



UNIVERSITÀ  
DI PAVIA

FACOLTA' DI INGEGNERIA  
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE E DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA

TESI DI LAUREA

TITOLO

CEMENTI BRUSHITICI DROGATI CON ZINCO E MAGNESIO:  
SINTESI, CARATTERIZZAZIONE E APPLICAZIONE  
COME SISTEMA DI DRUG DELIVERY DI MELOXICAM

Candidato: Clara Chiovetta

Relatore: Prof.ssa Marcella Bini

A.A. 2024/2025

# INDICE

<b>Sommario .....</b>	<b>4</b>
<b>Capitolo 1 .....</b>	<b>5</b>
<b>Introduzione.....</b>	<b>5</b>
1.1 Evoluzione dei cementi a base di fosfato di calcio .....	5
1.2 Classificazione dei CPC in base al prodotto di indurimento .....	6
1.3 Microstruttura e porosità del cemento.....	8
1.4 Meccanismo di rigenerazione ossea .....	9
1.5 Proprietà meccaniche.....	9
1.6 Sostituzioni ioniche nelle strutture di CPC .....	12
1.6.1 Meccanismo di sostituzione ionica nel $\beta$ -TCP .....	12
1.7 Cementi di fosfato di calcio come vettori di farmaci .....	14
1.7.1 Incorporazione del farmaco nei CPC .....	14
1.7.2 Interazioni tra cemento di fosfato di calcio e farmaci .....	15
1.7.3 Cinetica del rilascio del farmaco dai CPC .....	15
1.8 Scopo della tesi.....	17
<b>Capitolo 2 .....</b>	<b>18</b>
<b>Caratterizzazione dei materiali .....</b>	<b>18</b>
2.1 Misure di diffrazione a raggi X di polveri (XRD).....	18
2.1.1 Raffinamento strutturale mediante metodo di Rietveld .....	20
2.2 Misure di spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) .....	21
2.3 Misure di microscopia elettronica a scansione (SEM) e spettroscopia a dispersione di energia (EDS). .....	22
2.4 Misure di dissoluzione in vitro .....	23
2.5 Determinazione della densità apparente e della porosità.....	24
2.6 Caratterizzazione meccanica .....	25
<b>Capitolo 3 .....</b>	<b>29</b>
<b>Materiali e sintesi .....</b>	<b>29</b>
3.1 $\beta$ -TCP.....	29
3.1.1 Sintesi del $\beta$ -TCP .....	29
3.2 Meloxicam .....	30
3.3 Brushite .....	31
3.3.1. Sintesi dei cementi brushitici drogati.....	33
<b>Capitolo 4 .....</b>	<b>34</b>
<b>Risultati della caratterizzazione dei <math>\beta</math>-TCP.....</b>	<b>34</b>
4.1 Misure a raggi X.....	34
4.2 Misure FT-IR.....	35
4.3 Misure SEM/EDS.....	36
<b>Capitolo 5 .....</b>	<b>38</b>
<b>Risultati della caratterizzazione dei biocementi .....</b>	<b>38</b>

5.1 Misure a raggi X.....	38
5.1.1 Raffinamento strutturale mediante metodo di Rietveld .....	39
5.2 Misure FT-IR.....	42
5.2.1 Spettro FT-IR del meloxicam .....	43
5.2.2 Spettri FT-IR dei biocementi drogati con zinco .....	44
5.2.3 Spettri FT-IR dei biocementi drogati con magnesio.....	45
5.3 Misure SEM/EDS.....	46
5.4 Densità apparente e porosità.....	48
5.5 Analisi del rilascio farmaco.....	50
5.6 Prove meccaniche .....	51
<b>Conclusione.....</b>	<b>55</b>
<b>Appendice A.....</b>	<b>56</b>
A1. Spettro EDS dei $\beta$ -TCP .....	56
A2. Spettro EDS dei biocementi drogati zinco .....	57
A3. Spettro EDS dei biocementi drogati magnesio .....	58
A4. Curve di resistenza alla compressione dei biocementi drogati zinco .....	59
A5. Curve di resistenza alla compressione di cementi drogati magnesio.....	62
<b>Bibliografia e sitografia.....</b>	<b>65</b>

## Sommario

I cementi a base di fosfato di calcio rappresentano una classe di materiali ampiamente utilizzata in ambito biomedico come sostituti ossei per la riparazione di difetti che non guariscono spontaneamente, grazie alla loro bioattività, osteoconduttività e biodegradabilità. Inoltre, la loro capacità di indurire a temperatura ambiente consente l'incorporazione di farmaci e molecole biologicamente attive senza comprometterne la stabilità chimica.

Nel presente lavoro di tesi sono stati sintetizzati cementi brushitici drogati con zinco e magnesio con l'obiettivo di migliorare le proprietà e favorire una rigenerazione ossea più rapida ed efficace rispetto ai cementi brushitici puri. È noto, infatti, che lo zinco promuove la proliferazione e la differenziazione delle cellule osteoblastiche esercitando un effetto inibitorio sul riassorbimento osseo osteoclastico in vivo. Il magnesio, invece, svolge un ruolo significativo nel processo di calcificazione e la sua carenza potrebbe compromettere la crescita ossea, ridurre l'attività degli osteoblasti e degli osteoclasti, aumentare la fragilità delle ossa, portando all'osteoporosi.

La sintesi del cemento brushitico drogato è stata effettuata a partire da:  $\beta$ -tricalcio fosfato drogato con zinco e magnesio ( $\text{Ca}_{2.9}\text{Zn}_{0.1}(\text{PO}_4)_2$  e  $\text{Ca}_{2.9}\text{Mg}_{0.1}(\text{PO}_4)_2$  rispettivamente), ottenuto mediante sintesi allo stato solido ad alta temperatura a partire da carbonato di calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), fosfato di calcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) e drogante ( $\text{ZnO}$  o  $\text{MgO}$ ) e da monocalcio fosfato monoidrato ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , MCPM), di origine commerciale. Sono stati inoltre preparati cementi caricati con l'antinfiammatorio meloxicam, realizzando così sistemi di drug delivery che potrebbero essere utili nelle prime fasi post-intervento.

I campioni sono stati preparati in forma cilindrica per le misure meccaniche. Il rilascio del meloxicam è stato misurato a diversi tempi di immersione in una soluzione simulante i fluidi biologici del corpo umano, in accordo con i protocolli riportati in letteratura. I cementi sono stati caratterizzati prima e dopo immersione mediante diverse tecniche: diffrazione a raggi X (XRD), microscopia elettronica a scansione (SEM), spettroscopia a dispersione di energia (EDS), spettroscopia FT-IR, misure di porosità e prove meccaniche. I dati raccolti hanno permesso di analizzare l'effetto dei droganti, del farmaco e del tempo di immersione in soluzione sulla morfologia, sulle proprietà chimiche-composizionali e meccaniche dei cementi.

# Capitolo 1

## Introduzione

I difetti ossei rappresentano una delle problematiche più diffuse in ortopedia e possono derivare da infezioni, traumi, neoplasie e patologie congenite. Nella maggior parte dei casi, tali difetti richiedono interventi di innesto osseo, poiché non sono in grado di guarire spontaneamente, anche se un trattamento inadeguato può condurre a gravi complicanze, fino alla disabilità permanente o al decesso. Per questo motivo, la ricerca biomedica è fortemente orientata al costante sviluppo di materiali innovativi per la riparazione e la sostituzione del tessuto osseo [1]. Attualmente, i trattamenti principalmente utilizzati dai chirurghi ortopedici sono la fissazione interna e l'impianto di innesti ossei. Gli innesti autogeni sono tra i più efficaci, ma hanno una serie di limitazioni riguardanti la scarsa disponibilità di tessuto raccolto e le possibili complicazioni nel sito del prelievo. Anche gli innesti allogenici e gli xenoinnesti presentano diversi svantaggi, tra cui il rischio di rigetto e la trasmissione di malattie infettive. Dati i rischi di infezione e contaminazione derivanti dai materiali di origine naturale, la scoperta di materiali sintetici come i cementi a base di fosfato di calcio (Calcium Phosphate Cements, CPC) ha rappresentato un progresso significativo nelle strategie di rigenerazione e riparazione dei difetti ossei [2].

### 1.1 Evoluzione dei cementi a base di fosfato di calcio

Il fosfato di calcio, simile ai componenti minerali del tessuto osseo, è stato ampiamente utilizzato per fornire supporto strutturale, riempire i difetti e promuovere la rigenerazione dei difetti scheletrici. Tali dispositivi possono ridurre i tempi operatori, limitare i danni associati a un'ampia retrazione muscolare, diminuire l'estensione delle cicatrici e attenuare il dolore post-operatorio, favorendo un recupero più rapido del paziente [3].

Nel 1920, Albee e Morrison impiegarono il triplo fosfato di calcio come stimolo per la crescita ossea. I risultati indicarono che le fratture mostravano una consolidazione più rapida quando il triplo fosfato di calcio veniva iniettato nello spazio tra le estremità ossee, rispetto ai controlli non trattati [4].

Negli ultimi tre decenni, sono stati compiuti molti progressi che hanno migliorato le proprietà dei CPC. La Fig. 1 mostra l'evoluzione dei CPC dagli anni Ottanta fino ai primi anni Duemila, mettendo in evidenza i principali progressi ottenuti nel tempo in termini di composizione, proprietà e applicazioni cliniche.

Negli anni '80, i CPC possedevano certamente biocompatibilità e osteoconduttività ma le loro prestazioni erano ancora limitate, soprattutto dal punto di vista della resistenza meccanica e della stabilità una volta impiantati. Negli anni '90, l'introduzione di agenti gelificanti ha portato a un miglioramento significativo delle proprietà di lavorabilità riducendo il tempo di presa e aumentando la stabilità in ambiente acquoso. A partire dagli anni 2000, i CPC sono stati ulteriormente modificati attraverso l'aggiunta di diversi componenti funzionali, tra cui ioni citrato, porogeni, fibre, agenti gelificanti, sistemi di veicolazione di farmaci, proteine o cellule. Queste formulazioni avanzate hanno permesso di ottenere cementi con migliori proprietà di iniettabilità, radiopacità, resistenza meccanica ed elevata porosità, favorendo angiogenesi e osteoinduzione. La Fig. 1 evidenzia anche le sfide

ancora aperte nello sviluppo di una nuova generazione di CPC: in particolare andrebbero migliorate l'attività antibatterica, la capacità di carico meccanico, la cinetica di rilascio di farmaci o proteine e i processi biologici come osteoinduzione e angiogenesi. Pur essendo stati scoperti nei primi decenni del Novecento, i maggiori progressi nei cementi a base di fosfato di calcio sono stati compiuti negli ultimi trent'anni, portando a materiali sempre più performanti per applicazioni cliniche quali la ricostruzione cranio-maxillo-facciale, la vertebroplastica, il trattamento dell'osteoporosi, l'odontoiatria restaurativa e la riparazione dei difetti ossei [3].

