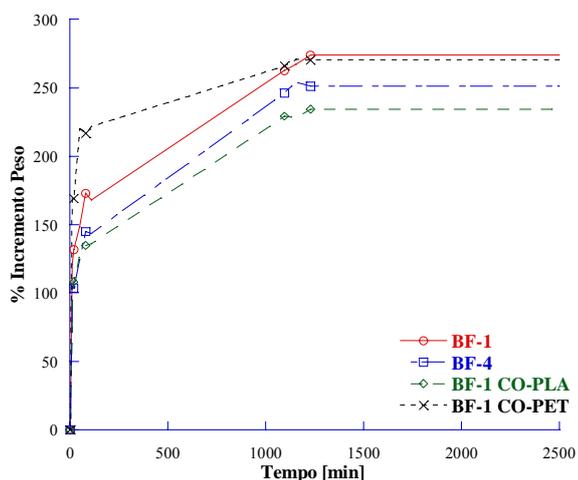


Figura 17. Assorbimento d'acqua delle strutture non sterilizzate.

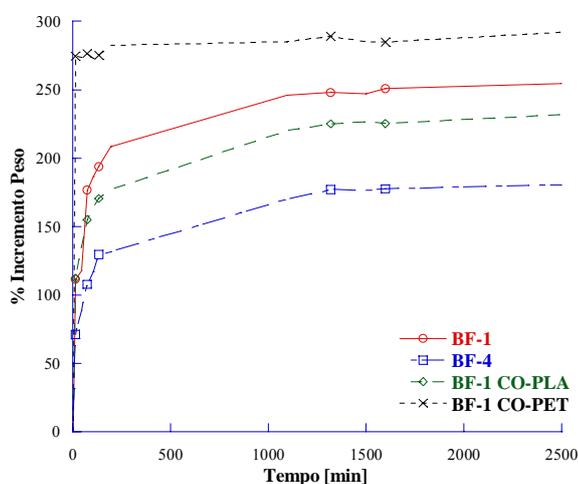


Figura 18 Assorbimento d'acqua delle strutture sterilizzate.

Dai grafici si osserva un rapido assorbimento d'acqua dovuto anche alla presenza del coating con acido ialuronico, altamente idrofillico.

I dati sperimentali sono stati interpolati con il modello di Fick riportato sulla norma:

$$\frac{C(t)}{C_s} = 1 - \frac{8}{\pi} \cdot \sum_{k=1}^{\infty} \frac{1}{(2k-1)^2} \cdot \exp\left[-\frac{(2k-1)^2 \cdot D \cdot \pi^2}{s^2} \cdot t\right],$$

dove $C(t)$ è la concentrazione d'acqua al tempo t , C_s la concentrazione d'acqua al tempo $t=\infty$, D la diffusività e s lo spessore della lastra.

Il modello è stato impiegato per ottenere la diffusività del materiale. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella sottostante.

Materiale non sterilizzato	Spessore [mm]	Diffusività [cm²/s]
BF-1	6.27	6.43x10 ⁻⁶
BF-4	5.20	3.70x10 ⁻⁶
BF-1 CO-PLA	5.8	4.58x10 ⁻⁶
BF-1 CO-PET	6.02	1.07x10 ⁻⁵

Tabella 2. Valori della diffusività per le strutture non sterilizzate.

Materiale sterilizzato	Spessore [mm]	Diffusività [cm²/s]
BF-1	5.54	6.72x10 ⁻⁶
BF-4	5.47	3.88x10 ⁻⁶
BF-1 CO-PLA	5.74	6.63x10 ⁻⁶
BF-1 CO-PET	5.84	3.75x10 ⁻⁵

Tabella 3 Valori della diffusività per le strutture sterilizzate.

Dalle tabelle risulta un incremento della diffusività con la sterilizzazione.

Prove Meccaniche

Prove di compressione

Queste prove sono state condotte sui seguenti scaffold:

BF-1, BF-4, BF-1 CO-PLA e BF-1 CO-PET sterilizzati e non e di BF-2.

Prima dell'esecuzione dei test meccanici tali strutture sono state idratate fino al raggiungimento dell'equilibrio.

Gli scaffold sono stati testati in acqua, ad una temperatura di 24°C.

Le prove sono state condotte secondo la norma UNI EN ISO 3386-1, essendo un materiale polimerico cellulare flessibile con bassa massa volumetrica.

In accordo con la norma non si giunge a rottura, ma sino ad un valore della deformazione pari al 70% dell'altezza iniziale del provino. La macchina di prova utilizzata è la INSTRON 4204. I risultati ottenuti sono riportati nel seguente grafico.

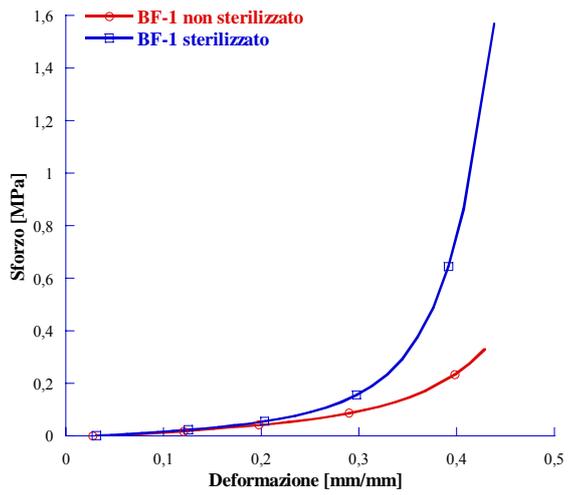


Figura 19. Comportamento a compressione dello scaffold BF-1 sterilizzato e non sterilizzato.

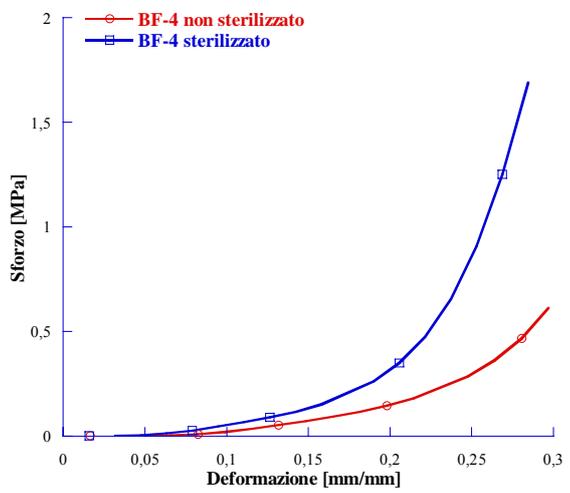


Figura 20. Comportamento a compressione dello scaffold BF-4 sterilizzato e non sterilizzato.

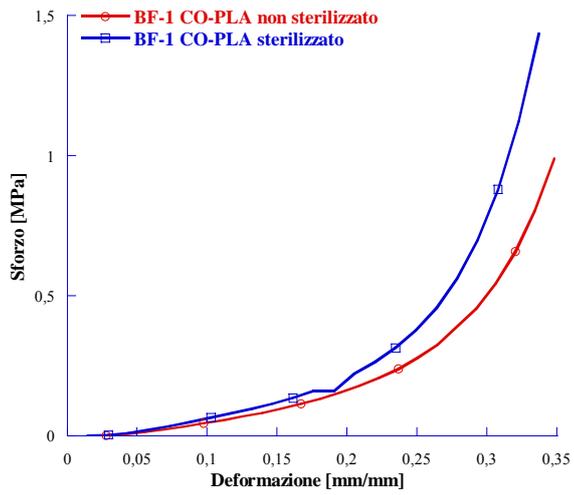


Figura 21. Comportamento a compressione dello scaffold BF-1 CO-PLA sterilizzato e non sterilizzato.

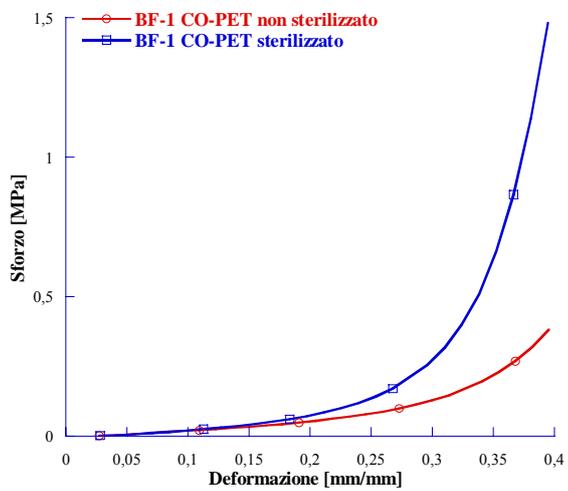


Figura 22. Comportamento a compressione dello scaffold BF-1 CO-PET sterilizzato e non sterilizzato.

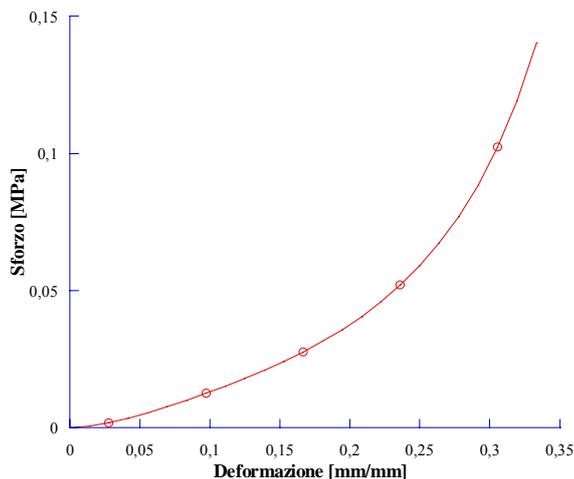


Figura 23. Comportamento a compressione dello scaffold BF-2 non sterilizzato.

Le prove di compressione condotte sulle differenti tipologie di strutture porose realizzate hanno mostrato, com'è possibile notare dalle figure 19-23, un andamento a “J” della curva sforzo deformazione.

La parte iniziale di tale della curva, infatti, risulta caratterizzata da una iniziale zona concava verso l'alto seguita da un hardening dovuta principalmente alla risposta del materiale ormai “compattato”. E' possibile notare, per le differenti tipologie di strutture realizzate l'effetto della sterilizzazione che non sembra evidenziare una riduzione delle proprietà a compressione.

Prove di trazione e lacerazione

Per caratterizzare meccanicamente le strutture realizzate, le prove statiche di trazione sono state eseguite sulla macchina dinamometrica elettromeccanica INSTRON 4204.

Tali prove sono state condotte su film compatti di:

1. HYAFF-11/PCL con la seguente composizione percentuale: 95% di HYAFF-11 e 5% di PCL;
2. HYAFF-11.

I provini da testare sono stati ricavati da un film sottile di materiale. La geometria e le specifiche di prova sono in accordo con la norma ASTM D1708-02a. La geometria usata per i provini è ad osso di cane; le dimensioni sono le seguenti:

1. spessore 0.60mm,
2. larghezza 5mm,
3. lunghezza della parte calibrata 15mm.

La velocità di deformazione imposta è di 10mm/min. Sul grafico seguente sono confrontati i risultati ottenuti per i due materiali.

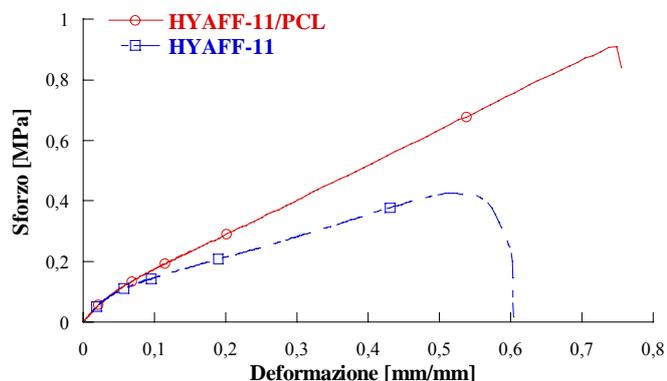


Figura 24. Curva sforzo – deformazione di HYAFF-11 e HYAFF-11/PCL.

L'andamento dei due grafici è essenzialmente lo stesso, presentando due zone a differente pendenza; va notato che in ogni caso i due grafici si discostano poco tra loro.

Dai grafici non si notano particolari differenze per ciò che concerne il modulo elastico, infatti, mentre per il provino di solo HYAFF-11 si ha un modulo elastico di 2,04MPa. Per il provino di HYAFF-11/PCL si ha un modulo elastico di 2,7MPa, ciò dipende anche dalla quantità esigua di PCL che non è tale da influenzare significativamente tale proprietà.

Mentre, per quanto riguarda la resistenza a trazione si nota un'influenza significativa del PCL. Infatti, mentre per il provino di solo HYAFF-11 il massimo stress è di 0,4MPa, per il provino di HYAFF-11/PCL è di 0,9MPa.

Quindi l'aggiunta del PCL migliora le proprietà meccaniche del sistema ed è possibile ipotizzare che: un aumento della quantità di PCL possa migliorare ulteriormente le proprietà meccaniche del struttura, influenzando anche in modo sensibile sul modulo elastico.

Per gli scaffold BF-1, BF-4, BF-1 CO-PLA e BF-1 CO-PET sterilizzati e non, non essendo possibile ottenere la geometria ad osso di cane secondo la norma, sono stati ricavati campioni a sezione rettangolare non standardizzati.

Anche per tali strutture la velocità di prova è di 10mm/min.

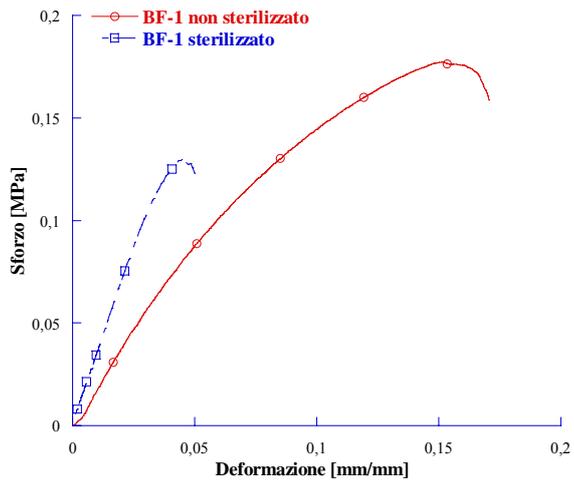


Figura 25. Comportamento a trazione dello scaffold BF-1 sterilizzato e non sterilizzato.

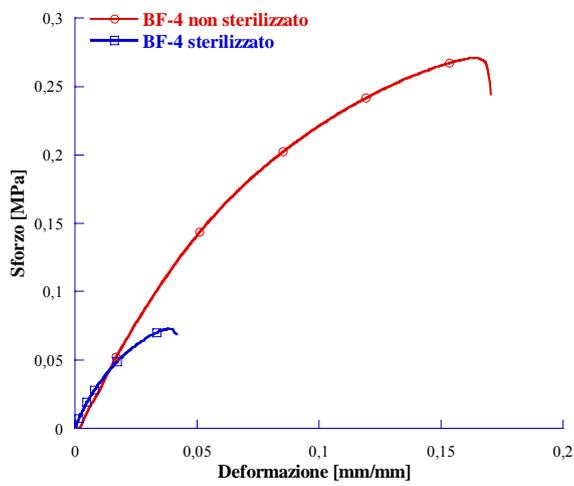


Figura 26. Comportamento a trazione dello scaffold BF-4 sterilizzato e non sterilizzato.

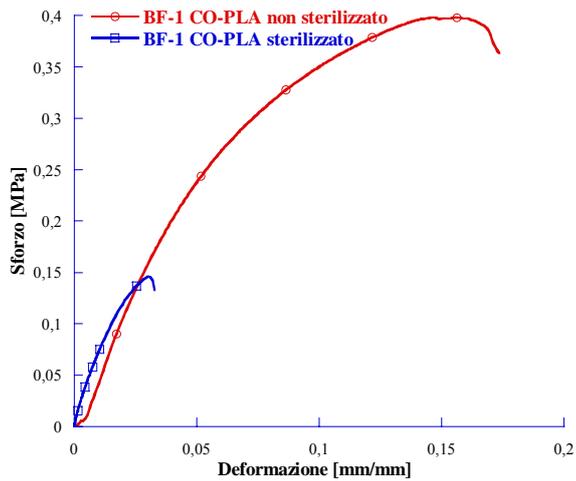


Figura 27. Comportamento a trazione dello scaffold BF-1 CO-PLA sterilizzato e non sterilizzato.

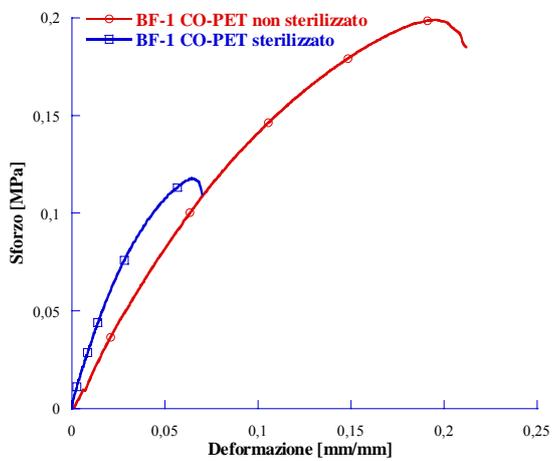


Figura 28. Comportamento a trazione dello scaffold BF-1 CO-PET sterilizzato e non sterilizzato.

Sono state eseguite anche delle prove di lacerazione per stimare la suturabilità dei campioni. Tale prova è stata eseguita secondo il metodo del chiodo con una velocità di 100mm/min.

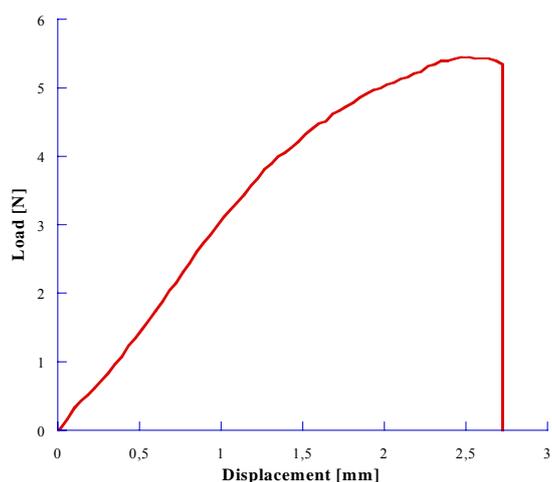


Figura 29. Andamento qualitativo del test di lacerazione.

Prove meccaniche di trazione, compressione e lacerazione sono state condotte sui campioni sempre con l'intento di valutare l'effetto del grado d'esterificazione dell'HYAFF-11 e della sterilizzazione. Le tabelle seguenti riportano i risultati medi a compressione, trazione e lacerazione.

