

---

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
CAMPUS DI CESENA  
DIPARTIMENTO DI  
INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E DELL'INFORMAZIONE  
*"GUGLIELMO MARCONI"*

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**SVILUPPO E CARATTERIZZAZIONE REOLOGICA DI  
SOSPENSIONI A BASE DI IDROSSIAPATITE PER LA  
REALIZZAZIONE DI IMPIANTI PER LA  
RIGENERAZIONE DEL TESSUTO OSSEO**

Tesi in  
Fondamenti di Ingegneria dei Tessuti Biologici LM

Relatore

**Prof. Giordano Emanuele Domenico**

Presentata da

**Boghi Caterina**

Correlatori

**Dott. Sprio Simone**  
**Ing. Dapporto Massimiliano**

Anno Accademico 2018/2019



# Sommario

MOTIVAZIONE E SCOPO DELLA TESI .....	5
1. INTRODUZIONE .....	9
1.1 IL TESSUTO OSSEO.....	9
1.1.1 CELLULE DEL TESSUTO OSSEO.....	11
1.1.2 MINERALIZZAZIONE E RIASSORBIMENTO DEL TESSUTO OSSEO.....	13
1.2 NECESSITÀ DI SVILUPPARE SOSTITUTI OSSEI .....	16
1.3 SOSTITUTI OSSEI MACROPOROSI.....	18
1.3.1 IDROSSIAPATITE .....	20
1.4 TECNICHE PER LA PRODUZIONE DI SCAFFOLD MACROPOROSI CERAMICI.....	23
1.4.1 REPLICA .....	24
1.4.2 SACRIFICIAL TEMPLATE .....	25
1.4.3 FOAMING DIRETTO .....	26
1.4.4 TECNICHE INNOVATIVE DI FABBRICAZIONE: LA STAMPA 3D.....	29
2. PREPARAZIONE DEI MATERIALI.....	34
2.1 CALCINAZIONE .....	34
2.2 MISCELAZIONE .....	36
2.3 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI MACROPOROSI .....	40
2.3.1 FOAMING DIRETTO .....	40
2.3.2 SINTERIZZAZIONE .....	43
3. TECNICHE ANALITICHE .....	46
3.1 ANALISI SULLE POLVERI.....	46
3.1.1 DIFFRATTOMETRIA A RAGGI X (XRD) .....	46
3.1.2 ANALISI DELLA SUPERFICIE SPECIFICA DELLE POLVERI - TECNICA B.E.T	48
3.1.3 ANALISI GRANULOMETRICA.....	52
3.1.4 SPETTROSCOPIA INFRAROSSA A TRASFORMATA DI FOURIER IN RIFLETTANZA TOTALE ATTENUATA (FTIR-ATR).....	55
3.2 ANALISI SULLA SOSPENSIONE .....	63
3.2.1 POTENZIALE $\zeta$ E pH .....	63
3.2.2 ANALISI REOLOGICHE.....	65
3.3 ANALISI SUI CAMPIONI SINTERIZZATI .....	79
3.3.1 MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE (SEM) .....	79
4. RISULTATI E CONCLUSIONI.....	83

4.1	SUPERFICIE SPECIFICA E ANALISI GRANULOMETRICA .....	83
4.2	DIFRATTOMETRIA A RAGGI X .....	85
4.3	ANALISI FTIR-ATR .....	88
4.4	POTENZIALE $\zeta$ e pH .....	90
4.5	ANALISI REOLOGICHE.....	93
4.5.1	VISCOSITÀ.....	93
4.5.2	VISCOELASTICITÀ.....	101
4.6	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI MACROPOROSI .....	111
4.7	ANALISI AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE .....	113
	CONCLUSIONI.....	117
	APPENDICE .....	120
	BIBLIOGRAFIA.....	121

## MOTIVAZIONE E SCOPO DELLA TESI

Questa attività sperimentale, svolta presso l'Istituto di Scienza e Tecnologia dei Materiali Ceramici (ISTEC-CNR) di Faenza, riguarda lo studio di biomateriali ceramici per la rigenerazione del tessuto osseo.

In campo ortopedico gli interventi di ricostruzione del tessuto osseo si rendono al giorno d'oggi sempre più necessari a causa del continuo aumento dell'età media e della popolazione attiva. Gli scenari clinici che il chirurgo ortopedico si ritrova a fronteggiare sono quindi molto numerosi, dalle malformazioni congenite agli eventi traumatici, dalle ipoplasie alle lesioni ossee neoplastiche primarie (osteosarcomi, tumori ossei benigni) o secondarie (metastasi).

Il tessuto osseo è intrinsecamente caratterizzato da un potenziale rigenerativo adeguato al ripristino di fratture di piccola entità, tuttavia risulta incapace di rigenerare ampie porzioni di sé stesso, in genere quando il difetto ha dimensioni superiori a 1-2 centimetri e vi è una perdita maggiore del 50% della circonferenza corticale[1].

L'approccio terapeutico convenzionale per la ricostruzione del difetto osseo prevede l'innesto di tessuto autologo, ovvero proveniente da un altro distretto anatomico del paziente stesso, o in alternativa di osso allogenic, ovvero proveniente da donatore. In questi casi, i benefici dell'impianto di tessuto osseo *biologico* sono tuttavia bilanciati da una limitata accessibilità ad altre regioni scheletriche del paziente, così come da rischio di infezioni e di dolore cronico nel sito donatore, nonché dai rischi immunologici associati all'uso di allotrapianti.

Per rispondere a queste esigenze, nell'ultimo secolo la ricerca scientifica si è concentrata sull'identificazione di strategie alternative per la ricostruzione dei difetti ossei, concentrandosi sulla sintesi di cosiddetti *scaffold*, ovvero strutture tridimensionali porose che fungono da "impalcatura" sulla quale il tessuto osseo aderisce e prolifera, e che non ha quindi la sola funzione di sostituire bensì di promuovere la neoformazione ossea.

La letteratura scientifica del settore riporta varie tipologie di biomateriali proposti a questo scopo, in particolare metalli, polimeri e ceramici.

Tra questi, i materiali ceramici a base di calcio-fosfati distinguono per elevato biomimetismo chimico, ovvero replicano perfettamente la struttura chimica della componente minerale inorganica del tessuto osseo, denominata *idrossiapatite*.

Al giorno d'oggi la possibilità di sintetizzare idrossiapatite (HA) in laboratorio lo ha reso il materiale bioceramico *gold standard* per la produzione di scaffold per la rigenerazione del tessuto osseo, data la sua comprovata biocompatibilità, biorisorbibilità e abilità osteogenica.

Utilizzando idrossiapatite è possibile realizzare sia strutture dense che porose. Strutture dense hanno indubbi vantaggi in termini di resistenza meccanica, tuttavia sono incapaci di favorire la migrazione e proliferazione di cellule al loro interno. Al contrario, la distribuzione di pori e vuoti all'interno di strutture porose determina limitazioni nelle loro performance meccaniche, ma presenta enormi vantaggi in termini di *osteoconduttività*, favorendo adesione e migrazione cellulare al loro interno, verso la completa rigenerazione e rivascolarizzazione del difetto osseo.

In letteratura sono riportate varie tecniche per la produzione di scaffold macroporosi, che in generale prevedono sintesi e *processing* di sospensioni concentrate a base di polveri bioceramiche. Tra queste, si ricordano in particolare il metodo di *Foaming Diretto*, che prevede l'incorporazione di bolle di aria all'interno di sospensioni bioceramiche che vengono poi essiccate e consolidate termicamente, e il metodo di *3D printing*, ovvero l'estrusione di una sospensione bioceramica in forma di filamento, seguendo un progetto tridimensionale preventivamente messo a punto via software grafico.

Il preciso controllo di queste tecniche di processo non può quindi prescindere da una dettagliata caratterizzazione reologica di sospensioni bioceramiche.

Le sospensioni bioceramiche, preparate mediante la miscelazione di acqua, polveri e reagenti disperdenti, devono essere "stabili", ovvero tali da non sedimentare o agglomerare in tempi brevi.

La stabilità di una sospensione acquosa dipende dalle caratteristiche fisico-chimiche, quali pH e dal potenziale  $\zeta$ , e influenza enormemente la viscosità del materiale che, in ultima analisi, si riflette sulle caratteristiche dello scaffold finale.

È ormai risaputo che i trattamenti termici influiscono molto sulle proprietà chimico-fisiche dell'idrossiapatite, ma assumono una rilevanza anche la concentrazione della polvere stessa e del disperdente utilizzato.

Ad oggi, la letteratura scientifica riporta lavori che indagano l'influenza dei processi termici, della concentrazione di polvere e di disperdente sulle proprietà chimico-fisiche e reologiche di sospensioni poco concentrate (<40% vol) o con utilizzo di idrossiapatite non calcinata.

In questo senso, mi sono dedicata, in una fase iniziale dell'attività, alla preparazione e valutazione di stabilità di varie sospensioni acquose con elevate concentrazioni di polvere e disperdente, utilizzando polveri di idrossiapatite calcinate a varie temperature. Ho inoltre effettuato molteplici misure reologiche, in termini di viscosità e viscoelasticità.

Successivamente, ho preparato campioni porosi con la tecnica di Foaming Diretto, caratterizzandoli in termini di porosità e microstruttura (Microscopia Elettronica a Scansione).

Questo lavoro di tesi si propone quindi di chiarire l'effetto del trattamento termico di calcinazione della polvere e delle concentrazioni di polvere e disperdente sulle proprietà reologiche delle sospensioni, al fine di ottimizzare la preparazione di impianti per la rigenerazione dell'osso.



# CAPITOLO 1

---

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 IL TESSUTO OSSEO

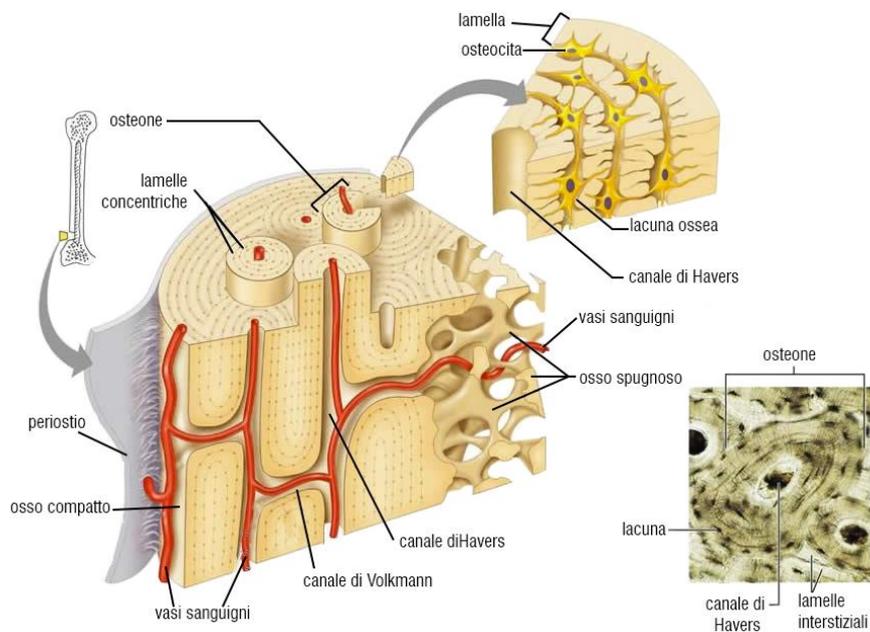
Lo scheletro umano è composto da più di 206 ossa di diverse tipologie: ossa lunghe negli arti, ossa corte nel polso e nella caviglia, ossa piatte nello sterno e nel cranio, fino alle ossa di forma più irregolari come il bacino e le vertebre. La funzione svolta dalle ossa è prevalentemente di carattere meccanico in quanto sostengono le parti molli e le proteggono da urti e traumi. Inoltre, agiscono come leve permettendo la trasformazione delle forze meccaniche generate dalla contrazione muscolare e quindi il movimento volontario del corpo umano.

Il tessuto osseo è un tipo particolare di tessuto connettivo calcificato costituito da cellule disperse in una matrice extracellulare (ECM) composta da una parte organica e da una componente minerale. La componente organica è prevalentemente costituita da collagene Tipo I e in misura minore da altri tipi di proteine. La componente mineralizzata è formata da sali inorganici di natura calcio-fosfatica, presenti sotto forma di cristalli di idrossiapatite (HA), con formula chimica  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . La componente organica della matrice extracellulare rappresenta circa il 30% del peso dell'osso mentre il restante 70% è rappresentato dalla componente inorganica mineralizzata.

Le straordinarie proprietà di resistenza meccanica che caratterizzano il tessuto osseo sono il risultato del complesso meccanismo biologico di *biomineralizzazione*, ovvero la deposizione controllata di matrice inorganica sulle fibre di collagene, da una scala nanometrica ad una macroscale[2], conferendo all'osso leggerezza ma al contempo robustezza ed elevata resistenza alle sollecitazioni. La componente mineralizzata funge inoltre da deposito di calcio e di altri ioni inorganici utili a molteplici reazioni biochimiche del metabolismo sistemico, quali la contrazione muscolare e la trasmissione di impulsi nervosi.

Il tessuto osseo si può principalmente suddividere in due tipologie: *fibroso* e *lamellare*.

Il tessuto osseo lamellare costituisce il tessuto osseo nei mammiferi adulti mentre il tessuto osseo fibroso è presente in embrioni, neonati e nell'adulto solo nei casi di neo-deposizione ossea. Il tessuto osso fibroso viene riassorbito, con progressiva deposizione nel tempo di tessuto osseo di tipo lamellare. Il tessuto osseo lamellare può essere a sua volta suddiviso in tessuto osseo di tipo *corticale*, più compatto e duro, e in tessuto osseo *spugnoso*, che si presenta come una rete tridimensionale di trabecole che ospita il midollo osseo, specialmente nelle vertebre e nelle regioni diafisarie delle ossa lunghe (vedi Figura 1.1).



**Figura 1.1: Schematizzazione della struttura ossea.**

La matrice ossea del tessuto lamellare è formata da lamelle che nel caso dell'osso corticale sono concentriche e complete e formano gli osteoni (o sistemi Haversiani), mentre nell'osso spugnoso sono lamelle incomplete unite a formare delle trabecole. L'orientamento delle trabecole all'interno del tessuto osseo spugnoso non è casuale, bensì esse si dispongono nello spazio secondo le linee di forza che vengono esercitate sul tessuto dalle sollecitazioni meccaniche a cui esso è sottoposto. Gli osteoni presentano tra una lamella e l'altra delle *lacunae*

contenenti principalmente liquido interstiziale e osteociti. Al centro dell'osteone si trova un canale detto canale centrale o *canale di Havers*, che contiene i vasi sanguigni responsabili della vascolarizzazione ossea. Il canale di Havers di un osteone si collega agli altri canali di Havers grazie ai *canali di Volkmann*, che hanno un orientamento trasversale rispetto all'asse mediano dell'osso. I canali di Havers comunicano inoltre con le lacune mediante microscopici canalicoli. Le ossa, ad eccezione delle superfici articolari, sono ricoperte da una membrana di tessuto connettivo fibroso compatto, il *periostio*. Il suo strato più interno, detto *endostio*, nelle ossa in via di accrescimento, è composto da osteoblasti che determinano la crescita di tessuto osseo. Un certo potenziale osteogenico del periostio persiste anche al termine della fase di accrescimento osseo, e si manifesta, per esempio, nel processo di guarigione delle fratture.

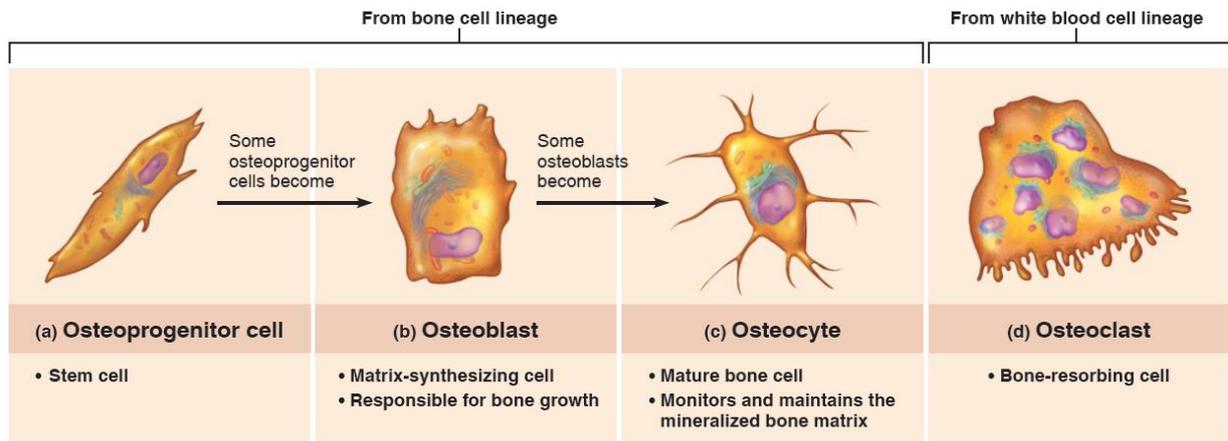
### 1.1.1 CELLULE DEL TESSUTO OSSEO

La componente cellulare del tessuto osseo è costituita da cellule osteoprogenitrici (preosteoblasti), osteoblasti, osteociti e osteoclasti (vedi Figura 1.2):

- I *preosteoblasti* si trovano sulle superfici libere delle ossa a livello dello strato più interno del periostio ma sono anche localizzate a livello dell'endostio, il tessuto connettivo lasso che riveste le cavità interne delle ossa in vicinanza dei capillari sanguigni. Le cellule osteoprogenitrici sono dotate di capacità proliferativa, che si manifesta in modo particolare durante l'accrescimento corporeo. Queste cellule si differenziano in osteoblasti maturi grazie a numerosi fattori e ormoni.
- Gli *osteoblasti* sono le cellule responsabili della sintesi delle componenti organiche della matrice extracellulare dell'osso e della deposizione della parte minerale. Hanno dimensioni piuttosto grandi e una forma globosa e formano delle lamine epitelioidei in corrispondenza delle superfici ossee che si stanno formando. La produzione della matrice ossea e la sua mineralizzazione avvengono con un orientamento ben preciso: gli osteoblasti iniziano a depositare osso dal lato rivolto verso la superficie ossea preesistente, in seguito ne depongono da ogni lato intorno a loro in modo tale che ogni cellula si allontani progressivamente dalle circostanti

a causa dell'interposizione di sostanza intercellulare. Col procedere della deposizione, gli osteoblasti rallentano l'attività e vengono inglobati nel tessuto osseo di neo-formazione, trasformandosi così in osteociti, mentre nuovi osteoblasti si differenziano via via dalle cellule osteoprogenitrici. Quando il processo di formazione di nuovo tessuto osseo è terminato, gli osteoblasti che rimangono a ridosso della superficie ossea cessano la loro attività trasformandosi in una membrana di cellule appiattite, le cellule di rivestimento dell'osso. Esse formano una barriera tra l'osso e l'ambiente circostante e mediano gli scambi molecolari tra i due compartimenti.

- Gli *osteoclasti* sono cellule multinucleate di dimensioni maggiori rispetto agli osteoblasti, deputate alla degradazione e al riassorbimento della matrice ossea con conseguente rilascio sistemico di ioni calcio e fosfato. I preosteoclasti, di derivazione macrofagica/monocitaria, sono i precursori degli osteoclasti e vengono trasportati dal torrente circolatorio fino alle sedi in cui devono avvenire processi di riassorbimento osseo. Migrano nel tessuto osseo e si fondono insieme originando osteoclasti attivi. Essi sono in grado di erodere la componente minerale, grazie ad enzimi di esocitosi e pH acido, e di digerire enzimaticamente le componenti organiche del tessuto osseo.
- Gli *osteociti* sono le cellule più numerose nell'osso che ha completato il suo sviluppo. La loro funzione consiste nella regolazione dell'omeostasi scheletrica del tessuto osseo ma sono anche capaci di "innescare" il rimodellamento. Originano dagli osteoblasti che, dopo aver prodotto la sostanza ossea, rimangono imprigionati nella matrice calcificata nell'interno di *lacune ossee* e sono presenti allo stato quiescente. Si ritiene che possano anche diventare simili agli osteoblasti ed avere quindi un ruolo nella riparazione di microfratture.



**Figura 1.2: Rappresentazione delle cellule del tessuto osseo.**

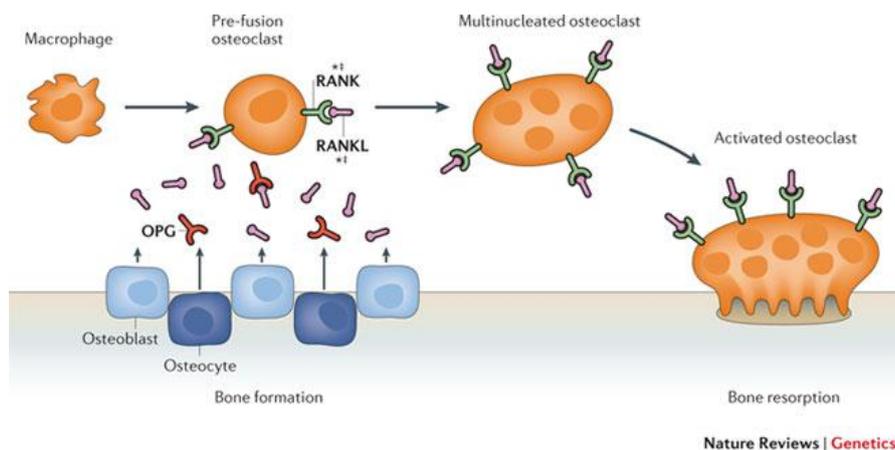
### 1.1.2 MINERALIZZAZIONE E RIASSORBIMENTO DEL TESSUTO OSSEO

La mineralizzazione è un processo nel quale una sostanza inorganica precipita su una matrice organica. Comprendere il processo di mineralizzazione è importante per lo sviluppo di scaffold con proprietà avanzate per la sostituzione ossea.

Tuttavia, ci sono ancora delle notevoli lacune nella conoscenza dettagliata del processo: mentre la struttura del collagene mineralizzato è ben nota, non è ancora chiara l'esatta sequenza di fenomeniche caratterizza la precipitazione del minerale nella matrice organica [3]. Tale processo, noto come *biomineralizzazione* è sicuramente preceduto dalla formazione di una rete di collagene prodotta dagli osteoblasti. Le fibrille di collagene hanno la funzione di sito di nucleazione della fase minerale e formano una struttura che consente una disposizione altamente organizzata dei cristalli. Queste cellule, inizialmente migratorie, rallentano gradualmente il loro movimento e rimangono sempre più immerse nella matrice. L'inizio della mineralizzazione richiede una combinazione di eventi quali l'aumento della concentrazione locale degli ioni precipitanti, la formazione dei nuclei di precipitazione e la rimozione degli inibitori della calcificazione. Durante la formazione della matrice ossea mineralizzata, gli osteoblasti depositano prima l'*osteotide*, una sostanza preossea che contiene già sostanze inorganiche ma in quantità molto inferiore alla sostanza ossea definitiva, e rilasciano proteine che catalizzano il processo di calcificazione dell'osteotide. La fase primaria della mineralizzazione, che

costituisce il 70% dell'intero processo, avviene rapidamente, mentre la fase secondaria che conduce alla completa mineralizzazione è più lenta e può durare da diversi mesi ad anni. Poiché la costruzione di cristalli iniziali è energeticamente molto dispendiosa, la costituzione di idrossiapatite avviene mediante l'accrescimento di cristalli preesistenti di più facile formazione, come ad esempio l'ottacalcio fosfato. Le membrane plasmatiche degli osteoblasti esposte a concentrazioni elevate di  $Ca^{2+}$  e  $PO_4^{3-}$  tendono a fondersi aumentando di dimensione e rilasciano parte della propria membrana sotto forma di vescicole contenenti calcio, fosfati e enzimi, sufficienti a supportare la propagazione di nuovi cristalli di idrossiapatite su cristalli preformati.

Il riassorbimento osseo è un processo mediante il quale gli osteoclasti promuovono la dissoluzione chimica della componente inorganica del tessuto osseo rilasciando ioni calcio e fosfato nel circolo ematico. Il riassorbimento osseo è fortemente stimolato o inibito dai segnali provenienti da altre parti del corpo, a seconda della domanda di calcio e altri minerali da parte dell'organismo. Bassi livelli di calcio stimolano il rilascio dell'ormone paratiroideo (PTH): il PTH promuove l'attività degli osteoclasti. La loro attività, tuttavia, necessita del contributo aggiuntivo degli osteoblasti, specialmente per quanto riguarda il reclutamento delle cellule precursori degli osteoclasti nella fase iniziale del riassorbimento osseo. Infatti gli osteoclasti non possiedono i recettori per il PTH, che invece sono presenti negli osteoblasti. L'attivazione osteoclastica può essere spiegata con il modello RANK-RANKL-OPG (vedi Figura 1.3).



**Figura 1.3: Modello RANK-RANKL-OPG.** Gli osteoblasti e le cellule staminali stromali esprimono il ligando RANKL, che si lega al suo recettore, RANK, sulla superficie dei preosteoclasti. Questo consente la differenziazione dei preosteoclasti in osteoclasti multinucleati e l'attivazione degli osteoclasti. L'osteoprotegerina (OPG) è secreta dagli osteoblasti e dalle cellule staminali stromali osteogeniche e protegge lo scheletro dall'eccessivo riassorbimento osseo legandosi a RANKL e impedendogli di interagire con RANK. Il rapporto RANKL / OPG nel midollo osseo è quindi un importante fattore determinante della massa ossea in condizioni normali e patologiche. Fonte: Richards, J. Brent, Hou-Feng Zheng, and Tim D. Spector, *Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges*, Nature Reviews Genetics 13.8 (2012): 576-588.

All'attivazione degli osteoclasti, le cellule aderiscono alla superficie ossea, a contatto con la componente mineralizzata. Successivamente gli osteoclasti formano membrane contorte, chiamate *ruffled-border* (letteralmente, "bordi increspato", vedi dettaglio in Figura1.2d), che aumentano sostanzialmente la superficie della membrana cellulare. Attraverso queste membrane contorte, gli osteoclasti secernono numerosi enzimi e acido cloridrico, mediando l'acidificazione del compartimento tra la cellula e la superficie ossea. L'acidità dell'ambiente porta alla dissoluzione della fase minerale di idrossiapatite cristallina, all'attivazione degli enzimi litici e alla digestione dei composti organici della matrice. Durante il processo di riassorbimento, la dissoluzione dell'idrossiapatite rilascia grandi quantità di calcio solubile, fosfato e bicarbonato. I prodotti di degradazione della matrice organica, dopo la digestione enzimatica, vengono accumulati in vescicole che sono secrete dalla cellula attraverso la membrana basolaterale.

## 1.2 NECESSITÀ DI SVILUPPARE SOSTITUTI OSSEI

L'idea di intervenire in caso di difetti ossei è emersa già molti secoli fa: basti pensare che tracce di trattamenti ortopedici sono state trovate nelle civiltà precolombiane ed egiziane.

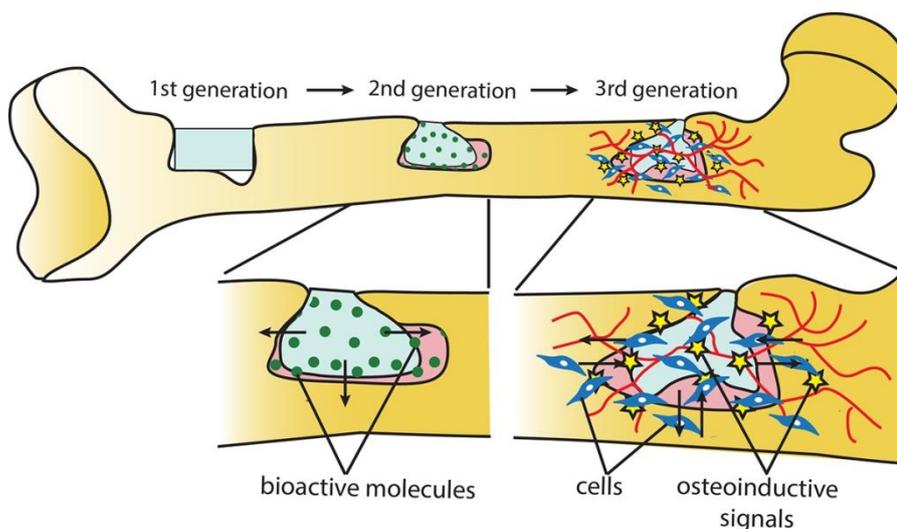
In tempi recenti, si stima che ogni anno abbiano luogo nel mondo più di 2 milioni di interventi chirurgici di trapianto a carico dello scheletro e delle ossa [4]. I difetti ossei possono svilupparsi a seguito di numerosi scenari clinici, tra cui gravi malformazioni congenite, eventi traumatici, ipoplasie, necrosi ischemiche, lesioni neoplastiche primarie (osteosarcomi, tumori ossei benigni) o secondarie (metastasi). Ampiamente utilizzato è l'autotrapianto, in cui viene utilizzato l'osso autologo, ovvero prelevato da un altro sito anatomico del paziente stesso. L'evidenza scientifica attesta che l'osso autologo può essere considerato il gold standard tra i materiali da innesto in quanto garantisce la neoformazione di tessuto osseo. Il suo utilizzo inoltre evita qualsiasi problema di immunogenicità o di rigetto. Tuttavia possiede anche numerosi svantaggi, principalmente legati alla presenza nel paziente di un secondo sito chirurgico, quello dal quale è stato prelevato l'osso, che può condurre a complicanze notevoli come dolore cronico o infezione [4]. Inoltre, è complesso e non sempre possibile riprodurre la forma e soprattutto le dimensioni delle porzioni di osso da sostituire. Come alternativa all'osso autologo viene fatto uso di osso allogenico. Provenendo da un donatore umano esterno esiste però il rischio di trasmissione di infezioni e può rivelarsi immunogenico. Oltre a ciò, un innesto con osso allogenico risulta essere una soluzione molto costosa, in quanto deve essere trattato e sterilizzato prima di essere utilizzato. Un'altra alternativa all'autotrapianto potrebbe essere l'uso di innesti con osso xenogenico. Essendo di origine animale desta preoccupazione la possibile trasmissione di patologie gravi attraverso particelle infettive proteiche, i *prioni*, che sono resistenti a numerosi trattamenti di sterilizzazione.

Pertanto, per superare tutte queste limitazioni, sono stati introdotti sostituti ossei ottenuti con l'impiego di biomateriali che col passare degli anni stanno divenendo sempre più popolari e innovativi.

La definizione di biomateriale si è evoluta da "*è un materiale non vitale utilizzato per la creazione di un dispositivo biomedico che deve interagire con*

*un sistema biologico*” (1987) a *“è un materiale per i quali si prevede un’interfaccia con i sistemi biologici al fine di valutare, trattare, migliorare o sostituire qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo umano”* (1991). Questa trasformazione nella definizione si riflette sulle evoluzioni nei concetti teorici di biomateriali e sulle aspettative delle loro prestazioni.

I biomateriali di prima generazione erano progettati per offrire elevate performance meccaniche, risultando tuttavia inerti nei confronti di stimoli o risposte cellulari specifiche nel sito di impianto. L'attenzione si è poi spostata verso biomateriali "di seconda generazione", tali da favorire un'interazione diretta con il tessuto circostante per stabilire un legame tra il materiale sintetico e il tessuto. Un altro passo rivoluzionario per questa seconda generazione di biomateriali è stato lo sviluppo di materiali biorisorbibili, che consentono una sostituzione graduale di tessuto senza limitare il processo rigenerativo. Questi progressi hanno condotto allo sviluppo di biomateriali di terza generazione, detti osteoinduttivi, ovvero capaci di "mimare" il microambiente fisiologico e indurlo a produrre e modulare le risposte biologiche desiderate per innescare e favorire i processi di rigenerazione tissutale. Alcuni esempi sono i sistemi di rilascio controllato di farmaci, sistemi con molecole bioattive in grado di innescare la formazione di nuovi tessuti, strutture seminate con cellule autologhe per facilitare il processo di rimodellamento [5]. In Fig. 1.4 è rappresentata l'evoluzione dei biomateriali applicati alla sostituzione del tessuto osseo.



**Figura 1.4:** Rappresentazione delle generazioni di biomateriali per sostituzione ossea

### 1.3 SOSTITUTI OSSEI MACROPOROSI

Nell'ambito della sostituzione ossea, le caratteristiche dello scaffold ideale sono:

- *Elevata biocompatibilità:* Abilità del materiale di interagire con l'organismo ospite, senza procurare effetti tossici o dannosi sul sistema biologico.
- *Limitata bioinerzia:* il materiale inerte non induce né subisce alterazioni chimiche o biologiche e non determinare processi immunitari, ma tuttavia non ha alcuna interazione con i tessuti circostanti.
- *Elevata bioattività:* Abilità del materiale ad originare legami chimici con il tessuto vivente.
- *Elevata osteoinduttività:* Abilità del materiale a indurre la differenziazione cellulare orientata alla sintesi e alla mineralizzazione del tessuto osseo.
- *Adeguate osteoconduttività:* Abilità del materiale nel rendere possibile la formazione e la diffusione di nuovo tessuto osseo attraverso le sue caratteristiche chimiche e morfologiche, in termini di distribuzione della porosità.
- *Biorisorbimento:* Abilità del materiale a partecipare ai fisiologici processi di rimodellamento osseo, al pari del tessuto biologico, in modo da essere sostituito nel tempo da nuovo tessuto osseo.

I numerosi studi condotti nel campo dell'ingegneria dei tessuti si sono rivolti sia alla ricerca di biomateriali che siano in grado di soddisfare nel modo migliore queste proprietà, sia alla progettazione ottimale dei sostituti ossei in termini di proprietà fisico-chimiche e meccaniche.

È ormai noto che nell'ambito dell'ingegneria tissutale gli scaffold svolgono un ruolo importante come sostituti per la rigenerazione del tessuto osseo. Gli scaffold sono strutture tridimensionali porose prodotte con biomateriali che forniscono un sostegno alla crescita delle cellule e alla loro migrazione nei

tessuti circostanti [6]. La maggior parte delle cellule di mammifero sono dipendenti dall'ancoraggio, in quanto non sono in grado di sopravvivere in assenza di un substrato a cui aderire. Gli scaffold forniscono pertanto un supporto adatto a favorire adesione, proliferazione e migrazione cellulare.

Nella fase di sviluppo di uno scaffold poroso per la rigenerazione del tessuto osseo è importante soddisfare alcuni criteri: devono essere prodotti con materiali biocompatibili, osteoinduttivi, osteoconduttivi; il tasso di formazione di nuovi tessuti deve essere simile al suo profilo di biodegradabilità; la resistenza meccanica degli scaffold deve essere sufficiente per fornire supporto meccanico nei siti portanti prima che sia formato nuovo tessuto in quantità sostanziali; la struttura deve avere una porosità adeguata e preferibilmente i pori devono essere interconnessi.