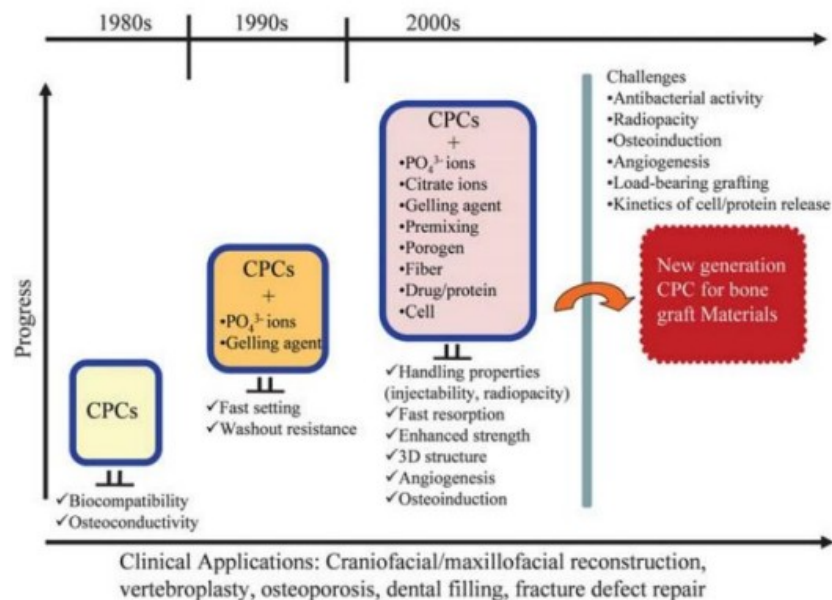


Figura 1. Progressi e sfide ancora aperte dei CPC impiegati come materiali per innesti ossei [3]

## 1.2 Classificazione dei CPC in base al prodotto di indurimento

Un CPC è costituito da una fase solida in polvere contenente uno o più fosfati di calcio, e da una fase liquida, generalmente acqua o una soluzione acquosa. Miscelando la polvere e il liquido in un rapporto appropriato si ottiene una pasta lavorabile che indurisce a temperatura ambiente o corporea. In funzione del prodotto di reazione, che dipende anche dal pH della pasta cementizia, i CPC possono essere suddivisi in due principali categorie: cementi apatitici, che induriscono formando idrossiapatite (HA) o apatite carente di calcio (CDHA) a  $\text{pH} > 7$ , e cementi brushitici, che induriscono formando brushite o monetite a  $\text{pH} < 6$ . I CPC che portano alla formazione di HA o CDHA possono essere classificati in due categorie principali, riassunte nella Fig. 2: CPC monocomponenti e CPC multicomponenti. Nei CPC monocomponenti, un singolo composto di fosfato di calcio, l' $\alpha$ -TCP, si idrolizza a CDHA senza variazione del rapporto Ca/P. Nei CPC multicomponenti, invece, due o più fosfati di calcio, alcuni più acidi e altri più basici, solidificano attraverso una reazione acido-base; il componente basico è normalmente il fosfato tetracalcico (TTCP), mentre i reagenti acidi sono il fosfato dicalcico anidro (DCPA) e il fosfato dicalcico diidrato (DCPD). In questo caso, il rapporto Ca/P dell'HA finale dipende dal rapporto tra TTCP e il componente acido [3]. Tutti i

CPC di brushite si ottengono come risultato di una reazione acido-base tra  $\beta$ -fosfato tricalcico ( $\beta$ -TCP) e un componente acido, ovvero fosfato monocalcico monoidrato (MCPM) o acido fosforico. In eccesso di  $\beta$ -TCP, la composizione finale è una miscela di brushite con  $\beta$ -TCP non reagito [5].

A differenza del cemento di tipo idrossiapatite, il cemento di tipo brushite viene riassorbito in vivo in misura molto maggiore anche se indurisce in generale troppo velocemente, mentre i CPC di apatite induriscono troppo lentamente. Il tempo di presa, relativamente più breve dei CPC di brushite è attribuito sia alla maggiore solubilità del cemento sia al più alto tasso di crescita dei cristalli di brushite [3]. A differenza dell'idrossiapatite, la brushite è metastabile in condizioni fisiologiche; per questo motivo, i CPC a base di brushite si riassorbono molto più rapidamente rispetto ai CPC a base di apatite.

Come mostrato nella Fig. 2, i CPC induriscono a seguito di un processo di dissoluzione e precipitazione. Nella fase di dissoluzione, quando la polvere di fosfato di calcio viene mescolata con l'acqua, una parte del solido si scioglie, si liberano ioni calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) nella soluzione e si crea quindi una soluzione sovrassatura. Successivamente, nella fase di precipitazione, gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  si ricombinano e si formano nuovi cristalli di fosfato di calcio, che crescono e si intrecciano tra loro. L'intreccio dei cristalli precipitati è responsabile dell'indurimento del cemento.

I cementi sono classificati oltre che sulla base del prodotto finale (apatite o brushite), anche in base al numero di componenti nella fase solida (singoli o multipli), al tipo di reazione (idrolisi o reazione acido-base), al meccanismo di presa e all'evoluzione della microstruttura durante l'indurimento. Nella Fig. 2 sono inoltre mostrate micrografie elettroniche a scansione di cementi di apatite e brushite induriti, ottenute rispettivamente dall'idrolisi di  $\alpha$ -TCP (fosfato tricalcico) e dalla reazione di  $\beta$ -TCP con MCPM [5]. È evidente anche una grande differenza dal punto di vista morfologico tra le due fasi.

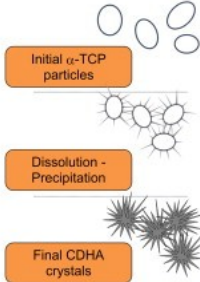
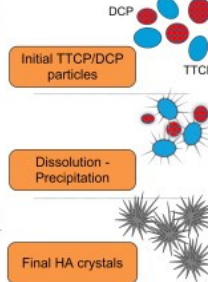
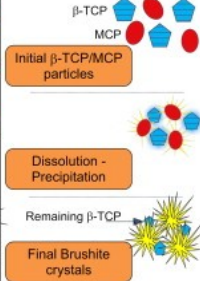

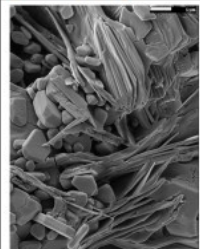
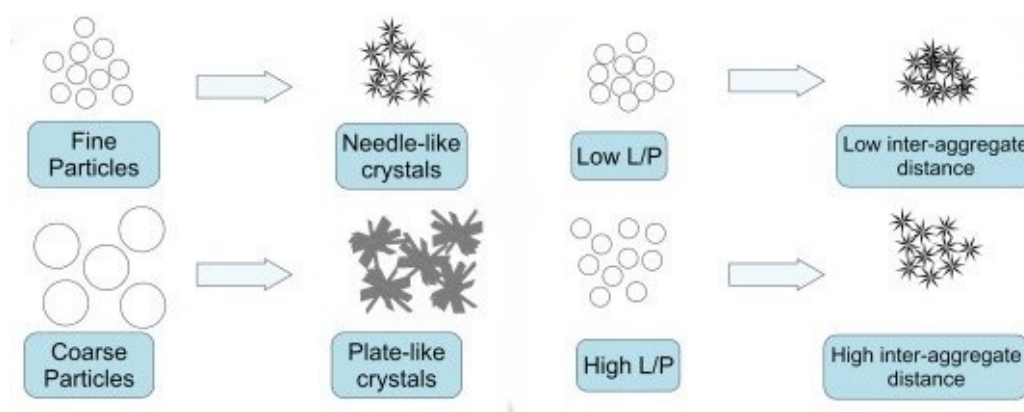
	Apatitic Cement		Brushitic Cement
	Single Component	Multiple Components	
Reactives	$\alpha$ -TCP	TTCP + DCPA/DCPD	$\beta$ -TCP + MCPM/MCPA
Reaction	$3\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_9(\text{HPO}_4)_4(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	$2\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{O} + 2\text{CaHPO}_4 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} + 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Type of Reaction	Hydrolysis	Acid-Base	Acid-Base
Setting mechanism and crystal morphology			
SEM		← APATITE BRUSHITE →	
			

Figura 2. Classificazione dei cementi di fosfato di calcio [5]

### 1.3 Microstruttura e porosità del cemento

I CPC sono materiali altamente porosi, a causa della presenza di spazi liberi tra i cristalli precipitati, con dimensioni dei pori tipicamente comprese nell'intervallo nano-micrometrico. Sebbene tale porosità possa rappresentare una limitazione per l'impiego dei CPC in applicazioni sottoposte ad elevati carichi meccanici, essa risulta cruciale per numerose altre applicazioni. In particolare, la porosità è un requisito fondamentale per favorire il riassorbimento del materiale e incrementarne la bioattività, grazie all'aumento della superficie che interagisce con l'ambiente biologico. Inoltre, la porosità intrinseca dei CPC rende questi materiali particolarmente adatti come vettori per sistemi di rilascio controllato di farmaci.

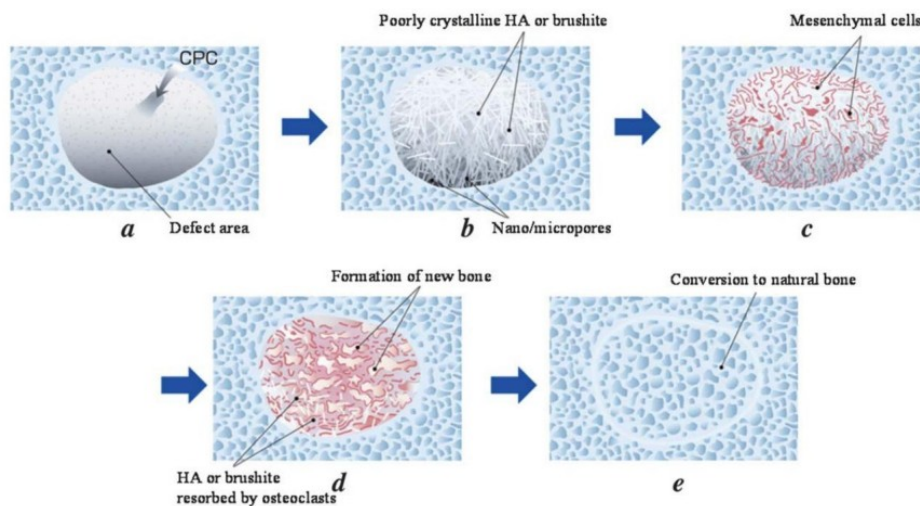


**Figura 3.** Regolazione della microstruttura e porosità dei CPC tramite granulometria della polvere e rapporto liquido/polvere. Immagine modificata da [5]

La microstruttura e la porosità dei CPC possono essere modulate agendo su specifici parametri di processo, in particolare sulla granulometria della polvere e sul rapporto liquido/polvere (L/P) (Fig. 3). A parità di rapporto L/P, l'impiego di polveri fini, caratterizzate da un'elevata area superficiale, favorisce una cinetica di reazione più rapida e porta alla formazione di cristalli aghiformi e pori di dimensioni ridotte, mentre l'utilizzo di polveri più grossolane determina la crescita di cristalli a piastra e la presenza di pori di dimensioni maggiori. Un ulteriore parametro per il controllo della porosità è rappresentato dal rapporto L/P: mantenendo costante la granulometria della polvere, un basso rapporto L/P comporta una minore distanza tra le particelle nella miscela iniziale, con la conseguente formazione di una struttura più compatta. Al contrario, un aumento del rapporto L/P favorisce la formazione di una microstruttura più porosa [5].

## 1.4 Meccanismo di rigenerazione ossea

La Fig. 4 schematizza il processo di rigenerazione ossea in un difetto trattato con CPC.



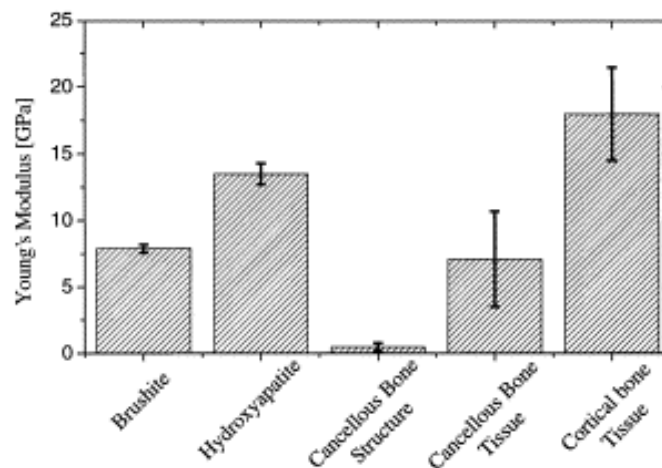
**Figura 4.** Processo di rigenerazione ossea in un difetto trattato con CPC [3]

In una prima fase, il CPC viene utilizzato per riempire il difetto osseo, adattandosi alla geometria della cavità e fornendo un supporto iniziale. Il legame si verifica inizialmente tra il corpo indurito (ad esempio, HA o brushite) e il tessuto osseo. Il cemento indurito evolve verso una fase di idrossiapatite a bassa cristallinità o brushite, caratterizzata dalla presenza di nano e microporosità. Questa microstruttura favorisce l'adesione e la migrazione delle cellule staminali mesenchimali sulla superficie del CPC, creando un ambiente osteoconduttivo idoneo all'avvio dei processi biologici di rigenerazione. In seguito, l'idrossiapatite a bassa cristallinità o la brushite vengono progressivamente riassorbite dagli osteoclasti, mentre gli osteoblasti depositano una nuova matrice ossea, portando alla formazione di un nuovo tessuto osseo. Circa 2 settimane dopo l'intervento chirurgico, il materiale nel sito riempito viene gradualmente convertito in osso mantenendone la forma ed entro pochi mesi viene gradualmente sostituito da osso neoformato. Per un'efficace rigenerazione ossea, la velocità di degradazione del CPC impiantato deve essere compatibile con la crescita del tessuto osseo all'interno del cemento in fase di degradazione. Se il CPC utilizzato non si degrada nel tempo stabilito, è necessario migliorarne la biodegradabilità per promuovere una rapida rigenerazione ossea [3].