	Compressione	Trazione		Lacerazione
	Modulo Elastico [MPa]	Modulo Elastico [MPa]	Sforzo a rottura [MPa]	Carico Massimo[N]
Scaffold BF-1	0.37	2.15	0.14	5.13
Scaffold BF-4	0.84	3.33	0.21	6.36
Scaffold BF-1 CO-PLA	0.95	6.33	0.27	11.87
Scaffold BF-1 CO-PET	0.38	1.89	0.40	7.89
BF2	0.22			4.13
BF2 CO-PP				17.61
Menisco Bovino	0.42 ⁶		70 ⁷	

Tabella 4. Valori medi a compressione, trazione e lacerazione degli scaffold non sterilizzati.

⁶ “Material Properties and Structure-Function Relationships in the Menisci”, Donald C. Fithian.

⁷ The tensile tests have been performed on natural bovine menisci.

	Compressione	Trazione		Lacerazione
	Modulo Elastico [MPa]	Modulo Elastico [MPa]	Sforzo a rottura [MPa]	Carico Massimo[N]
Scaffold BF-1	0.82	3.37	0.13	6.15
Scaffold BF-4	1.50	3.36	0.066	5.58
Scaffold BF-1 CO-PLA	1.16	7.44	0.14	7.41
Scaffold BF-1 CO-PET	0.92	2.94	0.11	8.55

Tabella 5. Valori medi a compressione, trazione e lacerazione degli scaffold sterilizzati.

Per quanto riguarda i campioni non sterilizzati, prove statiche di trazione hanno mostrato che le strutture BF-4 rispetto a quelle BF-1 presentano valori più alti del modulo elastico (3.33 contro 2.15MPa) e della resistenza (0.21MPa contro 0.14MPa). I campioni sterilizzati con i raggi γ , invece, hanno i moduli elastici praticamente uguali (3.37 e 3.36MPa), mentre la resistenza a trazione dei BF-1 (0.13MPa) risulta maggiore di quella dei BF-4 (0.066MPa).

La sterilizzazione, quindi, comporta per i campioni BF-1 un aumento del modulo elastico, ma la resistenza a trazione resta praticamente inalterata, mentre per i campioni BF-4 una riduzione della resistenza, anche se il modulo resta invariato.

A compressione i test eseguiti mostrano un'iniziale riduzione dello spessore del campione dopo la prima sollecitazione, successivamente, con gli ulteriori cicli di carico, si riscontra un comportamento elastico con una deformazione residua quasi trascurabile.

Gli scaffold hanno lo stesso comportamento ma con differenti valori. Infatti, dopo la prima compressione, per il BF-4 è evidente una maggiore riduzione dello spessore rispetto al BF-1 e ai suoi derivati (BF-1 CO-PLA e BF-1 CO-PET).

Le strutture mostrano una risposta alla compressione interessante, ma le proprietà di trazione e lacerazione non sono adeguate agli scopi della ricerca.

Dopo sterilizzazione, le proprietà meccaniche cambiano. A compressione, infatti, si riscontra un aumento del modulo elastico ed una riduzione della toe region.

A trazione e lacerazione, invece non si ha una significativa variazione tranne che per gli scaffold BF-4.

Dall'analisi dei dati sperimentali si è deciso di soffermare l'attenzione sulla matrice BF-1, in quanto dotata di un modulo elastico a compressione più prossimo a quello del menisco naturale. Inoltre, la struttura, dopo la prima compressione, nella quale si ha una riduzione dello spessore di circa il 20%, presenta una notevole elasticità. Le proprietà a trazione e lacerazione, tuttavia, non sono adeguate neanche disperdendo fibre corte nella matrice. Per questo motivo nelle successive strutture

l'attenzione è stata rivolta prevalentemente ai campioni rinforzati con reti e con fibre orientate circonferenzialmente. La scelta di quest'ultima tipologia di rinforzo è dovuta all'imitazione della distribuzione delle fibre di collagene nel menisco naturale.

Tuttavia, la rete è sicuramente più versatile, soprattutto in fase di suturazione durante l'intervento chirurgico, in quanto essa si estende per l'intera dimensione del device ed è quindi facile agganciarla. Ciò nonostante, per la tecnica d'intervento utilizzata è appropriato utilizzare anche il rinforzo con fibre orientate, in quanto le fibre che fuoriescono in corrispondenza dei corni favoriscono l'ancoraggio al piatto tibiale. Tuttavia, per tali device la suturabilità è scarsa essendo difficile agganciare le fibre e nel caso della rimozione di una porzione di menisco tale rinforzo diventa del tutto inefficace.

Dagli studi clinici condotti sulle strutture realizzate a base di BF-1 è stata riscontrata una buona ricrescita cellulare.

Per questo motivo sono stati realizzati altri device meniscali che, per favorire la suturazione, hanno la rete che fuoriesce in corrispondenza dei corni ed altri con delle fibre attaccate alla rete sempre in corrispondenza dei corni, facilitandone l'ancoraggio al piatto tibiale. Per rinforzare ulteriormente le strutture sono state disposte all'interno della matrice in differenti posizioni anche altre reti come riportato nella parte riguardante la realizzazione dei campioni.

PROVE MECCANICHE SU ESPIANTI

Prove statiche e dinamico-meccaniche di trazione

Le prove statiche di trazione effettuate su tutte le tipologie di campioni prelevati hanno fornito curve sforzo-deformazione caratterizzate da un tratto iniziale dalla forma a J (fig.30 e 31).

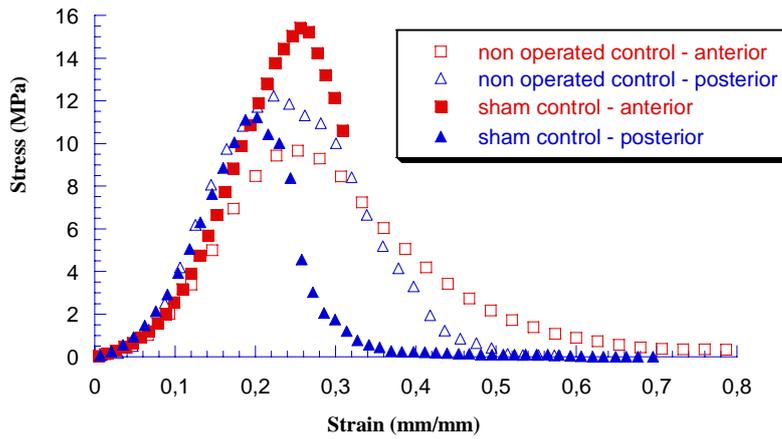


Figura 30. Curve sforzo-deformazione relative a campioni prelevati dalle regioni anteriore e posteriore di espianti post-operatori (sham control) e non (non operated control).

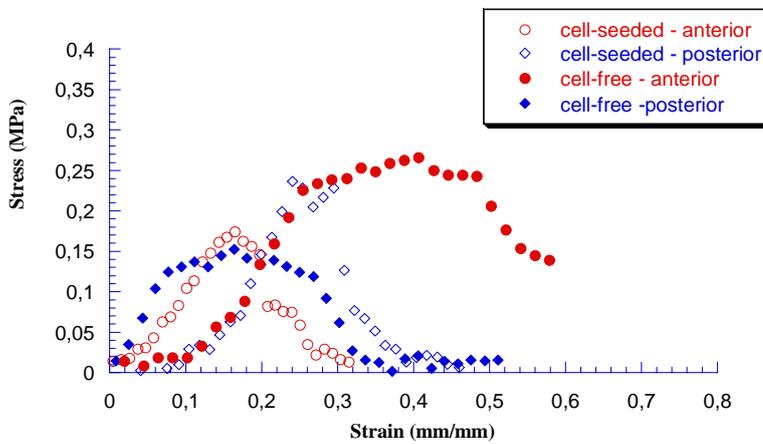


Figura 31. Curve sforzo-deformazione relative a campioni di tessuto ricresciuto a seguito dell' impianto di costrutti cellularizzati (cell seeded) e non (cell free), prelevati dalle regioni anteriore e posteriore.

Confrontando le curve ottenute si nota che i campioni di tessuto ricresciuto presentano dei valori dello sforzo massimo inferiori rispetto ai valori relativi agli espianti post-operatori e non (*sham control e non operated control*).

E' stato inoltre stimato, per ciascun campione, il modulo elastico di trazione come pendenza del tratto lineare della curva corrispondente. I valori ottenuti sono riportati nelle seguenti tabelle (Tab. 6,7,8,9).

Regione Anteriore	(57.1 ± 6.1) MPa
Regione Posteriore	(47.9 ± 1.1) MPa

Tabella 6. Valori del modulo di trazione dei campioni denominati *sham control* prelevati dalle regioni anteriore e posteriore.

Regione Anteriore	(61.8 ± 7.0) MPa
Regione Posteriore	(50.3 ± 2.2) MPa

Tabella 7. Valori del modulo di trazione dei campioni denominati *non operated control* prelevati dalle regioni anteriore e posteriore.

Regione Anteriore	(2.1 ± 0.4) MPa
Regione Posteriore	(1.6 ± 0.3) MPa

Tabella 8. Valori del modulo di trazione dei campioni di tessuto ricresciuto a seguito dell'impianto di costrutti cellularizzati (*cell seeded*), prelevati dalle regioni anteriore e posteriore.

Regione Anteriore	(1.6 ± 0.2) MPa
Regione Posteriore	(2.4 ± 0.4) MPa

Tabella 9. Valori del modulo di trazione dei campioni di tessuto ricresciuto a seguito dell'impianto di costrutti non cellularizzati (*cell free*), prelevati dalle regioni anteriore e posteriore.

I risultati delle prove dinamico-meccaniche su menischi espantati da articolazioni che non avevano subito alcun tipo di intervento (*non operated control*) e da menischi intatti espantati da articolazioni precedentemente sottoposte ad artrotomia e biopsia (*sham control*), hanno evidenziato che, sia per i campioni prelevati dalla regione anteriore che per quelli prelevati dalla regione posteriore, il modulo E' cresce debolmente al crescere della frequenza (fig.32).

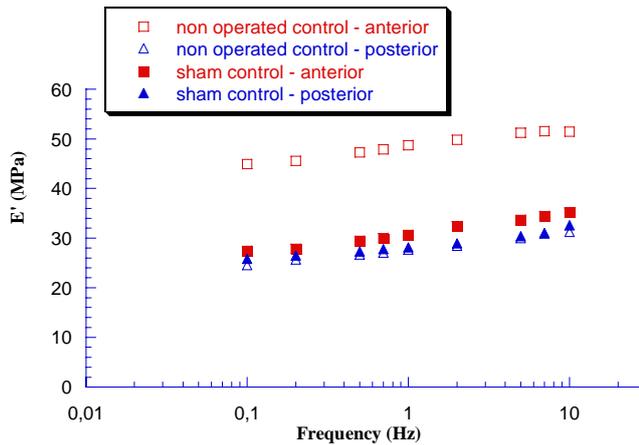


Figura 32. Andamento del modulo elastico (E') in funzione della frequenza per i campioni prelevati dalle regioni anteriore e posteriore di espianti post-operatori (*sham control*) e non (*non operated control*).

In particolare, i campioni prelevati dalla regione anteriore dei *non operated control* hanno evidenziato valori del modulo elastico (E') variabili da 50.0 a 51.6 MPa, mentre, quelli prelevati dagli *sham control* hanno evidenziato un range di variabilità di E' che va da 27.4 a 35.1 MPa.

Allo stesso modo, i campioni prelevati dalla regione posteriore dei *non operated control* hanno evidenziato valori del modulo elastico (E') compresi tra 23.8 e 31.3 MPa, mentre, quelli prelevati dagli *sham control* hanno evidenziato un range di variabilità di E' che va da 25.8 a 32.5 MPa.

L'andamento del modulo elastico E' dei campioni di tessuto ricresciuto dopo l'impianto di costrutti cellularizzati e non, è risultato, invece, quasi costante al variare della frequenza assumendo, inoltre, valori più bassi rispetto al caso precedente (fig.33).

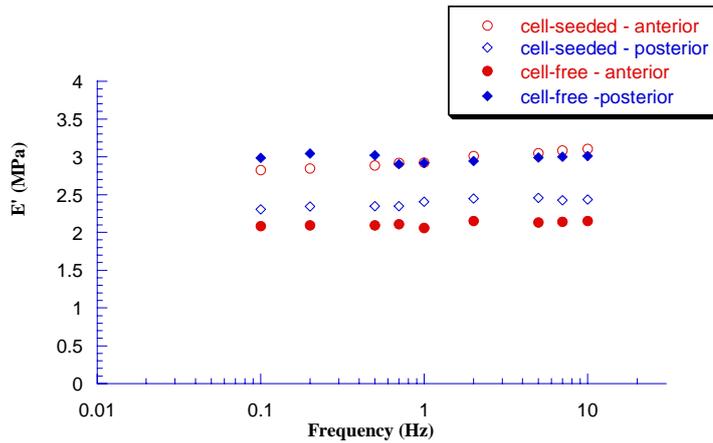


Figura 33. Andamento del modulo elastico (E') in funzione della frequenza per campioni, prelevati dalle regioni anteriore e posteriore, di tessuto ricresciuto a seguito dell'impianto di costrutti cellularizzati (cell seeded) e non (cell free).

In particolare, i campioni di tessuto ricresciuto a seguito dell'impianto di costrutti cellularizzati e non, prelevati, i primi, dalla regione anteriore e, i secondi, dalla regione posteriore, hanno evidenziato i valori più alti. Tali valori sono comunque inferiori a 3.1 MPa.

In tutti i casi esaminati il modulo elastico (E') assume sempre valori più elevati rispetto al modulo viscoso (E''), riflettendo la risposta prevalentemente elastica dei campioni sollecitati dinamicamente; il fattore $\tan \delta$ risulta, infatti, sempre inferiore a 0.14 (fig. 34 e 35).

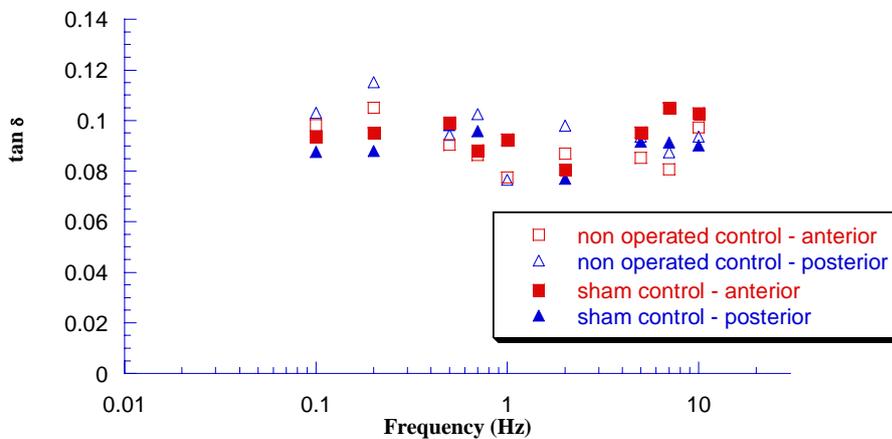


Figura 34. Andamento del fattore $\tan \delta$ in funzione della frequenza per i campioni prelevati dalle regioni anteriore e posteriore di espianti post-operatori (sham control) e non (non operated control).

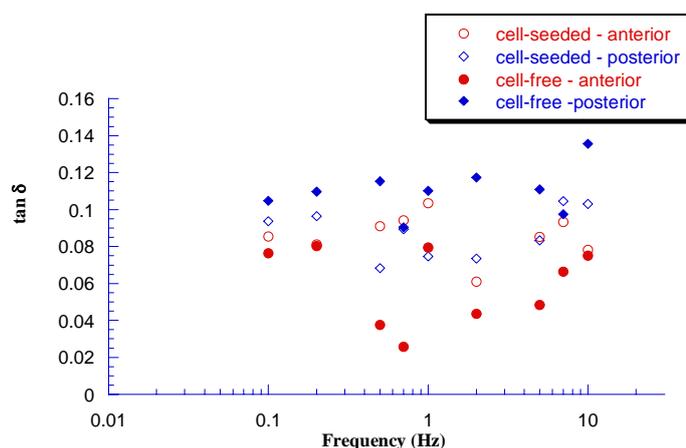


Figura 35. Andamento del fattore $\tan \delta$ in funzione della frequenza per campioni, prelevati dalle regioni anteriore e posteriore, di tessuto ricresciuto a seguito dell'impianto di costrutti cellularizzati (*cell seeded*) e non (*cell free*).

Conclusioni e sviluppi futuri

L'analisi morfologica, tramite microscopia elettronica (SEM) e microtomografia (microCT), ha permesso di osservare in dettaglio la struttura interna porosa degli scaffold realizzati, e di valutarne il grado di porosità, le dimensioni medie dei pori e la loro interconnessione.

Sostanziali differenze sono emerse fra il comportamento meccanico dei cosiddetti controlli (indicati come *sham control* e *non operated control*) e dei campioni di tessuto ricresciuto a seguito dell'impianto, nell'articolazione degli animali, di costrutti cellularizzati (*cell seeded*) e non (*cell free*).

In particolare, le prove statiche di trazione hanno mostrato che i campioni prelevati da menischi di pecora, utilizzati come controlli, risultavano caratterizzati da un modulo elastico e da una resistenza maggiori rispetto a quelli dei campioni di tessuto ricresciuto.

Dall'altro lato, invece, misure dinamico-meccaniche in trazione hanno suggerito una grossa differenza in termini di modulo elastico o conservativo, E' ; infatti, i campioni prelevati da menischi non trattati chirurgicamente (*non operated control*) hanno mostrato valori del modulo E' leggermente crescenti con la frequenza, a differenza dei campioni di tessuto ricresciuto, caratterizzati da valori di E' minori e costanti con la frequenza.

Inoltre, da un lato, non sono state riscontrate grosse differenze, in termini di comportamento statico e dinamico-meccanico, tra le due categorie di campioni di tessuto ricresciuto (*cell-free* e *cell-seeded*), dall'altro, se si paragonano i risultati relativi ai controlli (*sham control* e *non operated*

control), sembra che il trattamento chirurgico del ginocchio (biopsia e artrotomia) non influenzi le proprietà meccaniche e viscoelastiche della struttura naturale.

In conclusione, i risultati ottenuti utilizzando scaffold a base di policaprolattone (PCL) ed estere benzilico dell'acido ialuronico (HYAFF-11) sembrano essere promettenti per ciò che riguarda la rigenerazione del menisco e, da un punto di vista istologico, sono state notate alcune differenze tra impianti di costrutti cellularizzati (*cell-seeded*) e (*cell-free*).

La procedura fin qui utilizzata che, sulla base di un'analisi tomografica, ha consentito di ottenere scaffold secondo geometrie e dimensioni tipiche di un menisco mediale di pecora, potrebbe, in futuro, essere utilizzata al fine di realizzare strutture porose per la rigenerazione del menisco umano.