La porosità di uno scaffold è un aspetto molto importante. I pori consentono alle cellule di migrare anche nella parte più interna dello scaffold, in più direzioni, favorendo la crescita di nuovo tessuto osseo e i processi di rivascularizzazione. Tramite i pori avviene anche il trasporto di fattori di crescita per indurre la crescita dei tessuti e viene mantenuto il trasporto di ossigeno ed elementi nutritivi. La presenza di pori crea una superficie maggiore su cui possono avvenire interazioni fisico-chimiche tra il biomateriale, i tessuti e il fluido corporeo. Tali interazioni sono importanti per la creazione di un legame chimico tra i tessuti e lo scaffold. L'osteokonduzione avviene in maniera ottimale con pori di 300  $\mu\text{m}$ , sebbene possa già avvenire con pori di 50  $\mu\text{m}$ [7, 8]. Tuttavia, una dimensione dei pori troppo elevata pregiudica le proprietà meccaniche del campione finale. Un compromesso può essere dato da pori di 100  $\mu\text{m}$ , che consentono osteokonduzione e al contempo preservano buona resistenza meccanica [8]. Le interconnessioni dei pori in un biomateriale poroso sono le "vie" che collegano i pori gli uni con gli altri. Numerosi studi hanno dimostrato che i pori interconnessi facilitano l'osteokonduzione portando ad una migliore e più rapida crescita dell'osso all'interno del biomateriale poroso[8].

Nel mercato dei biomateriali per la sostituzione ossea, la ceramica detiene una posizione di rilievo, grazie alle sue proprietà di biocompatibilità e osteoconduttività [5]. In particolare, l'idrossiapatite (HA) è considerato il

materiale ceramico ideale per la produzione di scaffold macroporosi.

### 1.3.1 IDROSSIAPATITE

L'idrossiapatite (HA) è un minerale avente composizione chimica  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , facente parte del gruppo delle apatiti. La struttura atomica di una cella di idrossiapatite è riportata in Fig. 1.5.

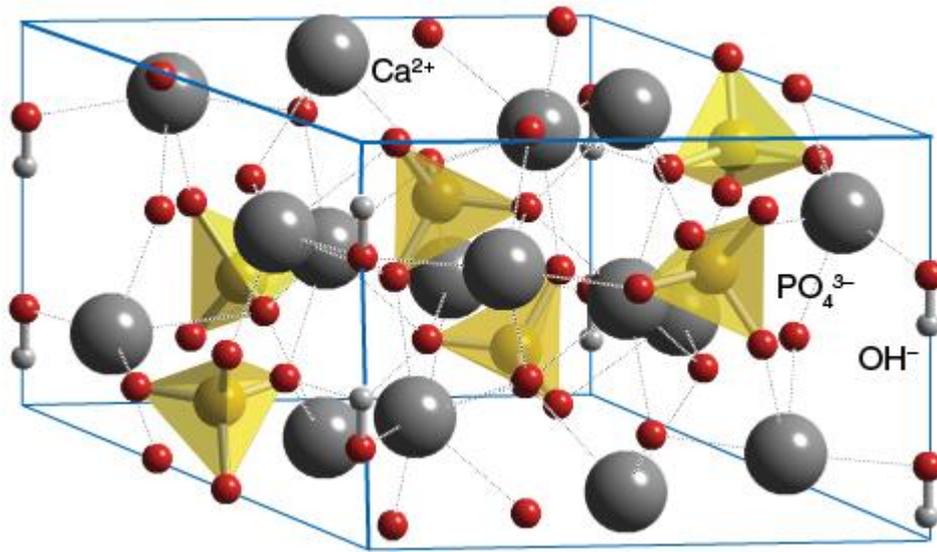


Figura 1.5: Struttura atomica della cella di Idrossiapatite.

I cristalli di idrossiapatite comprendono ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  disposti secondo una struttura esagonale intorno a colonne di  $\text{OH}^-$ . Gli ioni  $\text{PO}_4^{3-}$  formano dei tetraedri, due atomi di ossigeno sono sul piano orizzontale; gli altri due sono sugli assi paralleli all'asse c. HA appartiene al gruppo spaziale esagonale  $\text{P6}_3/\text{m}$  e ha dimensioni della cella  $a=b=9.42 \text{ \AA}$  e  $c=6.88 \text{ \AA}$  [9]. I gruppi ossidrili giacciono sugli angoli del piano basale e sono presenti a distanze regolari. Sei dei dieci ioni calcio della cella unitaria sono associati agli ossidrili, che risultano in forte interazione tra loro.

I domini cristallini accrescono preferenzialmente lungo l'asse c, dove le dimensioni dei domini cristallini risultano essere sempre maggiori che nella media del cristallo. Per la geometria del cristallo, l'asse c è perpendicolare al piano (002). Di conseguenza, misurando il piano (002) mediante tecniche come la

diffrazione a raggi X (vedi paragrafo 3.1.1) si ricavano informazioni sulle dimensioni dei cristalliti. Misurare la dimensione dei cristalliti dal picco diffrattometrico (002) fornisce proprio informazioni sulla dimensione dei domini di diffrazione "proiettati" lungo questo asse c (vedi paragrafo 4.2).

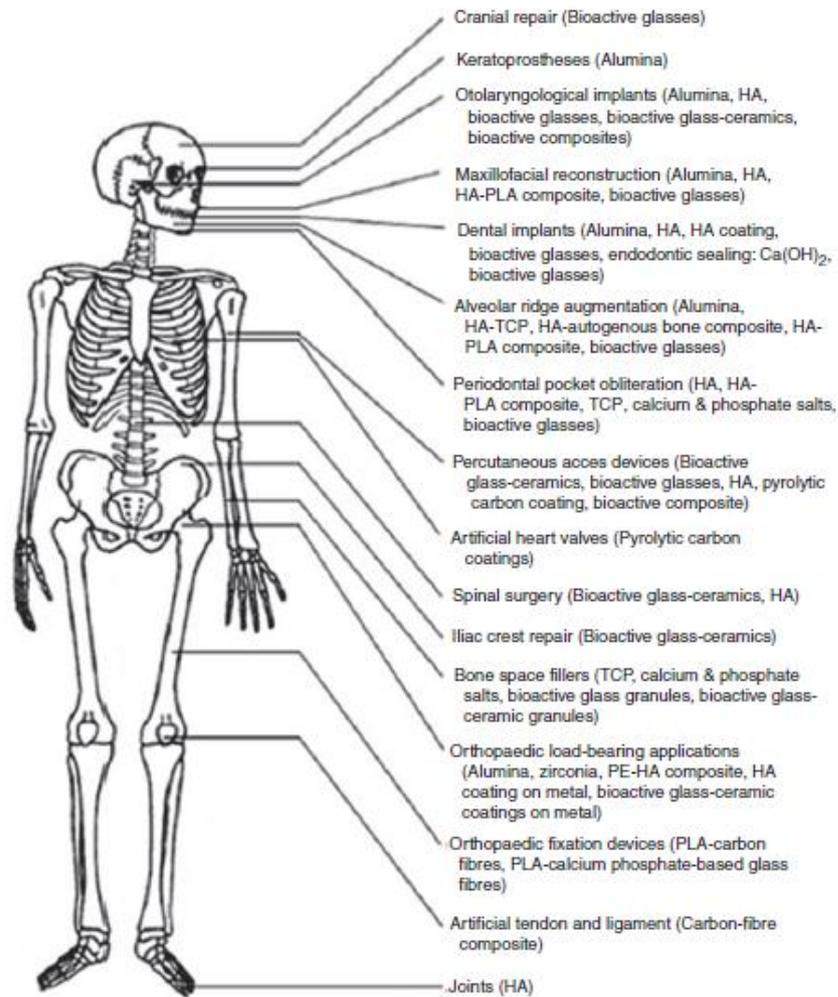
L'idrossiapatite dei tessuti biologici, diversamente da quella stechiometrica di sintesi  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , subisce frequenti sostituzioni ioniche a causa del metabolismo dell'organismo che ne modificano parzialmente la struttura cristallina. Gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  possono essere sostituiti da altri cationi bivalenti ( $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), mentre gli ioni  $\text{OH}^-$  da ioni monovalenti ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{F}^-$ ). In misura minore gli ioni tetraedrici  $\text{PO}_4^{3-}$  possono essere sostituiti da  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SiO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  [10].

La struttura cristallina delle apatiti, e in particolare la presenza di tunnel che facilitano gli scambi ionici, spiegano la considerevole variabilità delle strutture delle apatiti biologiche, la cui composizione può dipendere dalle concentrazioni di ioni che fluttuano nel plasma.

Il rapporto Ca/P per l'idrossiapatite è 10:6 (1.67) e la densità è 3.16 g/cm<sup>3</sup>; per le apatiti biologiche il rapporto Ca/P non assume un valore univoco ma varia nel range 1.58:1.80 per la presenza di sostituzioni ioniche, particolarmente con ioni carbonato, e di fasi cristalline a differente composizione come calcio fosfato amorfo (ACP), tricalcio fosfato (TCP), OCP e calcio fosfato diidrato (DCPD).

L'apatite biologica non è un materiale stabile; è coinvolta nel complesso metabolismo osseo e perciò è soggetta a continui cambiamenti strutturali dovuti anche al basso grado di cristallinità, che ne incrementa la reattività e quindi la solubilità in ambiente biologico.

HA è chimicamente e strutturalmente somigliante ai componenti minerali di ossa e denti dell'essere umano. È estremamente biocompatibile e consente la formazione di nuovo tessuto osseo promuovendone l'adesione. HA è termodinamicamente il composto ceramico di calcio fosfato più stabile in soluzione, con pH e composizione molto simili a quelli dei fluidi fisiologici [6]. Per questi motivi, ha la capacità di formare legami chimici con il tessuto osseo ospite. Per una panoramica dei suoi principali utilizzi si veda la Figura 1.6.



**Figura 1.6: Panoramica delle principali applicazioni di HA e altri biomateriali per la rigenerazione del tessuto osseo. Riferimento: An Introduction to Bioceramics. Larry L. Hench and June Wilson. Copyright 1993 by World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.27**

## 1.4 TECNICHE PER LA PRODUZIONE DI SCAFFOLD MACROPOROSI CERAMICI

Per produrre scaffold macroporosi esistono numerose tecniche. Le più note sono le tecniche “convenzionali”, tuttavia si stanno diffondendo anche metodi innovativi come la stampa 3D.

Esaminando la letteratura scientifica del settore, si riconoscono almeno tre tecniche “convenzionali” per la produzione di scaffold macroporosi (vedi Fig.1.7) [11-13]:

- Metodo Replica
- Sacrificial Template
- Foaming diretto

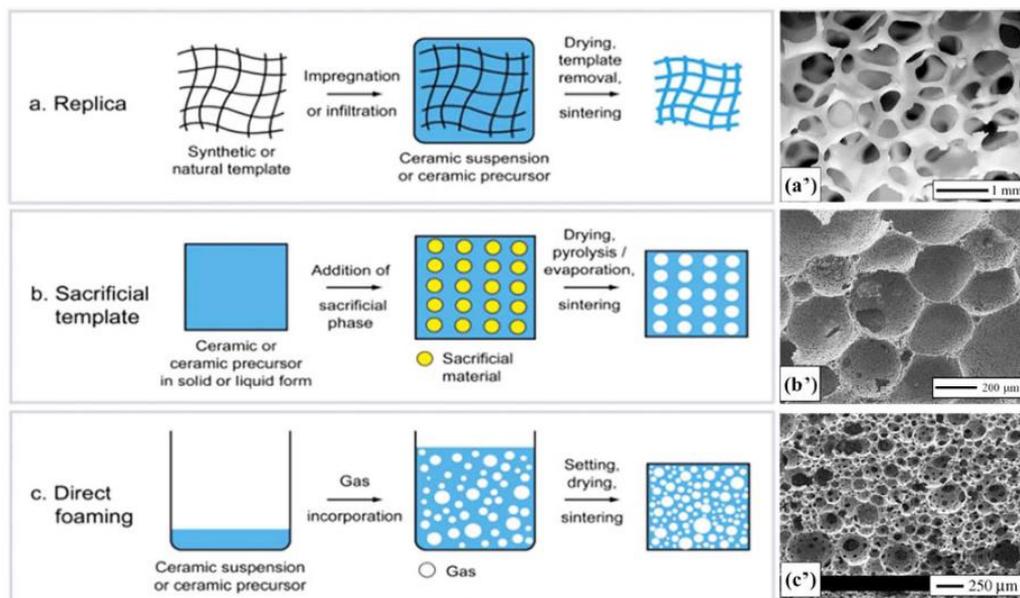


Figura 1.7: Tecniche convenzionali per la produzione di scaffold macroporosi.

#### 1.4.1 REPLICA

Il metodo replica si basa sull'impregnazione di una spugna porosa con una sospensione ceramica per produrre una ceramica macroporosa, di fatto uno scaffold, che esibisce la medesima morfologia del materiale originale. Replica è stato il primo metodo utilizzato per la produzione di ceramiche macroporose. L'invenzione originale risale agli inizi degli anni '60 e da allora la tecnica replica è diventata molto popolare ed è oggi ampiamente utilizzata industrialmente.

In questa tecnica, una spugna polimerica altamente porosa, tipicamente in poliuretano, viene inizialmente immersa in una sospensione ceramica fino a quando tutti i pori interni non vengono riempiti con materiale ceramico. La sospensione è preparata con polvere di Idrossiapatite, acqua e disperdente. La spugna impregnata viene quindi fatta passare attraverso dei rulli in movimento per rimuovere la sospensione in eccesso e consentire la formazione di un rivestimento ceramico sulla struttura originale. In questa fase, la sospensione deve essere sufficientemente fluida per essere parzialmente rimossa dai rulli, ma tale da mantenere il rivestimento ceramico evitando gocciolamenti. Pertanto, sono necessarie sospensioni ceramiche che presentano un comportamento reologico, in termini di viscosità e viscoelasticità, definito molto strettamente. Per adeguare il comportamento reologico della sospensione e per rendere sufficientemente resistenti ai trattamenti termici i rivestimenti ceramici della spugna, vengono aggiunti additivi tixotropici, leganti, addensanti e disperdenti convenzionali [13]. La spugna polimerica impregnata viene successivamente essiccata e sottoposta a trattamenti termici non superiori agli 800°C che consentono la decomposizione della parte polimerica della spugna. Dopo la rimozione del modello polimerico, il rivestimento ceramico viene reso più denso grazie alla sinterizzazione a temperature comprese tra i 1000°C e i 1700°C[13].

La grande fortuna di questo metodo è in parte dovuta al fatto che è applicabile a qualsiasi materiale ceramico che può essere opportunamente disperso in una sospensione. Gli scaffold macroporosi ottenuti con questo metodo possono raggiungere una porosità anisotropa che va dal 40% al 95% e sono caratterizzati da una struttura reticolata con pori altamente interconnessi di dimensioni comprese tra 200 µm e 3 mm[13].

Un limite di questo metodo è la difficoltà di impregnare totalmente la spugna che potrebbe presentare zone e piccoli pori non accessibili dalla sospensione. Questo impedisce di ottenere pori con dimensione inferiore ai 200  $\mu\text{m}$ . Inoltre, accade spesso che durante il processo termico per eliminare la spugna polimerica si creino crepe negli “*struts*” delle strutture, compromettendo le proprietà meccaniche.

Oltre alle spugne polimeriche sintetiche possono essere usate spugne in cellulosa. Inoltre nel metodo replica si utilizzano come modelli anche strutture naturali come legno e corallo che sono particolarmente interessanti per la loro speciale morfologia dei pori e per la complessità delle microstrutture, che potrebbero essere difficili da produrre artificialmente.

#### **1.4.2 SACRIFICIAL TEMPLATE**

La tecnica *sacrificial template* consiste nella preparazione di un composito bifasico che comprende una matrice di particelle ceramiche (o precursori ceramici) e una fase sacrificale dispersa che è inizialmente distribuita in maniera omogenea su tutta la matrice e viene infine eliminata per generare i pori all'interno della microstruttura. Questo metodo consente di ottenere scaffold porosi che mostrano una replica in negativo del modello sacrificale originale, al contrario della tecnica replica in cui la morfologia è positiva avendo replicato la struttura della spugna.

Il composito bifasico viene comunemente preparato pressando una miscela di polvere e materiale sacrificale ottenendo una sospensione bifasica oppure impregnando con una sospensione ceramica il materiale sacrificale già preformato. Come nel metodo replica, per rendere le strutture tridimensionali ceramiche sufficientemente resistenti ai trattamenti termici, vengono aggiunti leganti, addensanti e disperdenti convenzionali. Il modo in cui la fase sacrificale viene eliminata dal composto dipende dal tipo di materiale utilizzato. I materiali adoperati sono numerosi e includono composti organici, sali, liquidi, metalli. I composti organici vengono generalmente estratti attraverso pirolisi applicando lunghi trattamenti termici a temperature comprese tra 200°C e 600°C [13].

Materiali sacrificali come sali, particelle ceramiche e metalliche vengono invece estratti mediante l'uso di sostanze chimiche e acidi.

Uno dei principali vantaggi del sacrificial template è la possibilità di ottenere scaffold con porosità estremamente variabile, dal 20% al 90%, e con dimensione dei pori compresa tra 1  $\mu\text{m}$  e 700  $\mu\text{m}$  [13]. Inoltre, attraverso una scelta appropriata del materiale sacrificale si può adattare la distribuzione e la morfologia dei pori.

### 1.4.3 FOAMING DIRETTO

Nel metodo di foaming diretto vengono prodotti scaffold porosi tramite l'incorporazione di un gas (ad esempio aria) in una sospensione molto concentrata, che viene successivamente essiccata e sinterizzata per migliorarne le proprietà meccaniche. Come si riporta in letteratura, il gas può essere incorporato nella sospensione in vari modi: attraverso la reazione chimica di opportune miscele in soluzione, per gorgogliamento oppure per agitazione meccanica con mezzi macinanti mediante l'utilizzo di un girabottiglie o, per accelerare la procedura, di un mulino planetario ad alta energia [12, 14]. La formazione di bolle gassose procede attraverso meccanismi di nucleazione, coalescenza e crescita: per un controllo ottimale della distribuzione e della dimensione dei pori, la coalescenza delle bolle deve essere tuttavia limitata mediante l'utilizzo di agenti capaci di stabilizzare la schiuma. Vengono utilizzati tensioattivi (surfattanti) oppure particelle solide che diminuiscono l'estesa area superficiale gas-liquido delle bolle, sfavorendone la crescita e la coalescenza.

Questa tecnica non fa uso di fasi sacrificali, come nel caso del metodo Replica e Sacrificial Template, è quindi più semplice e meno costosa. Si possono ottenere scaffold con porosità che varia dal 40 % al 97% e con dimensione dei pori da 10 a 1000  $\mu\text{m}$ . In particolare, la porosità totale che si può ottenere è direttamente proporzionale alla quantità di gas incorporato nella sospensione durante il processo [14]. La dimensione e l'interconnessione dei pori, inoltre, dipende dalla stabilità della schiuma.

### **STABILITÀ DI UNA SOSPENSIONE REALIZZATA MEDIANTE FOAMING DIRETTO**

Le sospensioni bioceramiche per il foaming diretto devono essere “stabili”, ovvero tali da non sedimentare o agglomerare in tempi brevi, ma “stabili” devono anche essere le bolle di gas incorporate nella sospensione. Inoltre le sospensioni devono possedere adeguate proprietà reologiche che consentano alle bolle di gas, al momento del versamento della sostanza in contenitori preformati, di mantenere la loro forma, le dimensioni e la distribuzione [14].

Le schiume sono sistemi termodinamicamente instabili per la presenza di un'estesa interfaccia liquido-gas. Esse subiscono continui processi destabilizzanti che sono principalmente *drenaggio*, *coalescenza* e *disproporzione (maturazione di Ostwald)*. Questi meccanismi di destabilizzazione aumentano in modo significativo la dimensione delle bolle, generando pori eccessivamente grandi nella struttura finale. Pertanto, un problema critico nel metodo di Foaming diretto consiste nello stabilizzare le bolle d'aria incorporate nella sospensione.

Il *drenaggio* rappresenta la separazione fisica fra la fase liquida e quella gassosa di una schiuma per effetto della gravità [13]. Nelle schiume in cui avviene il fenomeno del drenaggio, le bolle di gas si muovono verso l'alto a formare uno spesso strato denso, mentre la fase più pesante si concentra nel fondo. Le bolle accumulate nella parte superiore generalmente si riarrangiano e si deformano per formare un sistema altamente impacchettato.

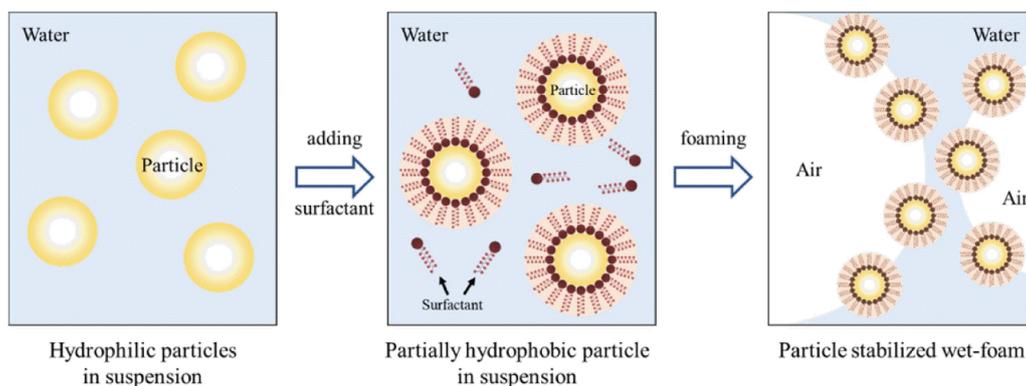
La schiuma risultante mostra una microstruttura tridimensionale caratterizzata da film sottili fra le facce delle bolle che si toccano, chiamati *angoli di plateau*. La *coalescenza* avviene quando dopo il drenaggio di un sistema, il sottile film che separa tra loro le bolle non è abbastanza stabile: la sua rottura causa l'associazione di due bolle adiacenti.

La stabilità del film sottile è determinata dalle interazioni attrattive e repulsive. Le forze di Van derWaals attrattive tendono a spingere le bolle le une contro le altre e rappresentano così la principale causa di collasso del materiale. La coalescenza può essere ostacolata dalle forze elettrostatiche e/o repulsive di tipo sterico sufficientemente forti da superare le forze attrattive di Van DerWaals. Tensioattivi e biomolecole adsorbite all'interfaccia gas-liquido possono limitare questo processo, diminuendo l'energia interfacciale.

Le schiume possono essere adattate efficientemente per prevenire i processi di drenaggio e di collasso, raramente prevengono però la *disproporzione* [13].

Tale meccanismo di destabilizzazione è dovuto alla differenza di pressione di Laplace fra bolle di dimensioni differenti [13]. La pressione di Laplace all'interno di una bolla di gas dipende dalla curvatura dell'interfaccia aria-acqua. Per bolle sferiche di raggio  $R$  ed energia all'interfaccia gas-liquido  $\gamma$ , la pressione di Laplace è data da:  $\Delta P = \frac{2\gamma}{R}$ .

A causa dell'azione di questi meccanismi fisici, le schiume possono collassare in pochi secondi dopo l'incorporazione dell'aria. Il tempo di sopravvivenza di una schiuma può essere aumentato da pochi minuti a diverse ore mediante l'adsorbimento di molecole anfifiliche, biomolecole o di particelle all'interfaccia aria-acqua. Esse rallentano la coalescenza e la disproporzione delle bolle d'aria adsorbendosi sulla superficie delle bolle d'aria e riducendo l'energia interfaciale aria-acqua [13] (vedi Figura 1.8).



**Figura 1.8: Meccanismo d'azione di una molecola anfifilica (surfattante). Le code idrofobiche si dispongono all'interno della bolla e le teste idrofili restano a contatto con l'acqua. La tensione superficiale del liquido si riduce inibendone la coalescenza grazie a una forza repulsiva elettrostatica o sterica.**

I tensioattivi adsorbono solo in parte l'energia all'interfaccia gas-liquido e non possono quindi prevenire la destabilizzazione a lungo termine portando al collasso delle schiume entro pochi minuti dal foaming. Perciò è necessario aggiungere agenti surfattanti, per consolidare la microstruttura della schiuma prima di un'eccessiva coalescenza delle bolle o di una disproporzione elevata.

La dimensione finale dei pori di un poroso ceramico dipende dal bilanciamento fra la cinetica di disproporzione delle bolle e la velocità di settaggio di una sospensione liquida.

I pori ottenuti sono tipicamente sferici e possono generare porosità chiuse o aperte in funzione del grado di coalescenza tra le bolle. Porosità chiuse sono raggiunte quando le particelle sono distribuite uniformemente attorno alle bolle di gas fino al consolidamento. Porosità aperte, che mostrano interconnessione, sono ottenute quando le particelle vengono confinate in angoli, a causa della disproporzione delle bolle.

#### **1.4.4 TECNICHE INNOVATIVE DI FABBRICAZIONE: LA STAMPA 3D**

Oltre alle tecniche convenzionali, negli ultimi decenni è stato introdotto l'utilizzo della "stampa 3D" per la produzione di scaffold macroporosi ceramici.

Si tratta di una tecnologia che implementa lo stesso principio di funzionamento di una comune stampante a getto d'inchiostro, ampliandone le potenzialità nelle tre dimensioni dello spazio. In questo modo si è in grado di riprodurre strutture molto complesse e ad alta risoluzione in tempi anche brevi, sulla base di un precedente progetto virtuale elaborato al computer.

Nel settore della medicina rigenerativa l'obiettivo coincide con la realizzazione di scaffold all'interno dei quali è possibile controllarne la porosità, in termini di distribuzione dimensionale, forma e interconnettività dei pori, favorendo pertanto la crescita cellulare e la rigenerazione dei tessuti[15].

Inoltre, questa tecnologia permette di riprodurre strutture tridimensionali delle esatte dimensioni del difetto tissutale del paziente, sfruttando le informazioni anatomiche provenienti da immagini radiografiche ospedaliere [16].

Il processo di stampa 3D è comunemente guidato da un software di modellazione 3D, ad esempio CAD (*Computer-Aided Design*), che controlla l'attuatore della stampante seguendo deposizioni di materiale linea per linea e quindi strato per strato. Il principio di funzionamento delle stampanti 3D può variare in funzione

dei materiali utilizzati e delle caratteristiche strutturali / funzionali desiderate nella struttura finale. Le tecnologie più comunemente utilizzate sono basate sulla fotopolimerizzazione della luce ultravioletta (UV). Questi metodi consentono di fabbricare scaffold 3D indurendo una resina fotopolimerica estrusa sotto l'esposizione controllata alla luce UV o un'altra fonte di energia simile. Per quanto riguarda la fabbricazione di scaffold polimerici o compositi, le tecnologie generalmente adoperate si basano sull'estrusione da una testina di polimeri termoplastici fusi a formare sottili filamenti che vanno a creare architetture 3D strato per strato. Un aspetto critico è rappresentato dal controllo delle proprietà reologiche del materiale estruso, in particolare la *viscosità*: un materiale troppo viscoso risulterà di difficile estrusione da ugelli piccoli, con limitazioni dirette sulla risoluzione spaziale dei dettagli dell'oggetto realizzato[11]. Al contrario, una bassa viscosità può compromettere la stabilità della struttura appena stampata, che potrebbe rischiare il collasso ben prima di stabilizzarsi.

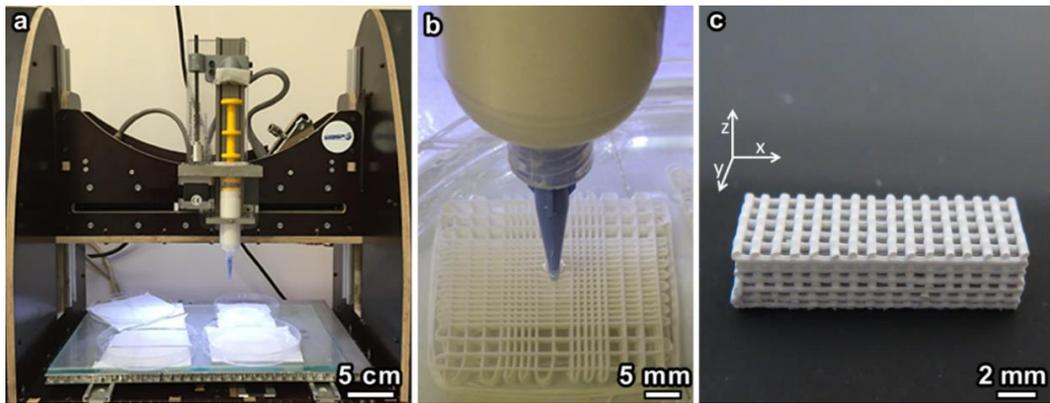
La stampa 3D di materiali ceramici è stata introdotta per la prima volta negli anni '90. Ad oggi, grazie ai più recenti progressi nella scienza dei materiali e nell'informatica, sono state sviluppate numerose tecnologie di stampa 3D per la produzione di scaffold. In base alla forma della materia prima pre-lavorata prima della stampa, queste tecnologie possono generalmente essere classificate in metodi a base di sospensioni ceramiche, a base di polvere e a base di solidi[17].

Nella stampa 3D con polveri, viene costituito uno strato di polvere contenente normalmente particelle di ceramica sfuse come materia prima. Le particelle di ceramica vengono poi aggregate in modo controllato mediante leganti chimici e successivamente sinterizzate utilizzando l'energia termica di un raggio laser (tecnologia *Laser Sintering*). Dopodiché, la polvere in eccesso viene eliminata con un leggero flusso d'aria e si prosegue con la deposizione dello strato successivo. Strato per strato si formerà così una struttura tridimensionale[16].

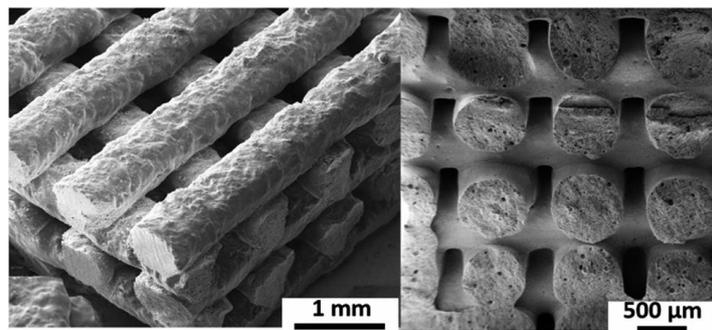
Le tecnologie di stampa 3D basate su sospensioni utilizzano sistemi liquidi o semiliquidi dispersi con particelle di ceramica, sotto forma di inchiostri (*ink*) o paste, a seconda del carico solido e della viscosità del sistema. Il range di viscosità include valori bassi per inchiostri con un basso carico di polvere

ceramica (fino al 30 vol%), fino a valori alti caratteristici di paste con un carico di ceramica molto maggiore (fino a 60 vol%)[17].

Uno degli approcci basata sulla stampa 3D a getto di inchiostro, è il cosiddetto *Direct ink writing* (DIW) conosciuta anche come Robocasting (Figura 1.9). La diffusione di questa tecnologia è cresciuta nel 1997 come strumento per produrre strutture ceramiche di forma complessa. La tecnica si basa sull'estrusione continua di una pasta attraverso un ugello e la sua deposizione strato per strato per creare la forma finale desiderata secondo un modello CAD[18]. Segue poi la sinterizzazione del materiale stampato. Di fatto è simile alla tecnica di stampa a getto di inchiostro, ma fa uso di inchiostri molto più viscosi e necessita quindi di ugelli con aperture di diametro maggiore. È quindi utilizzabile con successo per stampare paste estremamente viscosi a base di Idrossiapatite. Inoltre è in grado di fabbricare strutture autoportanti e monolitiche con pareti alte senza la necessità di supporti (come strati di polvere o supporti stampati), cosa impossibile con altre tecniche di stampa 3D[17]. Con tale tecnica si riescono ad ottenere scaffold con pori sino a 300  $\mu\text{m}$  e con porosità periodica (vedi Figura 1.10)[19]. L'inchiostro viene prodotto miscelando una polvere con acqua e piccole percentuali di additivi, inclusi disperdenti, leganti, agenti addensanti e coagulanti, al fine di ottenere le proprietà reologiche desiderate. Una pasta adatta per il Robocasting dovrebbe avere un'elevata concentrazione di polvere, necessaria per aumentare la densità del prodotto finale migliorandone la resistenza meccanica, e una adeguata viscosità tale da calare quando è sottoposta a sforzo di taglio (cioè avere un comportamento *shear thinning*) per facilitare l'estrusione e successivamente mostrare un rapido recupero della struttura interna per il mantenimento della forma, offrendo al contempo supporto meccanico agli strati successivi[18]. Una bassa viscosità non è compatibile con l'esigenza di avere un'elevata frazione di polvere nella sospensione, pertanto, è necessario scendere a compromessi per preparare sospensioni ceramiche idonee.



**Figura 1.9:** Da sinistra destra: a) visione frontale del blocco estrusore. b) Particolare dell'ugello di fuoriuscita dell'inchiostro. c) Scaffold ottenibile con il processo Robocasting. Fonte: C. Castegini, *Manifattura additiva dibiovetroceramici*, Tesi di laurea magistrale in Ingegneria dei materiali, Università degli Studi di Padova, a.a 2015-2016.



**Figura 1.10:** Immagine SEM di uno scaffold ceramico ottenuto con Robocasting.



# CAPITOLO 2

---

## 2. PREPARAZIONE DEI MATERIALI

In una fase preliminare dell'attività di tesi, la polvere Idrossiapatite (HA) commerciale (Sigma Aldrich, USA) è stata calcinata a tre differenti temperature (800°C, 900°C e 1000°C) per poter valutare gli effetti del trattamento termico sulle proprietà chimico-fisiche del materiale (superficie specifica, analisi granulometrica e composizione in fasi).

Sono state quindi utilizzate per preparare sospensioni acquose di idrossiapatite variando la concentrazione di polvere (45%, 60% e 75% in peso) e di disperdente (3%, 4% e 5% in peso) per osservarne gli effetti sulla stabilità e sulle proprietà reologiche finali. La stabilità chimico-fisica delle sospensioni acquose è stata valutata mediante misure di pH e potenziale $\zeta$ , mentre l'analisi reologica ha previsto misure sia di viscosità che di viscoelasticità.

Sono stati preparati poi campioni porosi mediante tecnica di foaming diretto, caratterizzati in termini di porosità e microstruttura (SEM).

### 2.1 CALCINAZIONE

Nello sviluppo di sostituti ossei macroporosi ceramici con il metodo di foaming diretto un passo decisivo è legato allo sviluppo di sospensioni ceramiche "stabili".

Questo requisito può essere soddisfatto mediante il controllo delle proprietà fisico-chimiche della polvere di idrossiapatite quali dimensione delle particelle, distribuzione granulometrica, carica superficiale e area superficiale, ma anche utilizzando reagenti disperdenti appropriati. La calcinazione di polveri rappresenta un valido processo termico capace di modificare le proprietà fisico-chimiche della polvere, in particolare l'area superficiale, la carica superficiale e la distribuzione granulometrica.