## 1.5 Proprietà meccaniche

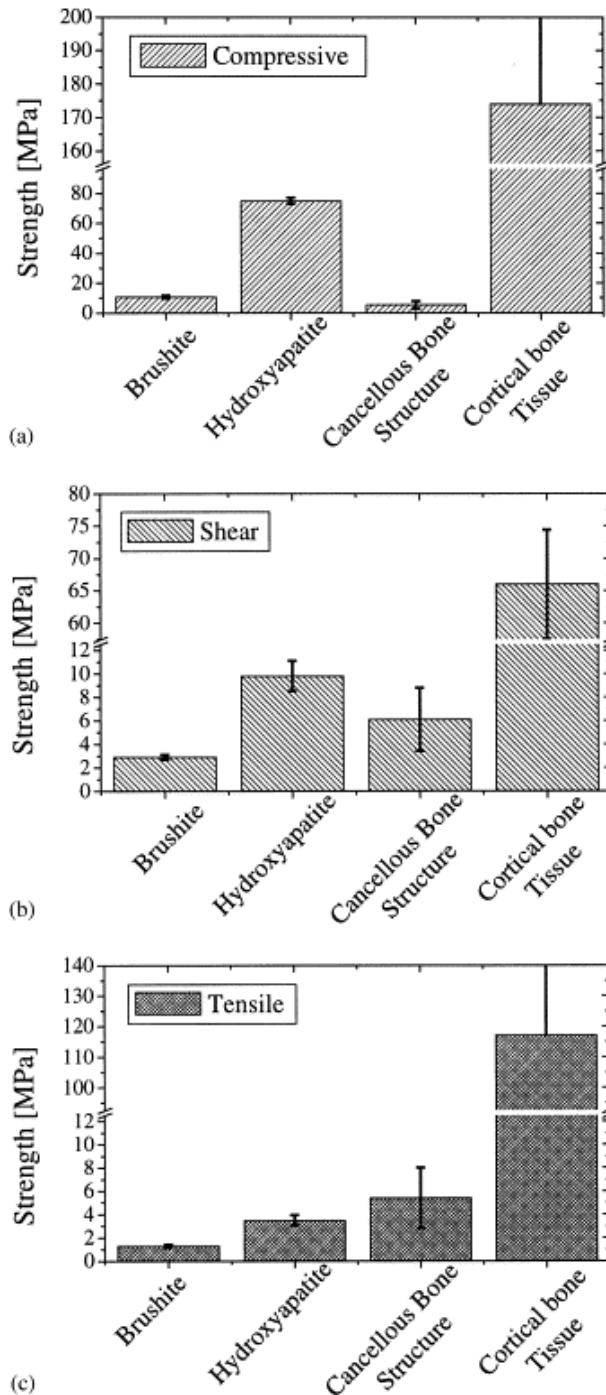
Ogni biomateriale di nuova generazione deve essere sottoposto a test meccanici al fine di garantirne funzionalità e affidabilità. Per i biocementi, la caratterizzazione delle proprietà meccaniche in condizioni di carico multiassiale risulta più complessa perché il loro comportamento è fortemente influenzato da difetti microstrutturali legati al processo produttivo. Il cemento a base di idrossiapatite presenta una resistenza meccanica superiore che ne suggerisce un potenziale impiego anche nelle regioni portanti dello scheletro

soggette a elevate sollecitazioni multiassiali. Poiché questi cementi sono destinati a essere utilizzati come sostituti ossei, la loro rigidità dovrebbe idealmente essere comparabile a quella dell'osso umano, che comprende un tessuto corticale compatto e un tessuto spugnoso a struttura porosa. Come mostrato in Fig. 5, i cementi brushite e idrossiapatite presentano valori medi del modulo di Young confrontabili rispettivamente con quelli dei tessuti ossei spugnoso e corticali umani. Tuttavia, la loro rigidità risulta significativamente superiore a quella dell'osso spugnoso considerato nella sua organizzazione strutturale trabecolare, caratterizzata da un'elevata porosità e da una maggiore deformabilità.



**Figura 5.** Valori medi del modulo di Young dei CPC, dei tessuti e delle strutture ossee [6]

La resistenza a compressione dipende principalmente dalle proprietà globali del materiale: in questi casi tutta la massa lavora insieme per resistere al carico, e i piccoli difetti locali contano relativamente poco. L'idrossiapatite è più compatta e uniforme, quindi le sue proprietà di massa hanno una rilevanza maggiore in compressione, mentre la brushite è meno compatta e quindi meno resistente rispetto all'idrossiapatite. In trazione e in taglio, invece, la differenza tra i due materiali è minore perché i difetti locali influenzano entrambe le fasi, riducendo il vantaggio della compattezza dell'idrossiapatite. Ne consegue che l'idrossiapatite presenta complessivamente proprietà meccaniche superiori rispetto alla brushite. L'applicabilità di questi cementi in ambito ortopedico può essere ulteriormente valutata confrontandone le resistenze meccaniche con quelle dell'osso umano, come riportato in Fig. 6. Il cemento a base di brushite mostra valori di resistenza comparabili o inferiori a quelli medi della struttura ossea spugnosa umana, confermando la sua idoneità come materiale di riempimento osseo, piuttosto che come elemento portante. Il cemento a base di idrossiapatite presenta una resistenza a compressione di circa un ordine di grandezza superiore rispetto ai valori medi dell'osso spugnoso umano, mentre le resistenze a trazione e a taglio risultano comparabili [6].



**Figura 6.** Confronto tra i valori medi di resistenza compressiva (a), di taglio (b) e trazione (c) dei CPC con i valori medi delle diverse strutture ossee [6]

Da un punto di vista clinico, un materiale cementizio dovrebbe avere una resistenza simile o maggiore di quella dell'osso spugnoso da sostituire, un modulo di elasticità simile a quello dell'osso in modo da mantenere un'adeguata tenacità e prevenire la frattura da fatica sotto carico ciclico. Una resistenza adeguata è maggiormente necessaria nelle fasi iniziali dell'impianto, poiché la resistenza degli impianti ossei aumenta nel tempo una volta che il nuovo osso inizia a crescere [3]. Le caratteristiche meccaniche dei CPC convenzionali ne limitano quindi l'utilizzo in applicazioni a basso o nessun carico portante.

## 1.6 Sostituzioni ioniche nelle strutture di CPC

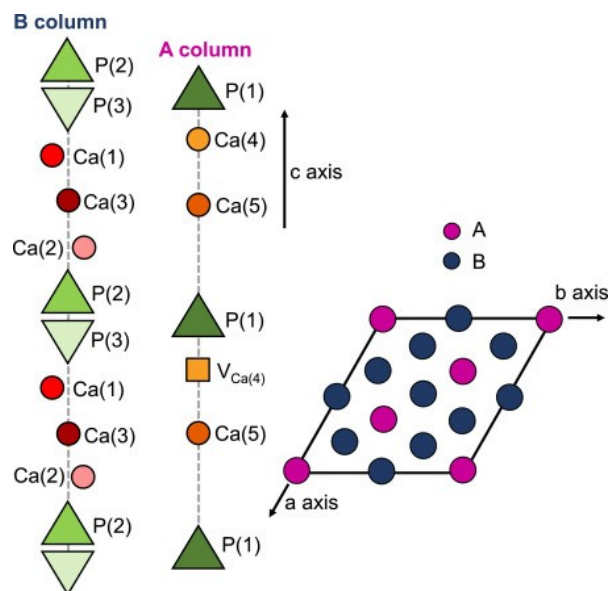
Le sostituzioni ioniche nelle ceramiche di fosfato di calcio, in particolare nelle fasi  $\alpha$ - e  $\beta$ -TCP, hanno suscitato grande interesse per il ruolo che gli ioni sostituenti possono svolgere nei processi biologici successivi all'impianto. Tra gli elementi più interessanti che sono stati proposti come sostituenti troviamo ad esempio zinco (Zn), magnesio (Mg) e stronzio (Sr).

Lo zinco è un elemento in grado di promuovere la proliferazione e la differenziazione delle cellule osteoblastiche e possiede un effetto inibitorio sul riassorbimento osseo osteoclastico in vivo. Il magnesio riveste un ruolo significativo nel processo di calcificazione, nella resistenza dell'osso ed influenza la formazione e la crescita dei cristalli di HA. Una carenza di Mg nel tessuto osseo è stata anche suggerita come possibile fattore di rischio per l'osteoporosi nell'uomo. Lo stronzio mostra effetti benefici nel trattamento dell'osteoporosi, prevenendo la perdita ossea attraverso un meccanismo di riduzione del riassorbimento osseo e di mantenimento della formazione ossea. Lo Sr aumenta l'apoptosi degli osteoclasti e favorisce la proliferazione delle cellule pre-osteoblastiche.

La presenza di ioni droganti nella struttura dei CPC può modificare e potenzialmente migliorare diverse proprietà strutturali, fisico-chimiche e biologiche, quali i parametri reticolari della cella elementare, la cristallinità, la solubilità nei fluidi fisiologici, la capacità di riassorbimento e l'osteointegrazione [7].

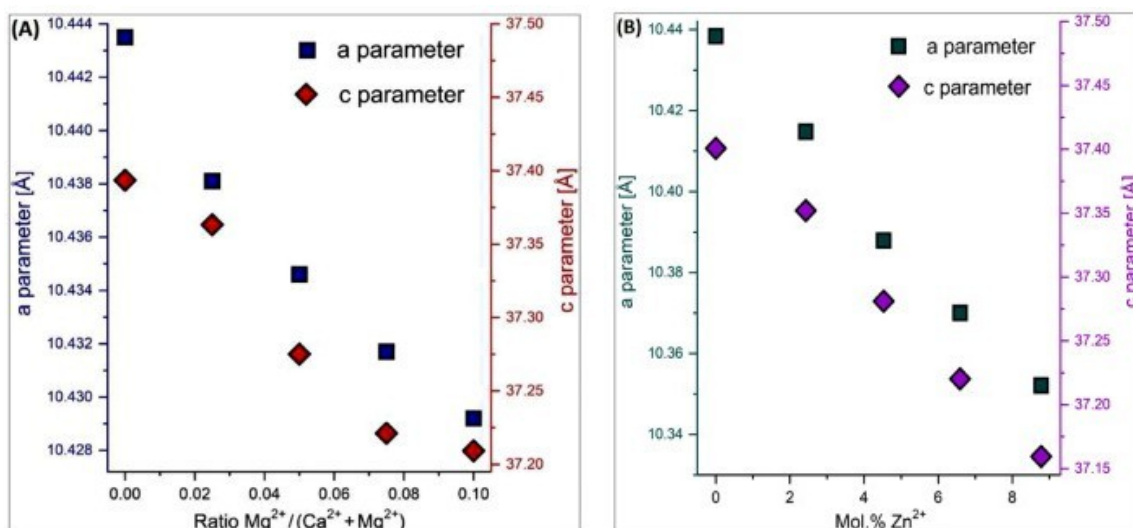
### 1.6.1 Meccanismo di sostituzione ionica nel $\beta$ -TCP

L'incorporazione di ioni sostituenti o dopanti nei CPC non avviene in modo casuale: essi si inseriscono in specifici siti cristallografici del reticolo cristallino del materiale cementizio. Il drogaggio non rappresenta infatti una semplice aggiunta chimica ma una sostituzione strutturale che può alterare i parametri reticolari e altre caratteristiche strutturali influenzando di conseguenza le proprietà fisico-chimiche e biologiche del materiale. Il  $\beta$ -TCP ha una struttura romboedrica (Fig. 7) che può essere descritta come costituita da due diverse colonne di atomi allineate parallelamente all'asse cristallografico c. La struttura comprende cinque siti cristallografici distinti per il  $\text{Ca}^{2+}$  (Ca(1), Ca(2), Ca(3), Ca(4), Ca(5)) con una diversa coordinazione con l'ossigeno. In un cristallo infatti ogni atomo è circondato da altri atomi e la coordinazione indica il numero di atomi vicini di un certo tipo che circondano un atomo centrale. In questo caso l'atomo centrale è il catione  $\text{Ca}^{2+}$  e gli atomi che lo circondano sono gli anioni  $\text{O}^{2-}$ . La coordinazione dello ione  $\text{Ca}^{2+}$  nei diversi siti cristallografici è rispettivamente sette, otto, otto, quattro e sei.