Parte II

Realizzazione di scaffold con tecnologie non convenzionali

INTRODUZIONE

L'ingegneria dei tessuti ha come scopo quello di riparare o rigenerare i tessuti umani associando una popolazione di cellule ad una matrice tridimensionale porosa che funga da scaffold. Oltre alle indispensabili proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità e/o biorisorbibilità, questi costrutti tridimensionali devono anche offrire un iniziale e adeguato supporto meccanico alla neo-struttura ossea, cartilaginea o ventricolare che essi vanno a supportare; ovviamente tale aiuto sarà necessario fin quando le neo-strutture non si saranno integrate con il tessuto circostante e, aspetto principale, non saranno in grado di autosostenersi.

Molte tecniche e dispositivi differenti sono stati utilizzati per la realizzazione di scaffold porosi 3D, ciascuno con i propri vantaggi e svantaggi. I convenzionali metodi di realizzazione di scaffold includono fiber bonding, gas foaming, separazione di fase, freeze drying, particulate leaching e altri. Il fiber bonding è stato sviluppato per migliorare le proprietà meccaniche; infatti con l'applicazione di un trattamento caldo le fibre dello scaffold si uniscono in dei punti. Nel gas foaming il polimero è saturato con diossido di carbonio (CO₂) alla pressione critica per raggiungere un'elevata solubilità del gas nel polimero. Quando la pressione del gas è riportata a quella atmosferica, la solubilità della CO₂ nel polimero decresce rapidamente, provocando, in questo modo, la formazione di bolle di gas o inclusioni di dimensione variabile. Un approccio simile si applica nella tecnica basata sulla separazione di fase dove un'iniziale soluzione di polimero viene raffreddata bruscamente a temperature basse per generare una separazione di fase che può essere, a seconda dei casi, liquido-liquido o solido-liquido; solo successivamente si provvederà alla rimozione del solvente secondo opportune tecniche, creando così scaffold porosi. Il freeze drying è leggermente differente da quest'ultimo, poiché la soluzione di polimero è direttamente ghiacciata.

Il particulate leaching prevede, invece, la formazione dei pori tramite una iniziale inclusione di particelle direttamente all'interno della matrice polimerica e la successiva rimozione delle stesse, una volta compattata la matrice tridimensionale.

Tuttavia le tecnologie sopra citate, benché controllino la dimensione dei pori e la struttura reticolare polimerica, portano alla formazione di network caratterizzati da pori scarsamente interconnessi, che rappresenta, sicuramente, svantaggi per quanto riguarda l'approvvigionamento dei nutrienti e l'effettivo rilascio dei segnali biologici. Tra le nuove tecniche di realizzazione di scaffold quelle di rapid prototyping sembrano essere le più promettenti a soddisfare molti dei requisiti generali richiesti per un biomateriale.

Basate su metodiche CAD/CAM, esse possono processare un ampio numero di biomateriali con geometria prefissata (su misura) e con proprietà meccaniche comparabili con le specifiche applicazioni considerate. Si ottengono, con queste nuove tecniche, scaffold tridimensionali

caratterizzati non solo da forme e dimensione dei pori specifiche, ma soprattutto una completa interconnessione tra i pori, i quali permettono una migliore migrazione cellulare e diffusione di nutrienti rispetto agli scaffold 3D realizzati con le tecniche convenzionali.

Tra i sistemi di rapid prototyping c'è la tecnica 3D fiber deposition che è quella utilizzata in questo lavoro di tesi. Tale tecnica prevede l'utilizzo di soluzioni reattive o polimeri termoplastici che vengono direttamente estrusi attraverso un needle metallico.

Un scaffold 3D è realizzato depositando strato su strato il materiale estruso, seguendo un opportuno modello CAD. Con questa nuova tecnica differenti materiali possono essere processati e organizzati in diverse architetture, ottenendo pori a geometria variabile.

Scopo del presente lavoro è stato realizzare, tramite tale tecnica di deposizione tridimensionale di fibre, e, successivamente, caratterizzare, da un punto di vista morfologico e meccanico, scaffold di policaprolattone con porosità interconnessa.

Il policaprolattone è un poliesteri alifatico lineare molto utilizzato negli ultimi anni per la rigenerazione dell'osso e della cartilagine, la cui caratteristica più peculiare, da un punto di vista chimico, è la sua capacità di degradarsi secondo un meccanismo attivato da idrolisi chimica, che fa sì che venga annoverato come uno degli esponenti principali della classe dei polimeri bioerodibili. Inoltre, l'arco temporale nel quale si realizza il processo di degradazione è piuttosto lungo, offrendo un supporto strutturale fino all'avvenuta crescita del tessuto in neo-formazione.

I risultati ottenuti hanno mostrato, da un lato, la possibilità di modulare il diametro della fibra, la distanza centro-centro tra due fibre in uno stesso piano e lo spessore dello strato, che influenzano le dimensioni globali dei pori, e dall'altro che le proprietà meccaniche degli scaffold realizzati dipendono, ovviamente, non solo dal materiale considerato, ma anche da fattori geometrici e dall'architettura tridimensionale.

Inoltre, la procedura proposta per la realizzazione di queste strutture, dette "3D-fiber deposited", a partire da un'analisi tomografica, potrebbe essere presa in considerazione allo scopo di realizzare scaffold custom made per la rigenerazione di tessuti soffici e duri.

Materiali e metodi

Premessa

Gli scaffold polimerici tridimensionali realizzati nel presente lavoro sono stati ottenuti tramite la tecnica 3D Fiber Deposition, che consiste nella deposizione di materiale strato per strato, utilizzando un *Bioplotter*, già descritto in letteratura da Landers et al. [10] [11] [12]. Di seguito, quindi, verranno descritti non solo i materiali utilizzati per realizzare tali strutture ed i principi di base della tecnologia utilizzata, ma anche i metodi che hanno consentito di caratterizzarle da un punto di vista meccanico e morfologico.

Il policaprolattone

Il policaprolattone 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 tecnologie quali l'organ substitution nella realizzazione di suture riassorbibili, il drug delivery per sistemi a rilascio controllato di farmaci nonché, negli ultimi anni, la tissue regeneration per la realizzazione di sistemi sostitutivi del tessuto osseo naturale [15]. Un così ampio e diversificato insieme di impieghi è legittimato dalle caratteristiche chimiche e fisiche del polimero del tutto particolari accompagnate da acclerate doti di biocompatibilità indispensabili per la riuscita della generica applicazione in campo biomedico [13] [15].

Proprietà chimiche

Da un punto di vista chimico il policaprolattone è un poliesteri alifatico lineare caratterizzato dalla formula di struttura riportata sotto (figura 1). Esso è in grado di sciogliere a temperatura ambiente a contatto con solventi molto diversi tra loro come dimetilacetammide (DMAc), benzene e cloroformio scelti in funzione delle peculiarità specifiche dell'applicazione a cui si fa riferimento [17].

La caratteristica più importante del PCL, da un punto di vista chimico, è la sua capacità di degradarsi 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 di degradazione attivato da idrolisi chimica consente al policaprolattone di essere annoverato quale uno dei principali esponenti della classe dei polimeri bioerodibili [16]. In particolare il processo di degradazione del PCL è caratterizzato da

almeno due fasi discrete la prima delle quali si fonda sull'idrolisi non enzimatica di Bulk del legame estere autocatalizzato dai gruppi carbossilici presenti lungo la catena principale [16].

Molti sono stati e sono tuttora gli studi mirati ad approfondire le modalità di degradazione del PCL. Ad esempio alcuni di essi hanno mostrato che i radicali liberi ottenuti dalla reazione del gruppo carbossilico con l'ossigeno risultano molto più reattivi che radicali prodotti dalla reazione con il gruppo OH [16]. Altri sono rivolti allo studio dell'evoluzione delle proprietà chimico fisiche durante il processo di degradazione.

Si riporta l'andamento del peso molecolare ponderale del polimero in acqua distillata (fig. 2); risulta evidente che, a seguito dell'attivazione di idrolisi, si innesca la rottura dei legami alifatici lungo le macromolecole le quali diventano via via più corte; ciò si traduce nella caduta del peso molecolare ponderale, in un primo momento più significativo poi più graduale, fino alla completa degradazione del polimero [16]. Analogamente, all'avanzare del meccanismo di degradazione, si manifesta una riduzione percentuale della massa di polimero (fig. 3) [15].

Come è possibile dedurre dai due diagrammi precedenti (2 e 3), 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 soluzione saline di varia natura si riduce a poco meno di 6 mesi. 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 è fondamentale che l'impalcatura offerta dal polimero, oltre a favorire la proliferazione delle cellule, fornisca anche un supporto strutturale fino all'avvenuta crescita del tessuto in neoformazione.

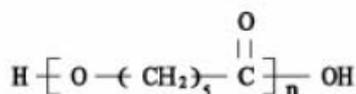


Figura 1. Formula di struttura del policaprolattone

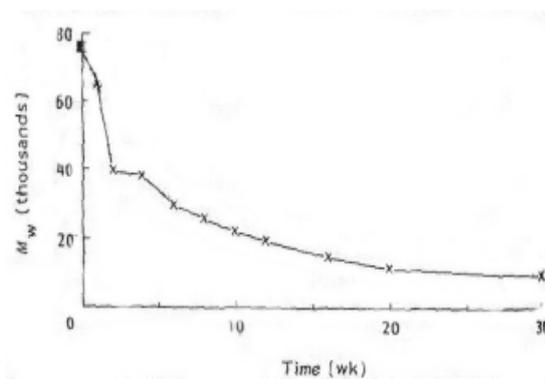


Figura 2. Andamento del peso molecolare ponderale in funzione del tempo dopo l'introduzione in acqua distillata

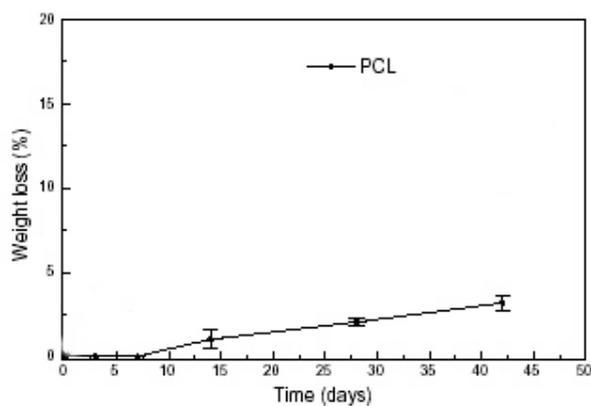


Figura 3. Andamento della perdita di peso del polimero in funzione del tempo dopo l'immersione in acqua distillata

[15]

Proprietà	U.M.	Condizioni	Valore
Conformazione molecolare	-	-	Quasi planare
Peso mol. (unità ripetitiva)	$g\ mol^{-1}$	-	114
Peso medio numerico M_N	$g\ mol^{-1}$	GPC	74000
Peso medio ponderale M_W	$g\ mol^{-1}$	GPC	25000

Tabella I. Proprietà chimiche salienti [14]

Proprietà fisiche

Il policaprolattone è un polimero termoplastico, semicristallino il quale, a temperatura ambiente, presenta uno stato fisico che ricorda quello di una gomma [14].

Appartenendo alla classe dei termoplastici esso è caratterizzato da un' elevata lavorabilità che ne consente il rapido modellamento nella forma che più è utile ai fini dell'applicazione.

Esso è un polimero molto versatile in quanto mostra un'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 entità.

Il principale limite del PCL, infatti, risiede proprio nelle proprietà meccaniche piuttosto esigue (resistenza a compressione pari a 1.58 MPa [15] e resistenza a trazione pari a 20.7÷42 MPa [13]) se confrontate con le principali caratteristiche del tessuto osseo naturale.

Proprietà	U.M.	Condizioni	Valore
<i>Viscosità intrinseca</i>	cm^3g^{-1}	<i>Diluizione infinita</i>	0.9
<i>Entalpia di polimerizzazione</i>	$kJ mol^{-1}$	25°C, 1atm	-28.8
<i>Entropia di polimerizzazione</i>	$kJ mol^{-1}$	25°C, 1atm	-53.9
<i>Energia libera di Gibbs</i>	$kJ mol^{-1}$	25°C, 1atm	-12.8
<i>Grado di cristallinità</i>	%	DSC	69
<i>Cella unitaria</i>	-	<i>Diffrazione ai raggi X</i>	Ortorombica
<i>Numero di coordinazione</i>	-	-	4
<i>Densità</i>	$g cm^{-3}$	<i>Diffrazione ai raggi X</i>	1.094÷1.200
<i>Elongazione</i>	%	-	700
<i>Transizione vetrosa – Tg</i>	°K	DSC	201
<i>Temperatura di fusione – Tf</i>	°K	DSC	331
<i>Calore di fusione - ΔH_f</i>	$kJ mol^{-1}$	DSC	8.9

Tabella 2. Proprietà fisiche salienti [14]

Preparazione degli scaffold : Bioplotter dispensing machine e tecnica 3D fiber deposition

Il bioplotter è una particolare *dispensing machine* utilizzata per ottenere oggetti tridimensionali porosi, di grande interesse nel campo medico e nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti. Tale processo prevede la deposizione di materiale fluido attraverso un sottilissimo ago e la sua successiva solidificazione (fig. 4)

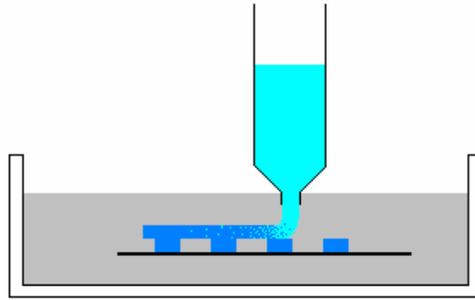


Figura 4. Metodo di deposizione del bioplotter

Affinché si abbiano oggetti tridimensionali di qualità, il materiale utilizzato deve possedere due importanti caratteristiche:

- Gli strati devono essere legati gli uni agli altri
- Il materiale estruso non deve né rigonfiare né contrarre troppo durante l'intero processo.

La deposizione strato per strato avviene o su un supporto, e quindi in presenza di sola aria, o in soluzione. Nel caso di deposizione in un liquido si ha il vantaggio di prevenire le deformazioni degli strati depositati non ancora completamente solidificati.

Per tali motivi solo materiali altamente viscosi possono essere processati in aria (ad esempio i fusi polimerici).

Per quanto riguarda i processi di solidificazione, è possibile distinguerne tre:

1. solidificazione indotta termicamente;
2. solidificazione indotta da reazione chimica;
3. solidificazione indotta da precipitazione.

Il primo processo prevede la solidificazione non solo di fusi ma anche di gel termicamente reversibili. In aggiunta a quanto detto bisogna aggiungere la possibilità di ottenere solidificazione mediante riscaldamento indotto.

Nel secondo caso, invece, un primo componente reattivo viene aggiunto al materiale da estrarre e contemporaneamente un secondo al mezzo plottante. Quando le due sostanze entrano in contatto tra loro si innesca una reazione chimica grazie alla quale il materiale estruso solidifica. Quanto detto è relativo al caso in cui la sostanza reattiva presente nel mezzo è molto più mobile rispetto a quello nel materiale depositato. Se così non fosse, ad indurire sarebbe il mezzo anziché il materiale estruso.

Nel terzo caso si va a modificare l'ambiente chimico circostante al materiale depositato per indurne la precipitazione e la successiva solidificazione. Si possono modificare, inoltre, la polarità, la pressione osmotica ed il pH.

È fondamentale per la buona riuscita del processo che il materiale estruso non si contragga molto.

Parametri significativi del processo

Il processo di realizzazione alla base della tecnologia del 3D plotting dipende da un elevato numero di parametri, i quali inizialmente difficili da stimare ma che sono solitamente valutati tramite esperimenti condotti su diversi materiali da utilizzare.

Di seguito vengono descritti alcuni tra i principali parametri:

- ***tipi di Needle (ago)***

A seconda della viscosità del materiale, ne esistono tre differenti tipologie (fig. 5) :

1. conical needles (*aghi conici*);
2. short needles (*aghi corti*);
3. long needles (*aghi lunghi*).

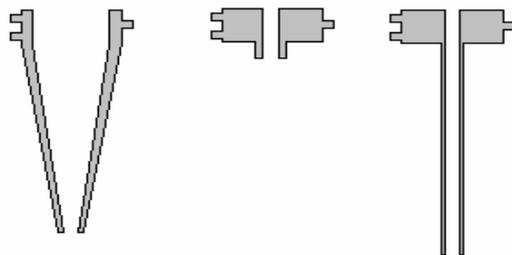


Figura 5. differenti tipi di needle

Di fondamentale importanza è anche il materiale di cui è costituito il needle in quanto lo stesso deve sopportare stress termici e meccanici. Un esempio sono i needle in metallo utilizzati per temperature solitamente superiori a 80°C o anche quelli in teflon utilizzati soprattutto affinché il materiale non aderisca alle pareti dell'ago e per la produzione di oggetti 3D in soluzione acquosa.

- ***lunghezza dei needle***

La lunghezza del needle è strettamente correlata alla viscosità del materiale depositato: materiali con bassa viscosità vengono processati con long needle mentre materiali altamente viscosi sono estrusi tramite short o conical needle. Questo, perché il materiale potrebbe

essere depositato troppo velocemente e il processo diventerebbe incontrollabile, o anche perchè l'estrusione del materiale potrebbe avvenire troppo lentamente. Per i liquidi non comprimibili la legge di **Hagen-Poiseuille** fornisce il legame tra la viscosità, il raggio interno del needle e la lunghezza dello stesso per un ago con diametro costante

$$V = \frac{\pi \cdot \Delta p \cdot \Delta t}{8 \cdot \eta \cdot L} \cdot r^4$$

dove: V è il volume del materiale estruso, η è la viscosità dinamica, r e L sono rispettivamente il raggio e la lunghezza del needle, Δp è la differenza di pressione tra la punta dell'ago e la cartuccia, Δt è il tempo di scorrimento. È ovvio che la portata del materiale (dV/dt) è inversamente proporzionale alla lunghezza dell'ago.

- ***Diametro del needle***

Come già detto, il tipo di ago dipende dalla viscosità del materiale. Naturalmente, il diametro del needle determina anche lo spessore dell'estruso, in altre parole, la finezza dell'oggetto e di conseguenza anche il tempo di processo. Nella legge di **Hagen-Poiseuille** il raggio (e quindi il diametro interno) del needle appare alla quarta potenza, questo significa che aghi molto sottili prolungano oltremodo il tempo di processo.

- ***Il materiale estruso***

L'alta viscosità del materiale estruso facilita il processo di realizzazione. Polimeri o piccoli granuli insolubili possono essere usati per aumentare la viscosità del materiale, assicurandosi, però, che le dimensioni di tali granuli non ostruiscano il passaggio del fuso attraverso l'ago.