La calcinazione è un trattamento termico che consiste nel trattare polveri ad una temperatura anche molto elevata, comunque inferiore a quella di fusione.

Rappresenta un trattamento molto importante che, in assenza di modificazioni della composizione in fasi del materiale, consente di eliminare tutte le sostanze volatili dal composto, riducendone anche l'attività superficiale verso una successiva sinterizzazione termica più controllata. Come diretta conseguenza, si assiste alla diminuzione della superficie specifica della polvere.

Normalmente nel caso di sospensioni ceramiche, le polveri commerciali non trattate termicamente hanno elevata area superficiale, quindi elevata attività superficiale e tendono a formare in soluzione agglomerati indesiderati di forma variabile e non prevedibile che causano anisotropie nella microstruttura del campione finale. È noto, infatti, che per produrre sospensioni ceramiche ben stabilizzate è necessario usare polveri con una superficie specifica bassa. D'altra parte, polveri con area superficiale estremamente bassa hanno maggiore densità e maggiore dimensione delle particelle; questo può causare eterogeneità nella densità della sospensione e di conseguenza nel campione finale [20]. Pertanto, deve essere raggiunto un compromesso tra questi aspetti.

Con la calcinazione si ha la formazione di agglomerati di dimensioni maggiori e più regolari con una ridotta superficie specifica a causa di una parziale coalescenza tra le singole particelle.

La coalescenza tra singole particelle è il risultato di due differenti meccanismi di trasporto di materia: diffusione superficiale, che causa generalmente una riduzione dell'area superficiale senza aumento della densità del materiale, e diffusione volumetrica (o diffusione dei bordi di grano), che induce una riduzione dell'area superficiale che implica anche la riduzione della porosità, portando quindi a densificazione. Sino ai 700°C - 800°C avviene solo il primo meccanismo, durante il quale la differenza di pressione di vapore in funzione della curvatura delle superfici delle particelle del materiale rappresenta la *driving force* del trasporto di materia.

Il trasferimento di atomi da superfici convesse a concave determina quindi una diminuzione dell'energia libera del sistema, cui corrisponde la diminuzione dell'area superficiale del materiale e l'eliminazione delle interfacce solido-vapore, anche alla base dei successivi trattamenti termici di sinterizzazione (vedi paragrafo 2.3.2).

La calcinazione è stata eseguita utilizzando un forno convenzionale, visibile in Figura 2.1, nel quale sono state impostate 2 temperature finali (800°C e 1000°C), con rampa di circa 200°C/h e permanenza di 1 ora.



**Figura 2.1: Forno convenzionale utilizzato per effettuare la calcinazione**

## **2.2 MISCELAZIONE**

Prima di poter miscelare la sospensione, è necessario setacciare la polvere calcinata con un setaccio con maglie da 150 µm per disgregare eventuali agglomerati. La setacciatura è stata effettuata sia in modo manuale (setaccio e pennello), sia in maniera automatica (mediante l'ausilio di un vibrovaglio).

Successivamente alla calcinazione e una volta eseguita la setacciatura si procede con la preparazione della sospensione, che prevede una pesata iniziale di acqua, seguita dall'aggiunta di deflocculante e infine la polvere di idrossiapatite (HA).

Per determinare le quantità da utilizzare ho fatto riferimento alla letteratura in cui il rapporto tra queste sostanze normalmente usato nella preparazione di sospensioni per il foaming è  $HA:H_2O:disperdente = 73:23:4$  [14].

Per valutare l'effetto della concentrazione di deflocculante sulla stabilità e sulle proprietà reologiche finali della sospensione, ho anche preparato sospensioni secondo i rapporti  $HA:H_2O:disperdente = 73:24:3$  e  $73:22:5$ .

Come agente deflocculante ho utilizzato il Dolapix CA (Zschimmers & Schwartz). Il deflocculante previene fenomeni di flocculazione incontrollata. Le forze a cui le particelle in soluzione sono sottoposte sono: *moto browniano* che si oppone alla sedimentazione ma favorisce l'incontro tra le particelle; *forze*

*attrattive di Van der Waals* che tendono a legare le particelle ogni volta che si avvicinano nel loro raggio di influenza; *forze repulsive* dovute al doppio strato di carica che tendono ad allontanare le particelle e a rendere stabile la sospensione. Fino a che le forze repulsive prevalgono su quelle attrattive, la sospensione è cinematicamente stabile. Quando le forze repulsive si riducono, le forze di Van der Waals possono prevalere e provocare l'aggregazione.

La deflocculazione può avvenire principalmente in due modi: tramite adsorbimento di molecole a forte connotazione sterica in grado di impedire che le particelle vengano a stretto contatto, oppure creando sulla superficie delle particelle uno strato di cariche uguali che ne favoriscano la mutua repulsione.

Per deflocculare una sospensione ceramica possono essere utilizzati:

- acidi e basi, che hanno l'effetto di cambiare la carica superficiale e variare così il potenziale zeta alterando il pH della sospensione;
- dispersanti organici tensioattivi con effetti sterici che si depositano sulle particelle ceramiche e ne impediscono l'avvicinamento a causa dell'ingombro sterico;
- dispersanti organici polielettroliti adsorbibili sulla superficie delle particelle con l'effetto di crearvi una carica elettrostatica.

Il Dolapix CA è un deflocculante organico polielettrolita sintetico che non ha azione schiumogena e consente di ottenere sospensioni ad elevato contenuto di frazione solida. L'effetto deflocculante del Dolapix CA è il risultato dell'interazione elettrochimica tra i suoi gruppi funzionali e la superficie delle particelle di ceramica causandone la mutua repulsione e di conseguenza promuovendone la dispersione e aumentando la stabilità della sospensione, riducendone la viscosità.

Per valutare, sia gli effetti della temperatura di calcinazione, sia della concentrazione di deflocculante sulla stabilità e sulle proprietà reologiche finali, ho preparato 6 differenti sospensioni acquose con tre diversi rapporti HA:H<sub>2</sub>O:dispersante, con polvere calcinata a 800°C e con polvere calcinata a 1000°C. In tabella I sono riassunte le tipologie di sospensioni acquose preparate:

	<b>Rapporto HA:H<sub>2</sub>O:disperdente</b>		
<b>HA 800</b>	73:24:3	73:23:4	73:22:5
<b>HA 1000</b>	73:24:3	73:23:4	73:22:5

**Tabella I: Tipologie di sospensioni acquose preparate.**

La sospensione è stata preparata utilizzando 90 g di polvere di idrossiapatite. Le quantità di acqua e Dolapix CA variano in base ai rapporti HA:H<sub>2</sub>O:disperdente e sono riportate in tabella II:

	<b>Rapporto HA:H<sub>2</sub>O:disperdente</b>		
	<b>73:24:3</b>	<b>73:23:4</b>	<b>73:22:5</b>
<b>HA (g)</b>	90	90	90
<b>Dolapix CA (g)</b>	3.71	4.94	6.17
<b>Acqua (g)</b>	29.59	28.36	27.13

**Tabella II: Quantità di sostanze usate per preparare le sospensioni acquose.**

La stabilità chimico-fisica delle sospensioni acquose è stata valutata mediante misure di pH e potenziale  $\zeta$ . Le misure di potenziale  $\zeta$  e pH sono state acquisite a diverse concentrazioni di polvere nella sospensione. Tali concentrazioni sono state calcolate come:  $\frac{x}{x+m_{Dolapix}+m_{H_2O}} \cdot 100\%$  dove x è la massa di polvere presente nella soluzione. In tabella III si riportano le concentrazioni della sospensione, ai cui valori è stato misurato il potenziale  $\zeta$  e il pH, e le aggiunte in massa di polvere per valori ottenere tali concentrazioni:

<b>Concentrazione della sospensione (% in peso)</b>	<b>Massa di polvere aggiunta (g)</b>
7	2.5
13	2.5
23	5
40	12.5
60	27.5
70	30
73	10

**Tabella III: Concentrazioni della sospensione e relativa massa (g) aggiunta di polvere.**

Le proprietà chimico-fisiche delle polveri che si ottengono a seguito di trattamenti di calcinazione differenti si riflettono già nella facilità di miscelazione della polvere. A parità di concentrazione di deflocculante infatti, sono riuscite a miscelare manualmente sospensioni con polvere calcinata a 1000°C fino alla concentrazione del 70% in peso, mentre le sospensioni con polvere calcinata a 800°C fino alla concentrazione del 60% in peso. In Figura 2.2 si può apprezzare la differenza che intercorre, a parità di concentrazione di polvere in massa, tra le due sospensioni con polveri calcinate a temperature differenti.



**Figura 2.2 (a) Sospensione concentrata al 60% di HA calcinata a 1000°C in rapporto 73:23:4. (b) Sospensione concentrata al 60% di HA calcinata a 800°C in rapporto 73:23:4.**

Per proseguire con il caricamento delle sospensioni a concentrazioni più elevate ho fatto uso di un mulino planetario a sfere ad alta energia (Pulverisette 6, Fritsch, Germania). Ho collocato la sospensione in un contenitore di zirconia ( $ZrO_2$ ) da 250 ml contenente 6 mezzi macinanti in  $ZrO_2$  (diametro di 15 mm), posto in rotazione a 400 rpm per un tempo variabile dai 10 minuti ai 30 minuti.

Con tale metodo, la sospensione si è mescolata in modo rapido ed efficace. Tale tecnica è stata ideata e messa a punto per il foaming diretto e, come vedremo nel paragrafo successivo, è stata utilizzata per ottenere i campioni macroporosi [14].

Per le analisi reologiche, in cui sono state valutate le proprietà di viscosità e viscoelasticità del materiale, ho preparato nuovamente le sei sospensioni

utilizzando metà dose rispetto a quella riportata in tabella II. Le prove reologiche sono state effettuate a concentrazioni di polvere di HA nella sospensione pari al 45%, 60% e 75%. Le aggiunte di polvere con la relativa concentrazione sono riportate in tabella IV:

<b>Concentrazione della sospensione (% in peso)</b>	<b>Massa di polvere aggiunta (g)</b>
45	13.62
60	11.35
75	25.00

**Tabella IV: Concentrazioni della sospensione e relativa massa (g) di polvere aggiunta.**

### **2.3 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI MACROPOROSI**

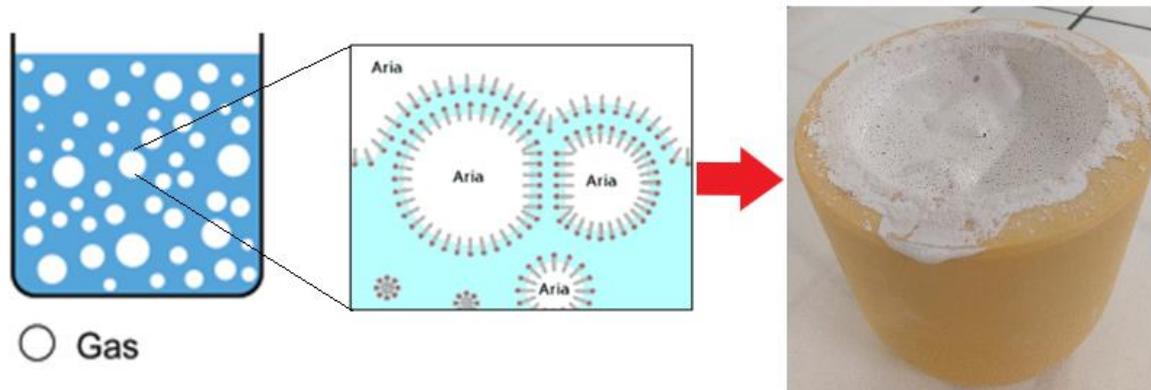
La progettazione di uno scaffold per applicazioni biomedicali richiede un'attenta valutazione di aspetti legati alla chimica, alla morfologia e alle proprietà meccaniche del tessuto osseo. Tra questi, un requisito fondamentale è rappresentato dalla porosità, in particolare della presenza di una distribuzione di dimensione dei pori tale da consentire proliferazione e crescita cellulare, apporto di sostanze nutritive, smaltimento di prodotti di scarto metabolici e rivascularizzazione. Allo stesso tempo, la presenza di pori dovrebbe anche essere tale da non compromettere le proprietà meccaniche al fine di essere utilizzabile anche come rigenerazione di segmenti ossei sottoposti ad elevato carico biomeccanico. Altro requisito importante è che i pori siano interconnessi.

#### **2.3.1 FOAMING DIRETTO**

Per preparare i campioni porosi con l'uso del foaming diretto ho seguito il procedimento descritto nell'articolo di Dapporto et al.[14]. Questa procedura è molto più veloce rispetto alle tecniche preesistenti per il foaming diretto e consente comunque di ottenere un risultato molto soddisfacente in termini di adeguata porosità e proprietà meccaniche.

Per incorporare il gas viene aggiunto alla sospensione un surfattante. Il surfattante è necessario per ridurre la tensione superficiale del liquido e per stabilizzare le bolle, inibendone la coalescenza (vedi Fig. 2.3).La coalescenza viene inibita grazie a una forza repulsiva elettrostatica o sterica fornita dal

surfattante, sufficientemente forte da superare le forze attrattive di Van der Waals[12]. Quando la velocità di generazione della bolla e dello scoppio sono equilibrio, si ottiene il volume massimo della schiuma [21].



**Figura 2.3: Incorporazione di aria all'interno della sospensione.**

Come agenti surfattanti ho utilizzato Olimpicon A (Olimpia Tensioattivi, Italy) e W53 (Zschimmer & Schwartz, Germany).

La realizzazione dei campioni macroporosi ha inizio con la preparazione della sospensione acquosa con le dosi riportate in Tab.II. Ultimata la preparazione della sospensione vengono aggiunti gli agenti schiumogeni: 1.95 g di Olimpicon A e 0.70 g di W53[14]. La giara con la sospensione, gli agenti schiumogeni e le 6 sfere di zirconia viene posta in agitazione meccanica nel mulino (in Figura 2.4) a 400 rpm per un tempo variabile dai 10 minuti ai 30 minuti, in base al tipo di sospensione.



**Figura 2.4: Mulino planetario a sfere ad alta energia (Pulverisette 6, Fritsch, Germania) usato per effettuare il foaming.**

Quando la sospensione ha incorporato gas a tal punto da occupare tutto il volume della giara è pronta per essere colata in stampi. Gli stampi sono stati realizzati con carta da filtro e hanno altezza 3 cm e base 4 cm x 10 cm (vedi Figura 2.5).



**Figura 2.5: Sospensione a base di HA calcinata ad 800°C in rapporto 73:23:4 prima del foaming, dopo il foaming durante la colatura negli stampi.**

Ho effettuato il foaming diretto con le 6 sospensioni riportate in Tab. I.

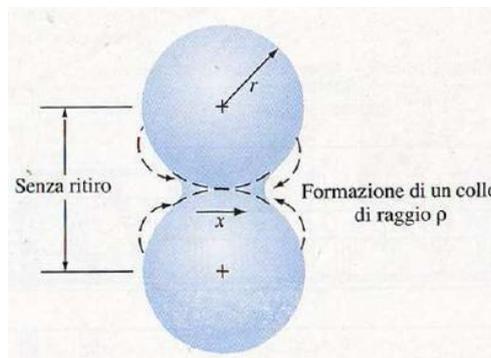


**Figura 2.6:** Campione prima della sinterizzazione, preparato con polvere calcinata a 1000°C in rapporto 73:23:4.

### 2.3.2 SINTERIZZAZIONE

I campioni colati nello stampo sono stati lasciati asciugare a temperatura ambiente. Una volta asciutti sono stati sinterizzati utilizzando un forno convenzionale. Il sintering è un processo termico durante il quale i campioni subiscono dei cicli ad alte temperature che non devono superare la temperatura di fusione. Come per gli altri processi ceramici, lo stadio del sintering può essere ottimizzato per controllare la densità e la porosità finale del pezzo.

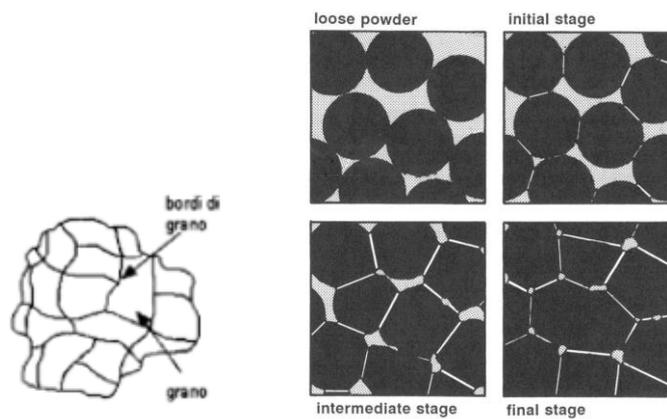
In un primo stadio di sintering, a temperature non superiori ai 700-800°C, avviene il fenomeno della diffusione superficiale, che causa una riduzione dell'area superficiale senza aumento della densità del materiale dovuto al fatto che i grani si saldano attraverso la formazione di forti legami chimici e si formano dei “colli” tra i grani (Figura 2.7) [22].



**Figura 2.7:** Formazione di “colli” tra i grani.

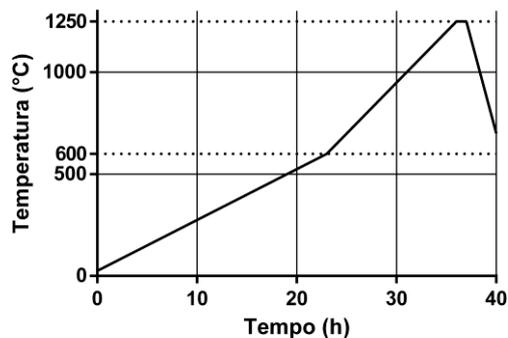
Successivamente, a temperature più elevate, l'energia termica fornita al campione consente l'attivazione del fenomeno di diffusione volumetrica o del bordo del grano. Qui ha inizio la densificazione, i colli iniziali crescono formando i bordi del grano, lo spazio tra un grano e l'altro diminuisce e il campione si riduce in volume. Allo stesso tempo, anche l'energia interfacciale totale dei bordi del grano diminuisce con la crescita del grano [22]. In uno stadio finale, è possibile ridurre idealmente tutti gli spazi tra i grani e produrre una ceramica estremamente densa.

In Figura 2.8 è riportata una rappresentazione di queste fasi.



**Figura 2.8: Rappresentazione delle fasi che avvengono nel processo disintering.**

Il ciclo termico di sintering che utilizzato per trattare i campioni è descritto dal grafico in Figura 2.9:



**Figura 2.9: La temperatura viene portata a 600°C in 23 h. Cresce sino a 1250°C in 13 h e permane a questa temperatura per 1 h. Il raffreddamento avviene spontaneamente.**



# CAPITOLO 3

---

## 3. TECNICHE ANALITICHE

### 3.1 ANALISI SULLE POLVERI

#### 3.1.1 DIFFRATTOMETRIA A RAGGI X (XRD)

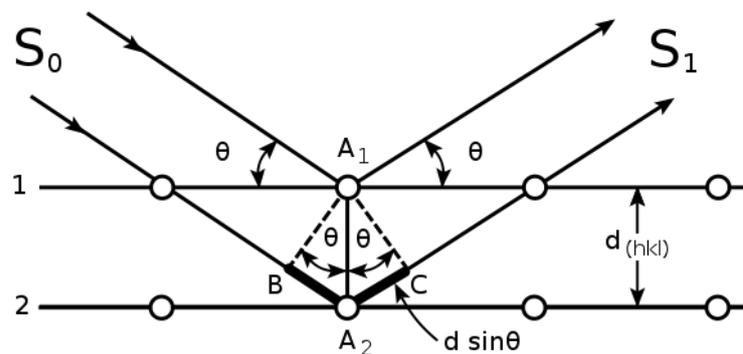
La diffrazione a raggi X (XRD o WAXS) è una tecnica analitica non distruttiva che permette la misura della distanza tra i piani reticolari di un materiale, parametro peculiare di ogni sostanza cristallina. Studiando gli effetti dell'interazione tra un fascio di raggi X e la materia tale tecnica fornisce informazioni sulla struttura cristallina di un materiale (grado di cristallinità, dimensione e orientazione dei cristalli, parametri della cella elementare, possibili polimorfismi e isomorfismi). I raggi X sono radiazioni elettromagnetiche estremamente penetranti che possiedono lunghezze d'onda, comprese tra circa 10 nm e 0,01 nm. Nei primi anni del '900 venne scoperto il fenomeno della diffrazione dei raggi X che aveva luogo durante l'interazione tra l'energia della radiazione incidente e la materia cristallina. Si osservò come lo spettro di diffrazione risultante contenesse informazioni fondamentali sulla distribuzione degli atomi nella complessa impalcatura tridimensionale, ordinata e periodica dei minerali, in quanto la lunghezza d'onda (circa 1 Å) dei raggi X è comparabile alle distanze interplanari. Quando un fascio di raggi X, attraversa la materia l'energia si modifica principalmente a seguito di due fenomeni diversi:

- *Assorbimento*: l'energia del fascio viene ceduta, tutta o in parte, al sistema materiale, aumentandone la temperatura o determinandone la transizione ad uno stato eccitato. L'atomo eccitato emette elettroni secondari per effetto fotoelettrico.
- *Diffusione (Scattering)*: la radiazione viene diffusa dalla materia e le onde elettromagnetiche ad essa associate cambiano direzione di propagazione. Se la diffusione è di tipo elastico, tale fenomeno non è accompagnato da perdita di energia. Se è di tipo anelastico si perde energia con conseguente aumento della lunghezza d'onda prodotta.

L'analisi viene condotta con l'ausilio di un diffrattometro, che emette una radiazione X monocromatica indirizzata verso il reticolo atomico della sostanza, dove si diffonde in tutte le direzioni grazie al contributo degli elettroni. Il fascio di raggi X viene prodotto all'interno di un tubo radiogeno facendo collidere elettroni ad elevata energia, generati da un catodo per effetto termoionico, su un anticatodo metallico in Tungsteno i cui atomi così eccitati emetteranno in fase di rilassamento un fascio di fotoni X. La tecnica della diffrazione di raggi X si basa sullo scattering elastico coerente: il fenomeno della diffrazione nasce infatti dalla somma coerente di tutte le onde elettromagnetiche diffuse dagli atomi che si trovano lungo una stessa famiglia di piani reticolari. Ciò si verifica solo quando la differenza di cammino ottico della radiazione tra piani cristallini adiacenti è pari ad un numero intero di lunghezze d'onda. Tale condizione è stabilita e descritta dalla *Legge di Bragg* (Figura 3.1):

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

Dove  $d$  è la distanza interplanare,  $\lambda$  la lunghezza d'onda della radiazione incidente,  $\theta$  l'angolo compreso tra il raggio incidente e il piano di scattering, ed  $n$  un numero intero positivo. Tale legge descrive l'interazione tra la radiazione incidente ed il cristallo permettendo, sotto le ipotesi di raggi paralleli e in fase, di ricavare la distanza di legame  $d$  imponendo la lunghezza d'onda  $\lambda$  della radiazione utilizzata e misurando l'angolo di incidenza  $\theta$ .



**Figura 3.1: Rappresentazione schematica della legge di Bragg**

Perciò, quando i raggi X sono quindi in concordanza di fase, perché diffratti da famiglie di piani reticolari secondo la *Legge di Bragg*, si genera uno spettro

caratteristico di macchie di diffrazione che sono rivelate da un detector e riportate in un diffrattogramma o spettro di diffrazione. È un diagramma costituito da una serie di picchi aventi diverse intensità e posizioni angolari relative alle varie fasi presenti nel campione indagato. Graficando le intensità dei picchi di diffrazione in funzione della posizione angolare  $2\theta$  si ottiene un pattern caratteristico del campione esaminato. I picchi caratteristici nello spettro di diffrazione X rappresentano quindi una sorta di carta d'identità per le fasi cristalline. Il confronto degli spettri ottenuti con quelli di banche dati permette dunque l'identificazione e il riconoscimento delle fasi incognite che compongono il campione definendo in maniera univoca la specie mineralogica analizzata.

### **MISURA DEI CRISTALLITI**

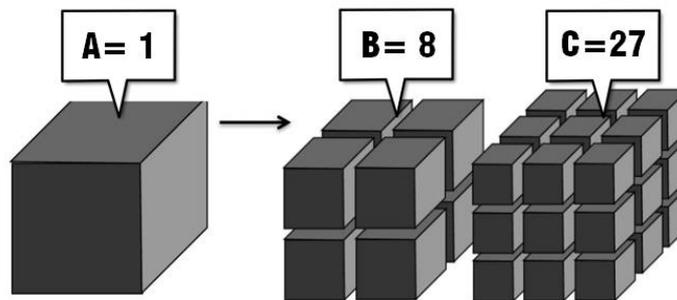
La diffrattometria a raggi X consente anche la misurazione della dimensione dei cristalliti, ovvero i domini di diffrazione coerente che compongono un policristallo reale. La misura dei cristalliti si può ottenere usando la *relazione di Scherrer*:

$$D = \frac{k\lambda}{B\cos\theta}$$

Dove D è il diametro di cristalliti in Å, k è la costante di proporzionalità di Scherrer (~0.9),  $\lambda$  è la lunghezza d'onda in Å (~1.5406),  $\theta$  è l'angolo di Bragg in gradi, B la larghezza del picco a metà altezza (FWHM) in radianti.

### **3.1.2 ANALISI DELLA SUPERFICIE SPECIFICA DELLE POLVERI - TECNICA B.E.T**

In campo ceramico la dimensione, la forma ma soprattutto la superficie specifica delle particelle di un materiale hanno una notevole importanza. È noto che per produrre sospensioni ceramiche ben stabilizzate è necessario usare polveri con una superficie specifica bassa, poiché polveri con area superficiale grande tendono a formare in soluzione agglomerati indesiderati. Se un solido ha una elevata superficie specifica, esiste sottoforma di particelle molto piccole. Per spiegare questo concetto, un banale esempio è riportato in Figura 3.2.



**Figura 3.2:** Un elemento cubico di lato 3 cm ha un'area superficiale di  $9 \text{ cm}^2$  ed una superficie specifica di  $54 \text{ cm}^2$ ; suddiviso in 8 elementi cubici di lato 1,5 cm, ciascuno con area superficiale di  $2,25 \text{ cm}^2$ , acquisisce una superficie specifica pari a  $108 \text{ cm}^2$ ; suddiviso ancora in 27 elementi cubici di lato 1 cm, ciascuno con area superficiale di  $1 \text{ cm}^2$ , avrà una superficie specifica pari a  $162 \text{ cm}^2$ .

La superficie specifica (talvolta definita anche Area superficiale specifica) è l'area superficiale dei granuli di un determinato materiale, per unità di peso, generalmente espressa in metri quadrati/grammo ( $\text{m}^2/\text{g}$ ).

Considerando il caso ideale di una polvere costituita da piccole sfere tutte col medesimo diametro, la superficie specifica ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) corrisponde alla superficie di una singola sfera moltiplicata per il numero  $n$  di particelle per unità di peso.

Purtroppo i materiali formati da particelle perfettamente sferiche o perfettamente cubiche sono un'astrazione. Nella realtà, sono presenti deformazioni, porosità, irregolarità, che rendono impossibile l'uso della geometria classica per il calcolo della superficie imponendo il ricorso a tecniche analitiche appositamente ideate.

La tecnica utilizzata si basa sull'adsorbimento, un processo in cui atomi o molecole di un gas (adsorbato) aderiscono allo strato superficiale di un materiale (adsorbente) e vi aderiscono. Dalla conseguente formazione di uno strato monomolecolare di gas, si potrà risalire alla superficie specifica del materiale.

Esistono due tipologie di adsorbimento, l'adsorbimento fisico e l'adsorbimento chimico, che si differenziano nella natura delle interazioni coinvolte nella formazione dello strato di adsorbato. Nel primo caso l'entità delle interazioni è molto debole in quanto comprende forze di Van der Waals e di attrazione elettrostatica, nel secondo caso sono invece coinvolti veri e propri legami chimici e quindi le interazioni sono più forti.

Per misurare l'area superficiale, si fa uso solo dell'adsorbimento fisico. Infatti le forze deboli sono di tipo reversibile e quindi attuando un processo contrario all'adsorbimento (deadsorbimento) il gas adsorbito si distaccherà dal materiale con facilità.

La teoria di *Brunauer-Emmett-Teller* (B.E.T), proposta nel 1938, ha l'obbiettivo di spiegare l'adsorbimento fisico delle molecole di gas su una superficie solida.

La teoria è fondata su 3 postulati fondamentali:

1. L'adsorbimento è multi-molecolare e ogni singolo strato obbedisce all'*equazione di Langmuir* (si forma un singolo strato di adsorbato e la velocità di adsorbimento del gas è direttamente proporzionale alla quantità di adsorbente);
2. Il calore medio di adsorbimento per gli strati successivi al primo è uguale al calore di condensazione del gas;
3. Il calore medio di adsorbimento del primo strato è diverso da quello degli strati successivi.

L'equazione B.E.T. caratteristica è:

$$\frac{p}{V_{ads}(p^o - p)} = \frac{(C - 1) p}{V_m C p^o} + \frac{1}{V_m C}$$

$V_{ads}$  = volume totale del gas adsorbito sulla superficie dell'adsorbente;

$V_m$  = volume del gas adsorbito per la formazione di uno strato monomolecolare;

$p$  = pressione parziale dell'adsorbato;

$p^o$  = pressione di saturazione dell'adsorbato sull'adsorbente alla temperatura del bagno refrigerante;

$\frac{p}{p^o}$  = pressione relativa;

$C$  = costante che esprime l'energia netta di adsorbimento.

Per un determinato sistema adsorbente/adsorbato i valori di  $V_m$  e di  $C$  sono costanti, quindi l'equazione B.E.T. diviene:

$$\frac{p}{V_{ads}(p^o - p)} = \alpha \frac{p}{p^o} + \beta$$

$$\text{con } \alpha = \frac{(C-1)}{V_m C} \text{ e } \beta = \frac{1}{V_m C}$$

L'equazione è quella di una retta in forma esplicita  $y = \alpha x + \beta$ , con  $\alpha$  e  $\beta$  rispettivamente pendenza e intercetta.

Graficando  $\frac{p}{V_{ads}(p^o - p)}$  in funzione di  $\frac{p}{p^o}$  si ottiene una linea retta nella regione di pressione relativa approssimativamente compresa tra 0.05 e 0.30. Si possono quindi ricavare dal diagramma i valori di  $\alpha$  e  $\beta$ , e quindi di  $V_m$ , calcolabile come  $\frac{1}{(\alpha + \beta)}$ . Noto  $V_m$ , si converte il suo valore da unità di volume a unità di area moltiplicando per il valore dell'area ricoperta da 1 cm<sup>3</sup> di adsorbato in uno strato monomolecolare ( $S_0$ ):  $S = V_m S_0$ .

A questo punto  $S$  è la superficie totale del campione; la superficie specifica corrisponde al rapporto  $\frac{S}{W}$ , con  $W$  il peso del campione.

### **METODO DI ANALISI**

I campioni vengono comunemente preparati riscaldandoli sottovuoto o sotto flusso di gas per rimuovere le impurità. La procedura di analisi inizia immergendo la cella contenente il campione nel bagno refrigerante ad azoto liquido in modo da consentire il processo di adsorbimento. Si provoca così una variazione del flusso di gas del sistema, che raggiunge nuovamente l'equilibrio dopo circa un minuto. A questo punto il sistema inizia a registrare i dati. Rilevati i dati di adsorbimento, si procede al deadsorbimento: il bagno refrigerante è sostituito con un bagno di acqua a temperatura ambiente e l'azoto adsorbito viene così liberato andando ad arricchire di nuovo la miscela di gas in uscita. In condizioni ideali il deadsorbimento è uguale all'adsorbimento, con segno opposto. Nella realtà, se si opera sotto appropriate condizioni, eventuali variazioni sono ridotte a livelli trascurabili.

### 3.1.3 ANALISI GRANULOMETRICA

Un aspetto importante per caratterizzare le polveri ceramiche è quello di determinare le dimensioni delle particelle (granuli) che le costituiscono, la frequenza delle dimensioni e la distribuzione di frequenza. La distribuzione granulometrica delle polveri viene determinata sfruttando la velocità di sedimentazione delle particelle disperse in un mezzo liquido secondo la *legge di Stokes*. La velocità di sedimentazione viene convertita in dimensione essendo note le relazioni tra dimensioni, densità, forma e velocità di caduta.

Una particella in caduta in un fluido viscoso a causa della forza di gravità è in realtà soggetta all'azione di 3 forze:

$F_G$  = la forza di gravità che permette alla particella di sedimentare.

$F_A$  = la spinta idrostatica, che si oppone a quella di gravità e che agisce verso l'alto (principi di Archimede).

$F_D$  = la “forza di resistenza”, che rappresenta la resistenza del fluido al passaggio delle particelle entro il fluido stesso; anche questa agisce verso l'alto ed è caratteristica del fluido.

All'equilibrio la risultante di tali forze è nulla:

$$F_A + F_G + F_D = 0$$

È possibile scrivere l'equazione del moto di una particella in maniera più rigorosa :

$$mg - m^o g - F = m^o \frac{dv}{dt}$$

nella quale  $m$  è la massa delle particelle,  $m^o$  la massa del volume di liquido pari al volume della particella,  $g$  l'accelerazione gravitazionale,  $F$  la “forza di resistenza”,  $v$  la velocità della particella e  $t$  il tempo.

La legge di Stokes è basata sul fatto che quanto più il liquido è viscoso, tanto più è bassa la velocità di una sfera lasciata cadere in tale liquido. Quando la resistenza data dalla viscosità del liquido è esattamente bilanciata dalla spinta gravitazionale, la velocità della sfera nel liquido diviene costante. Questo

fenomeno si verifica più rapidamente se le particelle sono piccole. Di conseguenza,  $\frac{dv}{dt}$  si annulla e la relazione diviene:

$$F = mg - m^{\circ}g$$

Per una particella sferica di diametro D con densità  $\rho$ , che cade in un liquido di densità  $\rho^{\circ}$  si ottiene:

$$F = \frac{\pi}{6}(\rho - \rho^{\circ})gD^3$$

Il moto stabile di una particella sferica in un fluido è determinato da due differenti coefficienti adimensionali: il numero di Reynolds (Re) e un coefficiente di freno (C).

$$Re = Dv \frac{\rho^{\circ}}{\eta} C = \frac{F}{\left(\frac{\pi}{4}D^2\right)\left(\frac{\rho^{\circ}}{2}v^2\right)}$$

Nel caso di flussi laminari, il numero di Re ha valori minori di 1000 e la relazione che lega Re e C è:  $C = \frac{24}{Re}$ . Sostituendovi le equazioni di Re, C e F si ottiene la legge di Stokes:

$$D^2 = \frac{18v\eta}{(\rho - \rho^{\circ})g}$$

L'analisi della sedimentazione si basa proprio su questa formula: calcolando la velocità di sedimentazione v all'equilibrio (definita come la distanza percorsa in un certo periodo di tempo) e conoscendo la densità del granulo, la viscosità e la densità del fluido, è possibile ricavare il diametro della particella. Più la velocità di sedimentazione è elevata, più la particella ha diametro grande e sedimenta prima.