**Figura 7.** Struttura tridimensionale del  $\beta$ -TCP e proiezione della cella elementare romboedrica [2]

Il  $Mg^{2+}$  si incorpora nella struttura del  $\beta$ -TCP fino a una concentrazione del 14% molare, preferibilmente nel sito Ca(5) in quanto avendo un raggio ionico inferiore al Ca (rispettivamente 0,720 e 1,00 Å), preferisce siti a coordinazione inferiore in quanto siti con coordinazione maggiore sarebbero troppo spaziosi con la conseguente formazione di legami più deboli e instabilità locale. Dopo la completa occupazione di questo sito, può essere occupato anche il sito Ca(4). A causa del differente raggio ionico, l'incorporazione di  $Mg^{2+}$  determina una diminuzione dei parametri reticolari a e c del  $\beta$ -TCP (vedi Fig. 8 A). Nel caso di  $Zn^{2+}$ , il limite di incorporazione nei CPC è del 9,09% molare e la preferenza è sempre per la posizione Ca(5). Come per il  $Mg^{2+}$ , l'incorporazione di  $Zn^{2+}$  (raggio ionico 0,740 Å) si traduce in una riduzione sia del parametro a che c (vedi Fig. 8 B). La diminuzione dei parametri reticolari a e c e quindi la contrazione della cella elementare può rappresentare una conferma dell'avvenuta incorporazione degli ioni dopanti nel reticolo [2].



**Figura 8.** Parametri reticolari a e c della fase  $\beta$ -TCP in funzione del contenuto molare di ione dopante (A)  $Mg^{2+}$  e (B)  $Zn^{2+}$  [2]

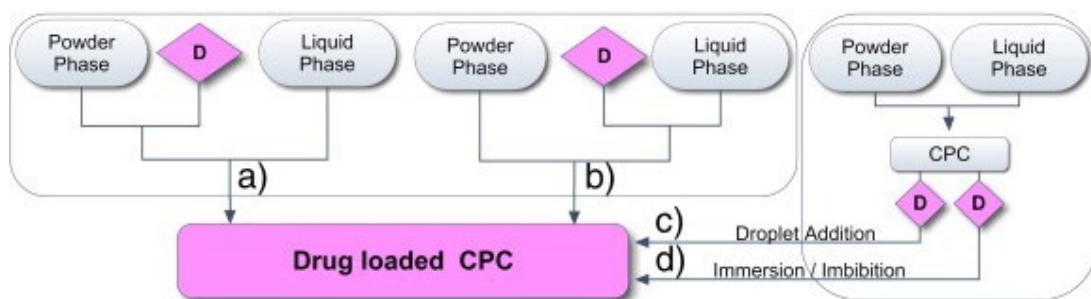
## 1.7 Cementi di fosfato di calcio come vettori di farmaci

Il trattamento delle malattie ossee può risultare inefficace a causa della difficoltà nel mantenere concentrazioni adeguate di farmaco direttamente nel sito di infezione. L'impiego di cementi ossei carichi con farmaci rappresenta un approccio promettente in quanto consente di ottenere e soprattutto mantenere sufficienti concentrazioni locali di farmaco [2].

### 1.7.1 Incorporazione del farmaco nei CPC

L'indurimento dei CPC avviene a temperatura ambiente o corporea offrendo quindi l'opportunità di utilizzare i CPC non solo come innesti ossei osteoconduttivi, ma anche come sistemi di rilascio controllato di farmaci a livello locale. L'incorporazione di molecole attive può essere utilizzata per aumentare la capacità di rigenerazione ossea del materiale o per trattare specifiche patologie e disturbi scheletrici.

Le prestazioni di qualsiasi dispositivo per la somministrazione di farmaci dipendono da diversi fattori, tra cui la microstruttura, la potenziale degradazione della matrice, la solubilità del farmaco e la natura delle interazioni tra farmaco e matrice.



**Figura 9.** Schema di incorporazione di farmaci o di molecole biologicamente attive nei CPC [5]

La Fig. 9 illustra le diverse modalità di incorporazione di farmaci o di molecole biologicamente attive (indicate con D) nei CPC. Il farmaco può essere integrato nel sistema in due modi: miscelato con la fase in polvere del cemento oppure solubilizzato nella fase liquida. In entrambi i casi, il principio attivo viene incorporato durante la fase di preparazione, consentendo una distribuzione relativamente omogenea all'interno della matrice cementizia. In alternativa, il caricamento del farmaco può essere effettuato dopo l'indurimento del cemento. Questa modalità può avvenire mediante aggiunta di gocce della soluzione contenente il farmaco sulla superficie del materiale oppure tramite imbibizione ossia immersione del cemento in una soluzione del farmaco. L'aggiunta di farmaco post-indurimento non consente l'iniezione del cemento direttamente nel sito del paziente perché richiede che il materiale sia già indurito prima dell'incorporazione del farmaco. Tuttavia, tali modalità permettono di preservare le proprietà strutturali derivanti dalla reazione di indurimento a bassa temperatura, mantenendo inalterate le caratteristiche meccaniche e microstrutturali del cemento. Un approccio alternativo per il caricamento del farmaco consiste nell'incorporarlo in microsfele polimeriche prima della miscelazione con il CPC.

Questa strategia, rispetto ai metodi di caricamento descritti in precedenza, presenta due ulteriori vantaggi: da un lato consente di modificare la cinetica di rilascio del farmaco (ad esempio, rallentandolo nei momenti iniziali e rendendolo più costante nel tempo) e, dall'altro, la degradazione delle microsfeere crea una matrice porosa con una maggiore capacità di riassorbimento e rimodellamento [5].

### **1.7.2 Interazioni tra cemento di fosfato di calcio e farmaci**

Nei CPC la stabilizzazione non è un evento istantaneo: in seguito alla presa iniziale del cemento e al successivo indurimento, la maturazione e la stabilizzazione chimico-strutturale può continuare per ore, giorni o addirittura settimane con graduale stabilizzazione del pH e delle concentrazioni ioniche. L'aggiunta di un farmaco può modificare la cinetica di presa, le proprietà reologiche e lo sviluppo microstrutturale dei CPC. L'impatto dell'incorporazione del farmaco sulle proprietà meccaniche dei CPC è particolarmente rilevante in quanto può limitarne le applicazioni finali. Inoltre, anche la cristallinità, la dimensione dei cristalli e la porosità possono essere modificate, con un conseguente effetto sulla cinetica di rilascio.

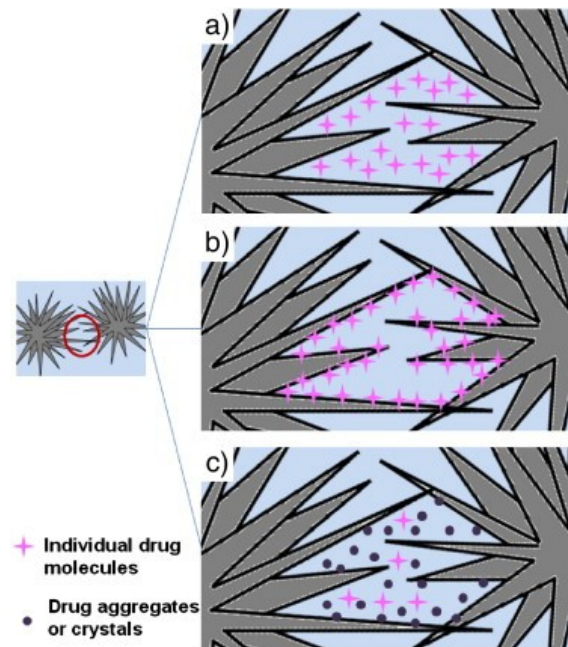
Non è da trascurare nemmeno la verifica della stabilità del farmaco nella matrice cementizia. La natura dinamica dei processi di dissoluzione-precipitazione che avvengono durante la presa porta a variazioni del pH locale e delle concentrazioni ioniche in soluzione, le quali possono influire sulla funzionalità del farmaco andandone ad alterare la struttura [5].

### **1.7.3 Cinetica del rilascio del farmaco dai CPC**

I CPC possono essere considerati, dal punto di vista del rilascio del farmaco, come matrici a lenta degradazione perché la loro velocità di degradazione è molto più bassa rispetto alla velocità di rilascio del farmaco. Per questo motivo si ipotizza che il meccanismo principale di rilascio del principio attivo sia la diffusione attraverso la matrice cementizia indurita. Un aspetto importante che determinerà la cinetica del rilascio del farmaco è la sua distribuzione all'interno del CPC. Come detto in precedenza, il farmaco può essere incorporato nella fase liquida o nella fase in polvere del CPC. In quest'ultimo caso, si verificherà una dissoluzione parziale di farmaco a seconda della solubilità del farmaco nella fase liquida reagente del CPC. La maggior parte del farmaco rimarrà intrappolata tra i cristalli aggrovigliati, in uno dei seguenti modi, come rappresentato in Fig. 10:

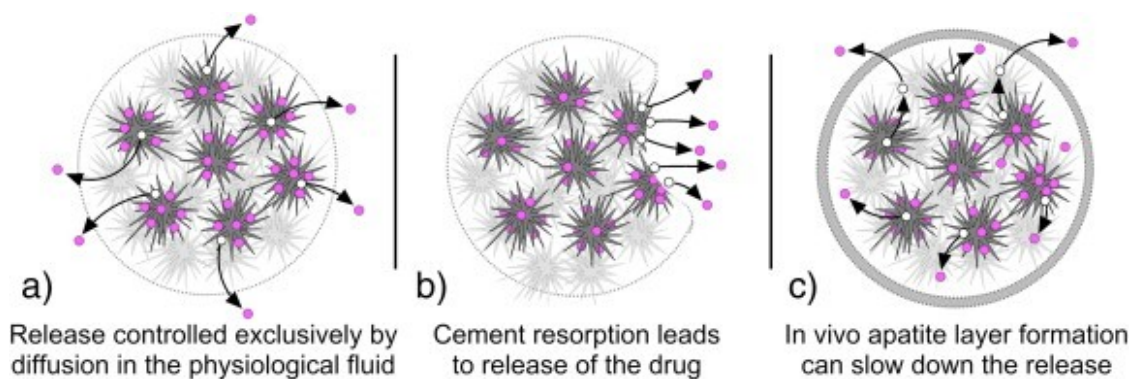
- a) disciolto nella fase liquida all'interno dei pori esistenti tra i cristalli,
- b) adsorbito o legato chimicamente sulla superficie dei cristalli,
- c) in forma solida, nel caso in cui la concentrazione aggiunta fosse superiore alla solubilità del farmaco nella fase acquosa del cemento. In quest'ultimo scenario, le molecole di farmaco disciolte coesistono con aggregati e/o cristalli di farmaco.