- ***Mezzo di base (aria o liquido)***

Il mezzo utilizzato dipende strettamente dal materiale estruso. Ci sono due proprietà del materiale da depositare che sono prese in particolare considerazione: densità e polarità.

Il mezzo utilizzato dovrebbe avere una densità molto simile a quella del materiale estruso, inoltre essa non dovrebbe essere molto alta per evitare sia il galleggiamento del materiale depositato, sia una difficoltà inutile nel legame tra gli strati.

Una significativa differenza di polarità tra il materiale depositato ed il mezzo comporta un restringimento dell'estruso e la formazione di gocce prima della solidificazione dovute alla tensione superficiale. Questo può essere evitato con la scelta di un differente mezzo o con l'aggiunta di un tensioattivo. Quando, invece, la viscosità è molto simile il mezzo dissolve il materiale estruso o lo fa rigonfiare.

- **Velocità di deposizione**

La velocità di deposizione dipende dalla portata di materiale che fluisce dall'ago e dalla velocità di solidificazione del materiale. Maggiore è la velocità di solidificazione del materiale, più alta deve essere la velocità di deposizione, infatti la capacità di aderire del materiale depositato è ancora adeguata a legare gli strati quando ognuno di questi è a contatto con quello sottostante. D'altra parte se il tempo di solidificazione è lungo si sceglie una velocità di deposizione relativamente bassa per consentire al materiale depositato di indurire prima che un ulteriore strato venga sovrapposto.

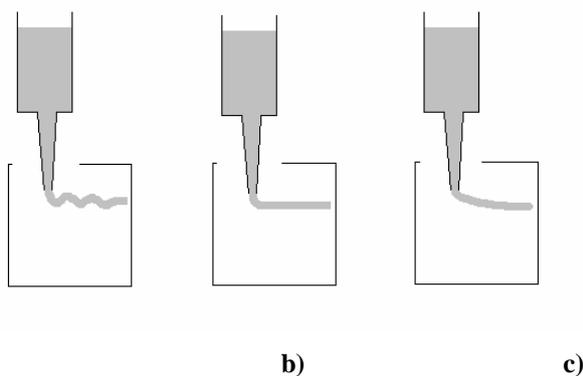


Figura 6. Diverse relazioni tra velocità di estrusione e materiale estruso

Di conseguenza, è possibile commentare gli esempi riportati in figura nel seguente modo:

- a) Con una velocità di alimentazione bassa l'estruso comincia a rigonfiare. In questo caso la soluzione più semplice è diminuire la pressione imposta.
- b) Questo rappresenta il caso ottimale: il materiale estruso risulta deformato in maniera non significativa.

- c) In quest'ultimo caso il processo è troppo veloce ed evidenzia uno stiramento del materiale, infatti il fuso si lega con lo strato precedentemente depositato molto più tardi. Per evitare ciò si incrementa la pressione imposta.

- **Pressione imposta**

La pressione imposta dipende strettamente dalla velocità di deposizione e ovviamente influisce sul flusso del materiale. Può facilmente essere variata durante il processo di deposizione ed è spesso usata per il “setting” del flusso di materiale.

- **Spessore dello strato (layer thickness)**

Lo spessore dello strato dipende dal modo in cui questi si legano.

- a) Se lo spessore degli strati è tale che gli stessi si toccano, ossia c'è un solo punto di contatto, allora il layer thickness deve essere leggermente più piccolo del diametro della fibra.
- b) L'80% del diametro della fibra rappresenta ad esempio un valore consigliato.
- c) Se, invece, lo spessore è troppo piccolo ci sono deformazioni nella zona di sovrapposizione dei fusi e la porosità cala in maniera considerevole. In alcuni casi non c'è una netta separazione fra gli strati, tale fenomeno influenza negativamente la struttura porosa desiderata.

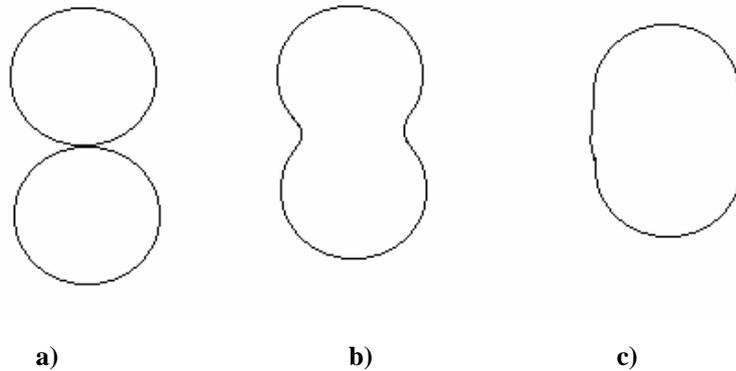


Figura 7. Relazioni diverse di angolo-sezione tra spessore e diametro di layer

- **Corner delay**

Quando si realizza un dato pattern costituiti da fibre in parallelo ci sono punti in cui la struttura tende a "curvarsi". Se, col tempo, viene depositato del materiale senza alcun "ritardo" non dovrebbero svilupparsi angoli acuti. La ragione di questo è che l'ago è sopra lo strato che è appena stato costruito. Per compensare questo effetto e assicurare, inoltre, un buon legame, che è particolarmente importante ai bordi, viene solitamente preso in considerazione un "ritardo di angolo" (corner delay).

Questo ritardo ha anche il compito di costruire le pareti esterne, in accordo con le specifiche, quando le parti superiori saranno costruite evitando possibili deformazioni dovute alla differente velocità di costruzione tra i bordi e la parte centrale dell'oggetto.

Il ritardo di angolo dipende dalla velocità di deposizione, mostrata a titolo di esempio nella figura 8 di seguito riportata.

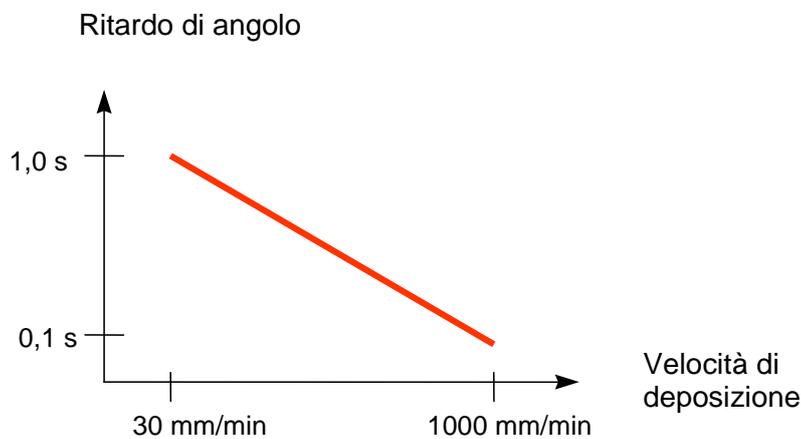


Figura 8. Dipendenza del ritardo di angolo dalla velocità di deposizione

- **Pattern (modello)**

Il biplotter è in grado di selezionare diversi pattern. Ogni strato può essere disposto in maniera parallela o concentrica. Per stabilizzare il processo di estrusione è necessario assicurare il contatto tra uno strato superiore di materiale e quello sottostante. Di conseguenza, il biplotter non può essere usato per costruire oggetti in cui i filamenti sono sempre allineati nella stessa maniera o sono sempre concentrici.

- **Strand distance (distanza tra le fibre)**

La minima distanza tra le fibre è approssimativamente l'80% del loro diametro. Per strand distance si intende, quindi, la distanza tra due fibre parallele, poste in uno stesso piano, valutata centro-centro.

La porosità è fortemente influenzata dalla distanza tra le fibre e dipende dal diametro interno del needle.

- **Sistema di coordinate**

La macchina possiede un sistema di riferimento cartesiano con il quale lavora (fig. 9) . I parametri da fornire allo strumento sono: **strand distance** sia lungo x che y, **layer thickness** su z. Inoltre il bioplotter ha due velocità, una sul piano xy e una lungo z.

Per evitare punti di intersezione tra le fibre nell'allineamento in z è possibile impostare una distanza tra le stesse sul piano xy. È possibile impostare l'allineamento tra la fibra di uno strato e lo strato sottostante; questo può essere di 0°, 45°, 90°. Tale caratteristica permette di costruire strutture porose con differenti proprietà meccaniche.

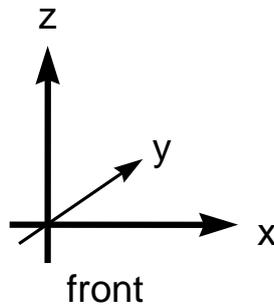


Figura 9. Sistema di coordinate

- **Contorno esterno**

Il profilo esterno è decisivo se la parte esteriore dell'oggetto è chiusa o aperta. La distanza tra il profilo esterno e l'oggetto non dovrebbe superare il diametro della fibra.

Dopo aver descritto la procedura di base ed i parametri che influenzano la realizzazione delle strutture porose, è importante focalizzare l'attenzione sulle modalità di funzionamento del bioplotter.

Il sistema di deposizione è composto da una siringa posizionata sull'asse z di un microposizionatore a tre assi, messo in moto da motori passo-passo. La siringa, che può

essere in acciaio oppure in teflon a seconda che si voglia depositare del materiale fuso o disciolto in un solvente, presenta aghi intercambiabili caratterizzati da differenti diametri interni, dai quali il polimero viene estruso grazie all'applicazione di una pressione controllata. Un sistema ad aria compressa è connesso direttamente alla cartuccia attraverso un adattatore. La pressione del gas di spinta può essere regolata sia manualmente che attraverso il software di comando. La siringa viene posta all'interno di cartucce riscaldate attraverso un sistema di termocoppie controllate elettronicamente e un termosensore controlla la temperatura del needle.

Il sistema è interfacciato ad un computer che controlla in ogni momento sia il posizionamento della siringa, sia la pressione applicata. Il dispositivo presenta inoltre un software CAD appositamente sviluppato che consente di disegnare la struttura strato per strato.

La realizzazione della struttura è ottenuta, facendo muovere la siringa, disposta in una cartuccia lungo l'asse z, rispetto alla piattaforma di deposizione. Una volta deposto uno strato, la siringa è spostata verso l'alto di un tratto Δz ed il sistema comincia nuovamente a deporre per realizzare lo strato successivo. Come accennato in precedenza, scegliendo opportunamente, in fase di impostazione, l'orientazione delle fibre che compongono ogni singolo strato si possono ottenere strutture tridimensionali caratterizzate da differenti architetture (*pattern*) e geometrie.

Preparazione dei campioni

Sono stati realizzati scaffold tridimensionali cilindrici, caratterizzati da un diametro di 8mm e da un'altezza di 3mm, utilizzando il *Bioplotter dispensing machine* (Envisiontec GmbH, Germany) (fig. 10).

Per fare questo, sono stati inseriti all'interno di una siringa in acciaio inossidabile dei *pellets* ($M_w = 65000$, Aldrich) di policaprolattone (PCL) e, successivamente, sono stati portati alla temperatura di 120°C tramite una cartuccia metallica riscaldata posizionata sul braccio mobile del *plotter*. Una volta fuso, il polimero è stato forzato attraverso l'ago della siringa con azoto in pressione (8-8.5bar). Gli scaffold sono stati realizzati depositando le fibre strato dopo strato, secondo dei modelli cilindrici caricati nel sistema CAD/CAM del *bioplotter*.

L'ago utilizzato, anch'esso di acciaio inossidabile, presentava un diametro interno pari a 250 μ m.

I parametri dai quali è dipesa la dimensione complessiva dei pori sono:

- diametro delle fibre (dipendente dal diametro interno dell' ago e/o dalla velocità di deposizione);
- spaziatura fra le fibre (*strand distance*) impostata, pari a $400\mu\text{m}$;
- spessore di ciascuno strato, pari a $200\mu\text{m}$.

L'architettura degli scaffold è stata ottenuta depositando fibre di $200\mu\text{m}$ di diametro secondo i *pattern* $0^\circ/90^\circ$ e $0^\circ/45^\circ/90^\circ/135^\circ$, con una velocità di deposizione di $30\text{-}35\text{mm/min}$.

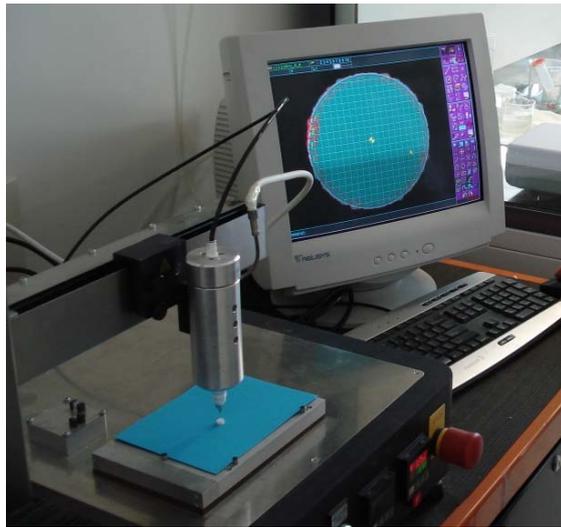


Figura 10. Realizzazione di uno degli scaffold cilindrici in PCL tramite bioplotter

VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE DEI MATERIALI

Microscopia a scansione elettronica

La geometria e l'architettura degli scaffold sono state caratterizzate tramite un'analisi a microscopio a scansione elettronica (SEM).

Il microscopio a scansione elettronica (fig. 1) 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:

1. un blocco cilindrico in cui sono contenuti vari elementi quali un filamento di tungsteno, sistemi di bobine e lenti condensatrici;
2. una base sulla quale è collocato il porta campioni 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 d'elaborazione che permette l'assegnazione delle informazioni necessarie all'esecuzione della prova e gli spostamenti lungo la superficie del campione. Inoltre, esso è corredato di un monitor CRT sul quale viene visualizzata in tempo reale l'immagine scannerizzata dallo strumento. L'immagine rilevata è costituita da tanti *spot* luminosi la cui intensità è legata a quella 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.

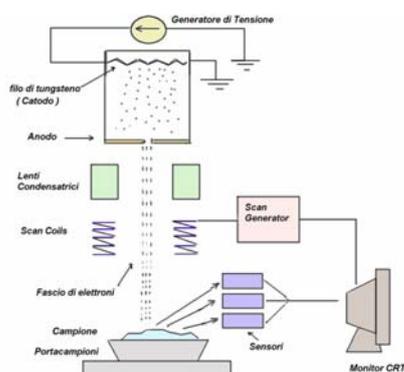


Figura 1. Schema dell'architettura di un microscopio a scansione elettronica

Le superfici dei campioni vengono osservate a forte ingrandimento grazie ad un microscopio a scansione elettronica (Mod Leica 420). Le strutture, per poter essere analizzate, devono essere prima metallizzate, in seguito vengono portate in condizioni di vuoto spinto ed infine osservate. Grazie a questo tipo d'analisi è possibile ottenere informazioni di diversa natura: nel nostro caso principalmente la presenza o meno di una porosità e la dimensione dei pori.

Microtomografia

La microtomografia tridimensionale è una forma miniaturizzata della tomografia assiale computerizzata, meglio nota come TAC, e viene usata per creare mappe tridimensionali di piccoli campioni, di solito di pochi centimetri di grandezza.

Il microtomografo (micro-CT) è un'apparecchiatura che consente di ricostruire immagini 3D acquisendo slice molto sottili. Tali immagini contengono informazioni solo bidimensionali. In seguito, tali slice, vengono elaborate dal calcolatore, per mezzo d'opportuni software, ed assemblate in modo da ricostruire l'oggetto. Tuttavia il grado di precisione della ricostruzione è strettamente connesso all'impostazione dei parametri d'acquisizione e di quelli d'elaborazione. Tipicamente la risoluzione spaziale dei CT-scanner è nel range 1-2.5mm. Il micro-CT incrementa la risoluzione spaziale di sette o otto ordini di grandezza, in termini di volume. Nel caso dello SKYSCAN 1072 (fig. 2) la risoluzione spaziale è di 5 μm .



Figura 2. SKYSCAN 1072.

L'aspetto più interessante della microtomografia è che si possono ottenere informazioni molto dettagliate sulla struttura ma senza danneggiarla, ossia con tecniche non distruttive.

Il fascio di raggi X incidente sull'oggetto genera una proiezione 2D. Nella figura seguente è illustrato il caso più semplice in cui i raggi sono paralleli.

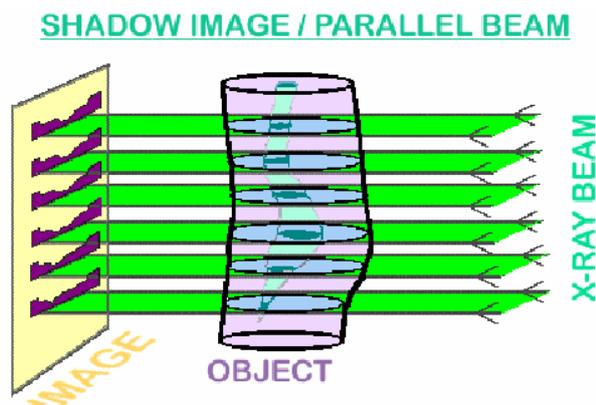


Figura 3. Rappresentazione di un fascio di raggi X.

La ricostruzione avviene facendo ruotare l'oggetto ed acquisendo le successive proiezioni. Terminata tale fase, il software assembla ciascuna immagine in modo da costruire slice sottili bidimensionali dalle quali, in seguito, tramite opportuno programma è possibile ricostruire l'oggetto. In fase d'acquisizione è fondamentale impostare parametri quali la tensione e la corrente in modo da riuscire a visualizzare il campione. Modificando opportunamente i parametri è possibile, nel caso di provini composti di più parti, visualizzare alcuni elementi piuttosto che altri. In realtà non siamo nel caso di fasci di raggi X paralleli, bensì divergenti, ma ad una certa distanza questi possono essere assunti approssimativamente tali (paralleli).

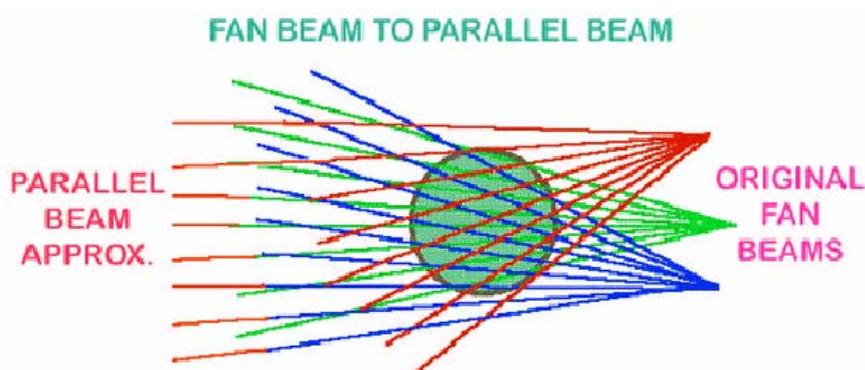


Figura 4. Fasci di raggi X.