### **METODO DI ANALISI**

Lo strumento utilizzato in questo lavoro di tesi è il SediGraph 5100 Micromeritics (Figura 3.3).



**Figura 3.3: SediGraph 5100 Micromeritics.**

Prima di effettuare l'analisi vengono calcolate tramite legge di Stokes alcune velocità di caduta per vari diametri. Considerando la velocità come rapporto tra lo spazio e il tempo, ad una certa altezza della cella si troveranno, dopo un certo tempo di sedimentazione, solo particelle con raggio uguale o inferiore a quello determinato risolvendo la legge di Stokes.

Inizialmente il dispositivo di analisi viene tarato introducendo nella cella portacampione un liquido noto, in genere Esametafosfato di sodio ("CALGON") allo 0.05% in peso. Dopodiché il materiale da analizzare viene disperso in tale liquido. Il liquido con il materiale viene poi immesso nella camera di miscelazione dell'analizzatore all'interno della quale un agitatore magnetico provvede a mantenere in sospensione le particelle.

La sospensione ottenuta viene quindi trasferita attraverso un sistema di pompe peristaltiche alla cella di analisi. A questo punto l'agitatore viene bloccato e le particelle iniziano a sedimentare sotto l'effetto della gravità. Un fascio di raggi X, generato all'interno dell'analizzatore, attraversa la cella di analisi dove stanno precipitando le particelle e viene rilevato da un detector posto sulla sua linea di azione al di là della cella.

Misurando l'intensità del fascio trasmesso alle diverse altezze della cella si può ricavare la concentrazione delle particelle aventi dimensioni differenti, e quindi diagrammare le variazioni di concentrazione in funzione delle dimensioni dei

grani. L'analisi è eseguita scansionando la cella dal basso verso l'alto determinando prima la frazione più grossolana che infatti sedimenta prima.

Per velocizzare molto il processo, durante l'analisi, la cella portacampione è in movimento; in particolare si muove verso il basso ad una velocità impostata dal dispositivo in accordo con il processo di acquisizione dei dati.

La velocità di caduta delle particelle dipende anche dal loro stato di aggregazione: se le particelle si aggregano tra loro si comportano come una singola particella più grande con velocità di caduta maggiore rispetto a quella che si avrebbe per le singole particelle separate. Per evitare ciò, è opportuno sonicare la sospensione prima dell'analisi.

### **3.1.4 SPETTROSCOPIA INFRAROSSA A TRASFORMATA DI FOURIER IN RIFLETTANZA TOTALE ATTENUATA (FTIR-ATR)**

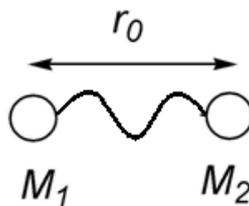
La spettroscopia infrarossa è una tecnica spettroscopica di assorbimento normalmente utilizzata nel campo della chimica analitica e della caratterizzazione dei materiali. Si acquisisce il segnale nel dominio del tempo (o dello spazio) e quindi si ricava lo spettro nel dominio della frequenza tramite una operazione di trasformata di Fourier. La radiazione elettromagnetica infrarossa (*infrared*, IR) ha una lunghezza d'onda compresa tra 700 nm e 1 mm. La maggioranza delle applicazioni analitiche è tuttavia ristretta principalmente alla porzione dello spettro riferita al medio infrarosso con lunghezza d'onda compresa tra i 10 e 50  $\mu\text{m}$ . La radiazione utilizzata può essere caratterizzata, oltre che dalla lunghezza d'onda, anche in termini di frequenza che nella tecnica FTIR viene normalmente espressa come numero d'onda  $\bar{\nu}$  e misurata in  $\text{cm}^{-1}$ . L'infrarosso medio ha numeri d'onda nel range di 4000  $\text{cm}^{-1}$  - 200  $\text{cm}^{-1}$ . Per numeri d'onda si intende il numero di cicli contenuti in 1 cm di onda elettromagnetica e si calcola nel seguente modo:  $\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{f}{v}$  dove  $\lambda$  è la lunghezza d'onda,  $v$  la velocità e  $f$  la frequenza. Infatti, in un tipico spettro infrarosso, in ascissa troviamo il numero d'onda del fotone incidente, e in ordinata la trasmittanza che è una grandezza fisica che misura la quantità di potenza termica scambiata da un materiale o un corpo per unità di superficie e unità di differenza di temperatura.

L'utilizzo più importante e caratteristico dell'analisi FTIR consiste nell'identificazione di composti: le molecole si trovano inizialmente nello stato vibrazionale a più bassa energia (stato fondamentale) e assorbendo radiazione IR passano al primo stato eccitato; l'insieme delle vibrazioni indotte dalle radiazioni infrarosse è caratteristico di ogni singola molecola che così risultano distinguibili tra loro.

La teoria delle vibrazioni ammette che un legame chimico tra due atomi possa essere paragonato ad un modello meccanico costituito da due masse puntiformi collegate tramite una molla, come rappresentato in Figura 3.4. Se la massa viene spostata ad una distanza  $r$  dalla sua posizione di equilibrio  $r_0$  in seguito all'applicazione di una forza lungo l'asse di legame, la forza di richiamo  $F$  risulta proporzionale allo spostamento ed è descrivibile attraverso la *legge di Hooke*:

$$F = -k(r - r_0)$$

dove  $k$  è la costante di forza del legame che dipende dalla rigidità della molla e il segno negativo indica che la forza è di richiamo, cioè che agisce nella direzione opposta allo spostamento.



**Figura 3.4: Modello che rappresenta un legame chimico tra due atomi.**

Secondo la fisica classica, la frequenza di vibrazione in tale sistema è data dalla

formula:  $f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{M_R}}$

dove  $M_R$  è detta massa ridotta ed è definita come  $M_R = \frac{M_1 \cdot M_2}{M_1 + M_2}$ .

Questa frequenza  $f$  corrisponde a quella della radiazione IR assorbita dalla molecola. Più è grande la costante di forza del legame  $k$ , cioè quanto più il

legame è forte, più sarà grande la frequenza assorbita e il picco corrispondente a tale gruppo funzionale si troverà nello spettro a numeri d'onda elevati. Inoltre, la frequenza di assorbimento è tanto maggiore quanto minore è la massa degli atomi coinvolti nella vibrazione.

Le vibrazioni possono essere suddivise in due categorie fondamentali: stiramento (*stretching*) e deformazione (*bending*):

- Una vibrazione di stiramento (*stretching*) comporta il continuo cambiamento della distanza interatomica lungo l'asse di legame tra i due atomi e può essere di tipo simmetrico oppure asimmetrico.
- Le vibrazioni di deformazione (*bending*) sono invece caratterizzate da una variazione dell'angolo tra due legami e sono di quattro tipologie differenti: a forbice nel piano (*scissoring*), oscillazione nel piano (*rocking*), ondeggiare fuori dal piano (*wagging*), torsione fuori dal piano (*twisting*).

In una molecola vi sono, nella quasi totalità dei casi, più legami ed essi non vibrano in maniera indipendente, ma coordinata, e le vibrazioni riguardano l'intera molecola. In generale per una molecola di N atomi sono possibili  $3N-6$  vibrazioni ( $3N-5$  per molecole lineari), quindi anche una molecola semplice ha moltissime vibrazioni possibili. Il numero teorico delle vibrazioni fondamentali non sarà quasi mai osservato, in quanto gli *overtone*s (multipli di una data frequenza) e le combinazioni di toni (somma di due vibrazioni) aumentano il numero delle bande, mentre altri fenomeni come la debole intensità e la forte vicinanza lo riducono.

### **LO SPETTRO FTIR**

Lo spettro è rappresentato come trasmittanza percentuale in funzione di numero d'onde, ed i picchi (bande) sono quindi rivolti verso il basso. Ogni banda sarà caratterizzata dalla posizione, che è il numero d'onda in corrispondenza del minimo della trasmittanza; da intensità che varia in base a dove si trova il minimo della banda, o più in alto o più in basso; dalla forma, cioè se una banda è più larga o più stretta. In Figura 3.5 sono indicate le zone dello spettro in cui

assorbono i gruppi funzionali più comuni delle molecole organiche. Ogni gruppo funzionale corrisponde ad uno specifico numero d'onda.

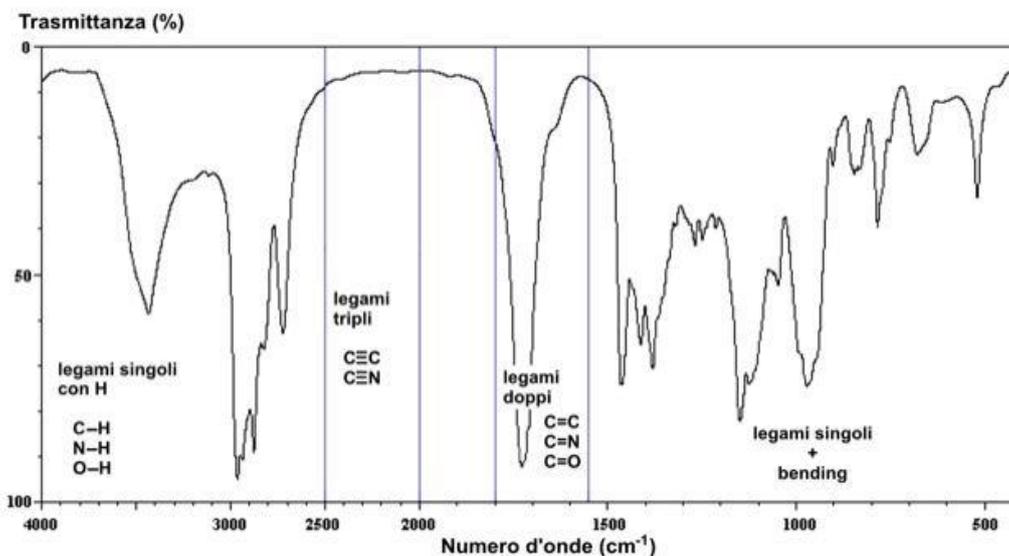


Figura 3.5: Esempio di spettro FTIR.

L'identificazione di un composto mediante spettro FTIR avviene in due passaggi successivi:

1. Per prima cosa si individuano i gruppi funzionali che dovrebbero essere presenti esaminando la zona delle “frequenze di gruppo”, che è compresa tra 3600 e 1200  $cm^{-1}$ . Include bande dovute sia a stiramenti che a deformazioni di gruppi funzionali (es. legami N-H, O-H, C-H, C=C, C=O, ecc).

2. Successivamente, si confronta lo spettro della sostanza sconosciuta con quello di un composto puro che contenga tutti i gruppi funzionali precedentemente trovati. A questo punto si osserva la zona delle “impronte digitali”, compresa tra 1200 e 600  $cm^{-1}$ . È molto utile al riconoscimento della sostanza in quanto piccole variazioni nella sua struttura, originate da vibrazioni dell'intero scheletro molecolare, provocano una apprezzabile variazione della forma e della distribuzione delle bande di assorbimento di questa zona consentendo così l'identificazione della molecola.

Le bande FTIR hanno intensità estremamente variabile. Alcune vibrazioni danno vita a bande molto intense, altre a bande deboli, ed altre a nessun assorbimento.

L'assorbimento di una radiazione IR infatti è limitato a molecole che presentano piccole differenze di energia tra diversi stati vibrazionali e rotazionali che necessitano dunque di un'energia bassa per fare avvenire le transizioni elettroniche. Inoltre una molecola, per assorbire una radiazione IR, deve subire un drastico cambiamento del momento dipolare. Di conseguenza, l'intensità di un assorbimento IR dipende dalla variazione del momento dipolare provocata dalla vibrazione: ad una grande variazione del momento dipolare corrisponde una banda intensa, cosa che può accadere con legami polarizzati.

In tabella V vengono riportati i picchi di assorbimento relativi all'Idrossiapatite.

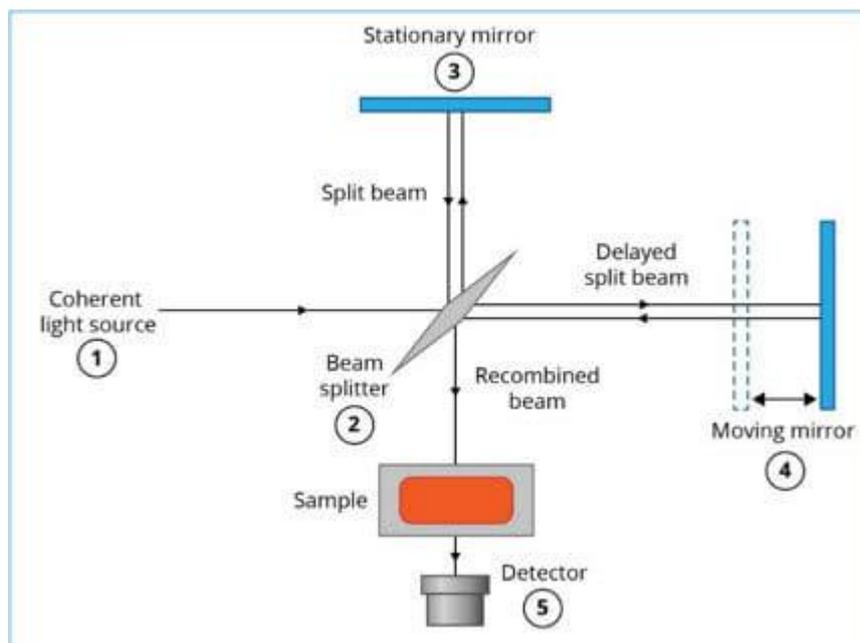
Numero d'onda ( $cm^{-1}$ )	Gruppo caratteristico
3570	H-O str.
3450	H-O str.
2350	C-O str.
1630	H <sub>2</sub> O
1540-1460	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> str. Sito A
1460-1430	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> str. Sito B
1050	P-O str.
960	P-O str.
880	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> bend. Sito A
873	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> bend. Sito B
600	H-O bend.
570	O-P-O bend. (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )
470	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>

**Tabella V: Picchi di assorbimento relativi all'HA. Str. indica una vibrazione di stiramento; bend. una vibrazione di deformazione.**

### **METODO DI ANALISI**

La spettroscopia a infrarosso a trasformata di Fourier, viene realizzata utilizzando un interferometro, che permette la scansione di tutte le frequenze presenti nella radiazione IR generata dalla sorgente. La scansione è possibile grazie a uno specchio mobile che spostandosi introduce una differenza di cammino ottico, che origina una interferenza costruttiva o distruttiva con il raggio riflesso da uno specchio fisso. La Figura 3.6 mostra uno schema della

struttura di uno strumento per FTIR. La sorgente luminosa IR invia un fascio luminoso sullo specchio (*Beamsplitter*). Tale specchio ha la caratteristica di essere semitrasparente e riflettente, per cui una parte del fascio finirà su uno specchio fisso (*Stationarymirror*) e l'altra parte su uno specchio mobile (*Movingmirror*). I due fasci riflessi dagli specchi si dirigono poi sul Beamsplitter che procede all'invio del fascio luminoso ricongiunto sul campione. Se lo specchio fisso si trova alla stessa distanza di quello mobile dal Beamsplitter, il raggio scaturente dal ricongiungimento sarà approssimativamente identico a quello emesso dalla sorgente. Se invece lo specchio mobile si sposta, ad esempio si allontana, l'onda riflessa su di esso percorrerà un cammino ottico maggiore rispetto a quella riflessa dallo specchio fisso, di conseguenza quando si ricongiungono possono non essere più in fase e dare così luogo al fenomeno dell'interferenza. Se la differenza tra i cammini ottici è un multiplo pari della mezza lunghezza d'onda il fenomeno sarà costruttivo mentre se è multiplo dispari sarà distruttivo. Il fascio luminoso derivante dall'interferenza attraversa quindi il campione e va al detector. Il segnale raccolto ed elaborato è costituito dall'intensità della luce in arrivo in funzione dello spostamento dello specchio mobile. Il grafico ottenuto si chiama interferogramma ed è la rappresentazione dell'intensità nel dominio del tempo. Applicando la trasformata di Fourier si ottiene lo spettro infrarosso, cioè la rappresentazione dell'intensità nel dominio della frequenza.



**Figura 3.6:** Schema del funzionamento della spettroscopia FTIR.

### ***LA SPETTROSCOPIA FTIR-ATR***

Oltre alla classica spettroscopia infrarossa a trasmissione, esiste una tecnica che si basa sul principio della riflettanza attenuata totale (ATR). Questa tecnica permette di esaminare campioni solidi e liquidi senza complicate tecniche di preparazione. In Figura 3.7 ne è schematizzato il funzionamento. Con questo sistema la radiazione infrarossa passa attraverso un particolare cristallo, trasparente all'IR, che permette all'onda elettromagnetica di essere riflessa al suo interno molte volte. La superficie del campione viene collocata a contatto con la superficie superiore del cristallo, dopodiché la radiazione IR entra nel cristallo, si riflette su di esso e quando l'angolo di incidenza è maggiore dell'angolo critico avviene il fenomeno noto come riflessione totale. Questa riflessione forma l'onda evanescente che si estende nel campione. Il numero di riflessione può essere variato variando l'angolo di incidenza. Il fascio è in seguito raccolto dal rivelatore all'uscita del cristallo dando uno spettro FTIR in riflettanza totale attenuata (ATR).

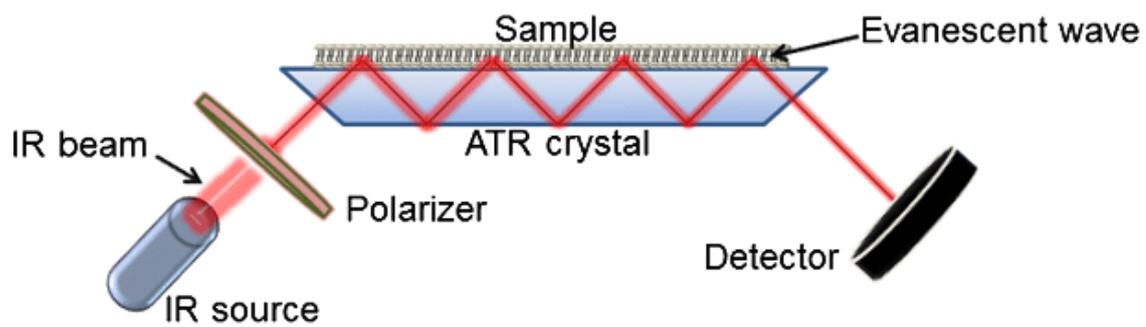


Figura 3.7: Schema del funzionamento della spettroscopia FTIR-ATR.

## 3.2 ANALISI SULLA SOSPENSIONE

### 3.2.1 POTENZIALE $\zeta$ E pH

Il potenziale zeta ( $\zeta$ ) è una proprietà fisica esibita da qualsiasi particella in sospensione. Una particella dispersa in un liquido solitamente presenta cariche elettrostatiche superficiali che danno luogo ad un campo elettrico. Esso causa un aumento della concentrazione di ioni di carica opposta a quella della particella in prossimità della sua superficie. In particolare, all'interfaccia tra particella-liquido si forma un doppio strato elettrico (Figura 3.8): uno interno (strato stazionario, o di Stern), con gli ioni fortemente legati alla particella carica, ed uno esterno (strato diffuso, o di Gouy), dove le interazioni sono più deboli. Il piano più vicino alla superficie che può essere sottoposto a moto fluido, cioè dove avviene il movimento relativo della superficie solida e del liquido, è il piano di taglio o *slipping plane* contenuto nello strato diffuso. Il potenziale  $\zeta$  è definito come la differenza di potenziale tra il piano di taglio e la regione elettroneutrale della soluzione.

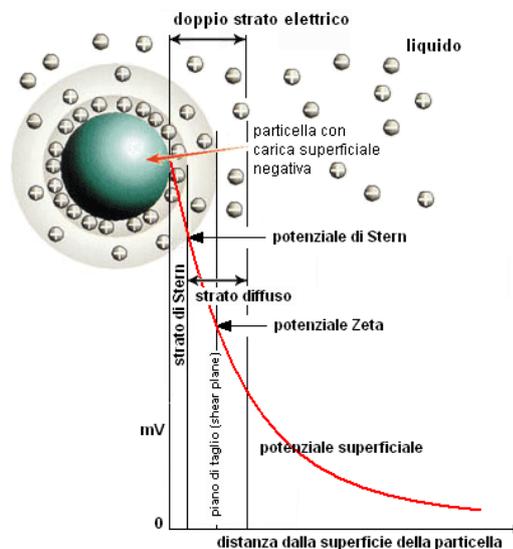


Figura 3.8: Strati elettronici di una particella in soluzione acquosa.

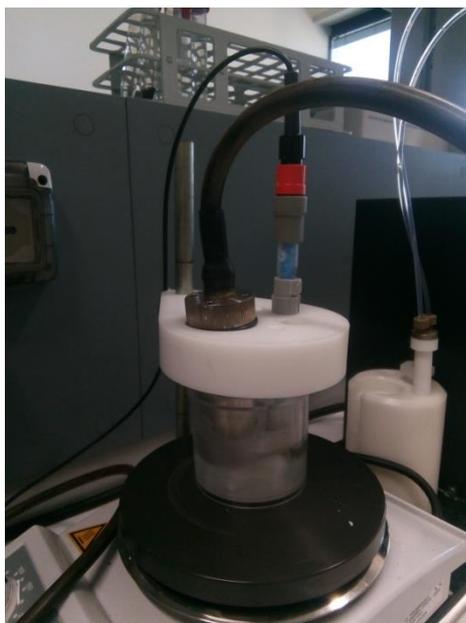
Il valore del potenziale  $\zeta$  è correlato alla natura e alla struttura del doppio strato elettronico. Esso fornisce una misura della repulsione/attrazione elettrostatica tra le particelle: se tutte le particelle in sospensione hanno, in valore assoluto, un alto valore del potenziale  $\zeta$  esse tendono a respingersi stabilizzando il sistema

colloidale, prevenendo l'aggregazione di particelle disperse e mantenendo la dispersione uniforme e libera di scorrere. Le particelle disperse in soluzione esercitano sempre fra loro un'attrazione dovuta alle forze di Van der Waals e sono stabili solo se si respingono con una forza repulsiva maggiore di quella di Van der Waals. Quando invece il potenziale è basso in valore assoluto, le forze attrattive prevalgono sulle repulsioni e quindi è più semplice che possano avere luogo processi quali la coagulazione e la flocculazione, rendendo la sospensione instabile. Il potenziale  $\zeta$  descrive così i fenomeni come dispersione, aggregazione o flocculazione di particelle nei sistemi dispersi e nelle sospensioni.

Il potenziale  $\zeta$  dipende oltre che dal doppio strato anche dalla densità della carica superficiale. La densità della carica superficiale, a sua volta, è in funzione dalla concentrazione di ioni che possono interagire con essa. In molti sistemi, è lo ione  $H^+$  che determina il potenziale e così il potenziale  $\zeta$  dipende dal pH. Il pH per cui il potenziale  $\zeta$  è nullo definisce il punto isoelettrico della sospensione e normalmente è il punto in cui il sistema è meno stabile. Perciò, è importante misurare anche il pH del sistema. Il pH è una scala di misura che esprime l'acidità o la basicità di una soluzione acquosa in base alla concentrazione molare dei suoi ioni  $H^+$ . Esso è definito come  $pH = -\log_{10}[H^+]$ . Comunemente la scala del pH varia tra 0 e 14: per pH pari a 7 la soluzione è neutra, per valori inferiori di 7 è acida e per valori superiori a 7 è basica.

### **METODO DI ANALISI**

Gli strumenti per la misura del potenziale  $\zeta$  si basano sul calcolo sperimentale della mobilità elettroforetica o fanno ricorso a fenomeni elettroacustici come nel caso dello strumento utilizzato per questo lavoro di tesi, il DT-310, Dispersion Technology, visibile in Figura 3.9. In questa tecnica, un impulso ad ultrasuoni viene direttamente accoppiato alla sospensione da analizzare: le particelle nel colloide iniziano a vibrare e continuano a muoversi per inerzia spostandosi relativamente allo strato diffuso. Questo effetto dà vita ad un dipolo oscillante e viene generata una corrente elettrica alterata (*Colloidal vibration current*, CVI) dalla cui misura, mediante modelli matematici, si ottiene il potenziale  $\zeta$ . Lo strumento è corredato da una sonda per la misura del pH.



**Figura 3.9:** Le sonde del DT-310 per la misura del potenziale  $\zeta$  e per la misura del pH immerse nel campione

Il vantaggio principale del metodo elettroacustico è la possibilità di analizzare il potenziale  $\zeta$  in sospensioni molto concentrate (fino a 50 vol. %) e opache, per le quali non possono essere utilizzate le convenzionali tecniche ottiche, e non è necessaria una diluizione, che normalmente porta a una modifica del potenziale  $\zeta$ .

### **3.2.2 ANALISI REOLOGICHE**

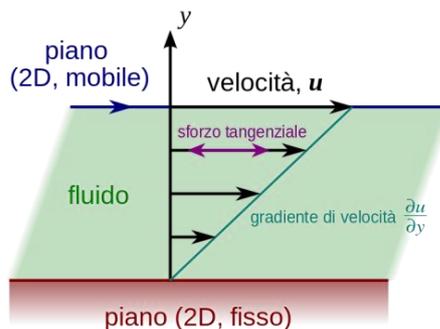
La reologia studia la risposta di un materiale soggetto a sforzi e deformazioni. Il suo campo di applicazione spazia dalla geologia allo studio dei polimeri, dalla bioingegneria alla cosmetica e alla caratterizzazione dei materiali; riguarda, quindi, tutti i processi in cui fluidi e solidi possono o devono “fluire”, per qualsiasi motivo.

#### ***VISCOSITÀ***

La viscosità è un comportamento di tipo liquido ed è definita come la resistenza di un materiale alla deformazione di scorrimento. È in funzione della velocità di deformazione (*Shear rate*), dello stress di taglio (*Shear stress*) e dipende dal tempo e dalla temperatura. Si può anche esprimere come la pendenza della curva *shear stress / shearstrain*. La viscosità nei fluidi newtoniani è indipendente dalla

deformazione di taglio e dallo sforzo di taglio impressi al materiale e dipende solo dalla temperatura. Al contrario, ciò non accade coi fluidi non Newtoniani, dove la viscosità può aumentare o diminuire in base allo sforzo di taglio o in funzione del tempo. In particolare un fluido non newtoniano è detto reopettico se mostra un aumento di viscosità nel tempo quando viene applicata uno sforzo di taglio. È invece chiamato tissotropico se la viscosità cala nel tempo a seguito di uno sforzo di taglio applicato.

La viscosità dinamica di un fluido è una misura della sua resistenza “allo scorrere” quando è applicato uno sforzo tangenziale. La causa di tale resistenza è dovuta agli strati adiacenti di fluido che si muovono con velocità diversa. La situazione ideale è quella di un fluido omogeneo in moto laminare tra due superfici piane orizzontali eguali, una fissa e l'altra mobile (Figura 3.10).



**Figura 3.10: Fluido omogeneo in moto laminare.**

Se la velocità del piano mobile è piccola e le particelle di fluido si muovono in direzione parallela al piano mobile con una velocità che varia linearmente da zero sul piano fisso a  $u$  sul piano mobile, allora la viscosità dinamica è semplicemente data dalla legge di Newton:  $\mu = \frac{F \cdot d}{S \cdot u} = \sigma \cdot \frac{d}{u}$

dove:

$F$  = forza che viene applicata al piano mobile

$d$  = distanza tra i due piani

$u$  = velocità costante del piano mobile

$S$  = superficie di ogni piano

$\sigma$  = sforzo di taglio (shear stress)

Nel caso più generale la velocità del fluido non è una funzione che varia linearmente con la distanza dal piano fisso, in questo caso la relazione tra sforzo di taglio e viscosità diventa:  $\mu = \sigma \cdot \frac{\delta y}{\delta u} = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}}$

dove:

$y$  = distanza dal piano fisso dello strato di fluido generico

$u(y)$  = velocità locale del fluido

$\dot{\gamma}$  = velocità di deformazione (shear rate)

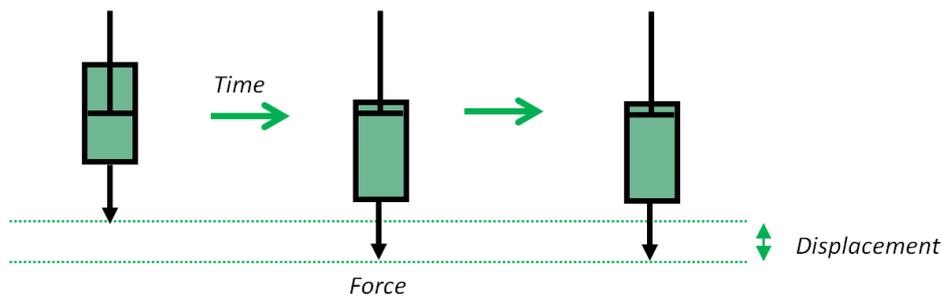
Un altro tipo di viscosità è quella cinematica, definita come il rapporto tra la viscosità dinamica di un fluido e la sua densità. Spesso viene anche chiamata diffusività cinematica. Essa fornisce una misura della resistenza “allo scorrere” di un fluido sotto l'influenza della gravità.

Facendo uso del reometro, è possibile misurare la viscosità e analizzare il suo comportamento:

- Sollecitando il materiale con una velocità di deformazione costante o uno sforzo di taglio costante nel tempo la viscosità sarà il valore a regime.
- Sollecitando il materiale con una rampa continua di velocità di deformazione o di sforzo di taglio nel tempo si esplora il comportamento della viscosità a valori diversi, crescenti, di sforzo o deformazione in ingresso.
- Sollecitando il materiale con gradini di velocità di deformazione di taglio o di stress di taglio crescenti in scala logaritmica, ad ogni step, la viscosità è misurata solo quando si raggiunge uno stato stazionario di velocità di deformazione o stress nel tempo. Questo consente una misura della viscosità più precisa rispetto agli altri metodi.

- Sollecitando il materiale con uno sforzo di taglio o con velocità di deformazione costanti all'aumentare della temperatura. Questo consente di valutare la viscosità al variare della temperatura.

Un materiale viscoso può essere modellato tramite uno smorzatore viscoso che obbedisce alla legge di Newton (Figura 3.11). Uno smorzatore viscoso è un dispositivo meccanico costituito da uno stantuffo che si muove attraverso un fluido Newtoniano viscoso. Quando viene applicato uno stress, lo stantuffo inizia immediatamente a spostarsi (deformandosi) e continua a spostarsi a una velocità di deformazione costante fino a che non viene rimosso lo stress. L'energia richiesta per lo spostamento (la deformazione) viene dissipata all'interno del fluido (solitamente sotto forma di calore) e la deformazione è permanente.



**Figura 3.11: Materiale viscoso modellato come uno smorzatore viscoso.**

### ***ELASTICITÀ***

L'elasticità è un comportamento di tipo solido ed è la proprietà dei corpi di deformarsi sotto l'azione di forze esterne e di riprendere, in tutto o in parte, la forma al termine della deformazione. Il modello matematico più semplice per la rappresentazione del comportamento elastico è quello lineare della legge di Hooke, che nel caso di stato di sforzo monoassiale, tipico delle prove di trazione, è  $\sigma = \varepsilon E$ .

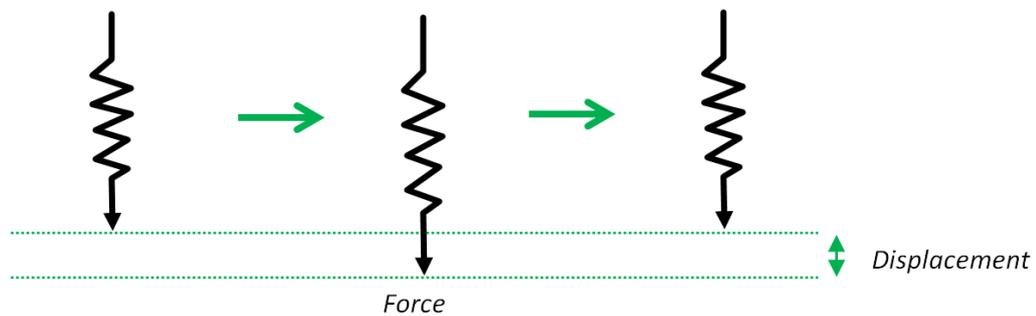
Dove:

$\sigma = \frac{F}{A}$  è lo sforzo agente nel provino con  $F$  applicata alle sue estremità e  $A$  superficie della sezione trasversale iniziale;

$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0}$  la deformazione del provino ovvero il suo allungamento relativo, con  $\Delta L$  allungamento assoluto del provino, ossia la differenza fra la lunghezza finale  $L$  e quella iniziale;  $E$  è il modulo di Young (o elastico), che è la costante di proporzionalità fra gli sforzi e le deformazioni in campo elastico.

La sollecitazione massima che garantisce il comportamento elastico del materiale è detta limite di elasticità. Nel caso venga superata, se il materiale è duttile il limite elastico è la tensione di snervamento, mentre nel caso di materiali fragili, che sono privi del campo plastico, il limite elastico comporta la rottura del materiale.

I fluidi strutturati come le sospensioni hanno uno stato energetico minimo (di equilibrio) associato alla loro microstruttura "a riposo". Questo stato può riguardare catene intrecciate in una soluzione polimerica o particelle disposte casualmente in una sospensione. L'applicazione di una forza o di una deformazione a un fluido strutturato sposta l'equilibrio lontano da questo stato di energia minima, generando una forza elastica che tenta di ripristinare la microstruttura al suo stato iniziale. Questo comportamento è analogo a quello di una molla allungata che cerca di ritornare al suo stato a riposo (Figura 3.12).



**Figura 3.12: Modello per un materiale elastico.**

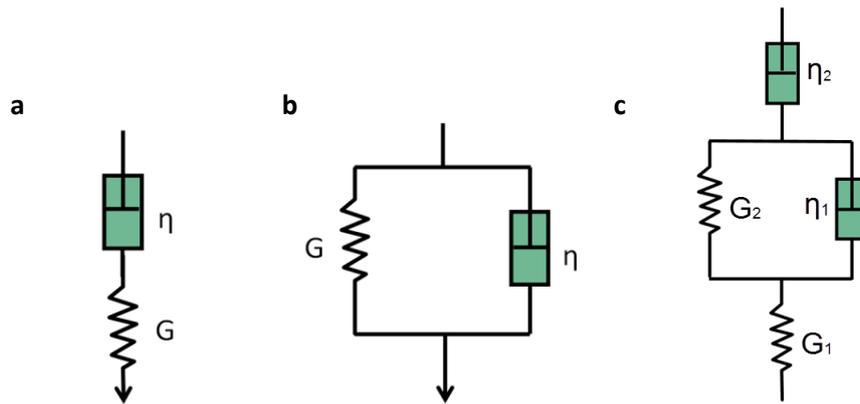
### **VISCOELASTICITÀ**

La viscoelasticità è una proprietà di materiali che mostrano sia comportamento viscoso, sia elastico.