In tutti questi casi, la matrice possiede pori di collegamento che possono essere permeati dai fluidi fisiologici circostanti e si può presumere che il rilascio del farmaco avvenga prevalentemente per diffusione attraverso il fluido che riempie i pori.



**Figura 10.** Modalità di distribuzione del farmaco all'interno di una matrice CPC [5]

La Fig. 11 rappresenta i possibili scenari di rilascio del farmaco dalla matrice CPC, mettendo in relazione i fenomeni di diffusione e degradazione del cemento. Nel caso a, il rilascio è controllato esclusivamente dalla diffusione del farmaco attraverso il liquido presente nei pori del cemento: ciò avviene quando la velocità di degradazione del CPC è inferiore alla velocità di diffusione del principio attivo, per cui la struttura della matrice rimane integra mentre il farmaco migra verso l'esterno. Nel caso b, il riassorbimento del cemento contribuisce in modo significativo al rilascio del farmaco facilitando la liberazione del principio attivo. Nel caso c, si considera una situazione in vivo in cui la formazione di uno strato di apatite sulla superficie del cemento può rallentare il rilascio del farmaco. Tale strato superficiale agisce come barriera riducendo la velocità di trasferimento del principio attivo verso l'ambiente circostante modificando quindi il profilo di rilascio nel tempo [5].



**Figura 11.** Meccanismi di rilascio del farmaco [5]

## **1.8 Scopo della tesi**

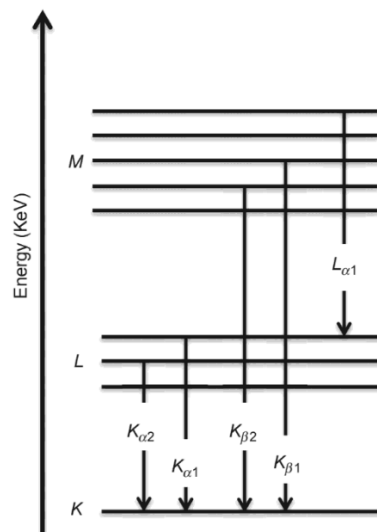
Lo scopo della presente tesi è stato la sintesi e la caratterizzazione di due gruppi di CPC drogati rispettivamente con zinco e magnesio, in quantità pari a circa il 3,3% in atomi. I cementi sono stati successivamente caricati con l'antinfiammatorio meloxicam per realizzare sistemi di drug delivery. I materiali sono stati preparati in forma bulk di geometria cilindrica, così da ottenere dispositivi solidi pronti per l'inserimento in siti di frattura ossea. I campioni sono stati tutti caratterizzati con diverse tecniche sperimentali al fine di determinarne la struttura, composizione, morfologia, porosità e le proprietà meccaniche prima e dopo l'immersione per diversi giorni in un tampone fosfato. L'obiettivo è stato quello di confrontare i due gruppi di cementi, valutandone il comportamento in termini di rilascio del farmaco e variazione delle caratteristiche chimico fisiche e meccaniche. In particolare, l'attenzione è stata rivolta all'analisi delle eventuali differenze attribuibili sia al tipo di drogaggio (zinco o magnesio) sia alla presenza del meloxicam all'interno della matrice cementizia.

## Capitolo 2

### Caratterizzazione dei materiali

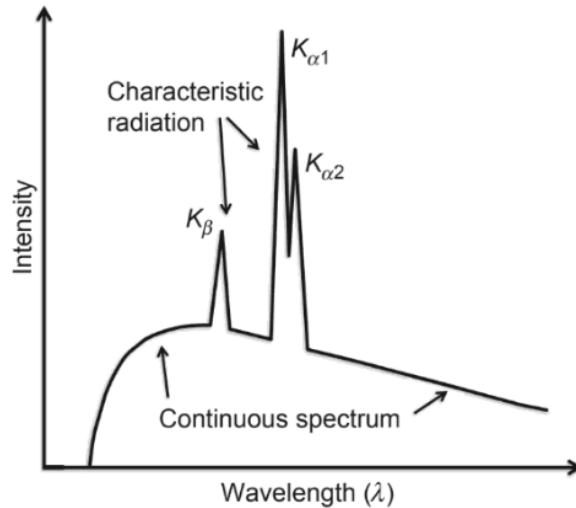
#### 2.1 Misure di diffrazione a raggi X di polveri (XRD)

I raggi X sono onde elettromagnetiche ad alta energia con una lunghezza d'onda compresa tra  $10^{-3}$  e 10 nm. In laboratorio, vengono prodotti principalmente mediante tubi a raggi X sigillati in cui un filamento, generalmente in tungsteno, viene riscaldato ad alta temperatura fino ad emettere elettroni, che vengono poi accelerati da un campo ad alto potenziale e diretti verso un bersaglio metallico, responsabile dell'emissione dei raggi X che avviene attraverso due meccanismi distinti. Il primo è legato alla decelerazione degli elettroni incidenti nel bersaglio che porta all'emissione di fotoni X con un'ampia distribuzione continua di lunghezza d'onda, nota come Bremsstrahlung. Il secondo meccanismo è la ionizzazione degli atomi colpiti del bersaglio mediante l'espulsione di elettroni degli orbitali interni. Per ristabilire una condizione di stabilità, gli elettroni provenienti da livelli energetici più esterni occupano i posti vacanti. Questo passaggio comporta l'emissione di fotoni con energie ben definite, che costituiscono la cosiddetta radiazione caratteristica, tipica del materiale utilizzato come bersaglio (Fig. 12). Affinché ciò avvenga, è necessario però che gli elettroni incidenti superino una certa energia minima.



**Figura 12.** Schema dei livelli energetici atomici e dell'emissione di radiazione X caratteristica [8]

La radiazione emessa è quindi una sovrapposizione di uno spettro continuo e di radiazioni caratteristiche, come si osserva in Fig. 13. In generale, le tecniche di diffrazione utilizzano solo la radiazione caratteristica con l'intensità più elevata  $K_{\alpha}$  e rimuovono la maggior parte della radiazione rimanente utilizzando filtri o monocromatori appropriati.



**Figura 13.** Distribuzione dell'intensità in funzione della lunghezza d'onda della radiazione X prodotta [8]

Una volta generati, i raggi X interagiscono con il materiale e possono subire diversi fenomeni, tra cui diffusione ed assorbimento. Nel caso dei materiali cristallini assume particolare importanza la diffrazione [8] che è un fenomeno complesso di diffusione (o *scattering*) e interferenza originato dall'interazione dei raggi X con un reticolo cristallino. L'interazione di un'onda elettromagnetica con la materia avviene attraverso due processi distinti di scattering:

- Scattering elastico, in cui i fotoni della radiazione incidente vengono deviati in diverse direzioni senza perdita di energia. È questo il processo responsabile dei fenomeni di interferenza e quindi della diffrazione.
- Scattering anelastico, in cui si verifica una variazione di energia dei fotoni. Questo fenomeno non dà luogo a processi di interferenza.

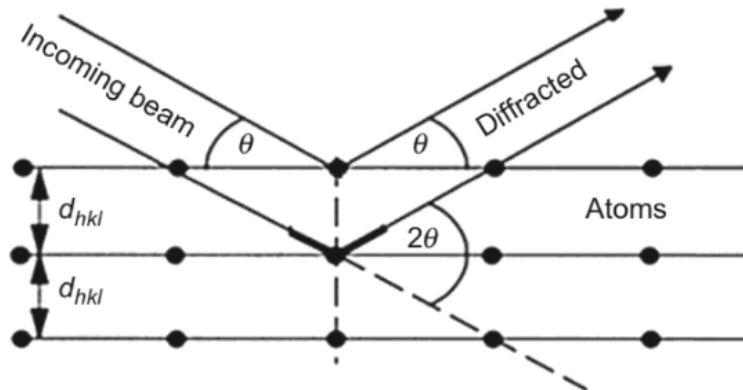
Bragg immaginò il fenomeno della diffrazione in termini di riflessione dei raggi X da parte di piani reticolari paralleli e idealmente infiniti, considerati come superfici semiriflettenti, in grado di riflettere e trasmettere parzialmente la radiazione incidente. Sebbene questo modello non sia rigorosamente corretto dal punto di vista fisico, poiché il fenomeno reale è dovuto alla diffusione e alla successiva interferenza tra onde diffuse dagli atomi del reticolo, esso fornisce una descrizione semplice ed efficace del fenomeno. La condizione per cui si osserva diffrazione costruttiva si verifica quando la differenza di cammino ottico tra due raggi riflessi da piani reticolari adiacenti è pari a un multiplo intero della lunghezza d'onda (Fig. 14).

Tale condizione è espressa dalla legge di Bragg:

$$n * \lambda = 2 * d * \sin (\theta)$$

Dove:

- $n$ : numero intero
- $\theta$ : angolo che il fascio uscente forma col piano cristallino
- $\lambda$ : lunghezza d'onda della radiazione
- $d$ : distanza tra due piani reticolari adiacenti



**Figura 14.** Schema della diffrazione dei raggi X da piani cristallini paralleli come immaginata da Bragg [7]

La direzione dei raggi diffratti dipende esclusivamente dal reticolo di traslazione, ossia dai parametri della cella elementare, ed è indipendente dalla natura degli atomi in essa contenuti. Il rivelatore misura l'intensità della radiazione diffratta in funzione dell'angolo  $\theta$ , ottenendo il diffrattogramma del campione analizzato.

Nel presente lavoro di tesi, le analisi di diffrazione delle polveri di  $\beta$ -TCP e dei biocementi sono state effettuate mediante un diffrattometro D2 PHASER Bruker, dotato di tubo a raggi X sigillato con anodo in rame e di rivelatore multicanale per la raccolta rapida dei segnali. L'analisi è stata effettuata in un intervallo angolare compreso tra  $10^\circ$  e  $70^\circ$ , con step di  $0,03^\circ$  e tempo di conteggio di 0.5 secondi per step.

### 2.1.1 Raffinamento strutturale mediante metodo di Rietveld

Per ottenere informazioni quantitative relative alle fasi contenute nei campioni di  $\beta$ -TCP e dei biocementi è stato utilizzato il raffinamento strutturale mediante metodo di Rietveld a partire dai diffrattogrammi raccolti. Tale analisi risulta particolarmente utile in quanto consente di distinguere e quantificare fasi cristalline diverse anche quando i rispettivi picchi di diffrazione risultano sovrapposti nel diffrattogramma. Il metodo di Rietveld consiste in un processo di raffinamento dei dati di diffrazione da polveri in cui un modello cristallografico teorico viene adattato ai dati sperimentali mediante un approccio ai minimi quadrati. Tale procedura consente di ottimizzare simultaneamente diversi parametri, tra cui i parametri reticolari, la dimensione dei cristalliti, i fattori termici, le posizioni atomiche e l'orientazione preferenziale, fino a ottenere la migliore corrispondenza tra il pattern calcolato e quello sperimentale. Un altro dato rilevante che si può ottenere sono le percentuali in peso delle fasi cristalline contenute nel campione. Il processo di raffinamento viene terminato quando

l'accordo visivo tra pattern sperimentale e calcolato è soddisfacente e quando i fattori di accordo (in particolare Rwp e GoF) raggiungono valori adeguati.