Lo SKYSCAN 1072 è una struttura compatta che combina un sistema *X-ray shadow microscopic* con un computer fornito di software per ricostruzioni tomografiche.

Esso è costituito da un *X-ray microfocus tube* con generatore ad alto voltaggio, una camera d'alloggiamento per il campione con controllo di precisione della posizione, una telecamera CCD ed un computer per l'acquisizione ed elaborazione. Nella figura seguente è illustrato lo schema del micro-CT SKYSCAN 1072 (fig. 7) .

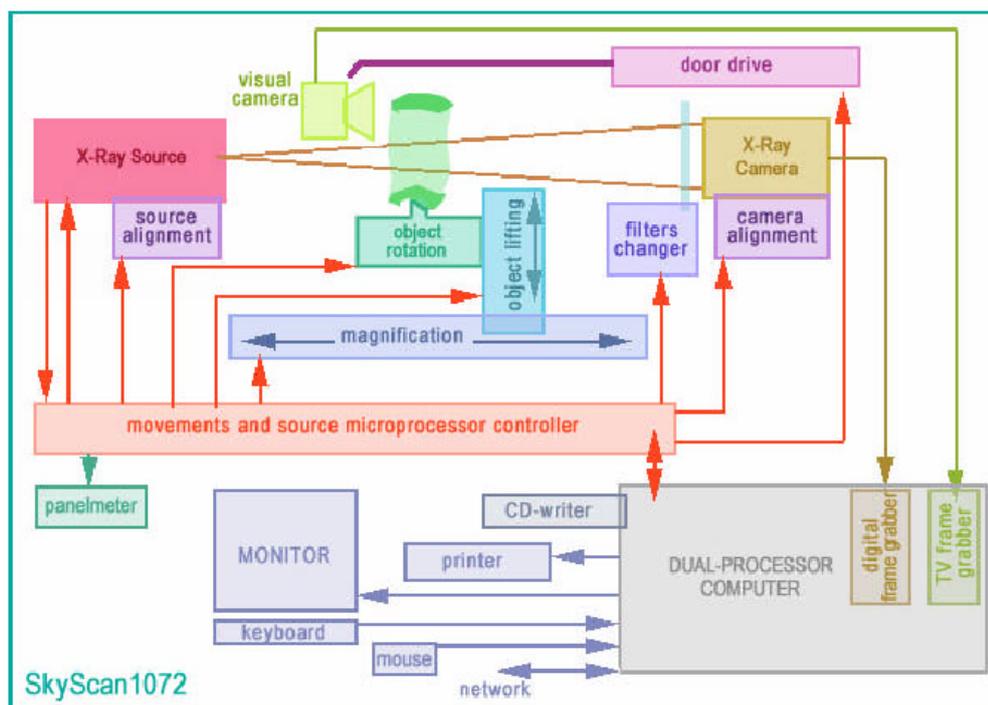


Figura 5. Schema del microtomografo SKYSCAN 1072.

Porosimetria a mercurio

La valutazione della porosità degli scaffold realizzati è stata effettuata in un range di pressione 0.1 - 400 kPa, utilizzando un porosimetro Pascal 140, Thermo Finnigan.

La porosimetria a mercurio è una tecnica sviluppata nel 1945 da Ritter e Drake e permette di misurare il volume e le dimensioni dei macropori e mesopori in sostanze solide porose (fig. 6) .

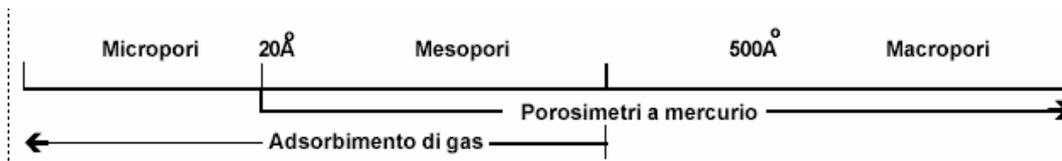


Figura 6. Valutazione della porosità in funzione della dimensione dei pori.

La tecnica si basa sulla proprietà del mercurio di comportarsi da liquido non-bagnante con una grandissima varietà di solidi.

Grazie a questa caratteristica il mercurio penetra attraverso i pori aperti di un campione solido sotto l'effetto di una pressione crescente.

Il raggio dei pori penetrati è inversamente proporzionale alla pressione esercitata secondo una relazione proposta da Washburn in cui alcune assunzioni sono da tenere in considerazione:

1. la tensione superficiale del mercurio e l'angolo di contatto con il solido sono costanti durante l'analisi;
2. la pressione d'intrusione deve essere all'equilibrio;
3. i pori sono considerati di forma cilindrica;
4. il solido non si deforma sotto l'effetto della pressione.

Misurando la quantità di mercurio penetrata nei pori del campione e la pressione d'equilibrio alla quale avviene l'intrusione si ottengono i dati sperimentali per poter calcolare la distribuzione del volume dei pori in funzione del loro raggio.

La determinazione della dimensione del poro mediante la tecnica di penetrazione del mercurio è basata sul comportamento dei liquidi "non bagnanti" nei capillari.

Un liquido messo in contatto con un solido poroso con il quale si comporti da non bagnante (ovvero se il liquido presenta con quel solido un angolo di contatto maggiore di 90°) non riesce ad essere assorbito spontaneamente dai pori del solido stesso a causa della tensione superficiale. Tuttavia, questa resistenza alla penetrazione può essere vinta applicando una pressione esterna.

La pressione richiesta è in funzione della dimensione del poro. La relazione tra la dimensione dei pori e la pressione esercitata, quando il poro è considerato cilindrico, è espressa come:

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

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

Questa relazione è comunemente conosciuta come equazione di Washburn. Sebbene in quasi tutte le sostanze porose non ci sono pori cilindrici, tale equazione viene generalmente usata per calcolare la

distribuzione della dimensione dei pori partendo dai dati ottenuti mediante il porosimetro a mercurio. L'equazione di Washburn si basa su alcune considerazioni.

In un capillare avente sezione circolare, la tensione superficiale del liquido è esercitata nell'area di contatto oltre una lunghezza pari alla circonferenza del poro. Questa forza, $2\pi r\gamma$, è perpendicolare al piano della superficie di contatto.

La forza tendente a spingere il liquido fuori del capillare è:

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

Contro questa forza, la pressione esterna esercitata sull'area all'interno della circonferenza di contatto sarà:

$$\pi r^2 p$$

Quando viene raggiunto l'equilibrio, le due forze hanno lo stesso valore:

$$-2\pi r\gamma \cos \theta = \pi r^2 p$$

Tale equazione mostra quindi che il raggio del poro è inversamente proporzionale alla pressione:

$$r = -2\gamma \cos \theta / p$$

Per pori di forma irregolare, il rapporto tra la sezione del poro (riferita alla pressione esercitata) e la circonferenza del poro (riferita alla tensione superficiale) non è proporzionale al raggio e dipende dalla forma del poro.

In aggiunta a queste approssimazioni, si deve assumere inoltre che la natura delle sostanze porose e la forma del poro rimangano costanti per tutto l'intero range di pressione applicata durante l'analisi. Nel porosimetro Pascal (fig. 7), 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 7. Porosimetri PASCAL 140 e PASCAL 240.

Tale porosimetro consiste, in linea di principio, in quattro parti:

1. dilatometro, contenente il campione da esaminare;
2. sistema di pressurizzazione, comprendente la pompa peristaltica dell'aria;
3. sistema di depressurizzazione, che include la pompa peristaltica dell'aria e la pompa da vuoto;
4. sistema di misura di capacità e della pressione, che misura l'intrusione del mercurio nel campione e la pressione d'intrusione.

Il nuovo metodo d'acquisizione dati PASCAL deriva dalla denominazione inglese Pressurization with Automatic Speed-up by Continuous Adjustment Logic.

Questa logica di pressurizzazione costituisce un passo in avanti rispetto alle metodologie usate in passato.

Il sistema PASCAL è dotato di una tabella fissa di velocità massima di pressurizzazione ottimizzata in conformità a due parametri: il valore di pressione attuale d'analisi e la velocità impostata dall'operatore.

Avere velocità massime diverse in funzione della pressione attuale è necessario poiché la legge che lega il raggio dei pori alla pressione d'equilibrio (equazione di Washburn) è un'equazione inversa ovvero se la pressione è bassa a piccole variazioni di pressione corrispondono grandissime variazioni di raggio. Viceversa, alle alte pressioni anche a grandi variazioni di pressione in ogni caso le differenze sui raggi dei pori sono minime.

Tutto ciò significa che l'attendibilità della distribuzione dei pori in un'analisi di questo tipo è direttamente legata alla velocità di pressurizzazione.

Infatti, l'analisi risulta essere molto delicata alle basse pressioni perchè, se la velocità non è controllata in modo opportuno il rischio è di avere un valore di mercurio penetrato attribuito ad una pressione che non è più quella reale alla quale è incominciato il fenomeno dell'intrusione. La conseguenza di questo fenomeno è di avere una distribuzione dei pori spostata verso valori più piccoli del reale.

Non appena il porosimetro rivela una penetrazione di mercurio, la velocità diminuisce repentinamente fintanto che la penetrazione è completamente avvenuta accelerando in seguito secondo la logica descritta precedentemente.

L'adeguamento dell'aumento di pressione in funzione della penetrazione permette di acquisire i punti sperimentali associando il volume alle pressioni in tempo reale limitando in tal modo i tempi morti che si verificano con altre logiche di pressurizzazione.

Il metodo utilizzato dal porosimetro PASCAL permette in tal modo di ottenere misure rapidissime (circa il 30% in meno degli altri metodi) con una riproducibilità ed attendibilità fuori della norma.

Il volume di mercurio penetrato è direttamente la misura del volume dei pori del campione espressi in mm^3 ed è ottenuto tramite un sistema capacitivo di lettura in cui un'armatura del condensatore è fissa ed è costituita dall'elettrodo tubolare esterno che si fissa sul dilatometro, mentre la seconda armatura è mobile ed è costituita dalla colonnina di mercurio all'interno del tubo calibrato del dilatometro.

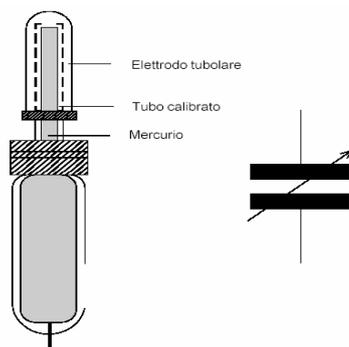


Figura 8. Sistema capacitivo.

All'aumentare della pressione ed alla presenza di penetrazione, la colonnina di mercurio incomincerà a scendere. Varierà in tal modo la capacità del condensatore in funzione della penetrazione. Il valore così riscontrato risulta essere quindi causato da due effetti che si sommano: la penetrazione nei pori del campione e la compressibilità del mercurio.

Infatti, il mercurio, pur essendo un liquido, è comprimibile alle alte pressioni rendendo necessario sottrarre i dati sperimentali dell'analisi una curva di compressione di solo mercurio che è normalmente chiamata analisi di "bianco".

Partendo dai dati ottenuti con tale analisi, nelle misure di porosità il software automaticamente corregge i dati letti, sottraendo punto per punto la curva del bianco memorizzata in precedenza. Tale operazione è indispensabile per una carretta interpretazione dei dati sperimentali, in caso contrario attribuiremmo un valore del volume dei pori maggiore al reale.

Misura delle pressioni

Il mezzo di trasmissione della pressione sul mercurio è l'aria ambiente condizionata alle diverse pressioni nel circuito pneumatico. Lo strumento, nella misura e nel calcolo delle pressioni tiene conto della pressione piezometrica sul campione creata dal livello iniziale del mercurio (tale livello è programmabile) e della sua diminuzione man mano che avviene la penetrazione. La pressione d'equilibrio deve essere corretta con la pressione idrostatica che esercita la colonna di mercurio sul campione.

Tale correzione è perciò significativa sui dilatometri tipo normali e wide (non sul dilatometro per ultramacropori che ricuce al minimo tale valore). Infatti, normalmente l'altezza iniziale della colonnina può essere circa 100mm che corrisponde ad una pressione idrostatica di circa 1,3kPa. La correzione della pressione è effettuata automaticamente.

Calcolo del raggio dei pori

Il raggio dei pori è funzione inversa della pressione secondo l'equazione di Washburn.

Superficie specifica

Uno dei risultati ottenuti tramite la porosimetria a mercurio è la superficie specifica del campione. Il calcolo si basa su un modello geometrico dei pori. Il modello generalmente accettato è quello cilindrico. Noto il volume del poro ed il suo raggio si risale facilmente al calcolo della superficie laterale del cilindro. Il calcolo è ripetuto per ogni punto sperimentale e dà una superficie specifica espressa in m^2/g sia sottoforma differenziale sia cumulativa.

Bulk Density (Densità bulk)

La BD è un parametro di fondamentale importanza nella caratterizzazione dei solidi e delle polveri poiché fornisce, una volta noto il peso di un materiale, il volume esterno occupato dal provino stesso. Essa è la densità di un solido, riferita al volume esterno del solido stesso. Essa si esprime in grammi di campione diviso il volume esterno occupato dal provino. La porosimetria a mercurio fornisce, tra le altre informazioni, anche una misura molto attendibile, precisa e riproducibile della BD. Il volume esterno di un campione si può misurare tramite questa tecnica grazie alla proprietà del mercurio di non bagnare le pareti di un campione solido e quindi di necessitare di una pressione per penetrare eventuali pori del campione stesso. Quindi, se il sistema campione – mercurio si trova sotto vuoto, il mercurio non sarà in grado di entrare all'interno dei pori, disponendosi quindi come un guanto sulla superficie esterna del campione.

A questo punto è sufficiente poter tarare, tramite una pesata, il portacampioni (dilatometro) riempito di mercurio fino ad un'altezza predefinita e, riferendosi a questo peso ripetere la pesata ponendo questa volta una quantità nota di campione nel dilatometro e riempiendo quest'ultimo sotto vuoto fino allo stesso livello precedente.

Il mercurio, come detto prima, sotto vuoto non penetra nei pori e dalla differenza delle due pesate si ottiene il peso di mercurio mancante e quindi, nota la temperatura del laboratorio e la densità del mercurio, il volume occupato dal campione.

Descrizione dello strumento

Il porosimetro PASCAL consiste in un monoblocco suddiviso in due sezioni:

1. la sezione di controllo (parte superiore) contenente le schede elettroniche ed il pannello di comando;
2. la sezione analitica (parte inferiore) contenente i dispositivi elettromeccanici e pneumatici destinati al corretto funzionamento analitico/strumentale.

Nella figura sottostante è rappresentato lo schema di principio del porosimetro Pascal 140 (fig. 9) ,
dove:

- 1 = Pompa da vuoto tipo E2M 1.5 Edwards;
- 2 = Pompa peristaltica aria;
- 3 = Pompa peristaltica mercurio;
- 4 = Serbatoio del mercurio;
- 5 = Dilatometro;
- 6 = Trappola per il mercurio;

- 7 = Sistema capacitivo e misurazione del livello di mercurio;
 8 = Vacuometro;
 9 = Trasduttore;
 10 = Aspiratore ausiliario (opzionale);
 11 = Valvola proporzionale ad apertura modulata V3.

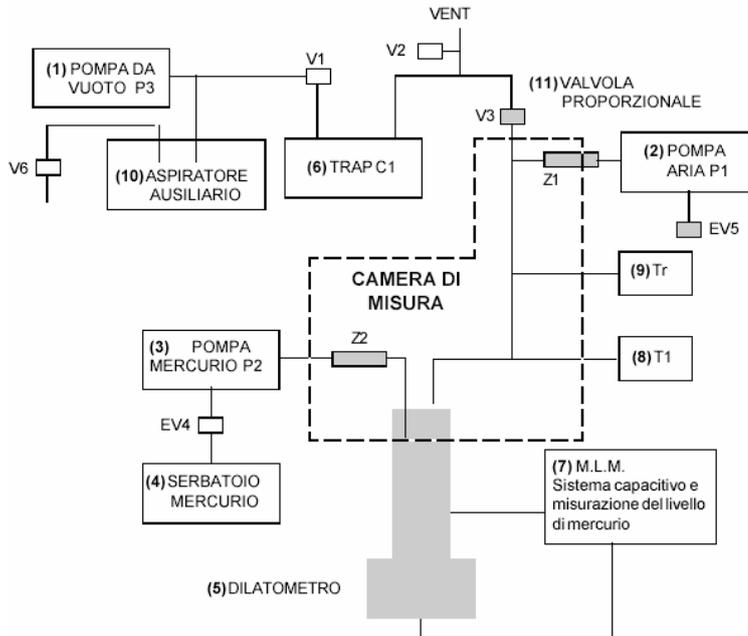


Figura 9. Schema del porosimetro PASCAL 140.

Circuito di generazione del vuoto

Questa funzione è ottenuta mediante l'impiego della pompa per vuoto primaria P3(1) che genera livelli di vuoto fino ad almeno 10 Pa. L'elettrovalvola V1 e la valvola modulata V3 provvedono a collegare la pompa alla camera di misura. Dopo la pompa da vuoto P3 e le elettrovalvole V1 e V3 sono presenti un serbatoio di cattura TRAP C1 (6) che raccoglierà il mercurio eventualmente trascinata ed un'elettrovalvola V2 (normalmente aperta) di sfiato (VENT) verso l'ambiente.

In caso d'interruzione di corrente elettrica, le elettrovalvole V1 e V2 (normalmente aperte) mettono la pompa P3 a pressione atmosferica impedendone l'allagamento da parte del proprio olio.

Mentre la pompa P3 è sempre alimentata, l'elettrovalvola V1 viene comandata in modo indipendente per consentire la creazione del vuoto in camera di misura solo quando serve.

L'apertura della valvola V3 è modulata per rallentare la generazione del vuoto nella camera di misura.

Circuito di riempimento del dilatometro.

Tale funzione viene ottenuta mediante l'impiego di un serbatoio (4) avente una capacità massima di 250 centimetri cubi di mercurio, di un'elettrovalvola a pinza V4 e di una pompa peristaltica del mercurio (3).

Il funzionamento della pompa peristaltica provoca automaticamente l'apertura dell'elettrovalvola EV4 che ha lo scopo di intercettare il flusso di mercurio in caso di malfunzionamento.

La pompa è dotata di tre velocità:

1. avanti veloce per il riempimento del bulbo del dilatometro;
2. avanti lento per il riempimento del capillare del dilatometro;
3. indietro veloce per svuotare il dispositivo Z2.