I materiali viscoelastici si oppongono sia alle sollecitazioni tangenziali sia alle sollecitazioni normali, generando quindi al loro interno sia sforzi tangenziali sia sforzi normali. La viscosità di un materiale viscoelastico è costituita da due contributi:

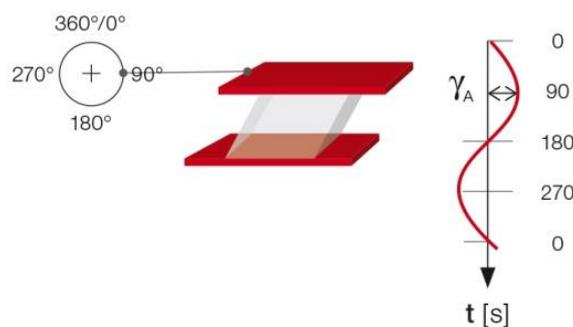
- la viscosità propriamente detta (*shear viscosity*), che è il rapporto tra gli sforzi tangenziali e la velocità di deformazione;
- la viscosità elongazionale (*extensional viscosity* o *elongational viscosity*), che è il rapporto tra gli sforzi normali e la velocità di deformazione.

Per descrivere e modellare il comportamento viscoelastico reale è possibile combinare molle e smorzatori. La rappresentazione più semplice di un liquido viscoelastico è una molla e uno smorzatore collegati in serie e viene chiamato modello di Maxwell (Figura 3.13 a). Un solido viscoelastico può essere rappresentato in maniera simile dal modello Kelvin-Voigt, che utilizza la stessa combinazione di elementi ma collegati in parallelo (Figura 3.13 b). Tuttavia, il modello che meglio descrive il comportamento viscoelastico dei sistemi reali in risposta a uno stress è il modello Burgers, che è di fatto un modello ottenuto collegando in serie il modello di Maxwell e il modello di Kelvin-Voigt (Figura 3.13 c).



**Figura 3.13: Modelli per la viscosità di un materiale. a) Modello di Maxwell. b) Modello di Kelvin-Voigt. c) Modello di Burger.**

La viscoelasticità viene studiata con prove dinamiche in regime sinusoidale. La procedura sperimentale prevede l'applicazione di una deformazione tangenziale oscillatoria, a frequenza ed ampiezza definite, per misurare lo sforzo di taglio, o viceversa. Il materiale viene inserito tra due piastre, quella superiore si muove in maniera oscillatoria avanti e indietro mentre il piatto inferiore rimane fermo. Quando la ruota motrice fa muovere la piastra superiore, la deformazione rispetto al tempo determina una curva sinusoidale con l'ampiezza della deformazione (Fig. 3.14).



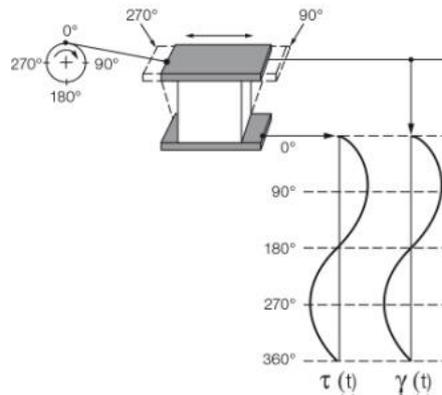
**Figura 3.14: Curva con l'ampiezza della deformazione, a seguito di uno sforzo applicato al materiale.**

Inoltre viene misurata la forza che agisce sulla piastra fissa inferiore mantenendola in posizione. Il segnale viene valutato reologicamente come sforzo

di taglio. Il diagramma risultante nel tempo è una curva sinusoidale con l'ampiezza dello sforzo di taglio.

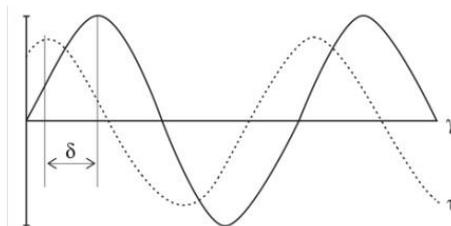
A seconda della natura del materiale, possono verificarsi i seguenti casi:

- I materiali puramente elastici presentano sforzo e deformazione in fase, per cui la risposta al cambiamento di uno di questi parametri influenza in maniera immediata l'altro parametro (Figura 3.15).



**Figura 3.15: Curve sforzo-deformazione in fase.**

- Nei materiali puramente viscosi, la deformazione è ritardata rispetto allo sforzo di  $90^\circ$ .
- I materiali viscoelastici mostrano un comportamento intermedio tra il comportamento puramente elastico e quello puramente viscoso, mostrando un valore del ritardo della deformazione (angolo di fase  $\delta$ ) rispetto allo sforzo compreso tra  $0^\circ$  e  $90^\circ$  (Figura 3.16). Per  $\delta < 45^\circ$  si ha un comportamento elastico, per  $\delta > 45^\circ$ , viscoso.



**Figura 3.16: Curve sforzo-deformazione sfasate.**

Un parametro importante per caratterizzare i materiali viscoelastici è il modulo dinamico complesso  $G^*$  che può essere impiegato per rappresentare le relazioni tra lo sforzo e la deformazione in una prova dinamica:  $G^* = \frac{\sigma}{\gamma} = G' + iG''$

Dove:

$\sigma$  = ampiezza dello stress di taglio (Pa)

$\gamma$  = ampiezza della deformazione di taglio (% o adimensionale)

$G'$  = modulo elastico o *storage modulus*  $G' = \frac{\sigma}{\epsilon} \cos\delta$ . Rappresenta la parte elastica del comportamento viscoelastico, esprime la capacità del materiale di conservare l'energia.

$G''$  = modulo viscoso o *loss modulus*  $G'' = \frac{\sigma}{\epsilon} \sin\delta$ . Rappresenta la parte viscosa del comportamento viscoelastico, esprime la capacità del materiale di dissipare l'energia.

$\delta$  = angolo di fase

### **SIGNIFICATO DI $G'$ E $G''$**

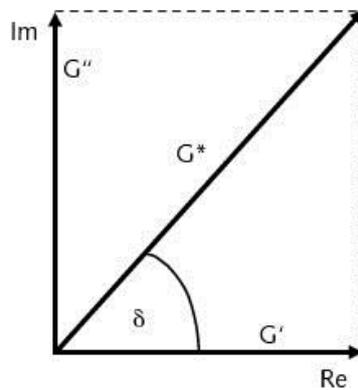
Il comportamento viscoso deriva dall'attrito interno tra i componenti di un fluido che fluisce, quindi tra molecole o particelle. Questo attrito si accompagna sempre allo sviluppo di calore nel campione, ovvero avviene una trasformazione di energia di deformazione in energia termica. Questa parte dell'energia è dissipata nei processi di attrito interno e non è più disponibile. È rappresentata da  $G''$ .

Al contrario, la porzione elastica di energia è immagazzinata nel materiale quando questi viene deformato estendendo e allungando le strutture interne senza sovraccaricarle eccessivamente o senza distruggere il materiale. Quando il materiale non è più sottoposto a sforzi, questa energia immagazzinata inutilizzata agisce come una forza trainante per far ritornare la struttura nella sua forma originale. È rappresentata da  $G'$ .

Nei materiali viscoelastici, mostrando una dipendenza dal tempo,  $G'$  e  $G''$  non sono costanti. Questa dipendenza temporale viene misurata mediante test

dinamici, come ad esempio il test “Frequency Sweep” in cui la dipendenza dal tempo può essere valutata facendo variare la frequenza a tensione costante: le alte frequenze vengono utilizzate per simulare il movimento rapido su scale temporali brevi, mentre le basse frequenze simulano il movimento lento su scale temporali lunghe o a riposo poiché  $\omega \cong \frac{1}{t}$ .

La relazione tra  $G''$ ,  $G'$  e  $\delta$  è rappresentata in Figura 3.17. Il rapporto tra  $G''$  e  $G'$  sarà quindi la tangente di  $\delta$ : tale valore è chiamato fattore di perdita o fattore di smorzamento e fornisce una misura di quanta energia è stata dissipata e immagazzinata.



**Figura 3.17: Relazione tra  $G'$ ,  $G''$  e  $G^*$ .**

### **REGIONE VISCOELASTICA LINEARE**

I test dinamici vengono effettuati solo nella zona cosiddetta di “viscoelasticità lineare” (LVER, *Linear Viscoelastic region*). Nella regione LVE,  $G'$  e  $G''$  mostrano un valore costante, il cosiddetto valore di plateau, e solo in questo range di valori di stress è possibile eseguire i test dinamici senza compromettere la micro-struttura del campione. Infatti, se le sollecitazioni applicate non sono comprese nella zona LVER, possono comparire delle non linearità e le misure non riescono ad essere più facilmente correlate alle proprietà micro-strutturali del materiale. Un esempio degli andamenti di  $G'$  e  $G''$  nella regione LVER sono riportati in Figura 3.18.

La regione LVE viene individuata mediante test preliminari “Stress Sweep”, nel quale il materiale viene sottoposto a sforzo di taglio crescente, a frequenza costante. Viene poi misurato il valore limite della regione LVER, chiamato

anche limite di linearità, che sarà quel valore di sforzo di taglio utilizzato nel test dinamico.

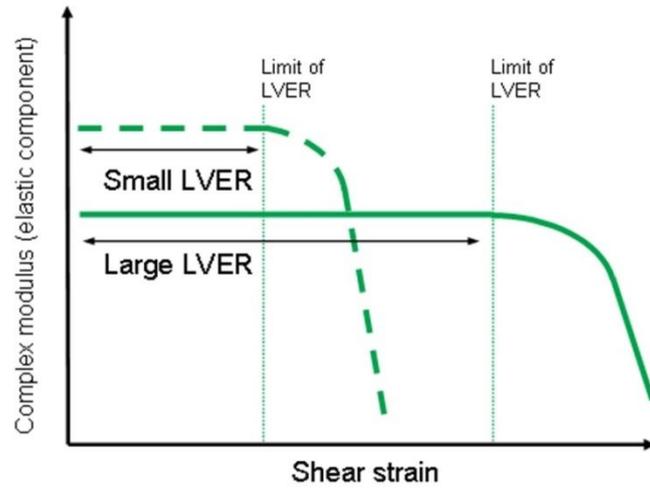


Figura 3.18: Esempio di regione di viscoelasticità lineare.

### ***METODO DI ANALISI***

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato un reometro rotazionale Bohlin C-VOR (Fig. 3.19).

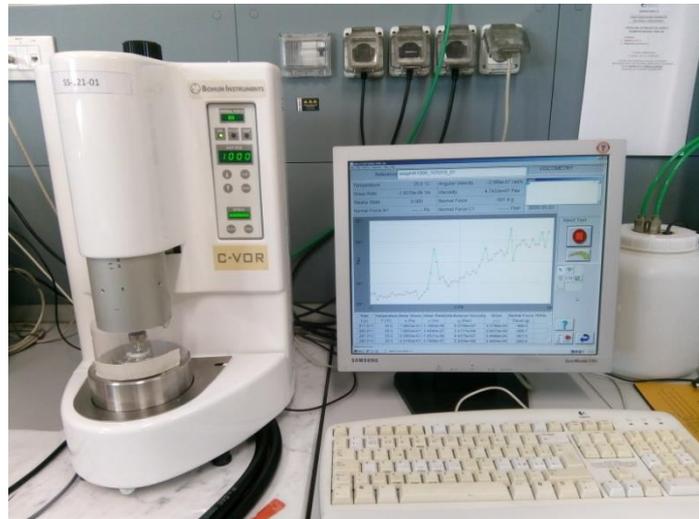


Figura 3.19: Reometro rotazionale Bohlin C-VOR.

Un reometro rotazionale basa il suo funzionamento sulla misura o sull'applicazione di una coppia  $M$ , di uno spostamento angolare e di una velocità

angolare. Dalla misura della coppia è possibile risalire allo sforzo applicato al materiale; dallo spostamento angolare si ottiene la deformazione; mentre dalla velocità angolare si calcola lo shear rate. Per queste relazioni vale anche il contrario.

La coppia è una misura di quanto una forza applicata su un oggetto causa la rotazione dello stesso:  $M = r \cdot F \cdot \sin\theta$ .

Dove:

$r$  = braccio, distanza tra il centro del piatto del reometro e il punto di applicazione della forza.

$F$  = forza applicata.

$\theta$  = angolo tra il braccio e il vettore della forza.

La coppia  $M$  è legata allo shear stress tramite una costante di stress (*stress constant*):  $\sigma = M \cdot K_\sigma$ .

La costante di stress, nel caso di geometria a piatti paralleli, dipende dal raggio del piatto del reometro e/o dalla dimensione iniziale del campione.

Lo spostamento angolare  $\theta$  è l'angolo, in radianti, che descrive un oggetto che compie un percorso circolare:  $\theta = \frac{s}{r}$ .

Dove

$s$  = lunghezza dell'arco percorso.

$r$  = raggio della circonferenza.

Lo spostamento angolare  $\theta$  è legato alla deformazione tramite una costante di deformazione (*strain constant*):  $\gamma = \theta \cdot K_\gamma$ .

La costante di deformazione dipende dal raggio del piatto del reometro e/o dalla dimensione iniziale del campione ma anche dalla distanza tra le due piastre del reometro.

La velocità angolare  $\Omega$  è la variazione di un angolo in funzione del tempo:

$$\Omega = \frac{\Delta\theta}{\Delta t}$$

Dove:

$\theta$  = angolo percorso in radianti.

t = tempo.

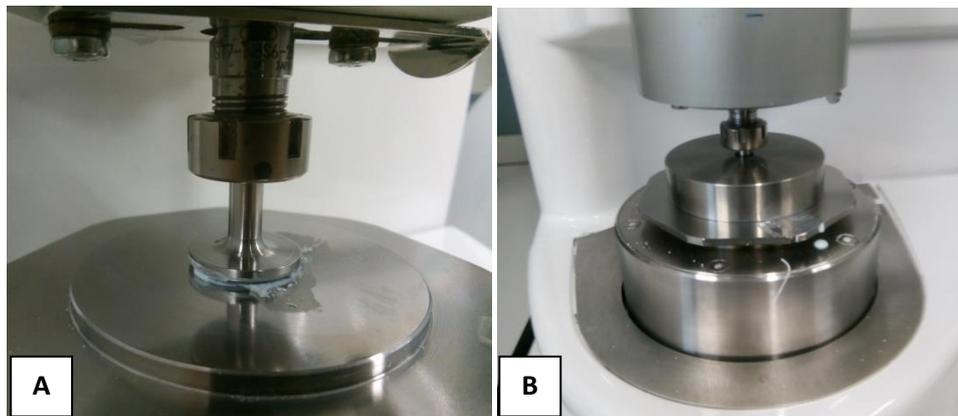
La velocità angolare è legata alla shear rate tramite la costante di deformazione:

$$\dot{\gamma} = \Omega \cdot K_{\gamma}$$

Infine è possibile sia calcolare la viscosità come  $\mu = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} = \frac{M K_{\sigma}}{\Omega K_{\gamma}}$  e il modulo di

taglio come  $G = \frac{\sigma}{\gamma} = \frac{M K_{\sigma}}{\theta K_{\gamma}}$ .

In questa attività è stata utilizzata una geometria a piatti paralleli con piatto superiore di diametro 40 mm (Fig. 3.20 A). Tra i due piatti è stato impostato un gap di 1 mm. Il gap deve essere almeno maggiore di dieci volte la misura delle particelle. È stata inoltre utilizzata una “trappola per solvente” per evitare che durante le prove l’acqua presente nel campione potesse evaporare (Fig. 3.20 B).



**Figura 3.20: A) Geometria a piatti piani paralleli nel reometro. B) Trappola per solvente.**

Sono state effettuate prove per misurare la viscosità istantanea sollecitando il materiale con una rampa continua di stress di taglio crescenti nel tempo a frequenza costante.

Per analizzare la viscoelasticità sono state condotte prove dinamiche. Sono state effettuate due prove preliminari “Stress Sweep” a 1 Hz e 10 Hz e poi una prova di “Frequency Sweep”. Gli “Stress Sweep” misurano  $G'$  e  $G''$  in funzione dello stress applicato a frequenza e temperatura costante e consentono di individuare la regione di viscoelasticità lineare del materiale (LVER, *Linear Viscoelastic region*) determinando il limite di linearità, che sarà quel valore di Shear Stress utilizzato nel test “Frequency Sweep”.

I test “Frequency Sweep” servono generalmente a descrivere il comportamento viscoelastico dipendente dal tempo di un campione nell'intervallo di deformazione non distruttiva. Vengono individuati  $G'$ ,  $G''$ , Phase Angle e il modulo dinamico complesso  $G^*$ .

### 3.3 ANALISI SUI CAMPIONI SINTERIZZATI

#### 3.3.1 MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE (SEM)

La microscopia elettronica consente di osservare superfici con una risoluzione decisamente migliore del microscopio ottico.

Il microscopio elettronico a scansione (SEM) non sfrutta la luce come sorgente di radiazione, ma riproduce immagini ingrandite mediante la generazione di un fascio di elettroni collimati ad elevata energia incidenti sulla sua superficie del campione. Il principio di funzionamento è schematizzato in Figura 3.21.

Gli elettroni sono in genere emessi da un catodo in tungsteno per effetto termoionico e vengono accelerati verso un anodo da tensioni comprese tra 1 e 50kV. L'intera colonna di elettroni deve essere sotto vuoto. Il vuoto protegge la sorgente di elettroni dalla contaminazione, ma consente anche di ottenere un'immagine ad alta risoluzione.

Il fascio di elettroni viene poi concentrato in un punto (o sonda) mediante un sistema di lenti condensatrici ed elettromagnetiche e può essere deflesso in orizzontale e in verticale in maniera controllata da una lente obbiettivo in modo tale da scansionare tutta la superficie del campione. Il punto in cui viene concentrato il fascio ha diametro che varia da 0.4 nm a 5 nm e la risoluzione del SEM dipende proprio da questo complesso sistema di lenti e in particolare proprio dal diametro del punto.

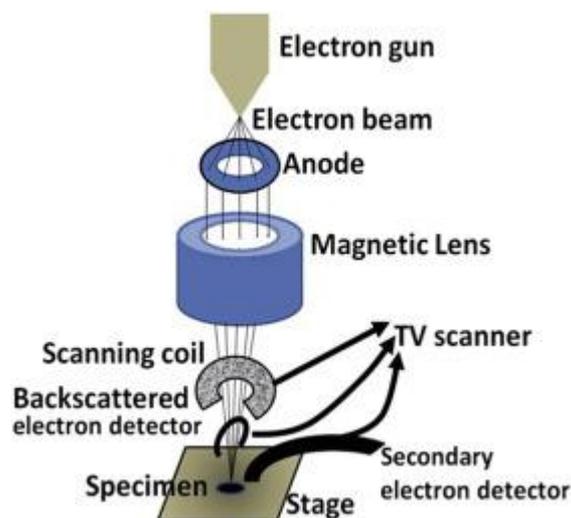
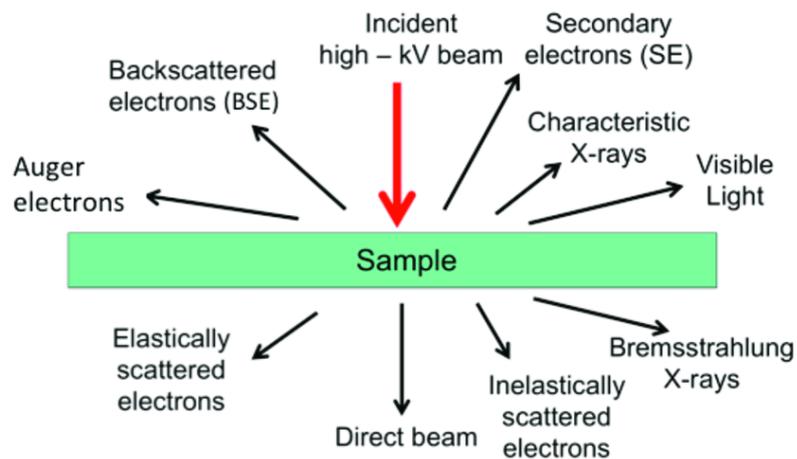


Figura 3.21: Rappresentazione schematica del principio di funzionamento di un SEM

Quando gli elettroni colpiscono il materiale subiscono essenzialmente due tipi di fenomeni:

- *Diffusione elastica*, dovuta ad urti elastici con il nucleo degli atomi bombardati. Consiste in una variazione della direzione della propagazione senza un rilevante cambiamento energetico.
- *Diffusione anelastica*, dovuta ad urti anelastici sia con il nucleo atomico che con gli elettroni ad esso legati. Consiste in una diminuzione di energia senza apprezzabile variazione di direzione di propagazione.



**Figura 3.22: I segnali generati in seguito all'interazione del fascio elettronico primario con il campione.**

Gli elettroni rilevati dai sensori possono provenire da profondità diverse del volume di interazione e di conseguenza riportare informazioni differenti.

Gli elettroni incidenti, detti anche *primari*, danno origine a radiazioni di diverso tipo (Figura 3.22).

Una parte degli elettroni primari, detti elettroni retrodiffusi (*Backscattered Electrons*, BSE), sono riflessi e mantengono l'energia iniziale. Avendo energie prossime a quella del fascio primario possono emergere da regioni più profonde del campione (dell'ordine di alcune centinaia di nm).

Altri primari non vengono riflessi e perdono la loro energia trasferendola agli elettroni del campione. Questi elettroni, in parte diffondono verso la superficie e in parte sfuggono all'esterno in seguito ad urti anelastici di elettroni primari contro gli elettroni esterni degli atomi del campione.

Quelli che sfuggono sono gli elettroni secondari (*Secondary Electrons*, SE) e costituiscono la quasi totalità di elettroni a bassa energia (inferiore a 50 eV): proprio a causa della loro bassa energia, gli elettroni secondari provengono da una profondità di pochi nm dalla superficie del campione.

Gli elettroni secondari non sono solo originati dagli elettroni primari, ma in parte anche da quelli retrodiffusi. Infatti, dopo aver subito delle deflessioni in seguito a collisioni singole o multiple, i retrodiffusi, possiedono energia sufficiente per allontanare elettroni orbitali prima di emergere in superficie.

Gli elettroni retrodiffusi e quelli secondari, venendo da profondità diverse, forniscono informazioni di tipo differente. Date le dimensioni elevate del volume di provenienza degli elettroni retrodiffusi, le immagini BSE hanno bassa risoluzione ma mostrano un'elevata sensibilità alle differenze di numero atomico: più è alto il numero atomico, più il segnale sarà intenso cioè il campione apparirà più chiaro nell'immagine. L'osservazione con gli elettroni retrodiffusi permette quindi di riconoscere le diverse fasi e costituenti del campione.

Alta risoluzione e tridimensionalità dell'immagine sono fornite invece dall'osservazione degli elettroni secondari: essi sono elaborati per ottenere un'immagine del campione sulla base di variazioni dell'intensità di emissione, legate alla morfologia strutturale ed al particolare angolo di incidenza formato con il fascio. Il ristretto volume di interazione permette di rilevare anche i più piccoli dettagli della superficie.

Questi elettroni vengono poi raccolti da un rivelatore. Il rivelatore deve essere sensibile alle basse energie ed è costituito dalla catena scintillatore, guida di luce, fotomoltiplicatore. Lo scintillatore, ricoperto da un sottile strato di alluminio, è polarizzato positivamente a forti tensioni (8 – 12 kV) mentre una griglia posta davanti allo scintillatore, ed a sua volta polarizzabile a tensioni variabili tra -50 e

+300 V, opera una selezione tra gli elettroni retrodiffusi e secondari. Questa consente di catturare gli elettroni e di incanalarli in un condotto in cui l'energia degli elettroni viene trasferita a dei fotoni che saranno letti da un fotomoltiplicatore. Il segnale, una volta filtrato, amplificato ed elaborato, viene portato al monitor. Il contrasto dell'immagine dipende dall'efficienza di raccolta del sensore, in quanto gli elettroni seguono traiettorie rettilinee e sono rivelati solo se il punto di produzione è in linea di collegamento ottico con il rivelatore.

L'immagine ottenuta è formata da ombre molto nitide e si presta ad evidenziare le piccole rugosità della superficie.

### ***PREPARAZIONE DEI CAMPIONI***

I campioni per analisi morfologica mediante SEM richiedono in genere una fase di preparazione preliminare per aumentarne la loro stabilità e conduttività elettrica, in quanto sottoposti a condizioni di alto vuoto e a fasci di elettroni ad alta energia. La formazione di un percorso conduttivo tra il campione e il portacampione, nella maggior parte dei casi realizzato mediante paste in grafite, impediscono l'accumulo di carica sulla superficie osservata. In caso contrario possono verificarsi errori ed artefatti.

Gli scaffold bioceramici non sono conduttivi e per poterli osservare al SEM devono essere adeguatamente preparati. In una prima fase, sono stati fatti aderire al portacampione mediante uno strato adesivo in grafite; tra il campione e il portacampione è stato creato un percorso conduttivo utilizzando un'ulteriore pasta a base di grafite e infine sono stati sottoposti a metallizzazione superficiale con oro mediante metallizzatore sputtering, in condizioni di vuoto (Fig. 3.23).



**Figura 3.23: Campioni metallizzati preparati per l'osservazione al SEM**

# CAPITOLO 4

---

## 4. RISULTATI E CONCLUSIONI

### 4.1 SUPERFICIE SPECIFICA E ANALISI GRANULOMETRICA

L'analisi della superficie specifica delle polveri e l'analisi granulometrica hanno fornito i seguenti risultati:

Polvere	Superficie specifica (m <sup>2</sup> /g)
HA (controllo)	96.88
HA 800°C	29.24
HA 900°C	13.08
HA 1000°C	5.12

Tabella VI: Valori di superficie specifica (m<sup>2</sup>/g) delle polveri calcinate a diverse temperature

La superficie specifica diminuisce quasi-linearmente all'aumentare della temperatura di calcinazione (Fig. 4.3).

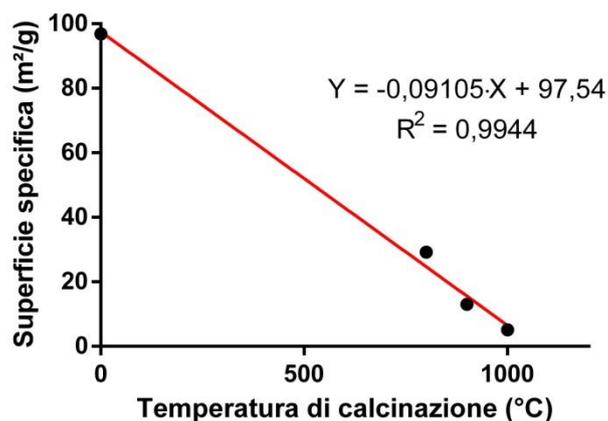


Figura 4.1: Superficie specifica al variare della temperatura di calcinazione.

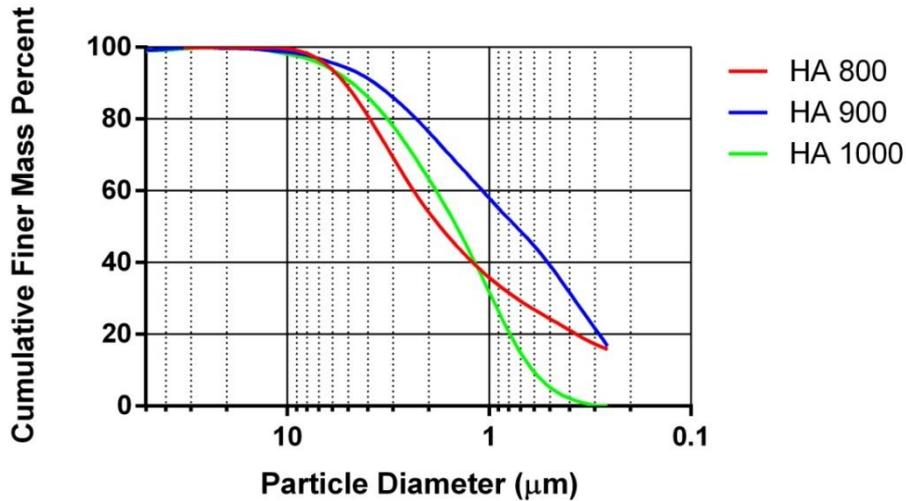


Figura 4.2: Analisi granulometrica delle polveri calcinate a 800°C, 900°C e 1000°C

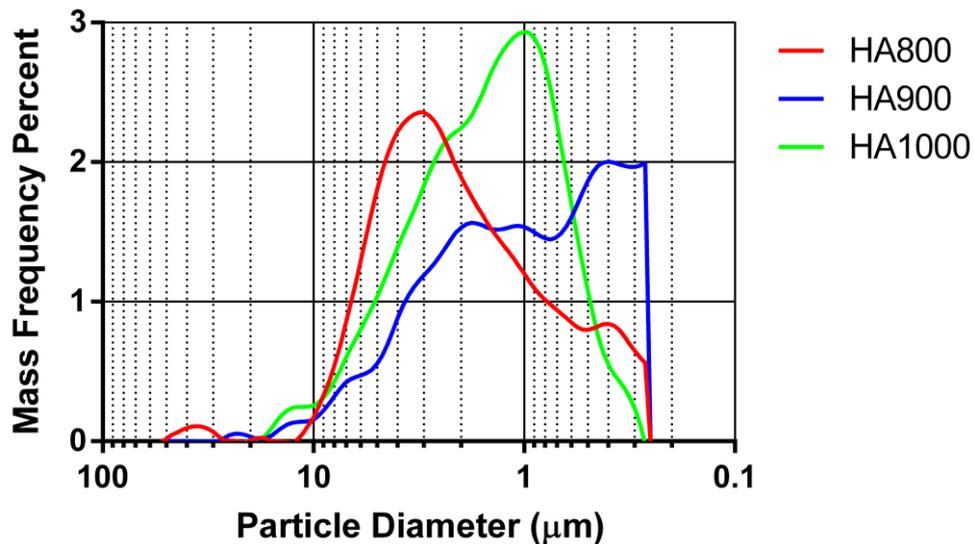


Figura 4.3: Frequenza di massa in funzione del diametro delle particelle delle polveri calcinate a 800°C, 900°C e 1000°C

Il risultato dell'analisi granulometrica, rappresentato in figura 4.2 e 4.3, mostra che la polvere che ha particelle con diametro inferiore è la polvere calcinata a 1000°C, mentre la polvere calcinata ad 800°C ha particelle con diametro maggiore. Il risultato non è coerente con i valori di superficie specifica individuati in quanto una polvere con elevata superficie specifica esiste sottoforma di particelle molto piccole. È possibile che questi risultati discordanti

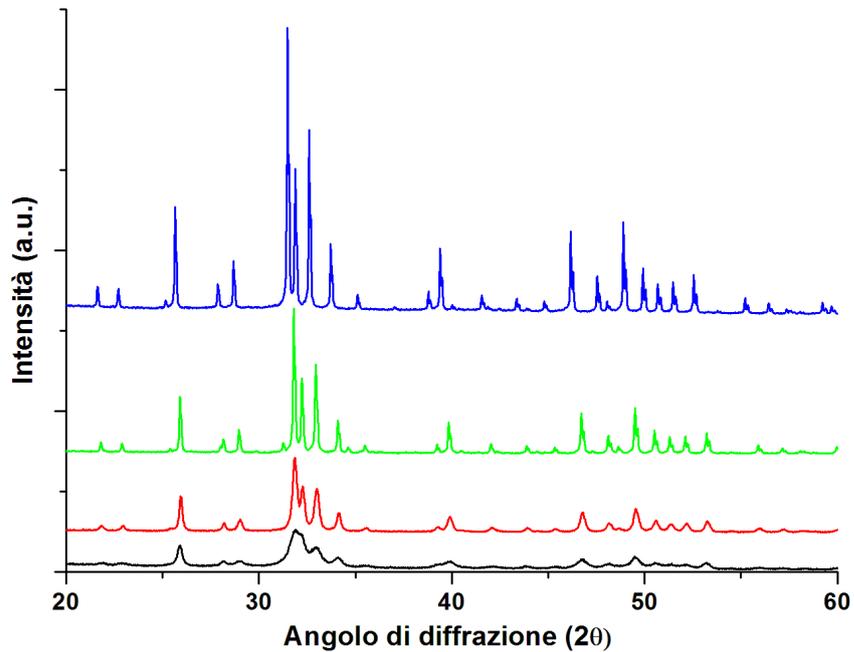
derivino dalla diversità dei principi fisici che sono alla base delle tecniche analitiche: nel caso dell'analisi della superficie specifica con tecnica B.E.T il campione è a contatto con azoto liquido che viene adsorbito sulla superficie; il volume di gas adsorbito è misurato dallo strumento che riporta in uscita i valori medi di superficie specifica. Invece, nell'analisi granulometrica il campione è immerso in un liquido; un fascio di raggi X colpisce la cella contenente il campione e il fascio trasmesso varia di intensità in base alla dimensione delle particelle nel campione. È verosimile che le polveri di HA calcinata a 800°C, che sono più fini, in sospensione tendano ad originare aggregati che vengono erroneamente riconosciuti identificati dalla tecnica analitica come particelle di dimensioni più grandi. Si può quindi ipotizzare che una temperatura di calcinazione di 800°C non sia sufficiente a ridurre l'attività superficiale della polvere consentendo la formazione, per interazioni elettrostatiche, di aggregati che hanno portato all'aumento della dimensione media delle particelle.

## **4.2 DIFRATTOMETRIA A RAGGI X**

In Figura 4.4 sono mostrati gli spettri XRD delle polveri calcinate a diverse temperature. I picchi XRD sono confrontati con quelli della polvere di idrossiapatite non calcinata (in nero). I grandi picchi di diffrazione presenti in ogni campione in posizione  $2\theta$  31.78 (piano 211), 32.266 (piano 112) e 32.951 (piano 300) confermano che le polveri sono idrossiapatite pura con struttura esagonale.

Gli spettri rivelano altri aspetti interessanti: la polvere di controllo non calcinata ha una scarsissima fase cristallina. Al crescere della temperatura di calcinazione, i picchi caratteristici dell'idrossiapatite rimangono i medesimi e divengono più alti (aumenta l'intensità) e distinti, a testimoniare un aumento del grado di cristallinità [20]. Inoltre diminuisce la loro larghezza e ciò suggerisce l'avvenuto incremento nella dimensione dei cristalli con l'aumentare della temperatura di calcinazione [20]. Non è stato identificato nessun picco extra che riflette una eventuale decomposizione dell'idrossiapatite con il trattamento termico. Si nota

nel campione di controllo, al valore di angolo di transizione pari a 32 ( $2\theta$ ), una sovrapposizione dei picchi 211 e 112.