## 2.2 Misure di spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)

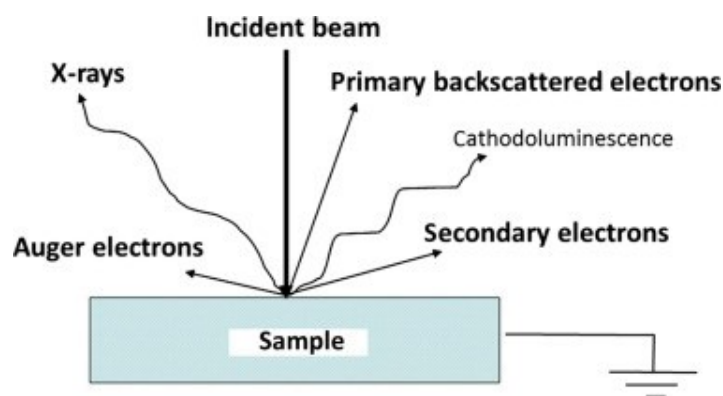
La spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier è una tecnica ampiamente utilizzata per analizzare la composizione chimica, identificare la struttura e le fasi di materiali di varia natura. È di particolare rilevanza però nell'ambito della chimica organica in quanto lo spettro infrarosso è l'impronta digitale delle diverse molecole organiche. Il principio alla base della FT-IR risiede nel fatto che i diversi legami di una molecola vibrano a frequenze specifiche quando sono esposti alla luce infrarossa (IR). Tali vibrazioni sono correlate alla struttura molecolare, rendendo la FT-IR uno strumento molto importante per l'identificazione e la caratterizzazione dei composti chimici. Il modello utilizzato per spiegare gli assorbenti è quello dell'oscillatore armonico, in cui i legami all'interno di una molecola possono essere assimilati a molle che collegano gli atomi. Quando una molecola assorbe energia nella regione infrarossa, tali legami vengono eccitati e iniziano a vibrare secondo diverse modalità, tra cui stiramenti (variazione della distanza interatomica), flessioni (variazione dell'angolo di legame) e movimenti più complessi di più atomi. Le frequenze di queste vibrazioni dipendono dalla massa degli atomi coinvolti e dalla forza del legame chimico. Poiché ciascun gruppo funzionale presenta frequenze caratteristiche, ogni molecola possiede uno spettro infrarosso unico. La spettroscopia infrarossa classica è una tecnica in trasmittanza, cioè il fascio infrarosso attraversa l'intero campione ed emerge dopo essere stato in parte assorbito. Non è quindi una tecnica adatta per studiare le sole superfici o materiali opachi, per i quali invece sono indicate le tecniche in riflettanza. La riflettanza totale attenuata (ATR) è una tecnica in cui il fascio infrarosso dapprima attraversa un cristallo ad alto indice di rifrazione e penetra nella superficie del campione, ma solo per pochi micron a causa di fenomeni ottici. Questa limitata profondità di penetrazione rende la tecnica particolarmente adatta allo studio di fenomeni superficiali. Dal punto di vista strumentale, una sorgente IR è tipicamente costituita da un filamento riscaldato elettricamente che emette radiazione in un ampio intervallo di lunghezze d'onda (circa 2,5-25  $\mu\text{m}$ , corrispondenti in numeri d'onda a 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ). Questa radiazione viene ripartita in due raggi: uno viene inviato verso uno specchio fisso, l'altro verso uno specchio mobile. La differenza nel cammino ottico genera un segnale di interferenza, detto interferogramma, che contiene l'informazione di tutte le lunghezze d'onda. Il fascio ricombinato attraversa il campione o viene riflesso da esso (a seconda che si lavori in trasmittanza o riflettanza) e, durante questa interazione, specifiche frequenze vengono assorbite in base alle caratteristiche vibrazionali delle molecole presenti. La radiazione trasmessa o riflessa raggiunge quindi il rivelatore. L'applicazione della trasformata di Fourier consente di convertire questo segnale dal dominio del tempo al dominio della frequenza, ottenendo lo spettro infrarosso classico in funzione del numero d'onda, con l'assorbanza o la trasmittanza sull'asse delle ordinate. L'analisi delle posizioni, delle intensità e della forma dei picchi permette di identificare i gruppi funzionali e di ricavare informazioni sulla struttura molecolare, mediante confronto con spettri di riferimento [9].

Nel presente lavoro, le misure spettroscopiche sono state effettuate mediante uno spettrofotometro Nicolet FT-IR Is20 equipaggiato con l'accessorio per campionatura in

riflettanza totale attenuata (ATR, ITR con piatto di diamante). Gli spettri ( $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ) sono stati raccolti co-addizionando 32 scansioni dello specchio mobile alla risoluzione di  $4\text{ cm}^{-1}$ .

### **2.3 Misure di microscopia elettronica a scansione (SEM) e spettroscopia a dispersione di energia (EDS).**

La microscopia elettronica a scansione (SEM) è una tecnica di imaging superficiale che produce immagini di un campione scansionandolo con un fascio focalizzato di elettroni. Il SEM consente di ottenere immagini tridimensionali ad alto contrasto, con un limite di risoluzione che può raggiungere qualche nanometro. Il principale vantaggio del SEM rispetto a molte altre tecniche di microscopia elettronica consiste nella possibilità di visualizzare un'area molto più ampia del campione, fornendo così una maggiore affidabilità delle informazioni morfologiche e topografiche. Il microscopio è dotato di un cannone elettronico che produce un fascio di elettroni accelerati con energie comprese tra 0,1 e 30 keV che viene poi focalizzato e collimato mediante lenti elettromagnetiche e diaframmi e infine indirizzato sulla superficie del campione. L'analisi viene condotta in condizioni di alto vuoto per minimizzare la diffusione degli elettroni. A seguito dell'interazione tra il fascio di elettroni e il campione, si verifica l'emissione di diversi segnali (Fig. 15) a seguito di processi di diffusione elastica e anelastica. La diffusione elastica avviene principalmente a opera del nucleo atomico. Gli elettroni incidenti che vengono diffusi elasticamente con un angolo maggiore di  $90^\circ$  sono chiamati elettroni retrodiffusi (BSE) e forniscono informazioni sulla densità elettronica del campione. La diffusione anelastica, invece, comporta un trasferimento di energia dagli elettroni incidenti agli atomi del campione, causando l'eccitazione degli elettroni del materiale. Questo processo porta alla generazione di elettroni secondari (SE), caratterizzati da energie inferiori a 50 eV che provengono da regioni molto superficiali (pochi nanometri) e costituiscono il segnale più utilizzato nel SEM per ottenere immagini topografiche ad alta risoluzione. A seguito di processi di rilassamento il campione può emettere anche raggi X e/o elettroni Auger che consentono di caratterizzare la composizione superficiale. In particolare, le informazioni chimiche vengono ottenute mediante l'analisi dei raggi X attraverso uno spettrofotometro a dispersione di energia (EDS) integrato nello strumento. Il campione per le misure SEM deve essere elettricamente conduttivo e collegato a terra per prevenire l'accumulo di carica elettrostatica che potrebbe causare distorsioni dell'immagine. Per evitare questo problema, la superficie dei campioni non conduttivi viene rivestita con uno strato ultrasottile di un materiale elettricamente conduttivo (oro o grafite solitamente) mediante sputtering [10].



**Figura 15.** Rappresentazione dei principali segnali generati dall'interazione tra fascio elettronico e campione nella microscopia SEM [10]

Per le analisi SEM/EDS dei  $\beta$ -TCP sono state utilizzate le polveri sintetizzate mentre per i cementi, sono stati prelevati piccoli frammenti dai cilindri fratturati, precedentemente sottoposti a prove di compressione. Sono state prima effettuate le analisi EDS sui campioni e successivamente gli stessi sono stati ricoperti da uno strato molto sottile d'oro, mediante sputtering, per poter effettuare le analisi SEM poiché i campioni sono isolanti.

Lo strumento utilizzato è stato un microscopio elettronico a scansione Zeiss EVO MA10 dotato di un rivelatore per spettroscopia a dispersione di energia (EDS) per microanalisi e operante con una tensione di accelerazione del fascio elettronico di 20 kV.

## 2.4 Misure di dissoluzione in vitro

Gli studi di dissoluzione in vitro sono stati eseguiti utilizzando un dissolutore Erweka DT600 (GmbH, Germany), composto da sei contenitori in vetro di forma cilindrica con fondo emisferico, provvisti di coperchio per ridurre l'evaporazione del mezzo di dissoluzione. I cilindri di cemento, contenenti ciascuno 6 mg di meloxicam, sono stati lasciati stabilizzare per circa un mese all'aria e successivamente sono stati sottoposti a prove di dissoluzione impiegando l'Apparatus I (basket method) [11]. A intervalli di tempo prestabiliti (4, 7, 12 giorni per i cementi contenenti zinco e 1, 4, 7 giorni per i cementi contenenti magnesio), sono stati prelevati campioni di soluzione dai vessel termostatati tramite una pompa peristaltica (Esapump Advanced Products s.r.l.), che li ha trasferiti nelle celle a flusso di uno spettrofotometro Lambda 25 (PerkinElmer). Le misurazioni sono state effettuate alla lunghezza d'onda di 362 nm. Successivamente, il fluido prelevato è stato reintrodotta nel vessel di origine così da mantenere costante il volume di dissoluzione. I valori di assorbanza sono stati acquisiti ed elaborati mediante un software dedicato alla gestione delle prove di dissoluzione e all'analisi spettrofotometrica (WinLab V6, PerkinElmer, Monza, Italy). Durante il test, il fluido di dissoluzione è stato mantenuto in condizioni statiche, con attivazione periodica della rotazione dei basket ogni 165 minuti, a una velocità di 30 rpm per una durata di 15 minuti. L'intero sistema è stato mantenuto a una temperatura costante di  $37 \pm 0,5$  °C. L'analisi è stata condotta utilizzando 500 mL di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) a pH 7,4, valore rappresentativo del pH fisiologico del plasma [12]. Per ciascun tipo di cemento, il rilascio del farmaco è stato valutato ai diversi tempi sperimentali, con circa 6 repliche per ciascun tempo di campionamento. Al termine dell'immersione, i cilindri sono stati posti in stufa da vuoto a 50° per 24h per facilitare l'asciugatura fino al raggiungimento di un peso costante. Dopodiché, i cilindri essiccati sono stati utilizzati per analisi

diffrazzometriche (XRD), microscopia elettronica a scansione (SEM), misure di spettroscopia FT-IR, per valutare la densità apparente e la porosità e per le caratterizzazioni meccaniche.

## 2.5 Determinazione della densità apparente e della porosità

La densità apparente è stimata sulla base del principio di Archimede applicando la seguente formula:

$$p_a = \left[ \frac{A}{A - B} \right] (p^\circ - d) + d$$

Dove:

- $p_a$  = densità apparente
- A = peso del campione in aria
- B = peso del campione immerso in acqua
- $p^\circ$  = densità dell'acqua ( $1\text{g/cm}^3$ )
- d = densità dell'aria ( $0.001\text{ g/cm}^3$ )

La correzione con la densità dell'aria d serve per ottenere una maggiore precisione della misura calcolata. Il peso in aria è determinato con una bilancia di precisione mentre il peso in acqua è ottenuto mediante un sistema che consente di immergere il campione nel liquido evitando che tocchi il fondo del recipiente (Figura 16). Il sistema include un supporto per il becker contenente acqua distillata, mantenuto sospeso, e un supporto immerso, poggiato sulla bilancia, per sorreggere il campione in acqua. La differenza tra il peso del campione in aria e quello misurato in acqua corrisponde alla spinta di Archimede, ovvero al peso del volume del fluido spostato. Da tale valore è possibile ricavare il volume del campione e, conseguentemente, la sua densità apparente.

Il sistema realizzato in laboratorio è mostrato in Fig. 16.