L'operatore potrà arrestare il riempimento e farlo ripartire, effettuare lo spurgo del capillare di mercurio introducendo aria alla pressione ambiente mediante l'elettrovalvola V2 agendo sul tasto AIR PULSE (l'operazione è d'aiuto nei soli dilatometri per polveri).

La linea del mercurio è intercettata da un'elettrovalvola di sicurezza EV4 (normalmente chiusa) che si aprirà solo quando la pompa peristaltica è in movimento.

Circuito per la generazione controllata della pressione

▪ Pressione crescente

L'applicazione della pressione crescente avviene modulando la velocità della pompa peristaltica P1 (2) che introduce aria tramite il filtro Z1. Inizialmente saranno chiuse solo le elettrovalvole V1 e V2 quindi verrà chiusa automaticamente anche la valvola V3 per consentire un incremento molto lento della pressione. La pompa peristaltica P1 è in grado di operare fino a 400kPa e di mantenere il livello iniziale di vuoto.

▪ Pressione decrescente

L'applicazione della pressione decrescente avviene in modo controllato mediante la peristaltica fino a circa la pressione ambiente quindi mediante l'apertura modulata di V3 fino al ripristino del livello iniziale del vuoto.

Circuito di misura della pressione

La pressione è controllata mediante il trasduttore assoluto T1 (8) in grado di operare fino a 400kPa. La camera di misura è dotata di un secondo trasduttore Tr (9) del tipo da vuoto (0-100Pa) che viene

utilizzato per azzerare automaticamente il trasduttore T1 e per la lettura quando viene raggiunto un vuoto inferiore a 100Pa durante il degasaggio sotto vuoto dei campioni.

Circuito di misura della variazione di volume del mercurio (7)

Tale valore si ottiene mediante la misura della variazione della capacità esistente tra la colonna di mercurio ed un elettrodo posto sul dilatometro. Il volume viene quindi ottenuto moltiplicando la variazione di livello misurato per i coefficienti (specifici per ogni tipo di dilatometro) ricavati nella fase di calibrazione. La misura del volume verrà utilizzata anche per determinare il livello di riempimento del dilatometro.

Aspiratore ausiliario

Questa opzione (10) asservita da una valvola manuale V5, può essere implementata nel porosimetro PASCAL 140 sia per l'utilizzo con il dilatometro speciale per ultramacropori S-CD6 sia per funzioni ausiliarie di pulizia.

La figura seguente mostra lo schema a blocchi generale del Porosimetro PASCAL 140.

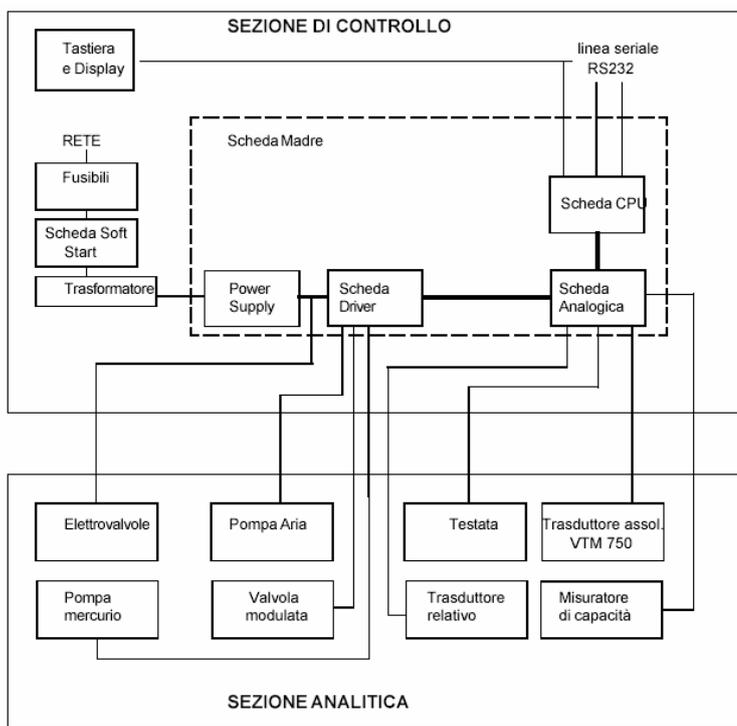


Figura 10. Schema a blocchi generale.

Caratterizzazione meccanica

La risposta meccanica degli scaffold dipende in primo luogo dalle proprietà del materiale utilizzato ma anche dalla porosità, dall'architettura e dalla geometria. L'analisi delle proprietà meccaniche risulta, a tale proposito, essenziale per comprendere se il materiale presenta caratteristiche adeguate al ruolo che deve svolgere. Da qui nasce la necessità di sapere come il materiale in questione si comporta se sottoposto a determinate sollecitazioni meccaniche.

Prove statiche di compressione

Gli scaffold dalla geometria cilindrica, caratterizzati da un diametro di 8 mm e da un'altezza di 3 mm, ottenuti depositando polimero fuso, sono stati sottoposti a compressione alla velocità di 1 mm/min, per un ammontare complessivo di deformazione pari a 0.60 mm/mm.

Lo sforzo e la deformazione ingegneristici in compressione sono stati valutati nel seguente modo:

$$\sigma_0 = \frac{F}{A_0}$$
$$\varepsilon_0 = \frac{\Delta h}{h_0}$$

dove F rappresenta il carico, A_0 ($\pi/4 D^2$) l'area apparente della sezione trasversale, Δh la variazione di altezza ed h_0 l'altezza iniziale del campione.

Le prove sono state condotte utilizzando l'INSTRON 4204 (fig. 11) con una cella di carico di 1kN.



Figura 11. l'INSTRON 4204

Prove dinamico-meccaniche in compressione

Test dinamico-meccanici in compressione sono stati condotti sugli scaffold realizzati utilizzando una macchina di prova con l'intento di valutare le proprietà viscoelastiche.

Le prove sono state condotte in soluzione fisiologica alla temperatura di 37 ± 0.5 °C, che è prossima a quella corporea, utilizzando una macchina di prova elettromagnetica EnduraTEC ELF 3200 series Bose (fig. 12). Le prove sono state effettuate su campioni condizionati in soluzione fisiologica a tempi diversi (da 48 h a 4 settimane), imponendo una deformazione variabile in maniera sinusoidale nel tempo, caratterizzata da un'ampiezza dinamica pari a 0.01 mm/mm, in un range di frequenze 0.1÷10 Hz.

Il test dinamico-meccanico, noto anche come “risposta in frequenza”, rappresenta la prova più utilizzata per determinare le proprietà viscoelastiche di un materiale.

Quando un materiale viscoelastico è soggetto una deformazione sinusoidale:

$$\varepsilon(t) = \varepsilon_0 \sin(\omega t)$$

la sua risposta in termini di sforzo è anch'essa sinusoidale:

$$\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta)$$

ma sfasata di un angolo δ .

Analizzando le possibili risposte dei vari tipi di materiali, si evince che nel caso di un solido elastico lo sforzo è direttamente proporzionale alla deformazione applicata e, quindi, varierà in fase con la stessa ($\delta=0^\circ$); per un fluido newtoniano, invece, lo sforzo risulta direttamente proporzionale alla velocità di deformazione $d\varepsilon/dt$ e, quindi, sfasato di 90° rispetto alla deformazione imposta ($\delta=90^\circ$).

Di conseguenza, per un materiale viscoelastico, δ risulta compreso tra 0° e 90° e la risposta meccanica, in termini di sforzo, risulta somma di due componenti, una elastica, in fase con la deformazione, e l'altra viscosa, sfasata di 90° rispetto alla deformazione; di conseguenza, la può essere riscritta come:

$$\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t) + \sigma_0 \cos(\omega t)$$

Dividendo per l'ampiezza di deformazione ε_0 :

$$\frac{\sigma(t)}{\varepsilon_0} = E' \sin(\omega t) + E'' \cos(\omega t)$$

dove E' e E'' hanno le dimensioni di un modulo e sono detti rispettivamente “modulo elastico” (storage modulus) e “modulo viscoso” o “modulo dissipativo” (loss modulus)

$$E' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cos \delta$$

$$E'' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \sin \delta$$

Le espressioni indicate per definire E' ed E'' dipendono dal fatto che il primo rappresenta il contributo del modulo in fase con la deformazione elastica, mentre il secondo quello relativo alla componente viscosa, cioè dissipativi. Quindi, il modulo elastico E' è connesso con l'energia immagazzinata durante il processo, mentre quello viscoso E'' è relativo all'energia dissipata come calore.

Il rapporto tra i due moduli dinamici E'' ed E' rappresenta, invece, la capacità del materiale di dissipare energia in condizioni dinamiche e prende il nome di *fattore di dissipazione*:



Figura 12. EnduraTEC ELF 3200 series Bose

RISULTATI E DISCUSSIONE

Microscopia a scansione elettronica

La microscopia a scansione elettronica ha consentito non solo di osservare la struttura porosa dei campioni analizzati, ma anche l'architettura delle fibre, la loro effettiva spaziatura ed il loro diametro.

Le immagini mostrate in fig. 1 evidenziano le differenti architetture realizzate ($0^\circ/90^\circ$ e $0^\circ/45^\circ/90^\circ/135^\circ$) mantenendo accuratamente fisso la spaziatura tra le fibre e ed i parametri di deposizione (temperatura, pressione applicata, velocità).

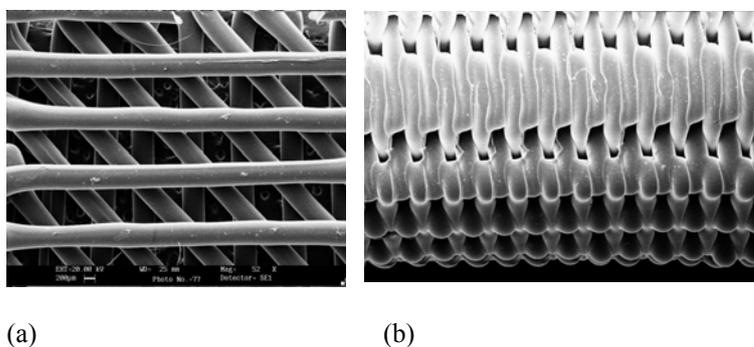


Figura 1. Immagini ottenute da analisi SEM delle strutture realizzate: a) sequenza di sovrapposizione $0^\circ/45^\circ/90^\circ/135^\circ$; b) superficie laterale di uno scaffold cilindrico di PCL caratterizzato da una sequenza di sovrapposizione $0^\circ/90^\circ$.

Le analisi SEM hanno mostrato che gli scaffold realizzati tramite tecnica 3D Fiber Deposition sono caratterizzati da un grado di interconnessione del 100%, da un diametro delle fibre variabile tra 190 e 210 μm e da un fiber spacing di 400 μm , che corrisponde ad una distanza effettiva tra le fibre pari a 200 μm

Microtomografia

La microtomografia ha permesso di analizzare la struttura porosa interna degli scaffold in PCL partendo da una serie di immagini stratificate bidimensionali per poi creare un modello tridimensionale dell'intera struttura (fig. 2).

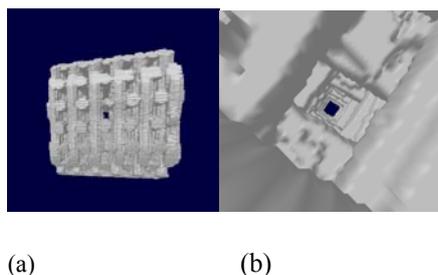


Figura 2. Ricostruzione tridimensionale di uno scaffold ottenuto con la tecnica *3D-Fiber Deposition*: (a) vista laterale; (b) immagine della struttura interna che evidenzia l'architettura delle fibre e l'interconnessione dei pori.

Tutti i dati sono stati forniti dal software CTAn, mentre, le ricostruzioni nelle tre dimensioni sono state ottenute utilizzando il software CTVol.

La microtomografia ha confermato che la tecnica *3D Fiber Deposition* consente la realizzazione di strutture porose tridimensionali i cui pori hanno dimensioni controllate e definite.

A conferma di questo, i risultati, ulteriormente elaborati con software opportuni, come Materialise Mimics, hanno mostrato la consistenza tra valori reali e teorici, evidenziando un diametro medio delle fibre pari a 200 μm ed una distanza centro- centro fra due fibre di uno stesso strato pari a circa 400 μm , come stabilito in fase di impostazione dei parametri; è stato, inoltre, valutato un grado di interconnessione del 100%.

In particolare, il valore di porosità valutato per le strutture caratterizzate da una sequenza di sovrapposizione $0^\circ/90^\circ$ è risultato pari a 60%, in netto accordo con le considerazioni teoriche (60.7%).

A tale proposito è noto, infatti, che il diametro delle fibre gioca sicuramente un ruolo fondamentale nella determinazione della porosità degli scaffold realizzati; tale valore, ovviamente, risulta influenzato anche da altri parametri, come la distanza effettiva tra due fibre adiacenti poste in un stesso piano.

Uno degli approcci teorici utilizzati per il calcolo della porosità è quello noto come “unit cube analysis”, che è solitamente adottato per scaffold ottenuti tramite tecniche di prototipazione rapida

[10], dove il volume occupato effettivamente dallo scaffold è valutato a partire dal tipo di *pattern* considerato. Di conseguenza, il calcolo della porosità P è effettuato nel seguente modo:

$$P = \left(1 - \frac{V_f}{V_A} \right) * 100\%$$

dove V_f rappresenta il volume effettivo del materiale dello scaffold ($\pi L d^2 n_1 n_2/4$), V_A il volume apparente ($L w H$), dove d rappresenta il diametro della fibra, L la lunghezza dello scaffold, w la larghezza dello scaffold, H l'altezza dello scaffold, n_1 il numero di fibre per strato e n_2 il numero strati dello scaffold. Tale approccio assume, chiaramente, che le fibre che costituiscono lo scaffold siano uniformi e che gli strati che esse formano non si fondano gli uni sugli altri nei punti di contatto; in ogni caso, è opportuno notare che la formula proposta va opportunamente modificata quando la sequenza di sovrapposizione risulta diversa da $0^\circ/90^\circ$. Nel caso, ad esempio, degli scaffold di PCL caratterizzati da un pattern $0^\circ/90^\circ$, la porosità può essere teoricamente ricavata dallo schema in figura 3-4, considerando il diametro della fibra pari a $200 \mu\text{m}$, lo spessore dello strato (layer thickness) di $200 \mu\text{m}$, cioè pari proprio al diametro, ed una distanza effettiva tra due fibre adiacenti sempre pari a $200 \mu\text{m}$.

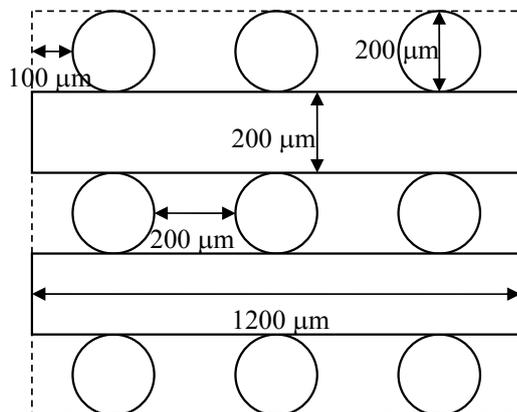


Figura 3. Cella rappresentativa di uno scaffold caratterizzato da una sequenza di sovrapposizione $0^\circ/90^\circ$, utilizzata per il calcolo teorico della porosità.

A questo punto risulta possibile calcolare la porosità P considerando una cella rappresentativa dello scaffold composta da 15 fibre, caratterizzata da una lunghezza L di 1200 µm, da un'altezza H di 1000 µm, da una larghezza w pari a 1200 µm.

Il modo secondo cui si procede è il seguente:

$$P = \left(1 - \frac{3 * 5 * \pi / 4 * d^2 * L}{L * w * H} \right) * 100\% = 60.7\%$$

Utilizzando anche l'approccio teorico ulteriormente semplificato [20, 12] è possibile pervenire allo stesso risultato:

$$P = \left(1 - \frac{\pi}{4} * \frac{d^2}{d_2 * d_3} \right) * 100\% = 60.7\%$$

dove, d rappresenta sempre il diametro della fibra, d₂ la spaziatura tra le fibre la "strand distance" impostata e d₃ lo spessore dello strato.

Porosimetria a mercurio

I risultati ottenuti dalle analisi effettuate in un range di pressione 0.1 - 400 kPa con il porosimetro Pascal 140, Thermo Finnigan, hanno mostrato, nel caso di scaffold con sequenza di sovrapposizione 0°/90°, un valore di porosità pari a 51 %, inferiore, quindi, a quello ottenuto elaborando i dati provenienti dall'analisi tomografica (60%). Per quanto riguarda, invece, il raggio dei pori non è stato possibile, ovviamente, valutarlo utilizzando l'equazione di Washburn, citata nel relativo ai "Materiali e Metodi", dal momento che essa fa riferimento a pori di geometria cilindrica.

Prove statiche di compressione

Le prove di compressione condotte su scaffold di PCL, allo stato secco, ottenuti a partire da polimero fuso, hanno mostrato curve sforzo-deformazione (fig. 4) caratterizzate da un breve tratto lineare iniziale, seguito da un tratto non lineare, fino al raggiungimento di un livello di deformazione pari a 0.6 mm/mm.

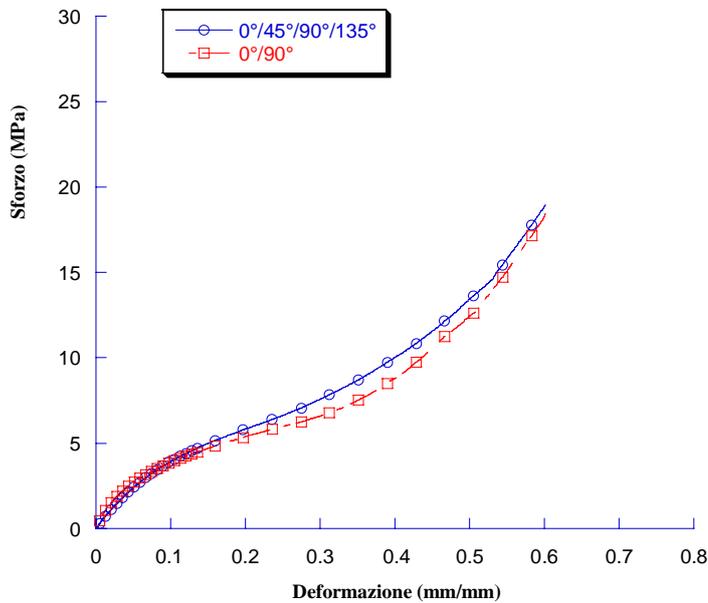


Figura 4. Curve sforzo-deformazione ottenute da prove di compressione effettuate su scaffold di PCL caratterizzati da pattern 0°/90° e 0°/45°/90°/135°, ottenuti a partire da polimero fuso.