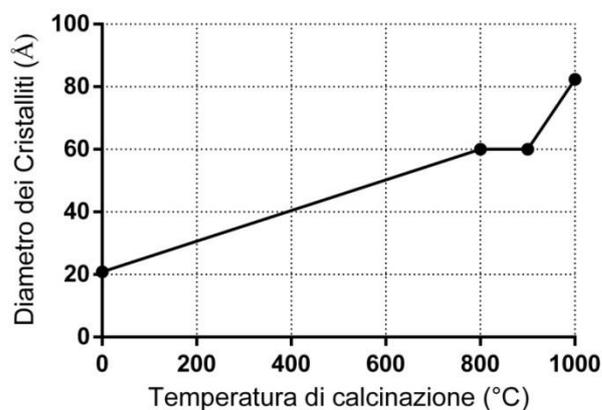
**Figura 4.1:** XRD per polveri calcinate a diverse temperature. HA controllo (nero), HA 800°C (rosso), HA 900°C (verde), HA 1000°C (blu)

In tabella sono riportati la larghezza del picco a metà altezza (*full-width under half-maximum*, FWHM) per il piano (002) e la dimensione dei cristalliti responsabili della riflessione del piano (002). Quando l'HA diventa più cristallina, aumenta la dimensione dei cristalliti e cala la FWHM in quanto tale misura è inversamente proporzionale alla lunghezza del cristallite [23]. I valori della FWHM e della dimensione dei cristalliti riportati in tabella VII, confermano l'aumento della cristallinità all'aumentare della temperatura di calcinazione osservata con l'analisi XRD.

Polvere	FWHM (002)	Dimensione cristalliti (Å)
HA ( <i>control sample</i> )	0.1939	20.8701444
HA 800°C	0.1357	60.06329917
HA 900°C	0.1357	60.0712571
HA 1000°C	0.1181	82.36568038

**Tabella VII:** Valori di FWHM (002) e Dimensione dei cristalliti (Å) delle polveri non calcinate e calcinate a diverse temperature

In Figura 4.5 è riportata la variazione della grandezza dei cristalliti all'aumento della temperatura di calcinazione. La dimensione dei cristalliti è stata calcolata utilizzando l'equazione di Scherrer. Si nota come l'incremento della dimensione dei cristalliti segue due step distinti. Nel primo, dalla polvere non calcinata a quella calcinata a 900°C, l'incremento della dimensione dei cristalliti è molto lento. Nel secondo, tra 900°C e 1000°C, la dimensione cresce molto più rapidamente. La crescita più lenta osservata nel primo step può essere imputata alla cristallizzazione di un grande numero di particelle, cosicché il meccanismo predominante è la cristallizzazione della fase amorfa [20]. Superati i 900°C, la crescita delle particelle cristallizzate avviene più velocemente con un meccanismo controllato di diffusione, che porta alla crescita dei cristalliti [20].



**Figura 4.2:** Diametro dei cristalliti (Å) all'aumentare della temperatura di calcinazione

### 4.3 ANALISI FTIR-ATR

L'analisi FTIR è stata condotta per individuare i gruppi funzionali presenti nella polvere di idrossiapatite e studiarne l'evoluzione alle diverse temperature di calcinazione. I gruppi funzionali presenti e il loro numero d'onda sono riportati in tabella V nel paragrafo 3.1.4. La Figura 4.6 mostra lo spettro FTIR delle polveri calcinate a diverse temperature, poste a confronto con la polvere di controllo non calcinata. La Figura 4.7 illustra alcuni dettagli dello spettro. La Figura 4.6 e la tabella V confermano la presenza di caratteristiche comuni nei vari campioni, ma anche notevoli differenze. Le bande di assorbimento caratteristiche dell'HA compaiono a  $\sim 964$ ,  $1045$ ,  $570$ ,  $635$   $\text{cm}^{-1}$  e sono presenti in tutti i campioni così come tutti i modi vibrazionali di  $\text{PO}_4^{3-}$  a  $964$ ,  $1045$ - $1095$  e  $570$ - $605$   $\text{cm}^{-1}$ . Le differenze che intercorrono tra lo spettro della polvere di controllo e quelle calcinate a diverse temperature si manifestano nella comparsa di nuovi picchi, nell'aumento dell'intensità di alcuni picchi e la scomparsa di altri. Il picco a  $3570$   $\text{cm}^{-1}$ , relativo alla vibrazione di stretching del gruppo ossidrilico, seppur piccolo, riduce il suo allargamento all'aumentare della temperatura di calcinazione e testimonia l'aumento del grado di ordine cristallino dell'HA (Fig. 4.7 d). Nei campioni calcinati compare un picco a  $632.5$   $\text{cm}^{-1}$  (Fig 4.7 a). È il picco assegnato alla vibrazione di stretching dello ione  $\text{OH}^-$ , il quale indica la presenza di  $\text{OH}^-$  nella struttura e conferma la formazione della struttura caratteristica dell'apatite e dell'ottima cristallinità del campione. Questi dati comprovano i risultati dell'analisi XRD in cui il grado di cristallinità aumenta con l'aumentare della temperatura di calcinazione. Nella regione intorno a  $1450$   $\text{cm}^{-1}$  è presente un picco che indica la presenza di  $\text{CO}_3^{2-}$  e che scompare con l'aumento della temperatura di calcinazione venendo rilasciato come gas volatile ( $\text{CO}_2$ ) (Fig. 4.7 c). Nei campioni calcinati a  $900^\circ\text{C}$  e  $1000^\circ\text{C}$ , il picco è totalmente assente, indicando che nella struttura il gruppo carbonato è già stato eliminato.

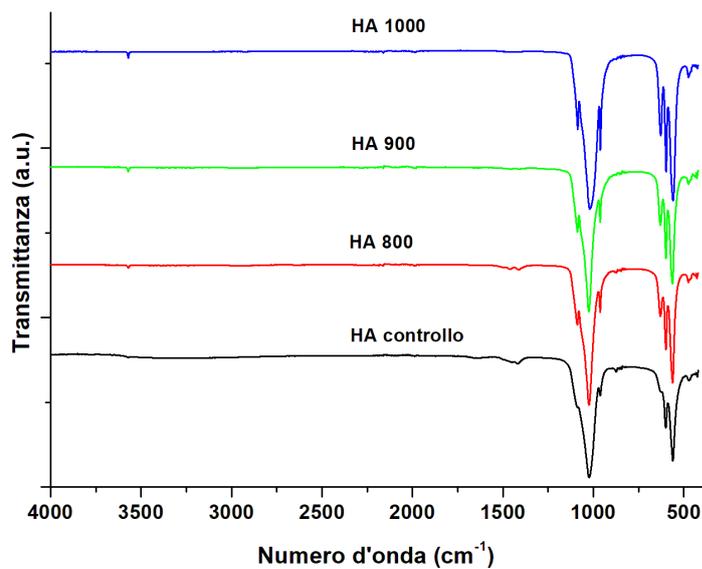


Figura 4.3: Spettro FTIR delle polveri a diverse temperature di calcinazione

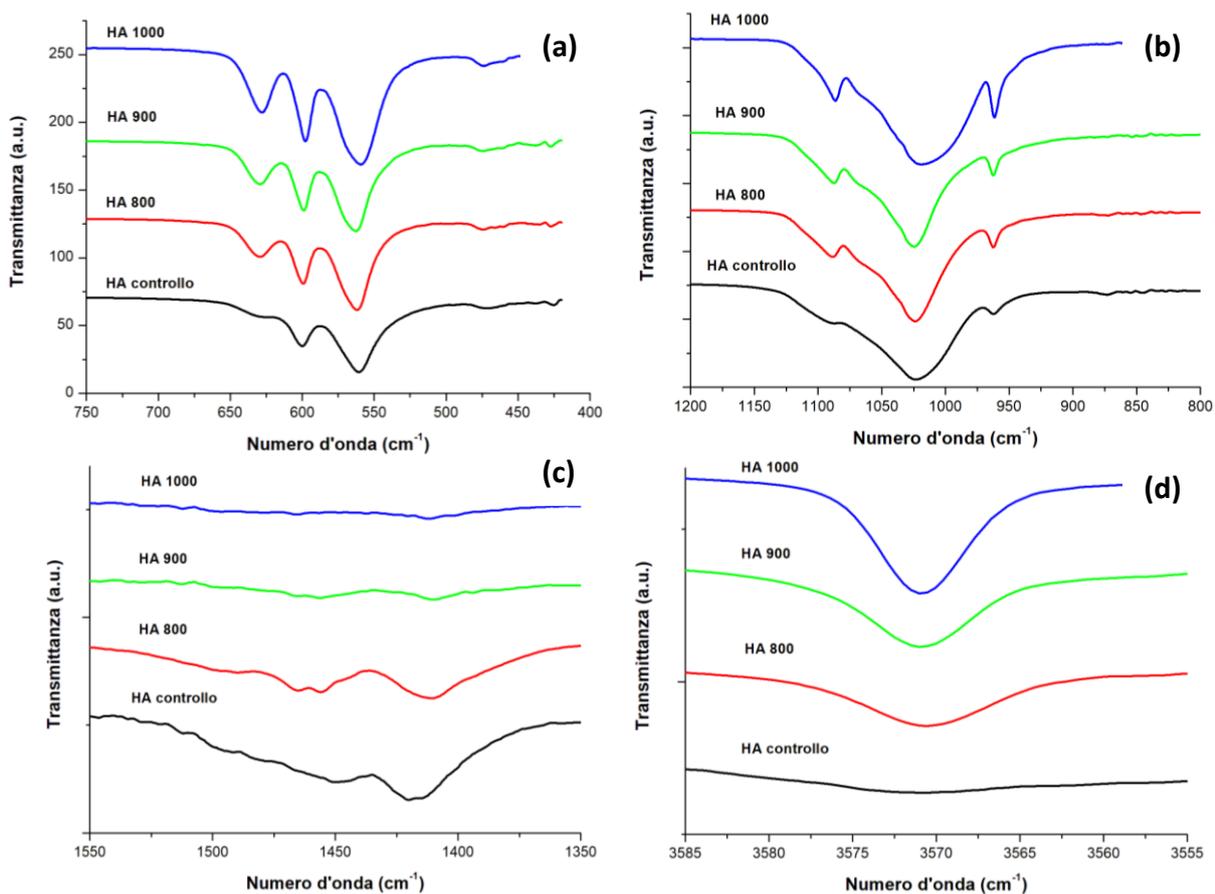
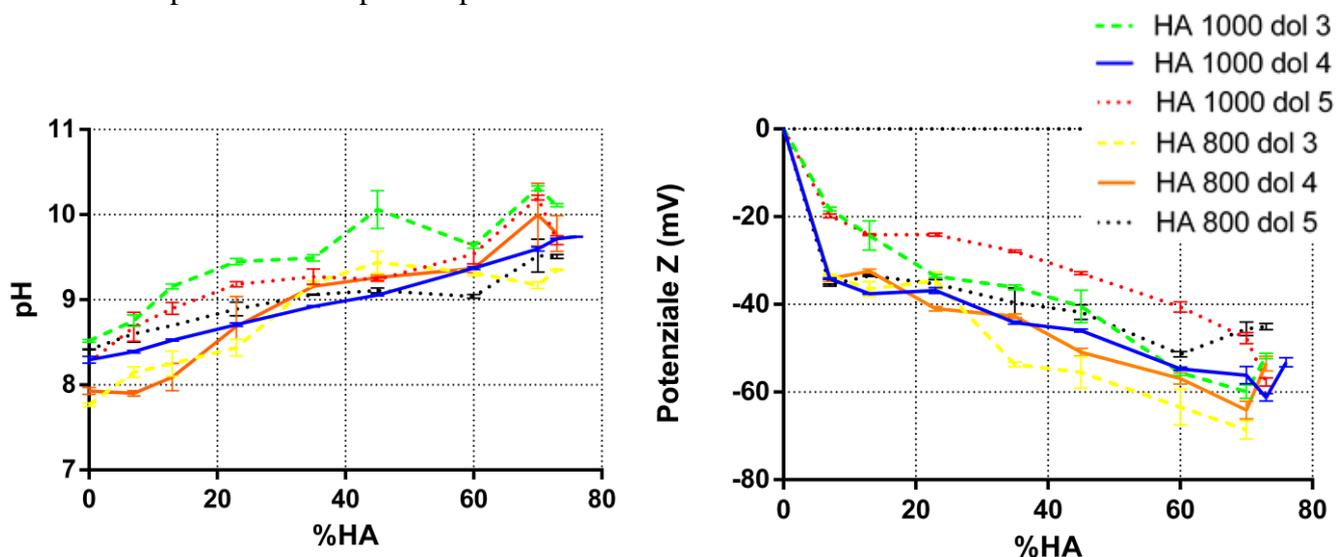


Figura 4.4: Dettagli dello spettro FTIR. (a) Spettro tra 400 e 750  $\text{cm}^{-1}$ . (b) Spettro tra 800 e 1200  $\text{cm}^{-1}$ . (c) Spettro tra 1350 e 1550  $\text{cm}^{-1}$ . (d) Spettro tra 3555 e 3585  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.4 POTENZIALE $\zeta$ e pH

La stabilità chimico-fisica delle sospensioni acquose è stata valutata mediante misure di pH e potenziale  $\zeta$ . Come è ben noto, le proprietà chimico-fisiche della superficie delle particelle di idrossiapatite sono molto sensibili ai trattamenti termici subiti. La calcinazione risulta essere un processo importante per ottenere una carica superficiale adeguata e un valore di potenziale  $\zeta$  elevato in valore assoluto, che sono un prerequisito per la preparazione di sospensione ben disperse con una concentrazione di polvere elevata.

In Figura 4.8 è riportato l'andamento del potenziale  $\zeta$  e del pH in funzione della percentuale in peso di polvere di HA contenuta nella soluzione.



**Figura 4.5: pH e potenziale  $\zeta$  in funzione della percentuale in peso di polvere di HA contenuta nella soluzione.**

Le differenze divengono più marcate se il potenziale  $\zeta$  viene graficato in funzione di  $\beta$ , un parametro introdotto per tenere in considerazione quanti mg di principio attivo di disperdente sono presenti per ogni  $m^2$  di area superficiale delle particelle ( $mg/m^2$ ), come si osserva in Figura 4.9.

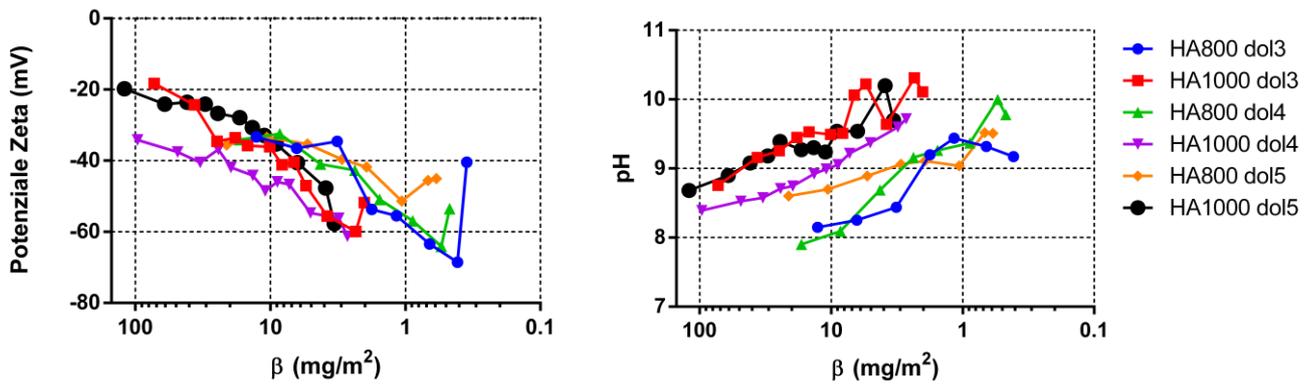


Figura 4.6:Potenziale  $\zeta$  e pH in funzione di  $\beta$  ( $\text{mg}/\text{m}^2$ )

Va infatti ricordato che le polveri calcinate a temperature differenti possiedono area superficiale diversa, quindi a parità di mg di disperdente nella soluzione, la quantità di disperdente per area superficiale non è la stessa. Inoltre, preparando sospensioni con diversi rapporti HA:H<sub>2</sub>O:disperdente, varia la quantità di disperdente a parità di temperatura di calcinazione, cioè a parità di area superficiale.

Dalla Figura 4.9 è possibile notare che a parità di  $\beta$ , i potenziali  $\zeta$  sono più elevati in valore assoluto con sospensioni calcinate a 1000°C. Tra tutte, la sospensione con il valore di potenziale  $\zeta$  maggiore in valore assoluto è quella preparata con polvere calcinata a 1000°C con rapporto HA:H<sub>2</sub>O:disperdente=73:23:4 (campione “HA 1000 dol 4”).

Il potenziale  $\zeta$  cresce quindi in valore assoluto al crescere del pH, cioè all'aumentare della percentuale in peso di polvere presente nella sospensione (vedi Figura 4.8).

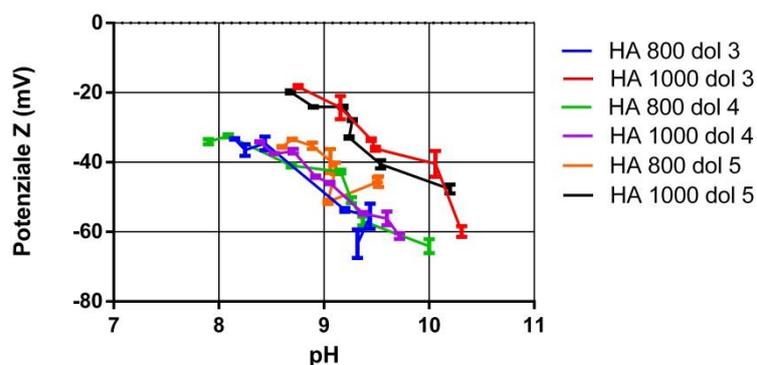


Figura 4.7: Potenziale  $\zeta$  (mV) in funzione del pH.

Questo incremento in valore assoluto del potenziale  $\zeta$  testimonia che il disperdente ha consentito la riduzione del grado di agglomerazione, aumentando le forze repulsive tra particelle e di conseguenza stabilizzando la sospensione. Infatti, all'aumentare del pH, cariche sempre più negative vengono esposte sulla superficie delle particelle di HA determinando un aumento del potenziale  $\zeta$  [20]. Si nota dalla Figura 4.8 che a parità di potenziale  $\zeta$  le sospensioni con polveri calcinate a 800°C sono più acide rispetto a quelle calcinate a 1000°C.

A parità di  $\beta$  e di temperatura di calcinazione non vi è un aumento in valore assoluto del potenziale  $\zeta$  all'aumentare della concentrazione di agente disperdente in soluzione come invece è riportato in letteratura [20]. Risulta invece che le sospensioni acquose preparate con la maggior quantità di disperdente (HA 1000 dol 5 e Ha 800 dol 5) sono quelle con potenziale  $\zeta$  leggermente inferiore in valore assoluto rispetto alle altre con polvere calcinata alla medesima temperatura. Avendo utilizzato un disperdente polielettrolita (Dolapix CA) è possibile che ad elevate concentrazioni non sia stato tutto adsorbito sulla superficie delle particelle e la quantità in eccesso si trovi libera in soluzione. La concentrazione di polielettroliti liberi comprime il doppio strato elettronico rendendo la repulsione elettrostatica meno efficace, determinando un calo in valore assoluto del potenziale  $\zeta$  [20].

Il potenziale  $\zeta$  dipende, oltre che dal doppio strato elettronico, anche dalla densità della carica superficiale. La densità della carica superficiale, a sua volta, è in funzione dalla concentrazione di ioni che possono interagire con essa e che causano modifiche nel pH. Il Potenziale  $\zeta$  dipende dunque dal pH.

Come nel caso del potenziale  $\zeta$ , graficando l'andamento del pH in funzione del parametro  $\beta$  sono più marcate le differenze che intercorrono tra le sospensioni con polvere calcinata alle diverse temperature e con diverse concentrazioni di disperdente. L'andamento del pH in funzione di  $\beta$  è visibile in Figura 4.10. È chiaramente evidente la netta demarcazione del valore di pH tra le sospensioni con polveri calcinate a 800°C e quelle con polveri calcinate a 1000°C: parità di  $\beta$ , le prime si trovano in una regione più acida rispetto alle seconde.

Questo comportamento potrebbe essere attribuito alla presenza del gruppo carbonato nella polvere di idrossiapatite calcinata a temperature più basse, come precedentemente osservato [20].

È inoltre possibile che questi valori del pH siano influenzati dal comportamento del gruppo idrossile ( $\text{OH}^-$ ). Durante un trattamento termico, a partire da 700-800°C, avviene il processo di deidrossilazione. Con il procedere della deidrossilazione, a temperature inferiori di circa 900°C, le dimensioni del nucleo di HA diminuiscono, di conseguenza diminuisce anche la distanza di diffusione, e il gruppo ossidrilico  $\text{OH}^-$  inizia a diffondersi attraverso l'HA [24]. A temperature superiori, i gruppi  $\text{OH}^-$  sono migrati sulla superficie e vengono rimossi dal reticolo di HA, combinandosi a formare una molecola di acqua e uno ione perossido e si ha perdita di massa [10, 24]. Idealmente, il risultato della deidrossilazione sarebbe un'apatite senza più gruppi ossidrilici, un'ossiapatite (OA). Tuttavia, come viene riportato in letteratura, al termine del trattamento termico a 1080°C, un 20% di apatite ha conservato il gruppo ossidrilico [24]. Alla luce di queste considerazioni, la polvere calcinata a 1000°C presenterebbe una quota maggiore di gruppi ossidrilici migrati in superficie, tali da essere dispersi molto facilmente in soluzione determinando un aumento del pH della sospensione.

## **4.5 ANALISI REOLOGICHE**

Le analisi reologiche hanno previsto misure sia di viscosità che di viscoelasticità a concentrazioni di polvere di HA nella sospensione pari al 45%, 60% e 75%. Le misure sono state effettuate sulle sospensioni preparate con la polvere calcinata alle due diverse temperature (800°C e 1000°C) e con concentrazione differente di deflocculante.

### **4.5.1 VISCOSITÀ**

Per le misure di viscosità è stato sollecitato il materiale con rampe crescenti di sforzo di taglio (*shear stress*). In tabella VIII sono riportati i valori di sforzo di taglio usati misurare la viscosità delle sospensioni alle diverse concentrazioni e per le due temperature di calcinazione.

% HA	HA 800 (Pa)	HA 1000 (Pa)
45	0.1-1000	0.1-1000
60	1-10000	1-10000
75	10-10000	1-10000

Tabella VIII: Range di valori di shear-stress impostati per le misure di viscosità istantanea

I risultati delle prove sono riportati in Figura 4.11 per concentrazioni di polvere di HA nelle sospensioni pari al 45%, in Figura 4.12 per concentrazione al 60% e in Figura 4.13 per il 75%.

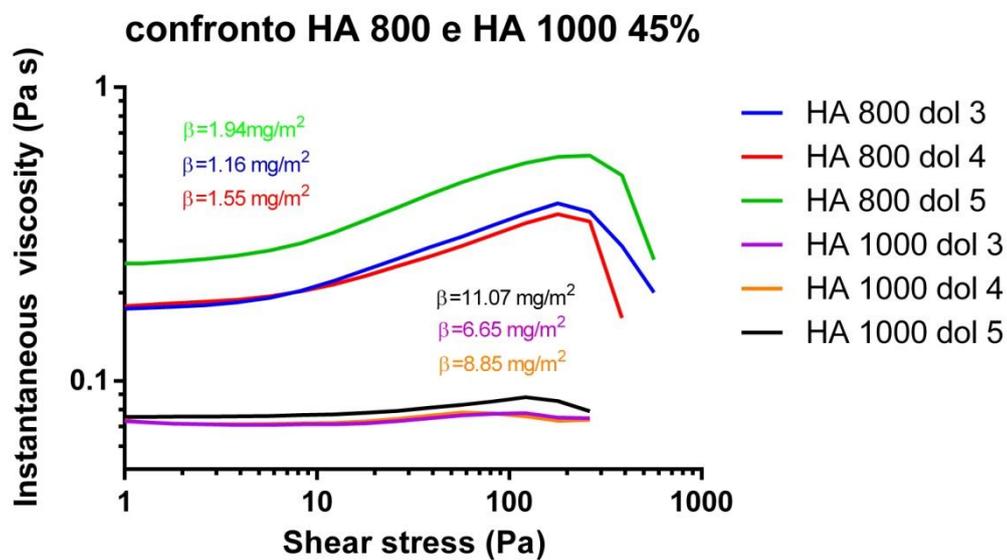


Figura 4.8: Viscosità istantanea per sospensioni con concentrazione di polvere in massa pari al 45%

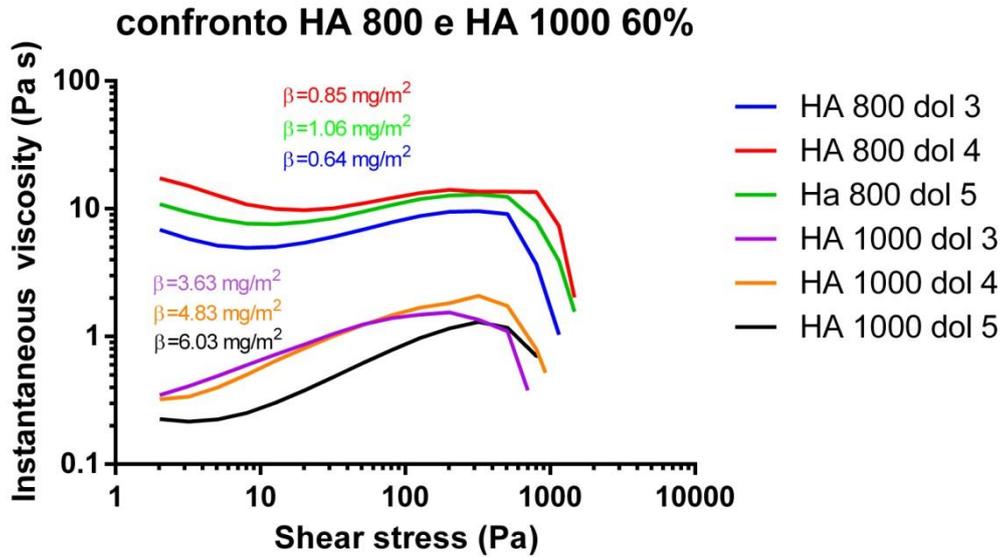


Figura 4.9: Viscosità istantanea per sospensioni con concentrazione di polvere in massa pari al 60%

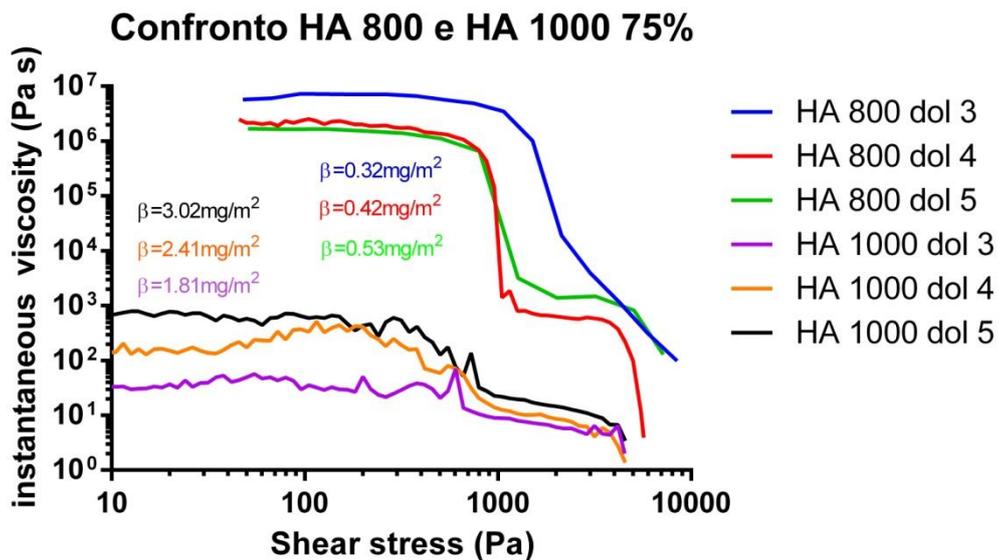


Figura 4.10: Viscosità istantanea per sospensioni con concentrazione di polvere in massa pari al 75%.

Una visione d'insieme degli andamenti della viscosità di tutte le sospensioni è fornita dalla Figura 4.14.

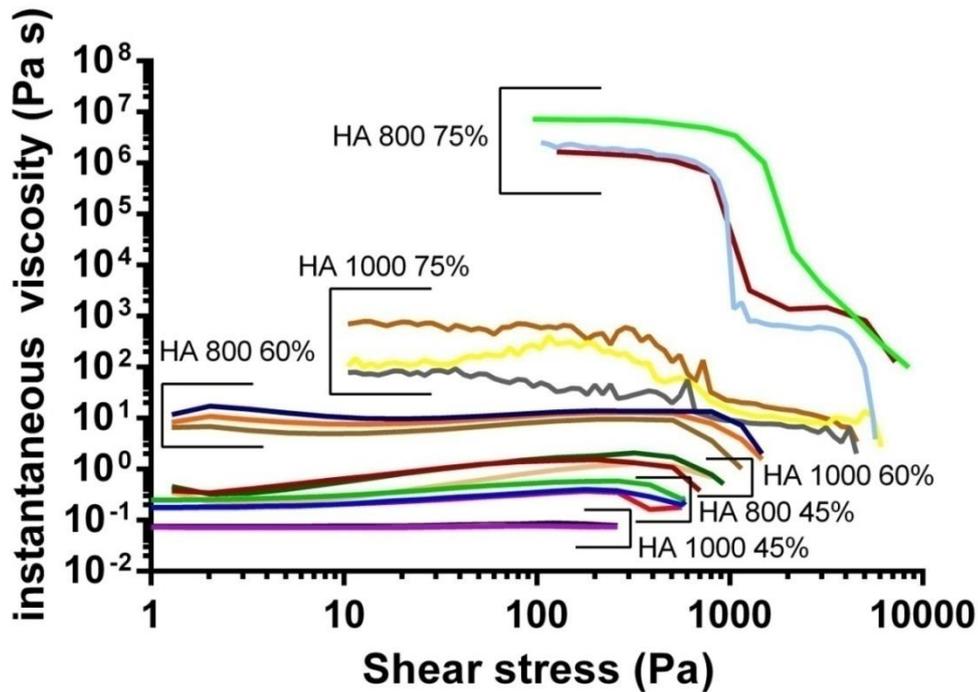


Figura 4.11: Raffronto della viscosità istantanea per tutti i tipi di sospensioni a tutte le concentrazioni

La viscosità aumenta considerevolmente all'aumentare della concentrazione di polvere di HA nelle sospensioni. Tale incremento è molto più marcato per le sospensioni con polvere calcinata a  $800^{\circ}\text{C}$ , dove si passa da un ordine di grandezza della viscosità di  $1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ , ad uno di  $10^7 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ . Inoltre, le sospensioni più concentrate mostrano prima una fase di plateau Newtoniano e poi una rapida caduta della viscosità. Le sospensioni meno concentrate mostrano invece un comportamento simile in termini quantitativi. È possibile che nel caso di polvere calcinata a  $800^{\circ}\text{C}$ , che ha una superficie specifica più ampia, il deflocculante non è sufficiente ad adsorbirsi su tutta la superficie delle particelle; il doppio strato di carica prodotto non è abbastanza efficace nel generare effetti repulsivi, facendo prevalere le forze attrattive [20]. Questo comportamento è anche confermato dal un potenziale zeta più basso in valore assoluto a parità di  $\beta$  per sospensioni con polvere calcinata a  $800^{\circ}\text{C}$ . La polvere è quindi più aggregata in sospensione e i valori di viscosità sono più elevati [25].

A parità di concentrazioni di polvere di HA nelle sospensioni, la variazione più sostanziale ai valori di viscosità non viene data dalle diverse concentrazioni di

deflocculante, bensì dalla temperatura di calcinazione. Ad una concentrazione di polvere di HA nelle sospensioni del 75%, si passa da una viscosità nell'ordine di  $10^2$ - $10^3$ Pa·s per la polvere calcinata a 1000°C, ad una nell'ordine di  $10^7$  Pa·s per quella calcinata a 800°C.

Tuttavia, l'effetto del deflocculante si dimostra essere più rilevante a concentrazioni più elevate di polvere in sospensione, dove le differenze tra sospensioni diverse sono maggiormente marcate. In letteratura si riporta che ad un aumento nella concentrazione di deflocculante si assiste ad un calo nella viscosità ma anche che se la concentrazione è troppo elevata, la viscosità torna a salire [22, 26]. Che un aumento nella concentrazione di deflocculante conduce ad un calo nella viscosità è vero solo nel caso di sospensione con polvere calcinata ad 800°C e concentrata al 75%. Negli altri casi, come si evince dai valori di  $\beta$  nelle Figure 4.11, 4.12, 4.13, può accadere che la sospensione meno viscosa sia quella con meno deflocculante o con più deflocculante. Il comportamento reologico delle sospensioni colloidali concentrate dipende principalmente dal contenuto di particelle solide e dal loro grado di agglomerazione. Avendo utilizzato un disperdente polielettrolita (Dolapix CA) è possibile che ad elevate concentrazioni (dol 5) non sia stato tutto adsorbito sulla superficie delle particelle e la quantità in eccesso si trovi libera in soluzione rendendo la repulsione elettrostatica meno efficace e risultando in un incremento della viscosità [20]. Al contrario, se la quantità di deflocculante non è sufficiente per rivestire completamente le particelle prevalgono forze attrattive che conducono ad un aumento della viscosità.

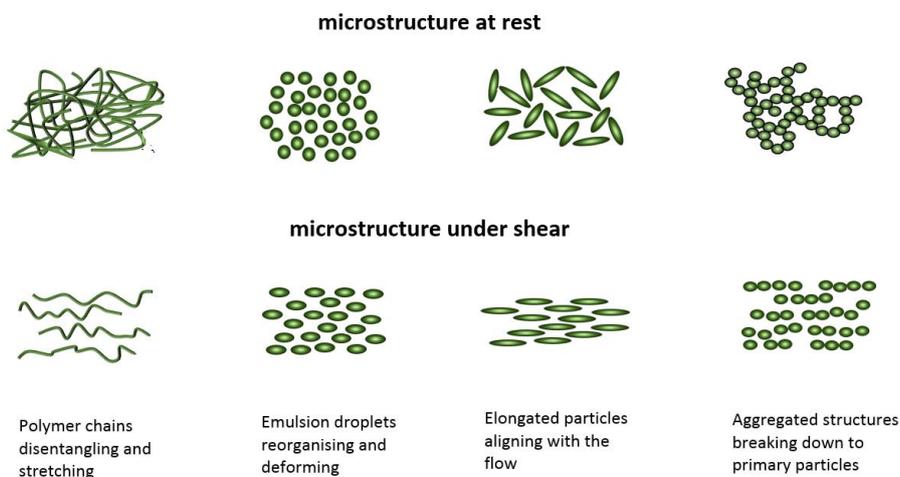
Le sospensioni possiedono tutte un limite di scorrimento (*yield stress*) che rappresenta il valore di sforzo di taglio in corrispondenza del quale si verifica una marcata variazione nella risposta del materiale. Questo fenomeno è estremamente evidente nel caso di sospensioni molto concentrate, come testimonia la Fig. 4.14. Al di sotto del limite di scorrimento la sospensione si comporta essenzialmente come un solido, mentre a valori superiori inizia a fluire come un liquido. Il comportamento solido è associato all'elasticità; il comportamento liquido è invece associato alla viscosità. Il limite di scorrimento rappresenta pertanto il valore dello stress in corrispondenza del quale si verifica

la transizione tra il comportamento elastico dei solidi e il comportamento viscoso dei liquidi.