**Figura 16.** Sistema impiegato per ricavare la densità apparente dei provini di cemento

Dopo aver calcolato i valori di densità apparente, si è proceduto al calcolo della porosità percentuale come segue:

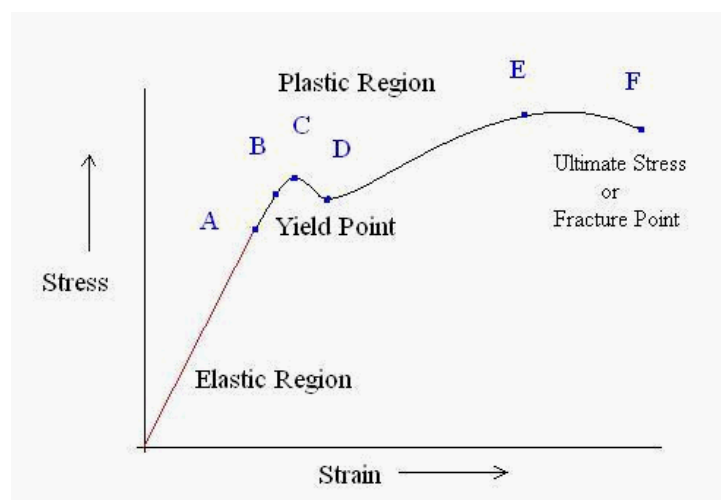
$$\Phi(\%) = \left(1 - \frac{p_a}{p_s}\right) * 100$$

Dove:

- $p_s$  = densità teorica della brushite ( $2.33 \text{ g/cm}^3$ )

## 2.6 Caratterizzazione meccanica

Le prove di compressione consistono nel sottoporre un campione di materiale a una forza di compressione controllata, fino alla sua deformazione o rottura. La configurazione e l'esecuzione sono spesso specificate dall'American Society of Testing and Materials (ASTM) o dall'International Organization for Standardization (ISO). I provini vengono preparati secondo le dimensioni indicate nella norma di prova, con geometrie comunemente cilindriche, cubiche o prismatiche [13]. Nel presente lavoro è stato adottato come riferimento lo standard ASTM F451-08. I campioni in studio sono stati preparati utilizzando degli stampi di altezza 12 mm e diametro 8 mm. Per ciascuna tipologia di campione in studio, le prove sono state eseguite su almeno cinque repliche al fine di garantire la significatività statistica dei risultati. Durante il caricamento, la forza di compressione viene applicata tramite una piastra di carico libera di muoversi lungo la direzione verticale, mentre una cella di carico integrata nella macchina di prova registra la forza applicata. Le prove sono state condotte in controllo di spostamento impostando una velocità di deformazione pari a 1 mm/min e registrando come output il carico misurato dalla cella (N). Le deformazioni del provino sono misurate attraverso il sensore di posizione della traversa della macchina (mm). Durante la prova sono stati quindi registrati i dati relativi al carico e alla deformazione campionati con una frequenza di 2Hz. Nei moderni sistemi di prova, i dati sono acquisiti digitalmente, visualizzati in tempo reale su uno schermo e memorizzati su file di testo [13]. I dati raccolti vengono quindi utilizzati per generare la curva sforzo-deformazione, mostrata in Fig. 17.



**Figura 17.** Esempio di curva sforzo-deformazione [14]

La curva ha origine nel punto in cui sia lo sforzo sia la deformazione sono nulli, quindi a contatto col campione a inizio prova. Nel tratto iniziale, fino al punto A, il materiale segue un comportamento lineare in accordo con la legge di Hooke; questo intervallo definisce il campo elastico e termina nel limite di proporzionalità. Tra i punti A e B la relazione diventa non lineare, fino a raggiungere il limite elastico o punto di snervamento oltre il quale le deformazioni diventano permanenti. Successivamente, il materiale entra nella fase plastica (da B a C), caratterizzata da deformazioni crescenti. In alcune condizioni, si osserva una riduzione della tensione associata a variazioni geometriche del provino (zona D). Proseguendo, il materiale può mostrare fenomeni di incrudimento, richiedendo tensioni maggiori per ulteriori deformazioni fino a raggiungere il valore massimo (punto E). Infine, il provino si frattura al punto F [14].

Per ciascuna unità di prova e per ogni test sono state registrate le dimensioni del provino, quali altezza (mm) e diametro (mm) per il calcolo dell'area della sezione trasversale (mm<sup>2</sup>). A partire da questi dati è stato quindi possibile determinare per ciascun campione il valore massimo della tensione di compressione, il compressive strength (MPa) (CS), calcolato come rapporto tra la forza registrata in corrispondenza della prima frattura del campione e l'area della sezione trasversale.

In particolare, il compressive strength  $\sigma$  è stato calcolato come segue:

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

Dove:

- F = forza massima applicata (N)
- A = area di contatto col campione (mm<sup>2</sup>)

È stato inoltre valutato il modulo di Young (MPa), definito come:

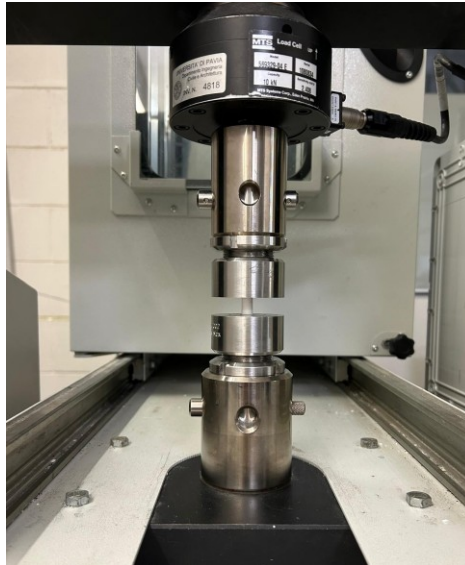
$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

Dove:

- $\sigma$  = stress, calcolato come riportato sopra
- $\varepsilon$  = strain, deformazione relativa del campione

Il modulo di Young è stato determinato come pendenza della porzione lineare della curva stress-strain, considerando una serie di punti appartenenti alla regione elastica.

Nel presente lavoro di tesi, le prove di compressione sui provini cilindrici sono state eseguite mediante una macchina MTS Insight dotata di cella di carico da 10 kN (Fig. 18).

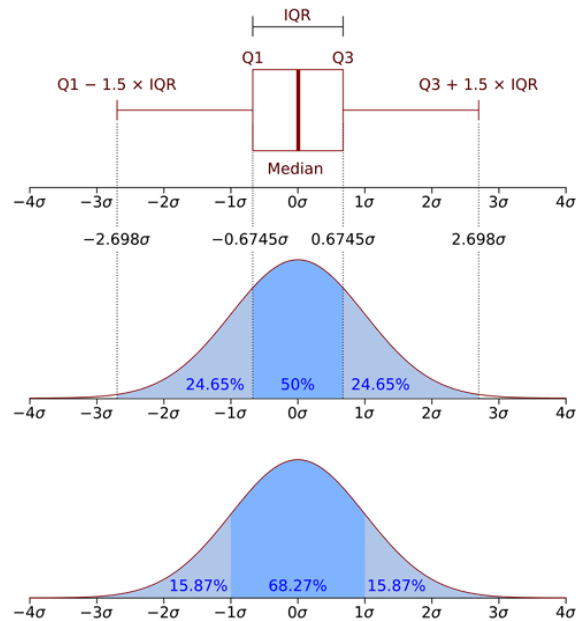


**Figura 18.** *Provino cilindrico di cemento posizionato sulla macchina di compressione*



**Figura 19.** *Provino cilindrico di cemento con frattura a seguito della prova di compressione*

A causa delle elevate deviazioni standard osservate durante la successiva elaborazione dei dati sperimentali, l'analisi dei risultati è stata effettuata escludendo i valori anomali (outlier) (Fig. 20). A tale scopo, sono stati determinati il primo quartile (Q1) e il terzo quartile (Q3), nonché la distanza interquartile ( $IQR = Q3 - Q1$ ). Successivamente, sono stati esclusi tutti i valori inferiori a  $Q1 - 1,5 \cdot IQR$  e superiori a  $Q3 + 1,5 \cdot IQR$ .



**Figura 20.** Scarto interquartile in una gaussiana

Infine, sui dati filtrati sono stati calcolati la media  $\mu$  e la deviazione standard  $\sigma$  come segue:

$$\mu = \frac{\sum_1^n x_i}{N}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_1^n (x_i - \mu)^2}{N - 1}}$$

Dove:

- $x_i$ : dati filtrati
- $N$ : numero totale di repliche per ciascuna condizione sperimentale

La variabilità osservata è attribuibile a un processo produttivo non perfettamente standardizzato nella preparazione dei campioni e alla presenza di difetti strutturali. Al fine di garantire una distribuzione uniforme del carico durante le prove, è stato necessario perfezionare le superfici dei provini in modo che risultassero lisce e parallele. Pertanto, prima di sottoporre i campioni al test di compressione, le facce superiore e inferiore dei biocementi cilindrici sono state limate per assicurare il miglior contatto possibile tra il provino e le piastre di compressione della macchina, comportando uno scostamento dai valori nominali delle dimensioni degli stampi utilizzati per la loro preparazione.

## Capitolo 3

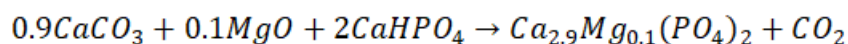
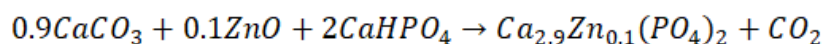
### Materiali e sintesi

#### 3.1 $\beta$ -TCP

Il  $\beta$ -tricalcio fosfato ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) ( $\beta$ -TCP) è uno dei materiali sintetici più impiegati come sostituto osseo e come precursore di cementi brushitici. Le sue proprietà osteoconduttive e osteoinduttive, insieme alla capacità di essere riassorbito dalle cellule, lo rendono particolarmente efficace nella rigenerazione dei difetti ossei. Il  $\beta$ -TCP presenta una solubilità simile a quella del minerale osseo naturale e, in condizioni fisiologiche, non si dissolve direttamente nel fluido biologico ma viene riassorbito principalmente da cellule specifiche, come gli osteoclasti. Questi ultimi provocano un'acidificazione locale che facilita la dissoluzione del materiale. Il fosfato tricalcico presenta diverse fasi polimorfiche che si stabilizzano a differenti intervalli di temperatura. Il  $\beta$ -TCP è una fase ottenuta ad alta temperatura mediante conversione termica di fosfato di calcio amorfo o idrossiapatite carente di calcio a temperature superiori a 650-750 °C. La fase  $\alpha$ -TCP è stabile sopra i 1115-1150 °C mentre la fase  $\alpha'$ -TCP è stabile oltre i 1430-1470 °C. Tali temperature possono subire variazioni significative in presenza di impurità elementari o di droganti [15].

##### 3.1.1 Sintesi del $\beta$ -TCP

Nel presente lavoro sono state sintetizzate polveri di  $\beta$ -TCP drogate con zinco e magnesio, mediante una reazione allo stato solido a partire da reagenti commerciali. In particolare, la composizione desiderata, pari a  $\text{Ca}_{2,9}\text{Zn}_{0,1}(\text{PO}_4)_2$  e  $\text{Ca}_{2,9}\text{Mg}_{0,1}(\text{PO}_4)_2$ , è stata ottenuta mediante sostituzione parziale del calcio rispettivamente con zinco e magnesio al fine di introdurre un drogaggio pari al 3,3% in atomi. La reazione di sintesi è stata impostata considerando opportuni rapporti stechiometrici tra i reagenti, secondo le seguenti equazioni:



Sono stati prodotti 1,5 g di  $\beta$ -TCP per volta. Tale valore è stato convertito in moli utilizzando la massa molare del  $\beta$ -TCP drogato Zn e drogato Mg (rispettivamente 312,71 g/mol e 308,60 g/mol).

$$\text{moli}(\beta - \text{TCP}_{\text{Zn}}) = \frac{\text{grammi}(\beta - \text{TCP}_{\text{Zn}})}{\text{PM}(\beta - \text{TCP}_{\text{Zn}})} = \frac{1,5 \text{ g}}{312,71 \text{ g/mol}} = 4,796 * 10^{-3} \text{ mol}$$

$$\text{moli}(\beta - \text{TCP}_{\text{Mg}}) = \frac{\text{grammi}(\beta - \text{TCP}_{\text{Mg}})}{\text{PM}(\beta - \text{TCP}_{\text{Mg}})} = \frac{1,5 \text{ g}}{308,60 \text{ g/mol}} = 4,860 * 10^{-3} \text{ mol}$$

Successivamente, le masse dei singoli reagenti (carbonato di calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), fosfato di calcio ( $\text{CaHPO}_4$ ), ossido di zinco ( $\text{ZnO}$ ) e ossido di magnesio ( $\text{MgO}$ )) sono state calcolate sulla base dei coefficienti stechiometrici della reazione tramite la seguente formula:

$$\text{massa del reagente (g)} = \text{rapporto molare} * \text{moli}(\beta - \text{TCP}) * \text{PM}(\text{reagente})$$