Valutando la pendenza del tratto lineare delle curve è stato possibile notare che, a parità di geometria, gli scaffold caratterizzati da un pattern 0°/90° risultano inizialmente più rigidi di quelli ottenuti con una sequenza di sovrapposizione 0°/45°/90°/135°.

I valori del modulo a compressione e dello sforzo massimo ottenuti sono stati riportati, in termini di valore medio \pm deviazione standard, nella Tabella 1.

Sequenza di sovrapposizione	Modulo a Compressione (MPa)	Sforzo Massimo (MPa)
0°/90°	134.6 ± 8.5	18.4 ± 1.6
0°/45°/90°/135°	93.1 ± 6.0	19.0 ± 1.4

Tabella 1. Proprietà meccaniche a compressione degli scaffold di PCL realizzati a partire da polimero fuso: modulo a compressione e sforzo massimo espressi in termini di valore medio ± deviazione standard.

Dalla tabella 1 si evince come a parità di diametro delle fibre e di altri parametri geometrici (distanza centro-centro tra le fibre e spessore dello strato) è possibile modulare l'iniziale rigidità a compressione delle strutture realizzate variando semplicemente la sequenza di sovrapposizione; in particolare gli scaffold caratterizzati da un pattern 0°/90° hanno mostrato un modulo a compressione maggiore rispetto a quelli caratterizzati da una sequenza 0°/45°/90°/135°.

Secondo quanto emerge dalla letteratura, il comportamento meccanico a compressione mostrato dalle strutture realizzate, risulta, simile a quelle delle schiume polimeriche [18]: dopo un tratto caratterizzato da un elevato modulo, spicca la presenza di una regione a bassa rigidità, seguita, infine, da una zona in cui la pendenza della curva aumenta nuovamente. Differentemente, però, dal comportamento tipico di una schiuma flessibile, non esiste una zona centrale di plateau, cioè caratterizzata da una pendenza nulla, ma soltanto una regione che presenta una pendenza più bassa rispetto a quelle dei tratti iniziale e finale delle curve sforzo-deformazione ottenute. I risultati ottenuti dalle prove di compressione condotte suggeriscono, in realtà, proprietà meccaniche superiori a quelle delle tipiche schiume flessibili. Se si prende in considerazione, ad esempio, il valore medio del modulo a compressione degli scaffold di PCL caratterizzati da una sequenza di sovrapposizione 0°/90° (134.6 MPa), calcolato nel campo delle piccole deformazioni come pendenza della curva sforzo-deformazione, tale valore risulta maggiore di quello teoricamente stimato (E_{est}) nel caso di schiume a celle aperte utilizzando la seguente formula [18]:

$$E_{est} = E \left(\frac{\rho_s}{\rho} \right)^2 = E(1 - P)^2 = 65.6 \text{ MPa}$$

dove P rappresenta la porosità (60.7%) ed E il modulo elastico a trazione delle fibre di PCL di diametro pari a 200 μm che costituiscono lo scaffold, valutato in accordo allo standard D 3822 e pari a 425.18 MPa con una deviazione standard di 50.6 MPa; ρ_s e ρ rappresentano rispettivamente la densità apparente dello scaffold e la densità del PCL. Le proprietà meccaniche degli scaffold di PCL con pattern $0^\circ/90^\circ$, ottenuti a partire da fuso, hanno evidenziato, quindi, proprietà meccaniche migliori rispetto a quelle stimate teoricamente utilizzando il modello per una schiuma a celle aperte [18], che tiene conto delle proprietà meccaniche delle fibre di PCL che lo costituiscono e della porosità. In particolare, il valore medio del modulo a compressione degli scaffold (134.6 MPa) valutato sperimentalmente è risultato praticamente il doppio di quello stimato teoricamente (65.6 MPa). A tale proposito, deve essere, comunque, evidenziato che la caratterizzazione delle fibre è stata effettuata in trazione, mentre gli scaffold sono stati testati in compressione e, di conseguenza, risulta abbastanza prevedibile che il modulo valutato sperimentalmente sia maggiore di quello stimato teoricamente, dal momento che il materiale è rigido in compressione che in trazione.

Prove dinamico-meccaniche di compressione

I test dinamico-meccanici in compressione condotti su scaffold a partire da PCL fuso hanno mostrato valori del modulo elastico leggermente crescenti con la frequenza per entrambe le architetture considerate ($0^\circ/90^\circ$ e $0^\circ/45^\circ/90^\circ/135^\circ$).

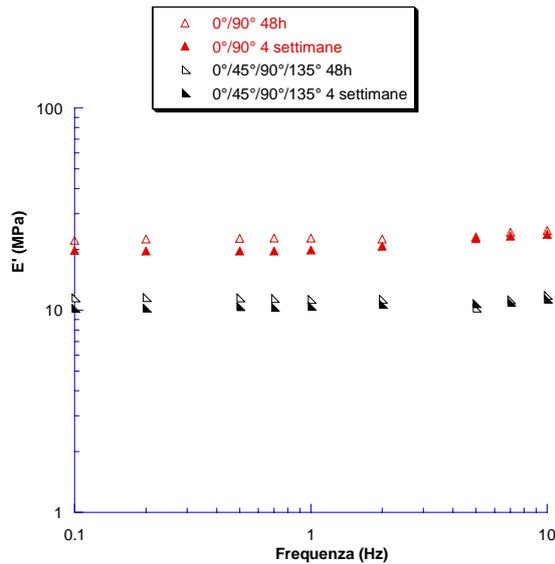


Figura 5. Proprietà viscoelastiche degli scaffold realizzati: andamento del modulo elastico E' con la frequenza.

La figura 5 mostra, inoltre, come i valori dei moduli elastici, ottenuti dopo un condizionamento in soluzione fisiologica alla temperatura di 37 ± 0.5 °C a tempi diversi (da 48 ore fino a 4 settimane), sembrano rimanere praticamente inalterati.

Più precisamente, le misure dinamico-meccaniche in compressione hanno evidenziato che gli scaffold caratterizzati da una sequenza di sovrapposizione $0^\circ/90^\circ$ presentano un modulo elastico E' variabile da 20.97 ± 1.7 MPa a 0.1 Hz fino a 23.98 ± 0.4 MPa a 10 Hz, mentre le strutture caratterizzate, invece, da un pattern $0^\circ/45^\circ/90^\circ/135^\circ$ hanno mostrato valori variabili da 10.22 ± 0.03 MPa fino a 11.58 ± 0.31 MPa, nello stesso range di frequenze.

Secondo quanto emerge da analisi dinamico-meccaniche presenti in letteratura, i valori di E' ottenuti nel caso di scaffold caratterizzati da sequenza di sovrapposizione $0^\circ/45^\circ/90^\circ/135^\circ$, sono, ad esempio, simili a quelli relativi alla cartilagine articolare bovina (9.64 ± 1.81 MPa), ma sicuramente maggiori di quelli misurati per la cartilagine di menisco porcino (1.93 ± 0.387 MPa) [19].

Tuttavia, tali valori di E' risultano inferiori a quelli dei moduli elastici (Tabella 1) ottenuti dalle prove di compressione statica; il motivo di tale differenza è, probabilmente, dovuto al fatto che, mentre le prove statiche di compressione sono state effettuate su campioni allo stato secco e a

temperatura ambiente, le misure dinamico-meccaniche, invece, sono state effettuate a $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ in soluzione fisiologica su campioni opportunamente condizionati.

Differentemente da quanto detto per il modulo elastico E' , è difficile individuare un andamento ben preciso per i valori del modulo viscoso (o dissipativo) E'' , che risultano in ogni caso inferiori a quelli di E' in tutto il range di frequenze esaminato (fig. 6).

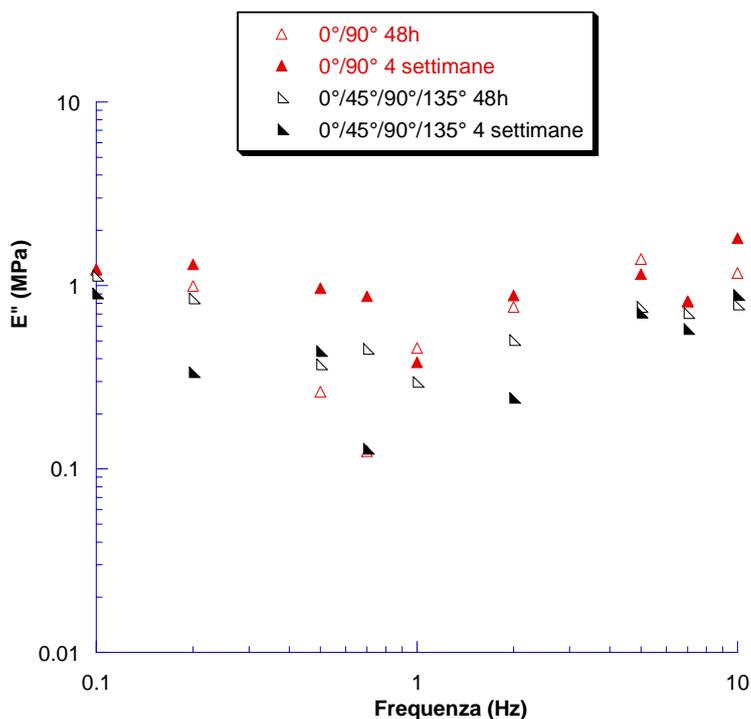


Figura 6. Proprietà viscoelastiche degli scaffold realizzati: andamento del modulo viscoso E'' con la frequenza.

Analogamente a quanto detto per E'' , anche per i valori del fattore di dissipazione $\tan\delta$, che rappresenta l'abilità di dissipare energia da parte della struttura, non è possibile individuare un trend ben preciso con la frequenza; tuttavia, i valori ottenuti, inferiori a 0.1, riflettono sicuramente un comportamento prevalentemente elastico nel range di frequenze esaminato (fig 7).

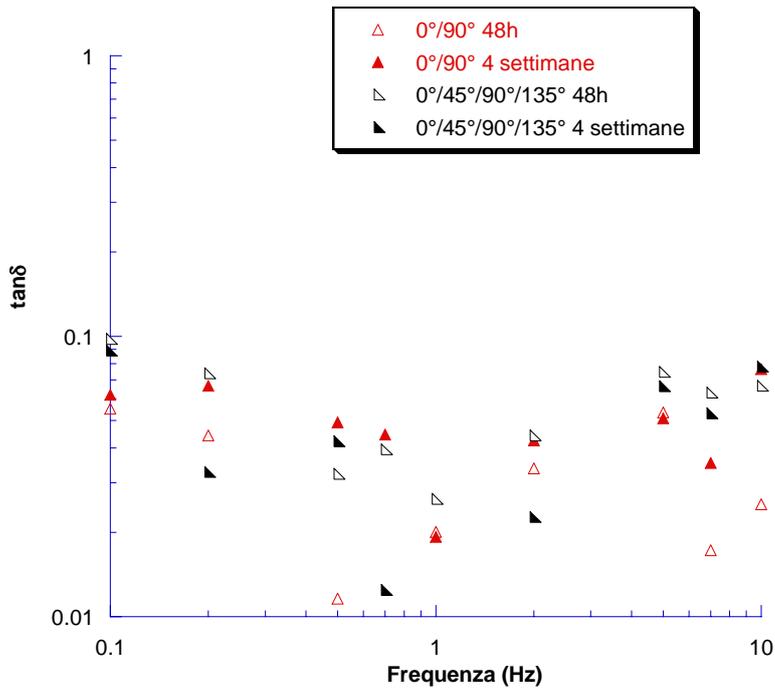


Figura 7. Proprietà viscoelastiche degli scaffold realizzati: andamento del fattore di dissipazione $\tan\delta$ con la frequenza.

Conclusioni e sviluppi futuri

Il presente lavoro ha visto la progettazione, la realizzazione e la preliminare caratterizzazione di scaffold tridimensionali per l'ingegneria dei tessuti, ottenuti tramite una tecnologia di prototipazione rapida nota come "deposizione tridimensionale di fibre" (*3D-Fiber Deposition*) (fig. 8). Mentre le tradizionali tecnologie di processo dei materiali polimerici sono orientate verso una produzione su larga scala, la suddetta tecnologia è volta ad ottenere scaffold caratterizzati da forma

e dimensioni specifiche oltre che da una struttura interna porosa. Infatti, tale tecnica ha consentito, tramite un sistema CAD/CAM, la realizzazione di scaffold caratterizzati da un network di pori controllati e completamente accessibili, proprietà fondamentali per il trasporto di nutrienti e per la loro diffusione.

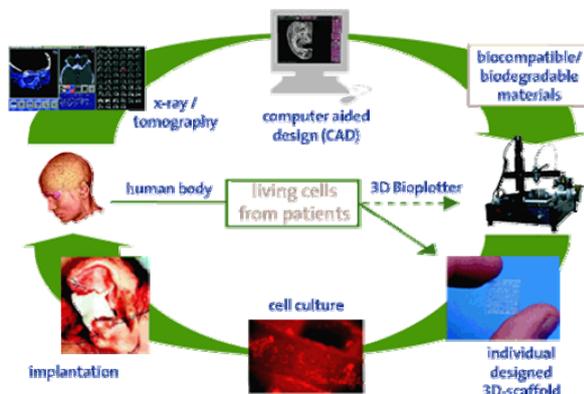


Figura 8. Fasi della realizzazione di un tessuto ingegnerizzato utilizzando la tecnica 3D Fiber Deposition

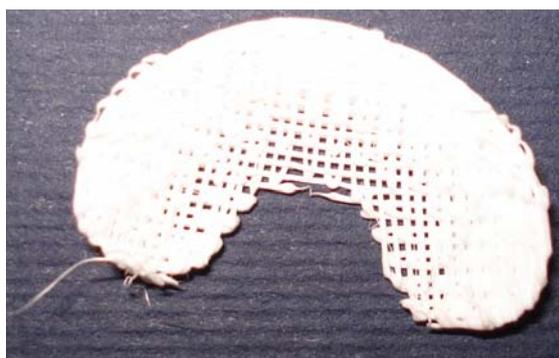


Figura 9. Esempio di scaffold in PCL per la rigenerazione del menisco realizzato mediante tecnica 3D fiber deposition

E' stata messa in evidenza, non solo, la possibilità di realizzare strutture altamente riproducibili caratterizzate da geometrie complesse, a partire da un'analisi tomografica, ma, soprattutto, la capacità di ingegnerizzare e di riprodurre scaffold con porosità tridimensionale interconnessa.

Risulta possibile, inoltre, modulare il diametro della fibra, la distanza centro-centro fra due fibre in uno stesso piano e lo spessore dello strato, che influenzano le dimensioni globali dei pori. Una

preliminare caratterizzazione meccanica, statica e dinamica, degli scaffold realizzati ha mostrato che le proprietà meccaniche non dipendono, ovviamente, solo dal materiale considerato, ma anche da fattori geometrici e dall'architettura tridimensionale. Di conseguenza, se mimare, in generale, le proprietà meccaniche dei tessuti naturali (ad esempio, la cartilagine articolare o del menisco) rappresenta uno degli obiettivi dell'ingegneria dei tessuti, combinando porosità e sequenza di sovrapposizione delle fibre, a partire da un'opportuna scelta del materiale da utilizzare, è possibile ottenere strutture caratterizzate da proprietà simili a quelle di un dato tessuto. Inoltre, la procedura proposta per la realizzazione di queste strutture, dette “*3D-fiber deposited*”, a partire da una tomografia, potrebbe essere presa in considerazione allo scopo di realizzare scaffold *custom made* per la rigenerazione di tessuti soffici e duri.

BIBLIOGRAFIA

1. Ramakrishna, S.; Mayer, J.; Wintermantel, E.; Leong, K. W., *Composite Science and Technology*, 61, 2001, pp. 1189-1224.
2. Park, J. B; Bronzino, J. D., *Biomaterials. Principles and Applications*, CRC Press LLC., Boca Raton (FL), 2003.
3. Chugens, C.; Maquet, V.; Grandfils, C.; Jerome, R.; Teyssie, P., *Polymer*, 37, 1996, pp. 1027-1038.
4. Nee, A. Y. C.; Fuh, J. Y. H.; Miyazawa, T. J., *Mater Processing Technol*, 113, 2001, pp. 262-268.
5. Agarwala, M. K., Jamalabad V. R., Langrana N. A., Safari A., Whalen P. J., Danforth D. C., "Structural Quality of Parts Processed by Fused Deposition", *Rapid Prototyping Journal*, 2, 1996, pp. 4-19.
6. Moreschi, R., *Tesi di Laurea. Applicazioni del processo di Selective Laser Sintering a polveri di materiali termoplastici*, Anno Accademico 2000/2001.
7. Xiong, Z, Yan, Y., Zhang, R., Sun, L., "Fabrication of Porous Poly(L-lactic acid) Scaffolds for Bone Tissue Engineering via Precise Extrusion", *Scripta Materialia*, 45, 2001, pp. 773-779.
8. Xiong, Z., Yan, Y., Wang, S, Zhang, R., Zhang, C., "Fabrication of Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering via Low Temperature", *Scripta Materialia*, 46 , 2002, pp. 771-776.
9. Ang, T. H., Sultana, F. S. A., Hutmacher, D. W., Wong, Y. S., Fuh, J. Y. H., Mo, X. M., Loh, H. T., Burdet, E., Teoh, S. H., "Fabrication of 3D Chitosan-hydroxyapatite Scaffolds Using a Robotic Dispensing System", *Materials Science and Engineering: C.*, 20, 2002, pp. 35-42.
10. Landers, R., Mullhaupt, R., "Desktop Manufacturing of Complex Objects, Prototypes and Biomedical Scaffolds by Means of Computer Assisted Design Combined with Computer Guided 3D Plotting of Polymers and Reactive Oligomers", *Macromol Mater Eng*, 282, 2002, pp. 17-21.
11. Landers, R., Hubner, U., Schmelzeisen, R., Mullhaupt, R., "Rapid prototyping of scaffold Derived from Thermoreversible Hydrogels and Tailored for Application in Tissue Engineering", *Biomaterials*, 23, 2002, pp. 4437-4447.