In condizioni statiche, le particelle ceramiche tendono ad agglomerare spontaneamente originando una rete 3D per tutto il volume della sospensione. Questa rete è la causa del limite di scorrimento ed è responsabile delle proprietà elastiche della sospensione [27]. Al crescere dello stress di taglio, la rete si disgrega, originando strati ordinati di particelle la cui separazione richiede sforzi sempre inferiori; si ritiene che questo fenomeno sia alla base del significativo calo di viscosità in corrispondenza del limite di scorrimento.

Lo *shear-thinning*, ovvero la diminuzione della viscosità all'aumentare dello sforzo di taglio, è quindi il risultato di riarrangiamenti microstrutturali che si verificano nel piano sul quale è applicato lo sforzo di taglio ed è comunemente osservato nel caso di dispersioni, comprese emulsioni e sospensioni. Un'illustrazione dei tipi di orientamento indotti dal taglio per vari materiali è mostrata in Figura 4.15.

Come si osserva in Fig. 4.13, la sospensione più concentrata, presenta un plateau newtoniano per bassi valori di sforzo di taglio, una zona intermedia caratterizzata da *shear thinning* seguita da un secondo plateau newtoniano con viscosità inferiore al primo per valori elevati di sforzo di taglio.



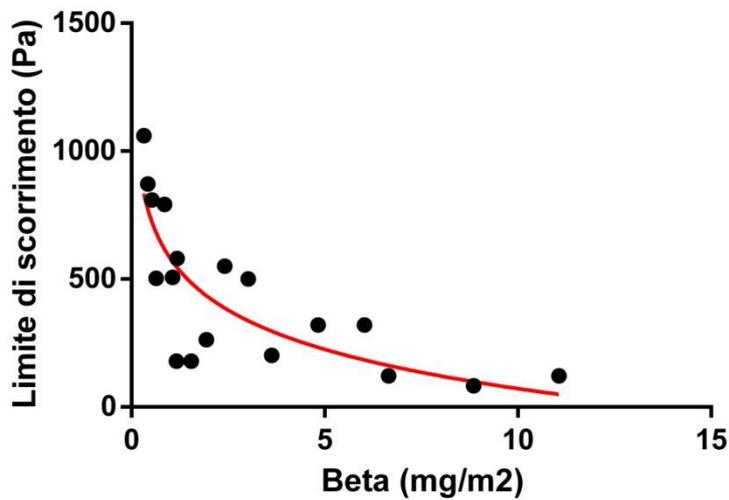
**Figura 4.12: Illustrazione di come le microstrutture rispondono a stress di taglio. Fonte: A Basic Introduction to Rheology, White Paper of Malvern Instruments Limited, 2016.**

I valori dei limiti di scorrimento di ogni sospensione sono stati graficati in Figura 4.16 in funzione del proprio valore di  $\beta$ . In rosso è rappresentata la linea di regressione che ha equazione:

$$\sigma_c = -221 \log(\beta) + 582.1$$

Con  $R^2=0.6638$ .

$\sigma_c$  rappresenta il valore del limite di scorrimento.



**Figura 4.13: Limite di scorrimento (Pa) in funzione di beta con linea di regressione in rosso**

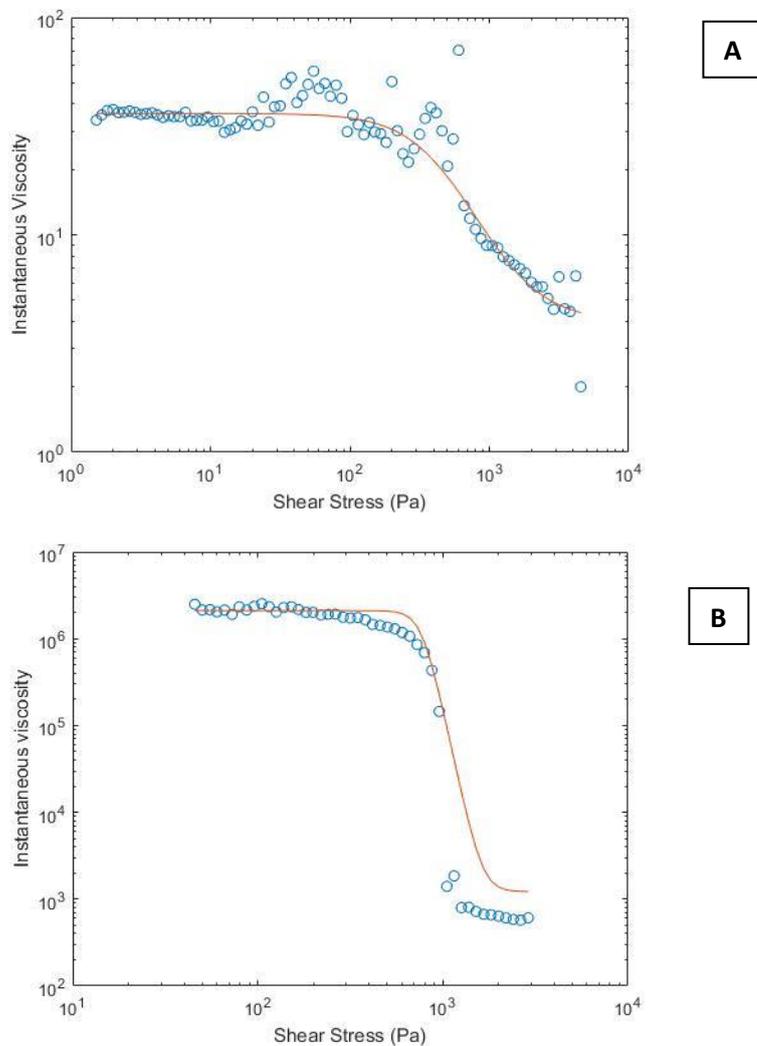
I dati sperimentali di viscosità e shear stress sono stati fittati con il modello di Barnes (o Ellis composto), che descrive il comportamento della viscosità all'aumentare dello sforzo di taglio e permette di modellare la viscosità anche nelle zone più critiche, dove si trova il limite di scorrimento. Il modello è definito dalla seguente equazione:

$$\frac{\eta - \eta'_\infty}{\eta'_0 - \eta'_\infty} = \frac{1}{1 + (\sigma/\sigma_c)^m}$$

Dove  $\eta$  è la viscosità fornita dal modello,  $\sigma$  è lo shear stress,  $\eta'_\infty$  è il valore di viscosità a shear stress maggiore,  $\eta'_0$  è il valore di viscosità a shear stress minore,  $\sigma_c$  è il valore del limite di scorrimento,  $m$  è un parametro di Ellis classico che descrive la caduta della viscosità.

Il valore del limite di scorrimento è stato calcolato utilizzando la linea di regressione  $\sigma_c = -221 \log(\beta) + 582.1$ , inserendo il valore di beta corrispondente alla sospensione desiderata.

I dati sperimentali di viscosità sono stati fittati con questo modello utilizzando MATLAB. Un codice di esempio viene fornito in appendice. Nel codice ho fatto variare il parametro di Ellis classico  $m$ , individuando il valore che minimizza l'errore tra il modello e i dati sperimentali. Come errore è stato utilizzato sia l'errore quadratico medio (MSE), sia la *residual standard deviation* (RSD). Individuato  $m$ , è stato plottato il modello fittato con i dati sperimentali. Un esempio di fitting ottenuto è riportato in Figura 4.17.



**Figura 4.14:** A) Fitting tra i dati sperimentali di viscosità istantanea della sospensione con HA calcinata a 1000°C al 75% Dol3e il modello di Ellis (in rosso). B) Fitting tra i dati sperimentali di viscosità istantanea della sospensione con HA calcinata a 800°C al 75% Dol4 e il modello di Ellis (in rosso).

#### 4.5.2 VISCOELASTICITÀ

Per analizzare la viscoelasticità sono state condotte prove in regime di sollecitazione dinamico. Con l'obiettivo di valutare la risposta del materiale in frequenza, nel range 1-10 Hz (test "Frequency Sweep"), sono state effettuate in una fase iniziale due tipologie di test "Stress Sweep" a 1 Hz e 10 Hz, rispettivamente, applicando gradini crescenti di sforzo.

I test "Stress Sweep" misurano  $G'$  e  $G''$  in funzione dello stress applicato a frequenza e temperatura costante e consentono così di individuare la regione di viscoelasticità lineare del materiale, ovvero i parametri di sollecitazione del materiale che non comportano alterazioni irreversibili della struttura del campione; tali parametri sono indispensabili per poter effettuare correttamente il test "Frequency Sweep". In tabella IX sono riportati i valori di Shear Stress individuati con test "Stress Sweep" e utilizzati nelle prove:

	HA 800			HA 1000		
% HA	73:24:3 Dol3 (Pa)	73:23:4 Dol4 (Pa)	73:22:5 Dol5 (Pa)	73:24:3 Dol3 (Pa)	73:23:4 Dol4 (Pa)	73:22:5 Dol5 (Pa)
45	1	1	1	1	1	1
60	0.1	0.1	0.1	1	1	1
75	10	10	10	10	10	10

Tabella IX: Valori di shear stress utilizzati nelle prove di frequencysweep.

I risultati dei test dinamici per le sospensioni con polvere calcinata a 800°C sono riportati nelle Figure 4.18 (dol 3), 4.19 (dol 3), 4.20 (dol 4), 4.21 (dol 4), 4.22 (dol 5), 4.23 (dol 5):

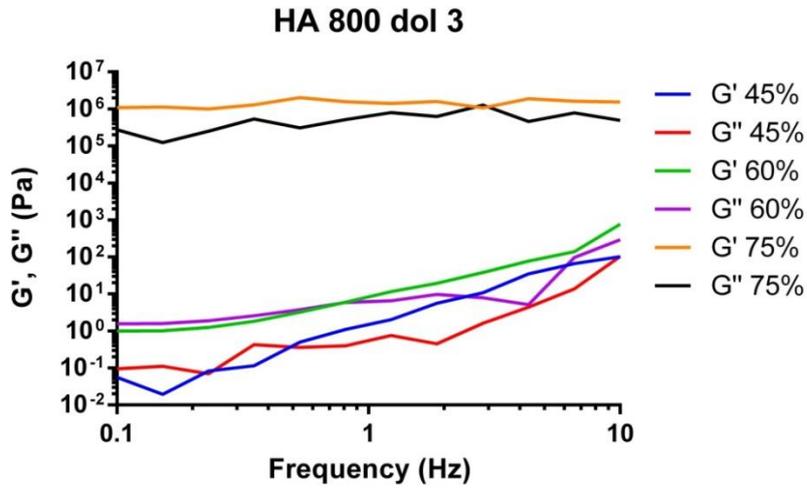


Figura 4.15: Modulo elastico  $G'$  e modulo viscoso  $G''$  al variare della concentrazione in massa di polvere per sospensione preparata con polvere calcinata a  $800^{\circ}\text{C}$  in rapporto HA:acqua:disperdente pari a 73:24:3.

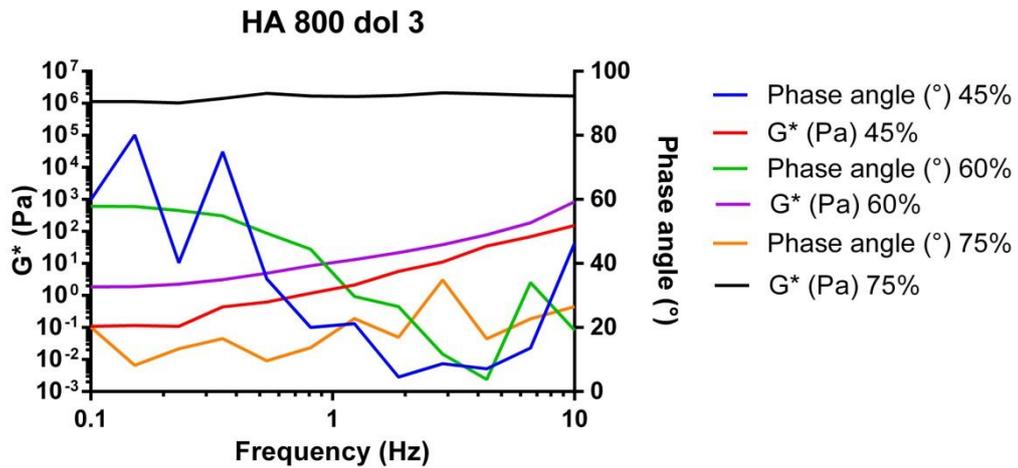


Figura 4.16: Modulo complesso  $G^*$  e  $phase\ angle(^{\circ})$  al variare della concentrazione in massa di polvere per sospensione preparata con polvere calcinata a  $800^{\circ}\text{C}$  in rapporto HA:acqua:disperdente pari a 73:24:3.

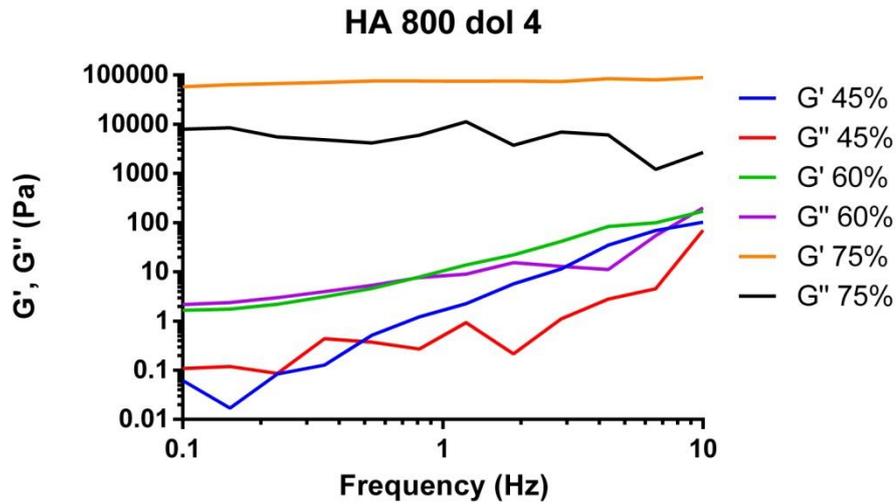


Figura 4.17: Modulo elastico  $G'$  e modulo viscoso  $G''$  al variare della concentrazione in massa di polvere per sospensione preparata con polvere calcinata a  $800^{\circ}\text{C}$  in rapporto HA:acqua:disperdente pari a 73:23:4.

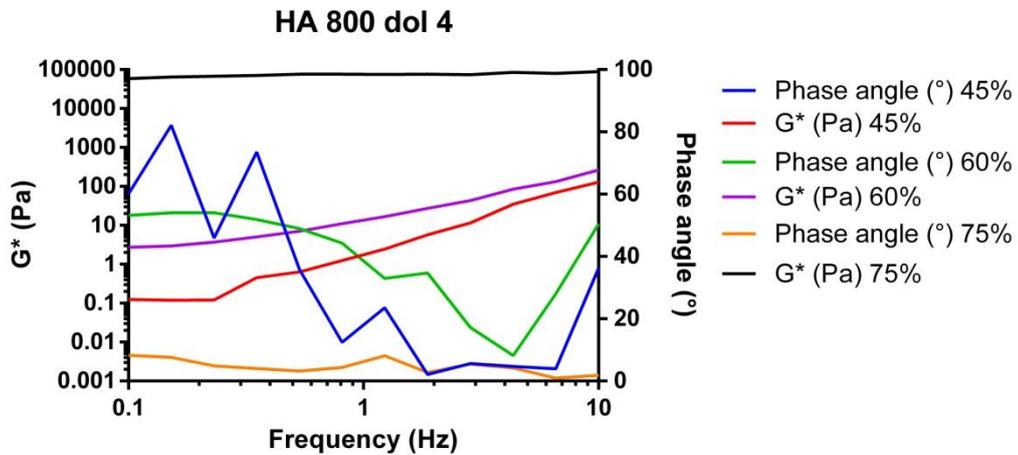


Figura 4.18: Modulo complesso  $G^*$  e *phase angle*( $^{\circ}$ ) al variare della concentrazione in massa di polvere per sospensione preparata con polvere calcinata a  $800^{\circ}\text{C}$  in rapporto HA:acqua:disperdente pari a 73:23:4.

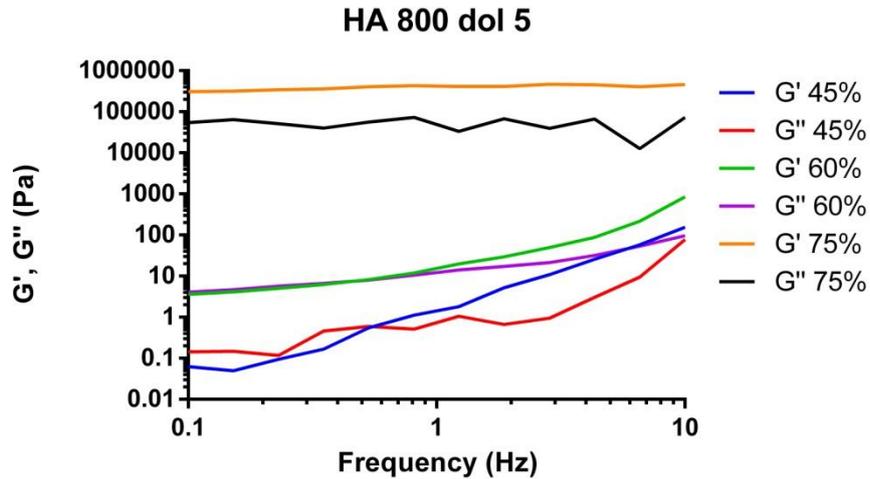


Figura 4.19: Modulo elastico  $G'$  e modulo viscoso  $G''$  al variare della concentrazione in massa di polvere per sospensione preparata con polvere calcinata a  $800^{\circ}\text{C}$  in rapporto HA:acqua:disperdente pari a 73:22:5.

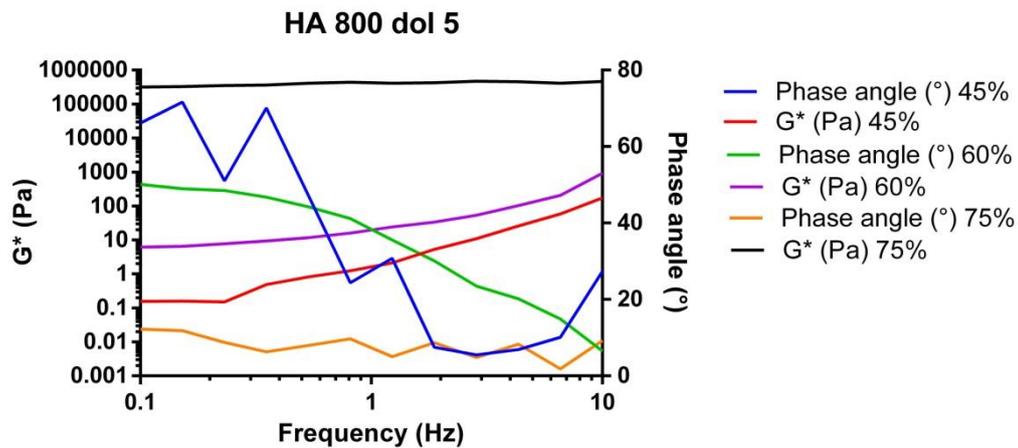


Figura 4.20: Modulo complesso  $G^*$  e phaseangle( $^{\circ}$ ) al variare della concentrazione in massa di polvere per sospensione preparata con polvere calcinata a  $800^{\circ}\text{C}$  in rapporto HA:acqua:disperdente pari a 73:22:5.

I risultati dei test dinamici per le sospensioni con polvere calcinata a  $1000^{\circ}\text{C}$  sono riportati nelle Figure 4.24 (dol 3), 4.25 (dol3), 4.26 (dol4), 4.27 (dol 4), 4.28 (dol 5), 4.29 (dol 5):

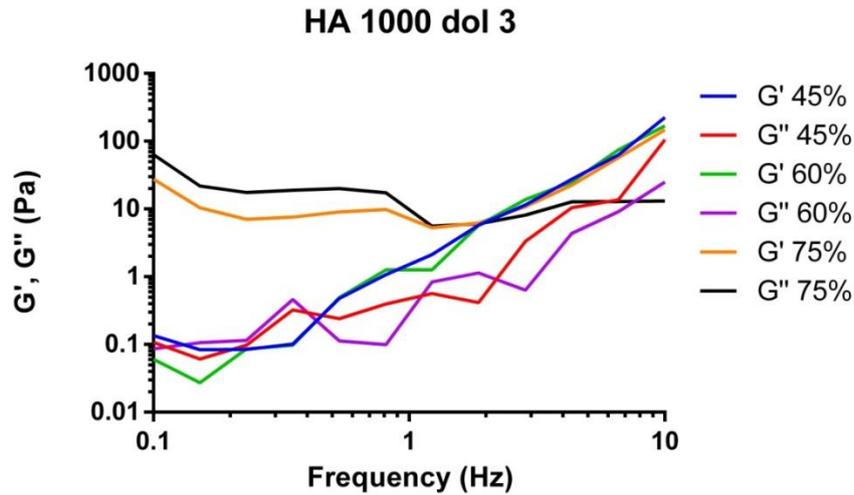


Figura 4.21: Modulo elastico  $G'$  e modulo viscoso  $G''$  al variare della concentrazione in massa di polvere per sospensione preparata con polvere calcinata a  $1000^{\circ}\text{C}$  in rapporto HA:acqua:disperdente pari a 73:24:3.

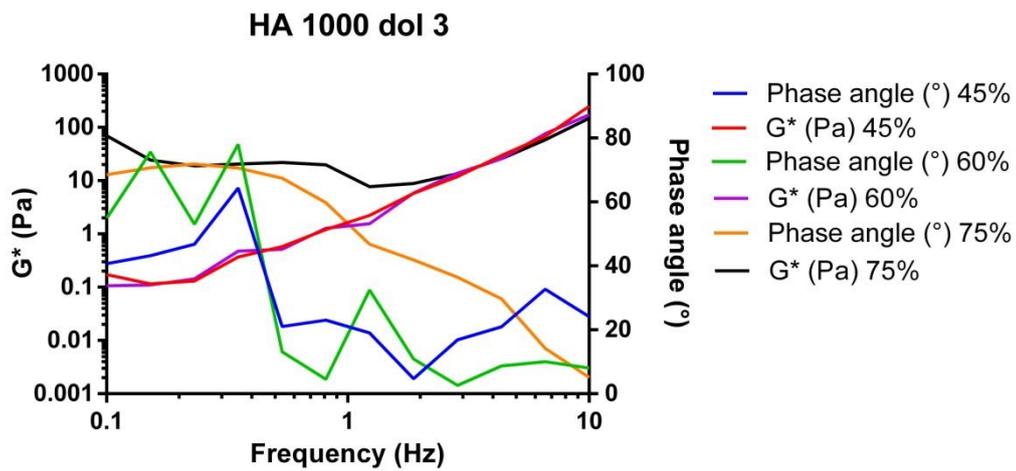


Figura 4.22: Modulo complesso  $G^*$ , phaseangle( $^{\circ}$ ) al variare della concentrazione in massa di polvere per sospensione preparata con polvere calcinata a  $1000^{\circ}\text{C}$  in rapporto HA:acqua:disperdente pari a 73:24:3.

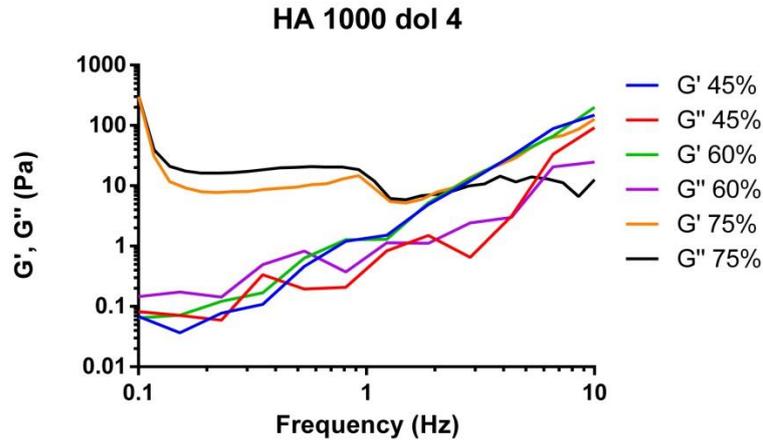


Figura 4.23: Modulo elastico  $G'$ , modulo viscoso  $G''$  al variare della concentrazione in massa di polvere per sospensione preparata con polvere calcinata a 1000°C in rapporto HA:acqua:disperdente pari a 73:23:4.

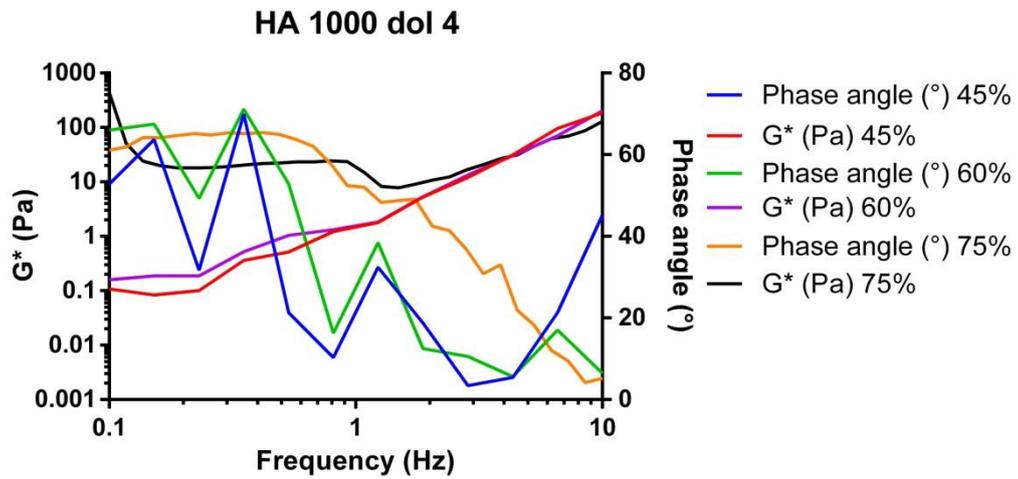


Figura 4.24: Modulo complesso  $G^*$ , phaseangle(°) al variare della concentrazione in massa di polvere per sospensione preparata con polvere calcinata a 1000°C in rapporto HA:acqua:disperdente pari a 73:23:4.

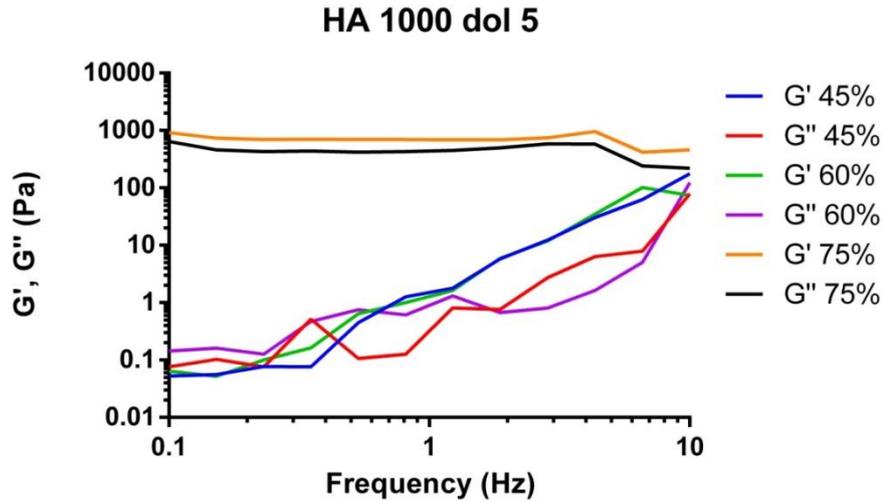


Figura 4.25: Modulo elastico  $G'$ , modulo viscoso  $G''$  al variare della concentrazione in massa di polvere per sospensione preparata con polvere calcinata a  $1000^{\circ}\text{C}$  in rapporto HA:acqua:disperdente pari a 73:22:5.

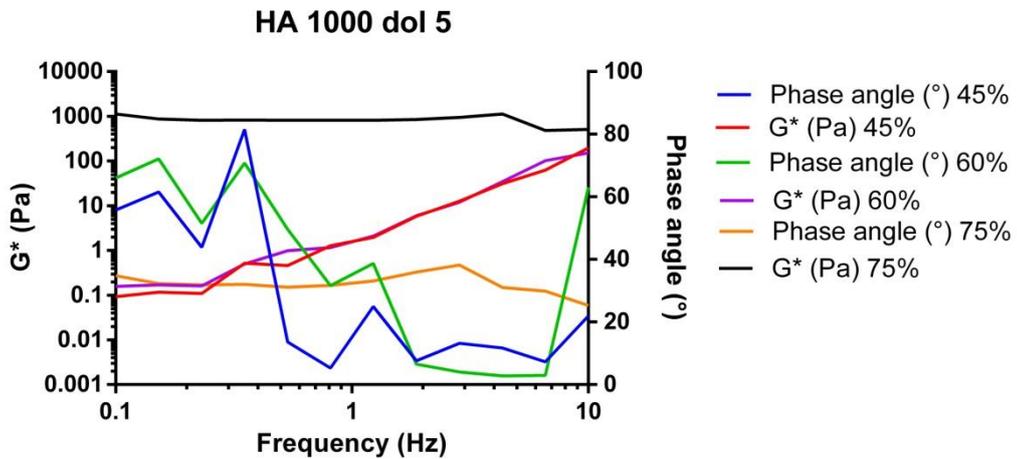


Figura 4.26: Modulo complesso  $G^*$ , phaseangle( $^{\circ}$ ) al variare della concentrazione in massa di polvere per sospensione preparata con polvere calcinata a  $1000^{\circ}\text{C}$  in rapporto HA:acqua:disperdente pari a 73:22:5.

Le Figure 4.30 e 4.31 che seguono mostrano il confronto del valore dei moduli  $G'$  e  $G''$  al variare della concentrazione di polvere e deflocculante:

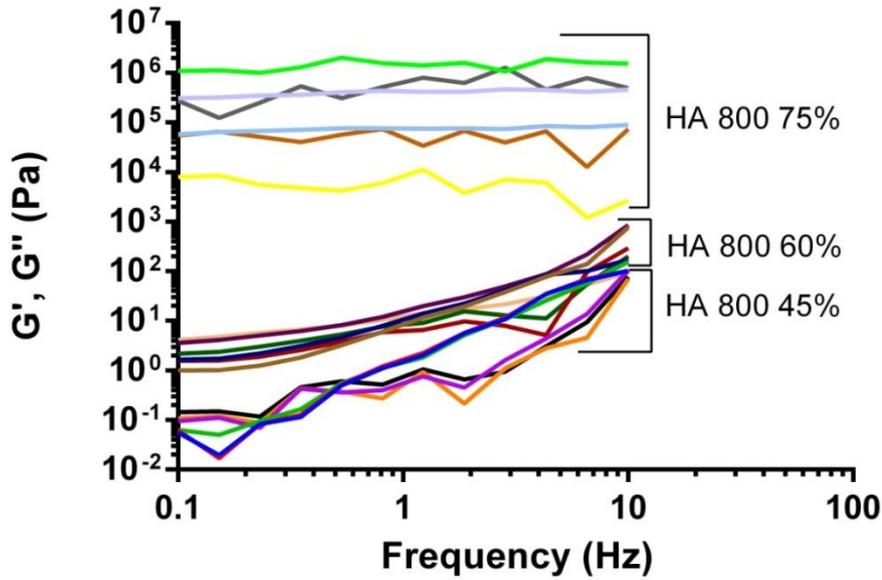


Figura 4.27: Confronto tra  $G'$  e  $G''$  al variare della concentrazione di polvere e di disperdente per polveri calcinate a 800°C.

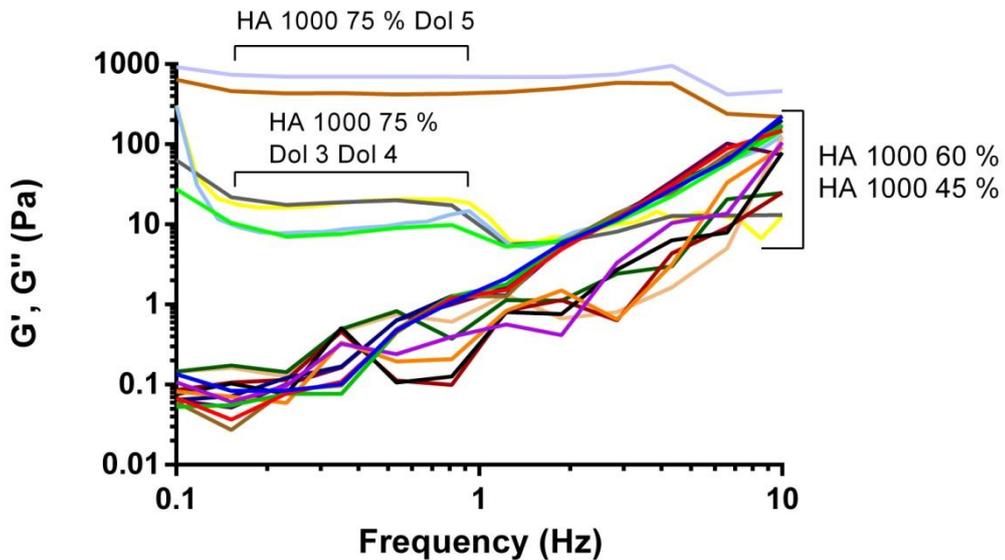


Figura 4.28: Confronto tra  $G'$  e  $G''$  al variare della concentrazione di polvere e di disperdente per polveri calcinate a 1000°C.

Come avviene nel caso della viscosità, il valore dei moduli elastici e viscosi aumenta considerevolmente all'aumentare della concentrazione di HA nelle sospensioni, soprattutto per le sospensioni con polvere calcinata a 800°C (vedi

Figura 4.30). Nel caso di polveri calcinate a 1000°C questo incremento risulta meno significativo e, come si apprezza in Fig. 4.31, le sospensioni concentrate al 45% e 60% in peso presentano valori molto simili a basse frequenze, divergendo solo leggermente a frequenze superiori. L'effetto del deflocculante è invece più marcato a concentrazioni elevate di polvere, soprattutto per la polvere calcinata a 800°C per cui ne risultano curve ben distinte a parità di concentrazione. Le motivazioni di tali comportamenti possono essere le medesime addotte per il comportamento viscoso.

Per tutti i campioni concentrati al 45% e al 60% avviene una transizione tra modulo elastico e viscoso, in particolare il modulo elastico  $G'$  assume valori più elevati del modulo viscoso  $G''$  ad una certa frequenza, detta *Crossover Frequency*. I valori di *Crossover Frequency* per le varie sospensioni sono riportati in Tab. X.

Il parametro  $G''$ , che rappresenta la componente viscosa del comportamento viscoelastico, esprime la capacità del materiale di dissipare l'energia, domina a basse frequenze. Al contrario  $G'$ , che rappresenta la parte elastica del comportamento viscoelastico ed esprime la capacità del materiale di conservare l'energia, è preponderante alle alte frequenze.

Di conseguenza, il materiale, a concentrazioni del 45% e 60%, in corrispondenza di basse frequenze di sollecitazione presenta il comportamento tipico di un liquido, mentre ad alte frequenze si comporta come un solido elastico. Questo andamento è caratteristico di un liquido viscoelastico (Figura 4.32). A conferma di ciò si vedano i valori del *phase angle* (Fig. 4.19, 4.21, 4.23, 4.25, 4.27, 4.29), che a tali concentrazioni calano, passando da valori  $> 45^\circ$  (tipici di un comportamento viscoso) a valori  $< 45^\circ$  (tipici di un comportamento elastico).

Prendendo in considerazione le sospensioni concentrate al 75%, tutte quelle preparate con polvere calcinata a 800°C non presentano una transizione tra  $G'$  e  $G''$  e hanno un comportamento *gel-like* (Fig. 4.32). Invece, nel caso di sospensioni con polvere calcinata a 1000°C, solo quella preparata in rapporto HA:acqua:dispersante pari a 73:22:5 (dol 5) ha un comportamento *gel-like*. Le altre due si comportano come un liquido viscoelastico.

Per sospensioni gel-like, il valore del *phase angle* è prossimo a zero, testimoniandone anche l'elevata viscosità istantanea.

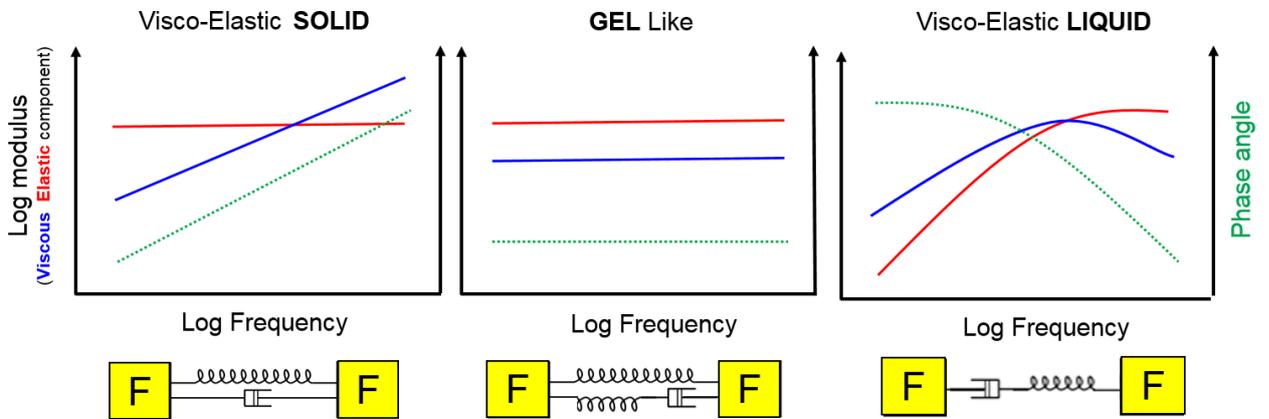


Figura 4.29: Risposta in frequenza tipica per un solido viscoelastico, un liquido viscoelastico e un gel nei test oscillatori. (Fonte: A Basic Introduction to Rheology, White Paper of Malvern Instruments Limited, 2016).

%HA	HA 800			HA 1000		
	73:24:3 Dol3 (Hz)	73:23:4 Dol4 (Hz)	73:22:5 Dol5(Hz)	73:24:3 Dol3 (Hz)	73:23:4 Dol4 (Hz)	73:22:5 Dol5 (Hz)
45	0.49 ± 0.02	0.49 ± 0.01	0.55 ± 0.02	0.45 ± 0.05	0.43 ± 0.01	0.44 ± 0.02
60	0.76 ± 0.06	0.75 ± 0.05	0.46 ± 0.09	0.44 ± 0.02	0.58 ± 0.01	0.59 ± 0.01
75	-	-	-	1.74 ± 0.64	1.99 ± 0.22	-

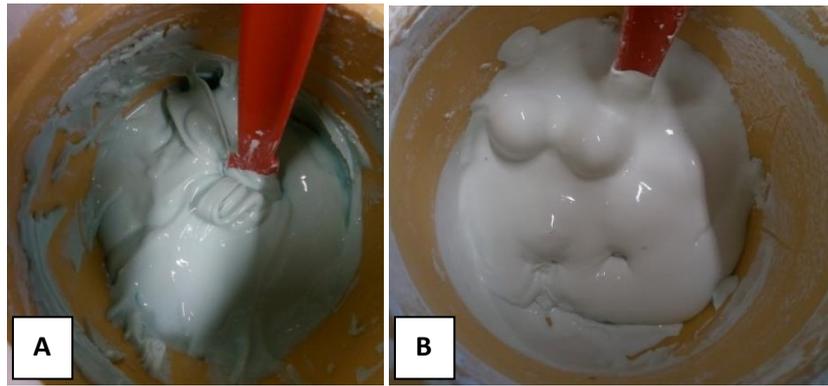
Tabella X: Crossover frequency per le varie sospensioni.

## 4.6 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI MACROPOROSI

Le sospensioni per Foaming Diretto sono state preparate utilizzando i materiali e le dosi riportate in Tabella II.

Le caratteristiche reologiche delle sospensioni assumono una notevole importanza nella fase di incorporazione di aria in forma di bolle, che per questo motivo ha presentato differenze tra una sospensione e l'altra. Nel caso della sospensione con polvere calcinata a 800°C e in rapporto 73:23:4 ho dovuto incrementare dosi di acqua, Dolapix CA, Olimpicon A e W53. Ho aggiunto ulteriormente: 0.18 g di Dolapix, 1 g di acqua, 0.6 g di Olimpicon e 0.6 g di W53. Anche per la sospensione con polvere calcinata a 800°C e in rapporto 73:24:3 ho aggiunto 0.2 g di acqua, 1.95 g di Olimpicon A e 0.70 g di W53 in più rispetto alla dose proposta. Queste due tipologie di sospensioni sono quelle con meno concentrazione di deflocculante e con viscosità, moduli elastici e viscosi più elevati. Questo comporta una difficoltà nell'incorporazione dei gas durante il foaming con le dosi "normali" di agenti surfattanti che, in tali quantità, non sono in grado di dare vita ad una forza elettrostatica e sterica tale da ridurre la tensione superficiale del liquido e inibire il collasso della schiuma.

Le differenze maggiori tra i vari tipi di sospensione sono date dalle differenti temperature di calcinazione. Ciò si rivela nei risultati delle analisi fisico-chimiche e reologiche e si rispecchia anche nell'aspetto della sospensione: come si può apprezzare dalla Figura 4.33, la sospensione di HA calcinata a 800°C in rapporto 73:23:4 concentrata al 73% è molto più "pastosa" rispetto a quella di HA calcinata a 1000°C al 73% sempre in rapporto 73:23:4.



**Figura 4.30:**A: Sospensione con polvere calcinata a 800°C e in rapporto 73:23:4; B: sospensione con polvere di HA calcinata a 1000°C al 73% in rapporto 73:23:4.

Il risultato del foaming diretto non è stato soddisfacente per il campione ottenuto con la sospensione preparata con polvere calcinata a 800°C e in rapporto 73:22:5.

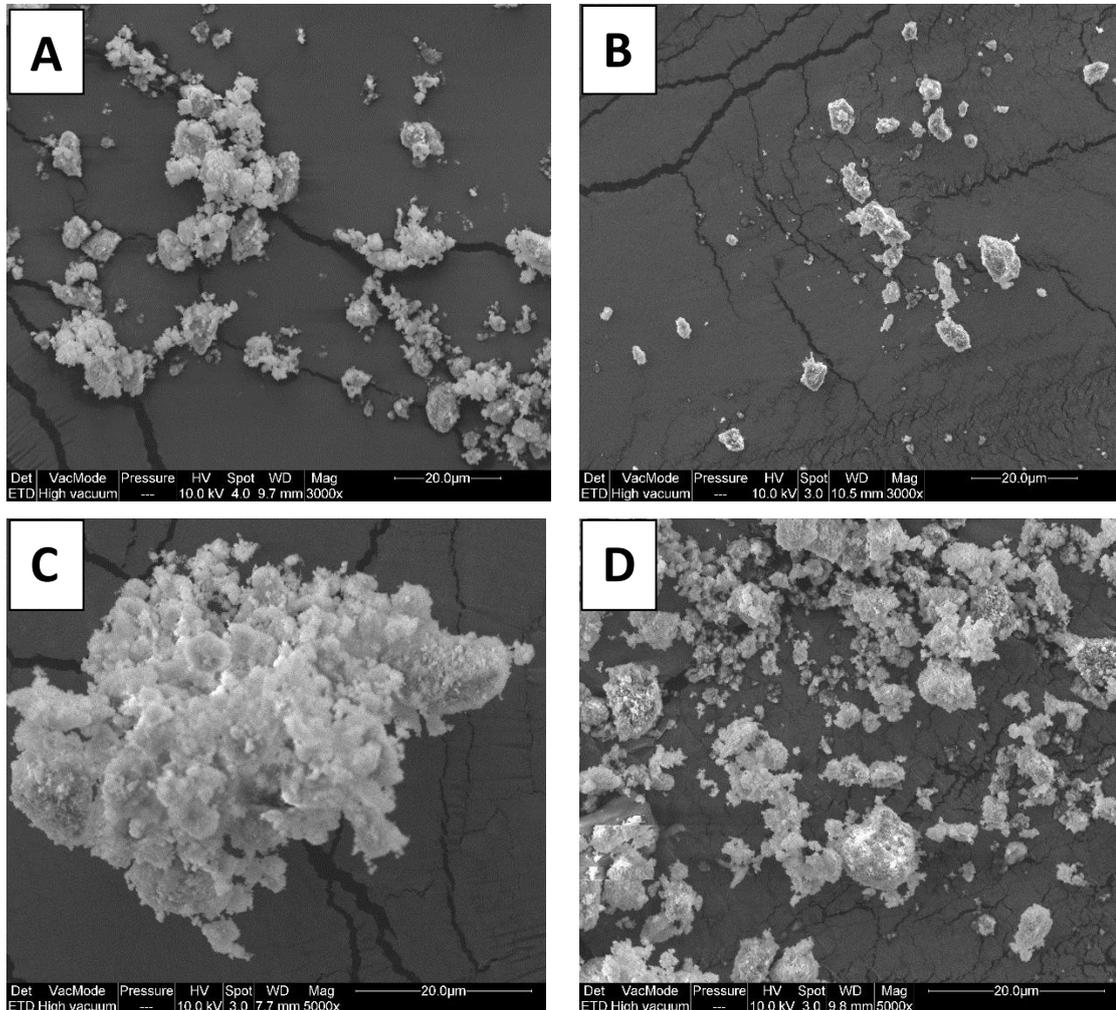
La sospensione aveva incorporato gas a tal punto da occupare quasi tutto il volume della giara utilizzando le dosi di schiumogeno “normali”, ma la schiuma presentava agglomerati disomogenei e indesiderati tali da rendere non facilmente colabile la sospensione negli stampi e inadeguato lo scaffold macroporoso ottenuto (vedi Figura 4.34). La disomogeneità della schiuma comporta l’assenza di idonea porosità e compromette le proprietà meccaniche del materiale finale.



**Figura 4.31:** Scaffold macroporoso “inadeguato” a confronto con uno scaffold “normale”.

## 4.7 ANALISI AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE

Al microscopio elettronico a scansione sono state osservate sia le polveri di HA calcinate, sia gli scaffold macroporosi ottenuti.

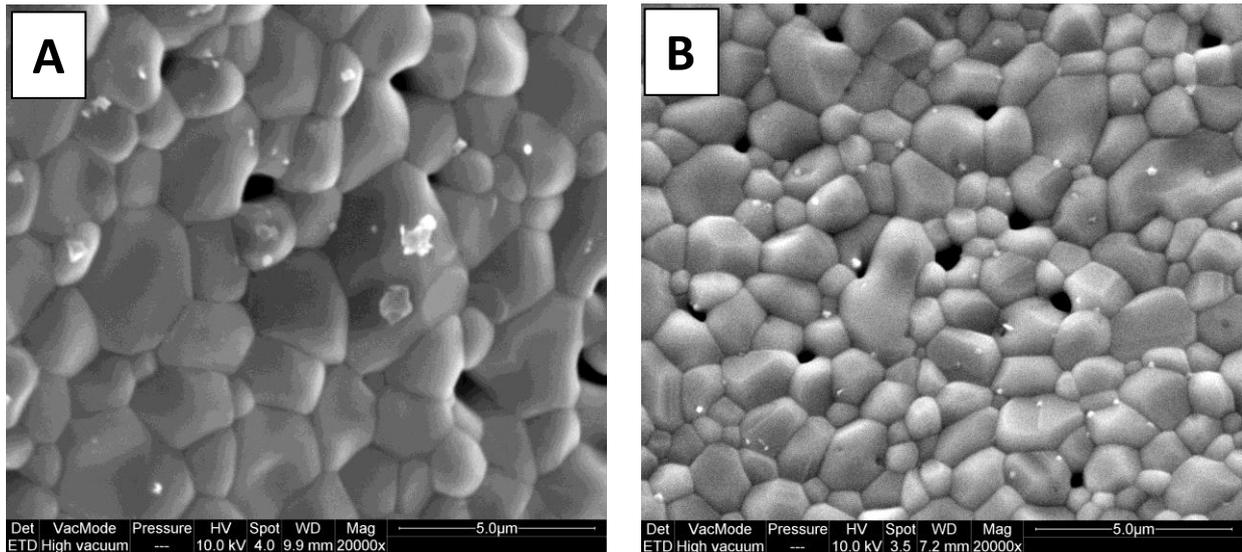


**Figura 4.32: Immagine SEM di polvere di HA calcinata a 800°C (A e C). Immagini SEM di polvere di HA calcinata a 1000°C (B e D).**

In base ai dati di superficie specifica ottenuti, la polvere con superficie specifica maggiore è quella calcinata a 800°C. Dovrebbe quindi essere quella con particelle di diametro inferiore. Tuttavia, ciò non risulta dalle analisi granulometriche. Come si osserva dalla Figura 4.35, la polvere di HA calcinata a 800°C è più fine ma forma aggregati di grandi dimensioni, al contrario di quella calcinata a 1000°C. Questi aggregati vengono riconosciuti dalle analisi

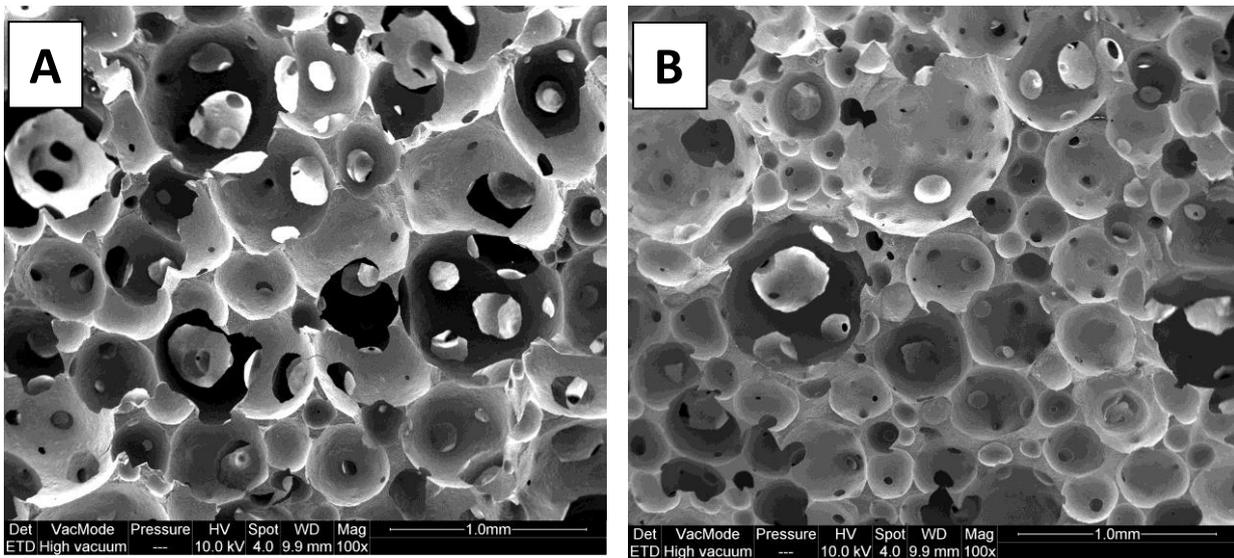
granulometriche come particelle di dimensioni più grandi, confermando le ipotesi riportate al paragrafo 4.1.

Che la polvere di HA calcinata a 800°C abbia diametro inferiore si può osservare dalla Figura 4.36, dove i grani compattati e strettamente coesi nella microstruttura dello scaffold sinterizzato sono in media più piccoli nel campione con polvere calcinata a temperatura inferiore.



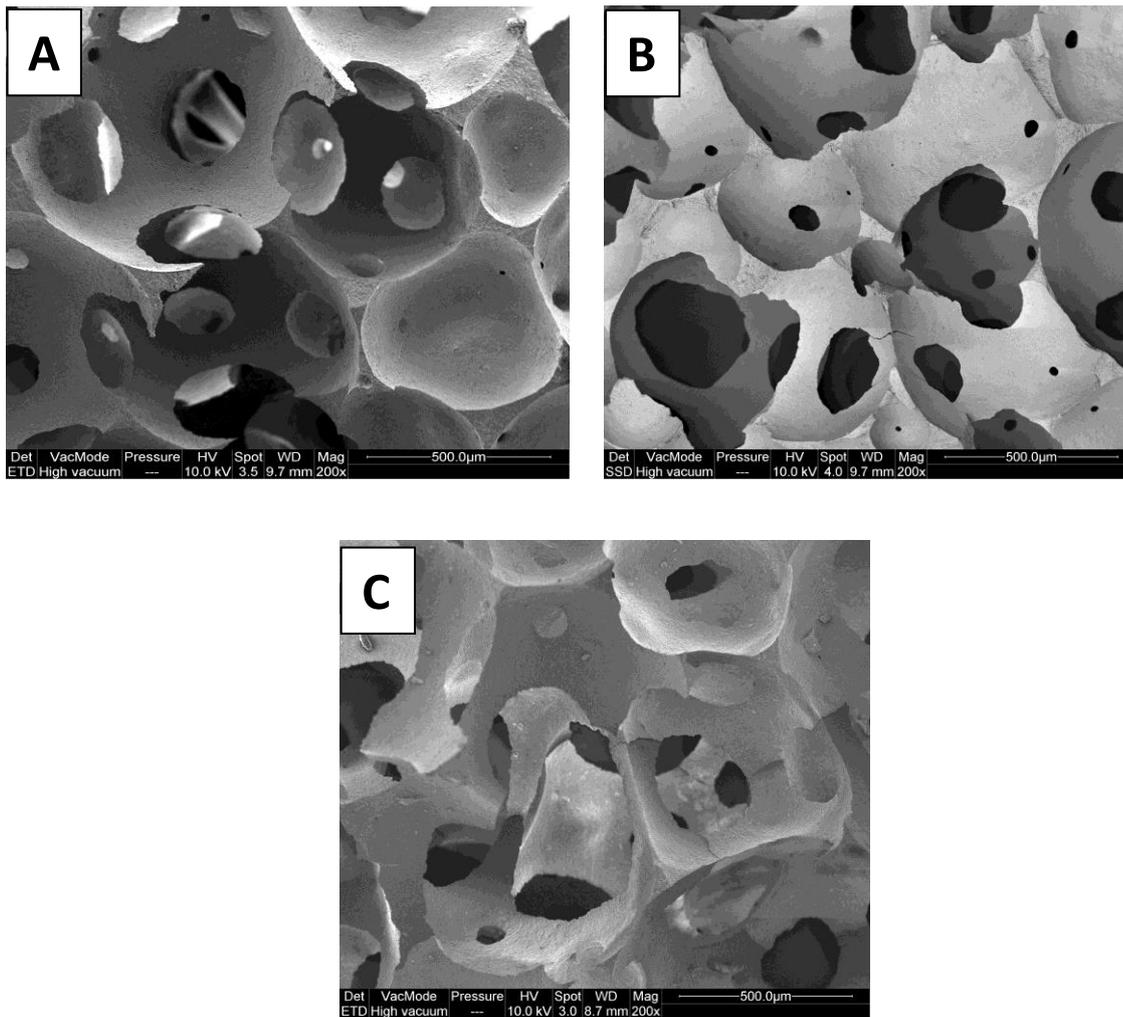
**Figura 4.33** A) Immagine SEM del campione poroso preparato con polvere di HA calcinata a 1000°C in rapporto 73:23:4. B) Immagine SEM del campione poroso preparato con polvere di HA calcinata a 800°C in rapporto 73:23:4.

In Figura 4.37 è mostrata la morfologia degli scaffold sinterizzati, ottenuti con sospensioni preparate con polvere di HA calcinata a 1000°C in rapporto 73:23:4 e con polvere di HA calcinata a 800°C in rapporto 73:23:4. I pori risultano essere di dimensioni diverse, hanno un'architettura sferica e sono interconnessi, a testimoniare la buona riuscita del processo di foaming diretto. La porosità del campione ottenuto con polvere calcinata a 800°C è leggermente inferiore (83.7%) rispetto a quella ottenuta con polvere calcinata a 1000°C (87.5%) e visivamente, la dimensione dei pori, è inferiore.



**Figura 4.34:A) Immagine SEM della morfologia dei pori del campione poroso preparato con polvere di HA calcinata a 1000°C in rapporto 73:23:4. B) Immagine SEM della morfologia dei pori del campione poroso preparato con polvere di HA calcinata a 800°C in rapporto 73:23:4.**

In Figura 4.38 sono riportate a confronto le immagini SEM con la morfologia dei pori dei campioni preparati con sospensioni con HA calcinata a 1000°C e con le diverse concentrazioni di deflocculante. Per tutti i tipi di campioni, i pori risultano sferici e altamente interconnessi.



**Figura 4.35:** A) Immagine SEM della morfologia dei pori del campione poroso preparato con polvere di HA calcinata a 1000°C in rapporto 73:24:3. B) Immagine SEM della morfologia dei pori del campione poroso preparato con polvere di HA calcinata a 1000°C in rapporto 73:23:4. C) Immagine SEM della morfologia dei pori del campione poroso preparato con polvere di HA calcinata a 1000°C in rapporto 73:22:5.

## CONCLUSIONI

Questa attività sperimentale ha portato alla preparazione e caratterizzazione reologica di sospensioni bioceramiche per la realizzazione di scaffold macroporosi per rigenerazione del tessuto osseo, sia mediante tecniche convenzionali quali Foaming Diretto, sia come sospensioni potenzialmente estrudibili per 3D printing. Sono di seguito riassunte le principali osservazioni sperimentali:

- Il trattamento termico di *calcinazione*, riducendo la superficie specifica e l'attività superficiale delle polveri, è il parametro che maggiormente influenza le proprietà chimico-fisiche e reologiche delle sospensioni;
- Le polveri calcinate a 800°C possiedono una superficie specifica maggiore, una dimensione granulometrica inferiore e una cristallinità inferiore rispetto a quelle calcinate a 1000°C;
- Le sospensioni preparate con polveri calcinate a 800°C presentano, a parità di coefficiente  $\beta$ , una minore stabilità, ascrivibile alla maggiore superficie specifica che favorisce l'agglomerazione;
- È stata ricavata una relazione matematica tra limite di scorrimento delle sospensioni e coefficiente  $\beta$ , mediante analisi di regressione dei dati ( $\sigma_c = -221 \log(\beta) + 582.1$ ). L'implementazione di questa relazione nel modello di Ellis, riportato in letteratura, ha portato ad un adeguato fitting dei dati sperimentali.
- Le sospensioni calcinate a 800°C presentano inoltre viscosità e moduli viscoelastici più elevati, per concentrazioni di polvere in massa del 45%, 60% e 75%. In corrispondenza di concentrazioni al 75% possiedono un comportamento gel-like, senza transizione tra moduli elastico e viscoso;
- Si ritiene che per queste ragioni le sospensioni contenenti HA calcinata ad 800°C, rispetto alle sospensioni preparate con polvere calcinata a 1000°C, risultano più viscoso e necessitano di tempi maggiori di foaming e di quantità più elevate di reagenti schiumogeni. Tuttavia, il foaming risulta essere soddisfacente anche con tali sospensioni (eccetto *dol 5*), in grado di generare ceramici 3D ad elevata porosità interconnessa e ottimo grado di coalescenza tra i grani. La porosità è leggermente inferiore con

sospensioni preparate con polvere calcinata a 800°C, così come la distribuzione dimensionale dei pori.

- A parità di temperatura di calcinazione, la concentrazione di disperdente (nel range investigato) non dimostra effetti significativi sulla stabilità delle sospensioni. In particolare, la sospensione che ha mostrato la maggiore stabilità (potenziale  $\zeta$  maggiore in valore assoluto) si è rivelata quella preparata con polvere calcinata a 1000°C con rapporto HA:H<sub>2</sub>O:disperdente=73:23:4.
- A parità di temperatura di calcinazione e per basse concentrazioni di polvere, la viscosità e viscoelasticità delle sospensioni non sono significativamente influenzate dalla concentrazione di disperdente. Tuttavia, l'effetto del disperdente si manifesta maggiormente all'aumentare della concentrazione di polvere in sospensione. Inoltre, l'aumento di deflocculante non è sistematicamente associato ad un proporzionale calo nella viscosità o nei moduli viscoelastici.
- Sospensioni concentrate al 45% e al 60%, indipendentemente dalla concentrazione di disperdente, presentano valori di *crossover frequency* confrontabili e si comportano come liquidi viscoelastici. Al 75% presentano invece un comportamento gel-like, eccetto le sospensioni preparate con polvere calcinata a 1000°C con rapporto HA:H<sub>2</sub>O:disperdente=73:23:4 e con rapporto HA:H<sub>2</sub>O:disperdente=73:24:3.
- Il metodo di foaming diretto applicato a tutte le sospensioni, nella maggior parte dei casi ha consentito di ottenere scaffold macroporosi con pori sferici e altamente interconnessi. Tuttavia, la sospensione preparata con polvere calcinata a 800°C in rapporto HA:H<sub>2</sub>O:disperdente=73:22:5 non ha consentito l'ottenimento di scaffold.

Questa attività sperimentale consente pertanto di concludere che la calcinazione di polveri a temperature non inferiori a 1000°C favorisce la preparazione di sospensioni per realizzare scaffold macroporosi con metodo di Foaming Diretto, mentre a parità di concentrazione polveri calcinate a 800°C mostrano una viscoelasticità più idonea a tecniche di estrusione controllata come il 3D printing/robocasting.

La caratterizzazione reologica di sospensioni bioceramiche presenta molteplici criticità nello studio sistematico dell'effetto dei vari parametri di processo sulle proprietà viscoelastiche, non ancora del tutto esplorato nella letteratura scientifica.

I risultati ottenuti con la presente attività sono di particolare interesse nell'ottica di una progettazione sempre più precisa di sospensioni bioceramiche; in questo contesto, l'ottenimento di materiali estrudibili con caratteristiche viscoelastiche predicibili risulta di fondamentale importanza nella tecnologia del 3D printing.

## APPENDICE

---

Codice MATLAB per fitting con modello di Ellis (vedi paragrafo 4.5.1).

```
%fitting modello di Ellis con curva viscosità di HA 1000 dol 3 75%

%mu_vera=valori di viscosità della prova
%sigma c= limite di scorrimento tratto dalla prova
%sigma= valori di stress della prova
%m=parametro di ellis
%mu0= viscosità iniziale
%muinf=viscosità al valore massimo di stress

mu_vera=[...];

sigma=[...];

beta=1.81;
mu0=2*36.16;
muinf=mu_vera(length(mu_vera))
z=0;
i=0;
sigmac = -221*log(beta) + 582.1
for m=0.01:0.1:100
i=i+1;
    z(i)=m;
mu=(mu0/2-muinf)./(1+(sigma/sigmac).^m)+muinf;
err_MSE(i)=immse(mu,mu_vera); %MEAN SQUARE ERROR
err_RSD(i)=sqrt((sum(mu_vera-mu).^2)/(length(sigma)-2)); %RSD
end
Erroremin_MSE=min(err_MSE);
index_MSE=find(err_MSE==Erroremin_MSE);
Erroremin_RSD=min(err_RSD);
index_RSD=find(err_RSD==Erroremin_RSD);
fprintf('Il grafico con MSE minore ha m = %d \n',z(index_MSE))
fprintf('Il grafico con RSD minore ha m = %d',z(index_RSD))
figure
subplot(2,1,1)
mu2_MSE=(mu0/2-2*muinf)./(1+(sigma/sigmac).^z(index_MSE))+2*muinf;
loglog(sigma, mu_vera,'o')
hold on
loglog(sigma, mu2_MSE)
title(['MSE Parametro di Ellis m= ',num2str(z(index_MSE))])
subplot(2,1,2)
mu2_RSD=(mu0/2-2*muinf)./(1+(sigma/sigmac).^z(index_RSD))+2*muinf;
loglog(sigma, mu2_RSD)
hold on
loglog(sigma, mu_vera,'o')
title(['RSD Parametro di Ellis m= ',num2str(z(index_RSD))])
```

## BIBLIOGRAFIA

---

1. Schemitsch, E.H., *Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size!* J Orthop Trauma, 2017. **31 Suppl 5**: p. S20-S22.
2. Stevens, M.M., *Biomaterials for bone tissue engineering*. Materials Today, 2008. **11**(5): p. 18-25.
3. Abou Neel, E.A., et al., *Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone*. Int J Nanomedicine, 2016. **11**: p. 4743-4763.
4. Fernandez de Grado, G., et al., *Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management*. J Tissue Eng, 2018. **9**: p. 2041731418776819.
5. Bongio, M., et al., *Development of bone substitute materials: from 'biocompatible' to 'instructive'*. Journal of Materials Chemistry, 2010. **20**(40): p. 8747-8759.
6. Tripathi, G. and B. Basu, *A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations*. Ceramics International, 2012. **38**(1): p. 341-349.
7. Ohji, T. and M. Fukushima, *Macro-porous ceramics: processing and properties*. International Materials Reviews, 2012. **57**(2): p. 115-131.
8. Lew, K.-S., et al., *Macroporous bioceramics: A remarkable material for bone regeneration*. Journal of Biomaterials Applications, 2011. **27**(3): p. 345-358.
9. Kay, M.I., R.A. Young, and A.S. Posner, *Crystal Structure of Hydroxyapatite*. Nature, 1964. **204**(4963): p. 1050-1052.
10. Tõnsuaadu, K., et al., *A review on the thermal stability of calcium apatites*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2012. **110**(2): p. 647-659.
11. Liverani, L., et al., *Porous Biomaterials and Scaffolds for Tissue Engineering*. 2017.
12. Kim, I.J., et al., *Wet Foam Stability from Colloidal Suspension to Porous Ceramics: A Review*. J. Korean Ceram. Soc, 2019. **56**(3): p. 211-232.
13. Studart, A.R., et al., *Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review*. Journal of the American Ceramic Society, 2006. **89**(6): p. 1771-1789.
14. Dapporto, M., et al., *A novel route for the synthesis of macroporous bioceramics for bone regeneration*. Journal of the European Ceramic Society, 2016. **36**(9): p. 2383-2388.
15. Ma, H., et al., *3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy*. Acta Biomater, 2018. **79**: p. 37-59.
16. Leukers, B., et al., *Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing*. J Mater Sci Mater Med, 2005. **16**(12): p. 1121-4.
17. Chen, Z., et al., *3D printing of ceramics: A review*. Journal of the European Ceramic Society, 2019. **39**(4): p. 661-687.
18. Ben-Arfa, B.A.E., et al., *Robocasting: Prediction of ink printability in solgel bioactive glass*. Journal of the American Ceramic Society, 2019. **102**(4): p. 1608-1618.
19. Maazouz, Y., et al., *Robocasting of biomimetic hydroxyapatite scaffolds using self-setting inks*. Journal of Materials Chemistry B, 2014. **2**(33): p. 5378-5386.
20. Ahmed, Y., S. El-Sheikh, and Z. Zaki, *Changes in hydroxyapatite powder properties via heat treatment*. Bulletin of Materials Science, 2015. **38**.
21. Mao, X., *Processing of Ceramic Foams*, in *Recent Advances in Porous Ceramics*, U.B. Al-Naib, Editor. 2017.
22. Champion, E., *Sintering of calcium phosphate bioceramics*. Acta Biomater, 2013. **9**(4): p. 5855-75.
23. Poralan, G., Jr., et al., *X-ray diffraction and infrared spectroscopy analyses on the crystallinity of engineered biological hydroxyapatite for medical application*. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2015. **79**: p. 012028.

24. Wang, T., A. Dorner-Reisel, and E. Müller, *Thermogravimetric and thermokinetic investigation of the dehydroxylation of a hydroxyapatite powder*. Journal of the European Ceramic Society, 2004. **24**: p. 693-698.
25. Gardini, D., C. Galassi, and R. Lapasin, *Rheology of Hydroxyapatite Dispersions*. Journal of the American Ceramic Society, 2005. **88**: p. 271-276.
26. Lelièvre, F., D. Bernache-Assollant, and T. Chartier, *Influence of powder characteristics on the rheological behaviour of hydroxyapatite slurries*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1996. **7**(8): p. 489-494.
27. Maas, M., U. Hess, and K. Rezwani, *The contribution of rheology for designing hydroxyapatite biomaterials*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2014. **19**(6): p. 585-593.

# RINGRAZIAMENTI

---

È doveroso da parte mia, in conclusione, ringraziare chi ha contribuito alla realizzazione di questo elaborato:

In primis, il mio relatore Prof. Emanuele Domenico Giordano che ha reso possibile l'inizio di questa attività presso l'Istituto di Scienza e Tecnologia dei Materiali Ceramici (ISTEC-CNR) di Faenza;

Il Dott. Simone Sprio che con grande disponibilità mi ha accolto nel suo gruppo di ricerca consentendomi e ai svolgere questo lavoro;

L'Ing. Massimiliano Dapporto per il suo prezioso aiuto, per avermi illustrato con grande pazienza e passione le conoscenze e i concetti necessari per portare avanti il lavoro, per avermi affiancata nell'attività pratica ed per essere stato sempre disponibile per rispondere ad ogni mio dubbio e richiesta;

L'Ing. Davide Gardini per il supporto e la discussione dei dati di caratterizzazione reologica;

Il Direttore, il personale dei laboratori, i dottorandi, gli assegnisti e i tesisti dell'Istituto di Scienza e Tecnologia dei Materiali Ceramici (ISTEC-CNR);

Un ringraziamento speciale ai miei genitori Nelli e Vanni, a mio fratello Francesco e a Lorenzo per il supporto fornito in tutti questi anni di studi.