12. Landers, R., Pfister, A., Hubner, U., Jhon, H., Schmelzeisen, R., Mullhaupt, R., "Fabrication of Soft Tissue Engineering Scaffolds by Means of Rapid Prototyping Techniques", *J Mater Sci*, 37, 2002, pp. 3107-3116.
13. R.Langer - Selected advances in drug delivery and tissue engineering - *Journal of Controlled Release* 62 (1999) 7–11.
14. Ivan Martin, David Wendt and Michael Heberer - The role of bioreactors in tissue engineering - *Biotechnology* Vol.22 No.2 February 2004;
15. X. Yu, C.T. Laurencin - Bioreactor-based bone tissue engineering - *PNAS* August 2004 vol. 101 no. 31, 11203–11208
16. G.N. Bancroft, A.G. Mikos - Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D
17. perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner - *PNAS*
18. October 2002 vol. 99 no. 20, 12600–12605.
19. X.P. Ma – Scaffolds for Tissue engineering – *Materials Today* - May 2004 - p.30-40
20. Gibson, L.J. and Ashby, M.F. (1997) *Cellular Solids: Structure and Properties*, Cambridge University Press.
21. L. Moroni, G. Poort, F. Van Keulen, J.R.de Wijn, C.A. van Blitterswijk. *Dynamic mechanical properties of 3D fiber-deposited PEOT/PBT scaffolds: An experimental and numerical analysis*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 78 (3) (2006).
22. T. Avitabile, F. Marano, F. Castiglione, Claudio Bucolo, M. Cro, L. Ambrosio, C. Ferratuo, A. Ribaldi, Biocompatibility and biodegradation of intravitreal hyaluronan implants in rabbits, *Biomaterials* 22 (2001) Elsevier
23. Arnold I. Caplan, Ph.D., *Tissue Engineering Designs for the Future: New Logics, Old Molecules*, *Tissue Engineering* Volume 6, number 1, 2000 Mary Ann Liebert, Inc.
24. J. Klompmaker, R.P.H. Veth, H.W.B. Jansen, H.K.L. Nielsen, J.H. de Groot, A.J. Pennings and R. Kuijer, Meniscal repair by fibrocartilage in the dog: characterization of the repair tissue and the role of vascularity, *Biomaterials* 17 1996, Elsevier Science.
25. Jan Klompmaker, Henk W. B. Jansen, René P. H. Veth, Hans K. L. Nielsen, Jacqueline H. de Groot & Albert J. Pennings, Porous Implants for Knee Joint Meniscus Reconstruction: A Preliminary Study on the Role of Pore Sizes in Ingrowth and Differentiation of Fibrocartilage, *Clinical Materials* 14 (1993) 1-11.
26. Tony G. van Tienen, Ralf G. J. C. Heijkants, Pieter Buma, Jacqueline H. de Groot, Albert J. Pennings, Rene P. H. Veth, Tissue ingrowth and degradation of two biodegradable porous polymers with different porosities and pore sizes, *Biomaterials* 23 (2002) 1731-1738.

27. E. Milella, E. Brescia, C. Massaro, P.A. Ramires, M.R. Maglietta, V. Fiori, P. Aversa, Physico-chemical properties and degradability of non-woven hyaluronan benyilic ester as tissue engineering scaffolds, *Biomaterials* 23 (2002) 1053-1063
28. G. A. Ameer, T. A. Mahmood, R. Langer, A biodegradable composite scaffold for cell transplantation, *Journal of Orthopaedic Research* 20 (2002) 16-19.
29. P. J. Prendergast, R. Huijskes and K. Soballe, Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces, *ESB Research Award 1996, Journal Biomechanics*, Vol. 30, pp.539-548, 1997.
30. G Abatangelo, P Brun, R Cortivo, Novel biomaterials based on hyaluronic acid its derivates: an overview.
31. M Z Bendjaballah, A Shirazi-Adl, D J Zukor, Biomechanics of the human knee joint in compression: reconstruction, mesh generation and finite element analysis, *The Knee* Vol. 2 pp.69-79, 1995.
32. Eliot H. Frank, Moonsoo Jin, Andreas M. Loening, Marc E. Levenston, Alan J. Grodzinsky, A versatile shear and compression apparatus for mechanical stimulation of tissue culture explants, *Journal of Biomechanics* 33 (2000) 1523-1527.
33. T. L. Haut, M. L. Hull, S. M. Howell, A high-accuracy three-dimensional coordinate digitizing system for reconstructing the geometry of diarthrodial joints, *Journal of Biomechanics* 31 (1998) 571-577.
34. Sean P. Walsh, Samuel L. Evans, Daphne M. O'Doherty, I. W. Barlow, Failure strengths of suture vs. biodegradable arrow and staple for meniscal repair: an in vitro study, *The Knee* 8 (2001) 151-156.
35. Synthesis of biodegradable polymers, in: W. Schnabel(Ed.), *polymer degradation*, Hauser International, Wien, 1981, p.169-173.
36. Vonda J. Wright, Hairong Peng and Johnny Huard, Muscle-based gene therapy and tissue engineering for the musculoskeletal system, *DDT* Vol. 6, No. 14 July 2001.
37. C. Ibarra, C. Jannetta, C. A. Vacanti, Y. Cao, T. H. Kim, J. Upton, J. P. Vacanti, Tissue Engineered Meniscus: A Potential New Alternative to Allogeneic Meniscus Transplantation, *Transplantation Proceedings*, 29, 986-988 (1997).
38. Yasuhiko Tabata, Reviews: Recent progress in tissue engineering, *DDT* Vol. 6, No. 1 January 2001.
39. Yasuhiko Tabata, Reviews: The importance of drug delivery systems in tissue engineering, *PSTT* Vol. 3, No. 3 March 2000.

40. Giovanni Vozzi, Christopher J. Flaim, Francesca Bianchi, Arti Ahluwalia, Sangeeta Bhatia, Microfabricated PLGA scaffolds: a comparative study for application to tissue engineering, *Materials Science and Engineering C* 20 (2002) 43-47.
41. Mayer, E. Karamuk, T. Akaike, E. Wintermantel, Matrices for tissue engineering-scaffold structure for a bioartificial liver support system, *Journal of Controlled Release* 64 (2000) 81-90.
42. D. J. Goertzen, D. R. Budney and J. G. Cinats, Methodology and apparatus to determine material properties of the knee joint meniscus, *Med. Eng. Phys.*, 1997, Vol. 19, 412-419, July.
43. Yuehuei H. An, Shane K. Wolf, Richard J. Friedman, Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices, *Biomaterials* 21 (2000) 2635-2652.
44. Giuseppe M. Peretti, Enzo M. Caruso, Mark A. Randolph, David J. Zaleske, Meniscal repair using engineered tissue, *Journal of Orthopaedic Research* 19 (2001) 278-285
45. M. Tissakht, A.M.Ahmed, Tensile stress strain characteristics of the human meniscal material, *Journal of Biomechanics* 28 (1995) 411-422.
46. Donald C. Fithian, Michael A. Kelly and Van C. Mow, Material properties and structure-function relationships in the menisci, *Clinical orthopaedics and related research*.
47. Channarong Kasemkijwattana, Jacques Menetrey, Hideyuki Goto, Christopher Niyibizi, Freddie H. Fu, Johnny Huard, The use of growth factors, gene therapy and tissue engineering to improve meniscal healing, *Materials Science and Engineering C* 13 (2000) 19-28.
48. Mark A. Sweigart, B. S., and Kyriacos A. Athanasiou, Review: Toward Tissue Engineering of the Knee Meniscus, Ph. D., P. E., *Tissue Engineering* Vol 7, No. 2, 2001.
49. Clemente Ibarra, MD, John A. Koski, MD, and Russell F. Warren, Tissue engineering meniscus, *Cells and Matrix*, MD, *Tissue Engineering in Orthopaedic Surgery* Vol. 31, No. 3, July 2000.
50. Masanori Kobayashi, Masanori Oka, Takashi Nakamura, Jyunya Toguchida. Development of artificial meniscus using poly vinyl alcohol – hydrogel (PVA-H).
51. Dizionario medico enciclopedico – PICCIN.
52. T. W. Solomons, *CHIMICA ORGANICA*. Zanichelli, Bologna, 1993.
53. R. Pietrabissa, *Biomateriali per protesi e organi artificiali*, PATRON.
54. V.Mezzogiorno, V.Esposito, M.Papa, Cosimo Passatore, B.Valentino, *Testo e atlante di Anatomia umana*, PICCIN.

Formattato: Italiano (Italia)

55. M.Molinaro, C.Rizzoli, G.Siracusa, M.Stefanini, Istologia di V.Monesi, PICCIN.
56. B.Bird, W.E. Stewart, E. N.Lightfoot, Fenomeni di trasporto, RCasa Editrice Ambrosiana.
57. Flory P. J. (1953) Principles of polymer chemistry. Cornell University Press., Ithaca.
58. Netti P. A., Ambrosio L., Astarita G., Del Nobile M. A., Benedetti L. e Nicolais L. (1995). Water sorption in hyaluronic acid esters. Berlin, Germany.
59. Netti P. A., Ambrosio L., Del Nobile M.A., Menisitieri G. e Nicolais L. (1996). Water transport in hyaluronic acid esters. Journal of bioactive & compatible polymers 312-316.
60. Zhong S. P., Campoccia D., Doherty P. J., Williams R. L., Benedetti L. e Williams D. F. (1994). Biodegradation of hyaluronic acid derivatives by hyaluronidase. Biomaterials 15: 359-365.
61. Benedetti L. 1994. Medical device technology. 11: 32-37.
62. Crank J. 1975. The mathematics of diffusion, 2nd ed., Oxford: Clarendon Press.
63. Barrie J. A. 1968. Diffusion in polymers, J. Crank e G. S. Park, eds., New York: Academic Press, 8: 259-308.
64. F. Pipino, L. Anagliarella Biomeccanica ortopedica e traumatologica –UTET
65. J.S. Smillie Lesioni del ginocchio- VERDUCI
66. Kapandji Fisiologia articolare – DEMI
67. AIMAT, Manuale dei materiali per l'ingegneria. McGraw-Hill, Milano, 1996.
68. R. M. Christensen, Theory of viscoelasticity: an introduction. Academic Press, New York, 1971.
69. Renato V. Iozzo, Marcel Dekker, Proteoglycans: Structure, Biology and Molecular Interactions. Chembiochem 1 (2000) 287-288.
70. C. R. Wheelless, Wheelless' Textbook of Orthopaedics. Copyright 1996.
71. E A Balzas, TC Laurent, RW Jeanoz, (1986) Nomenclature of hyaluronic acid Biochem. J 253:903.
72. P Prehm,(1984) Hyaluronate is synthesized at plasma membrane Biochem J 220:597-600.
73. MG Kuiawa, AI Caplan,(1986), Hyaluronic acid bonded to cells culture surfaces stimulates chondrogenesis in stage 24 limb mesenchyme cultures, Dev Biol 114:504-18.
74. A Rastrelli, M Beccaro, F Biviano, G Calderoni, A Pastorello.(1990) Hyaluronic acid esters, a new class of semi-synthetic biopolymers: Chemical and phisico-chemical properties. Chemical implant materials, Advanced in Biomaterials 9:199-205.

75. L Hume, J Bresnahan, L Benedetti, D Pison, E Topp, V Stells,(1994) Methylprednisolone esters of hyaluronic acid; macromolecular produgs as antiinflammatory agents. *Biomaterials*.
76. K Kyronen, L Hume, L Benedetti, A Urti, E Topp, V Stella, (1992) Methylprednisolone esters of hyaluronic acid in ophthalmic drug delivery: in vivo and in vitro release studies, *Int J Pharm* 80:161-9.
77. S Iannace, L Ambrosio, L Nicolais, A Rastrelli, A Pastorello, (1992), Thermo-mechanical properties of hyaluronic acids-derived products. *J Materials Sci* 3:59-64.
78. LM Benedetti, EM Topp, VJ Stella,(1990), Microspheres of hyaluronic acid esters-fabrication methods and in vitro hydrocortisone release, *J Contr Rel* 13:33-41.
79. V Crescenzi, A Francescangeli, D Renier, D Bellini, A Pastorello, *New Bioactive Products and Biomaterials from Hyaluronan*, *La Chimica e l'Industria*, 84,1-4, *RichMac Magazine-Marzo* 2002.
80. Allan S. Hoffman, *Hydrogels for biomedical applications. Advanced Drug Delivery Reviews* 43 (2002) 3-12.
81. D. Campoccia, P. Doherty, M. Radice, P. Brun, G. Abatangelo, D.F. Williams, *Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification*, *Biomaterials* 19(1998) 2101–2127.
82. M.R. Ziebell, *Controlled chemical modification of hyaluronic acid*, *J. Controlled Release* 53 (1998) 93–103.
83. P.J. Flory, J. Rehner, *Statistical mechanics of cross-linked polymer networks. II. Swelling*, *J. Chem. Phys.* 11 (1943) 521-526.
84. N.A. Peppas, E.W. Merrill, *Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels as swollen elastic networks*, *J. Appl. Polym. Sci.* 21 (1977)1763-1770.
85. T. Canal, N.A. Peppas, *Correlation between mesh size and equilibrium degree of swelling of polymeric network*, *J. Biomed. Mater. Res.* 23 (1989) 1183-1193.
86. N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, *Hydrogels in pharmaceutical formulations. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50 (2000) 27-46.
87. L. C. Dong, A. S. Hoffman, Q. Yan, *Macromolecular penetration through hydrogels. J. Biomater. Sci. Polym.* 5 (1994) 473-484.
88. J.K. Nulend - *Cellular mechanisms of Wolff's law of bone adaptation*.
89. F.C Bruni, D. Curone, S. Marini, D. Prè – *Ingegneria del tessuto osseo – Dispense corso di Biomeccanica- Università di Pavia*.
90. Schmidt – *Introduction of Tisse Engineering – BME* 379-385 (2003).

91. M.S. Chapekar – Tissue engineering: challenger and opportunities - Chemistry and life science – June 2000.
92. R. Langer, J.P. Vacanti. Tissue engineering. *Science* 260 (1993) 920–926.
93. F.Mussi, G.Bertolini, L.Portella – Ingegneria Tissutale: metodologie ed applicazioni.
94. 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.
95. 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.
96. D. W. Hutmacher – Scaffold in tissue engineering bone and cartilage – *Biomaterial* 21 (2000) p.2529-2543.
97. Jude O. Iroh - Poly(ϵ -caprolactone) – *Polymer Data Handbook* 1999.
98. L. H. Sperling, *Introduction to Physical Polymer Science*. John Wiley & Sons, New York, 1986.
99. Ambrosio L, Borzacchiello A, Netti PA, Nicolais L, Rheological study on hyaluronic acid and its derivative solutions, *J.M.S. APPL.CHEM.*, A36(7&8), pp991-1000, 1999.
100. G.Ciapetti, Ambrosio, L.Savarino, D.Granchi, E.Cenni, N. Baldini, S.Pagani, S.Guizzardi, F.Causa, A.Giunti, “Osteoblast growth and function in porous poly- ϵ -caprolactone matrix for bone repair: a preliminary study “, *Biomaterials* 24 (2003)3815-3824.
101. Joice M. Tan, An Overview of PHEMA: Properties, Applications and Future Progress. *Biomaterials* (24-4-2000).
102. Stoy, V. A., Kliment, C. A., *Hydrogels: Speciality Plastics for Biomedical, Pharmaceutical and Industrial Applications*. Technomic Publishing, Lancaster, PA.
103. Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E., *Biomaterials Science: An introduction to Materials in Medicine*. Academic Press, San Diego, CA.
104. C.M. Agrawal, J.S. McKinney, D. Lanctot, K.A. Athanasiou. Effects of fluid flow on the in vitro degradation kinetics of biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 21 (2000) 2443-2452.
105. Z. Xiong, Y. Yan, R. Zhang, L. Sun. Fabrication of porous poly(L-lactic acid) scaffolds for bone tissue engineering via precise extrusion. *Scripta Materialia* 45 (2001) 773-779.

106. Z. Xiong, Y. Yan, S. Wang, R. Zhang, C. Zhang. Fabrication of porous scaffolds for bone tissue engineering via low temperature. *Scripta Materialia* 46 (2002) 771–776.
107. T.H. Ang, F.S.A. Sultana, D.W. Hutmacher, Y.S. Wong, J.Y.H. Fuh, X.M. Mo, H.T. Loh, E. Burdet, S.H. Teoh. Fabrication of 3D chitosan–hydroxyapatite scaffolds using a robotic dispensing system. *Materials Science and Engineering C* 20 (2002) 35–42.
108. N. J. Hallab, K. J. Bundy, K. O’Connor, R. L. Moses, J. J. Jacobs. Evaluation of Metallic and Polymeric Biomaterial Surface Energy and Surface Roughness Characteristics for Directed Cell Adhesion. *Tissue Engineering* Volume 7, Number 1, 2001.
109. E. Biondi, C. Cobelli. *Storia della Bioingegneria*. Patron, Bologna 2001.
110. J. B. Park, R. Lakes, D. J. Mooney, I. V. Yannas, B. Palsson, J.A. Hubbel in *The Biomedical Engineering Handbook*, (D. Bronzino ed.). CRC Press (1995).
111. S. Ramakrishna, J. Mayer, e. Wintermantel, K. W. Leong. Biomedical application of polymer composites materials. *Composites Science and Technology* 61 (2001) 1189-1224.
112. B. S. Kim, D. J. Mooney. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Tibtech* May1998 (VOL 16).
113. D. W. Hutmacher. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21 (2000) 2529-2543.
114. E. Wintermantel, J. Mayer, J. Blum, K. L. Eckert, P Lüscher, M. Mathey. Tissue engineering scaffolds using superstructure. *Biomaterials* 17 (1996) 83-91.
115. M.E. Gomes, J.S. Godinho, D. Tchalamov, A.M. Cunha, R.L. Reis. Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties. *Materials Science and Engineering C* 20 (2002) 19–26.
116. W. Sun, Pallavi Lal. Recent development on computer aided tissue engineering. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 67 (2002) 85–103.
117. S.Yang, K. H. F. Leong, Z. DU, C. K. Chua. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part II: Rapid Prototyping Techniques. *Tissue Engineering*, Volume 8, Number 1, 2002.
118. J. J. Clair, Stereolithography and biomedical engineering. *J. Material Processing Technology* 57 (1996) 393-396.
119. P. X. Ma, J.-W. Choi. Biodegradable Polymer Scaffolds with Well-Defined Interconnected spherical Pore Network. *Tissue Engineering* Volume 7, Number 1, 2001.

Ringraziamenti

Al termine del ciclo di dottorato un sentito ringraziamento al Prof. Ambrosio, che mi ha dato la possibilità di dedicarmi allo studio dei biomateriali.

In particolare desidero ringraziare tutti gli amici del laboratorio “proprietà meccaniche”: Antonio (che mi ha guidato e seguito in questo lavoro di tesi), Luigi (che mi ha dato la parola), Rodolfo (sempre presente e costruttivo), che mi hanno accolto nel laboratorio e mi hanno reso parte attiva di un gruppo.

Gli amici del DIMP: Angela, Carmen, Daniela, Gemiliana, Maria Grazia, Olimpia, Paolo, Stefania, Valeria, Vincenzo.

Infine gli amici di sempre che ormai mi sopportano da parecchi anni: Francesco (o’cumpariell), Gennaro (o’president), Gianluca (o’prufessor), (Mac) Nicola, Salvatore (o’boss).

E tutti quelli, che anche se non citati, mi sono stati vicini in questi anni.