Calcolo delle masse dei reagenti per la fase  $\beta$ -TCP drogata con zinco:

$$g(\text{CaCO}_3) = 0.9 * 4.796 * 10^{-3} \text{ mol} * 100,09 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0.4320 \text{ g}$$

$$g(\text{CaHPO}_4) = 2 * 4.796 * 10^{-3} \text{ mol} * 136,06 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 1.3052 \text{ g}$$

$$g(\text{ZnO}) = 0.1 * 4.796 * 10^{-3} \text{ mol} * 81,37 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,0390 \text{ g}$$

Calcolo delle masse dei reagenti per la fase  $\beta$ -TCP drogata con magnesio:

$$g(\text{CaCO}_3) = 0.9 * 4.860 * 10^{-3} \text{ mol} * 100,09 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0.4378 \text{ g}$$

$$g(\text{CaHPO}_4) = 2 * 4.860 * 10^{-3} \text{ mol} * 136,06 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 1.3226 \text{ g}$$

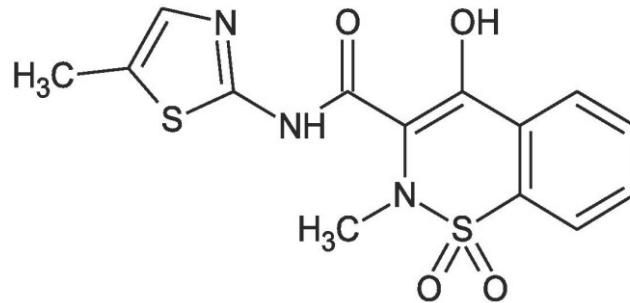
$$g(\text{MgO}) = 0.1 * 4.860 * 10^{-3} \text{ mol} * 81,37 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,0395 \text{ g}$$

I reagenti opportunamente pesati sono stati sottoposti a un processo di macinazione meccanica mediante ball milling al fine di ottenere una miscela omogenea e ridurre la dimensione delle particelle, favorendo così la reattività tra i reagenti. Si è visto nel capitolo precedente come la granulometria dei reagenti influenzi la formazione e la successiva presa del cemento. La macinazione è stata effettuata utilizzando un mulino a giare e sfere in tungsteno, materiale scelto per la sua elevata durezza e resistenza all'usura. Il processo è stato condotto per due cicli della durata di 15 minuti ciascuno a una velocità di rotazione pari a 200 rpm. Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato lo strumento Planetary Micro Mill PULVERISETTE.7–premiumlinediFritsch. Successivamente, le polveri macinate sono state sottoposte a trattamento termico in muffola per promuovere la reazione allo stato solido e la formazione della fase  $\beta$ -TCP drogata. Il trattamento è stato eseguito all'aria a una temperatura di 1000 °C per un tempo di 24 ore. Il riscaldamento e il raffreddamento sono stati realizzati con una rampa termica pari a 600 °C/h.

### 3.2 Meloxicam

Il meloxicam (MLX, Fig. 21) è un farmaco antinfiammatorio non steroideo (FANS) con proprietà antinfiammatorie, analgesiche, antipiretiche e antireumatiche. Viene utilizzato per alleviare diversi tipi di dolore, in particolare quelli associati a patologie muscoloscheletriche, osteoartrite e artrite reumatoide. A differenza dei FANS tradizionali non selettivi, il

meloxicam inibisce preferenzialmente l'attività della cicloossigenasi-2, riducendo la conversione dell'acido arachidonico in precursori delle prostaglandine, sostanze responsabili dell'infiammazione. L'inibizione della sintesi delle prostaglandine spiega gli effetti terapeutici del meloxicam che si manifestano con l'attenuazione dell'infiammazione e la riduzione del dolore [16].

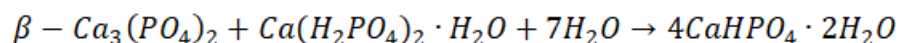


**Figura 21.** Struttura chimica 2D del meloxicam [17]

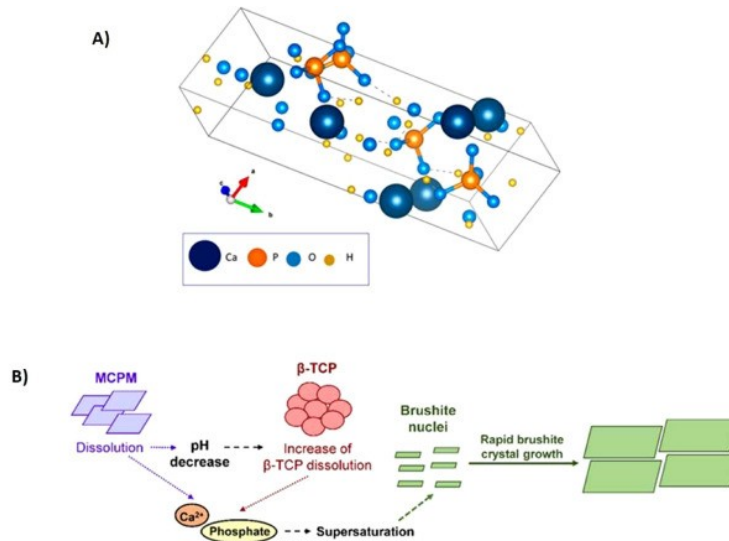
La bassa solubilità del meloxicam rende gli studi di formulazione farmaceutica molto complessi. Il meloxicam è insolubile in acqua poiché le molecole non polari del farmaco non riescono a inserirsi efficacemente nella struttura reticolare dell'acqua. Inoltre, risulta scarsamente solubile in solventi organici quali etanolo e metanolo mentre risulta solubile in dimetilformamide e dimetilsolfossido. La solubilità del meloxicam aumenta significativamente all'aumentare del pH della soluzione [18]. Dal punto di vista strutturale sono stati identificati cinque polimorfi di MLX chiamati Forme I, II, III, IV e V, ma solo le strutture cristalline della Forma I (enolica) e della Forma IV monoidrata (zwitterionica, MH) sono state completamente caratterizzate. La Forma I, la più stabile e la meno solubile, è il polimorfo maggiormente impiegato per lo sviluppo farmaceutico. Nei farmaci commerciali è stata osservata in alcuni casi la cristallizzazione concomitante della Forma I e della MH. La disidratazione della MH può portare alla Forma V compromettendo la purezza del prodotto. La presenza della Forma V potrebbe essere favorita dalla formazione della MH durante una fase di produzione che coinvolge umidità e la sua transizione alla forma anidra può avvenire spontaneamente o durante le fasi di essiccazione [17].

### 3.3 Brushite

La brushite ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) o fosfato bicalcico diidrato (DCPD), è una fase minerale cristallina caratterizzata da catene di unità  $\text{Ca-PO}_4$  disposte parallelamente e legate da molecole d'acqua (Fig. 22 A). La prima formulazione di cemento di brushite fu descritta da Mirtchi e Lemaitre nel 1987 attraverso la reazione tra  $\beta$ -TCP e MCPM (fosfato monocalcico monoidrato) che produce brushite come indicato nell'equazione seguente:



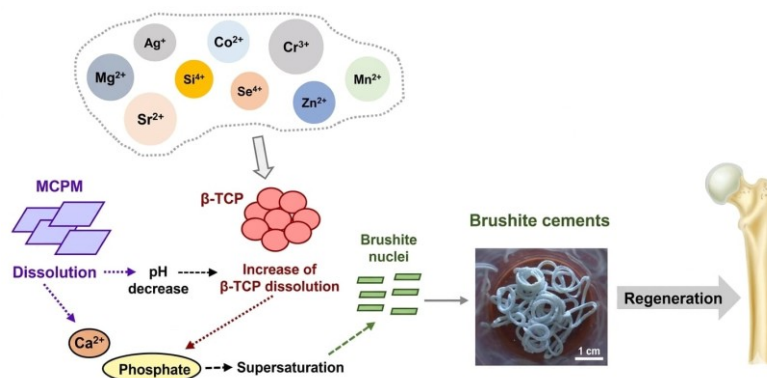
Il processo di presa del cemento inizia con la dissoluzione dell'MCPM in acqua che provoca un forte abbassamento del pH della pasta fino a valori intorno a 2,5. Questo accelera la dissoluzione del  $\beta$ -TCP favorendo la cristallizzazione della brushite. La rapida dissoluzione dei reagenti che rilasciano ioni calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e ioni fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) fino alla supersaturazione è seguita dalla nucleazione dei cristalli di brushite (Fig. 22 B).



**Figura 22.** A) Struttura cristallina della brushite B) Formazione della brushite [2]

Il tempo di presa, ossia il tempo in cui la miscela liquida diventa una pasta lavorabile, e l'iniettabilità rivestono un ruolo centrale nella produzione di biocementi. Il tempo di presa, nel caso di cementi iniettabili, deve essere sufficientemente lungo da permettere al chirurgo di applicare il cemento ma non eccessivo; tempi ideali si aggirano nell'ordine di 15 minuti. Anche l'iniettabilità è critica perché il cemento deve fluire attraverso siringhe con cannule strette e adattarsi al difetto osseo. Per migliorare l'iniettabilità e controllare il tempo di presa, sono stati sviluppati diversi approcci in cui si utilizzano additivi come acido citrico, acido fitico, solfati o pirofosfati. Tali agenti aumentano la repulsione tra le particelle e agiscono come ritardanti della presa [2].

Nel presente studio l'attenzione è stata rivolta a cementi brushitici drogati, che si ottengono a partire da  $\beta$ -TCP già dopato come mostra la Fig. 23.



**Figura 23.** Formazione della brushite drogata con ioni differenti. Immagine modificata da [2]

### 3.3.1. Sintesi dei cementi brushitici drogati

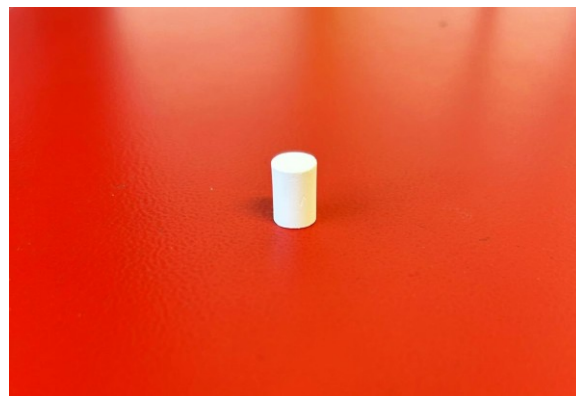
Per la preparazione di ogni biocemento, sono stati miscelati 300 mg di  $\beta$ -TCP drogato con Mg o Zn, 300 mg di MCPM e 6 mg di meloxicam. Le polveri sono state macinate manualmente in un mortaio di agata per 5 minuti al fine di ottenere una miscela omogenea. Dopo la macinazione, anziché utilizzare solo acqua distillata come fase liquida, è stata impiegata una soluzione con acido citrico, come ritardante, per prolungare il tempo di presa e migliorare la lavorabilità del composto. Alle polveri precedentemente macinate sono stati quindi aggiunti 300 mg di soluzione di acido citrico 0.5 M (circa 300  $\mu$ L, considerando la densità della soluzione), ottenendo un tempo di presa di circa 25 min, un tempo sufficiente per la produzione dei campioni di cemento. La soluzione di acido citrico (10 ml di soluzione 0.5 M) è stata così ottenuta:

$$0.5 \text{ M} : 1 \text{ L} = x : 0.010 \text{ L}$$
$$x = \frac{0.5 * 0.010}{1} = 5 * 10^{-3} \text{ mol}$$

La quantità in grammi di acido citrico è stata determinata come segue:

$$g(\text{acido citrico}) = 5 * 10^{-3} \text{ mol} * 192,13 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0.9606 \text{ g}$$

Dopo l'aggiunta della soluzione alle polveri, il composto è stato mescolato fino a formare una pasta, che è stata poi trasferita in una siringa utilizzata per colare il materiale all'interno di stampi cilindrici di circa 12 mm di altezza e 8 mm di larghezza (Fig. 24). I campioni sono stati infine lasciati essiccare in stufa a 25 °C per 24 ore per consentire l'asciugatura completa e il consolidamento del materiale.



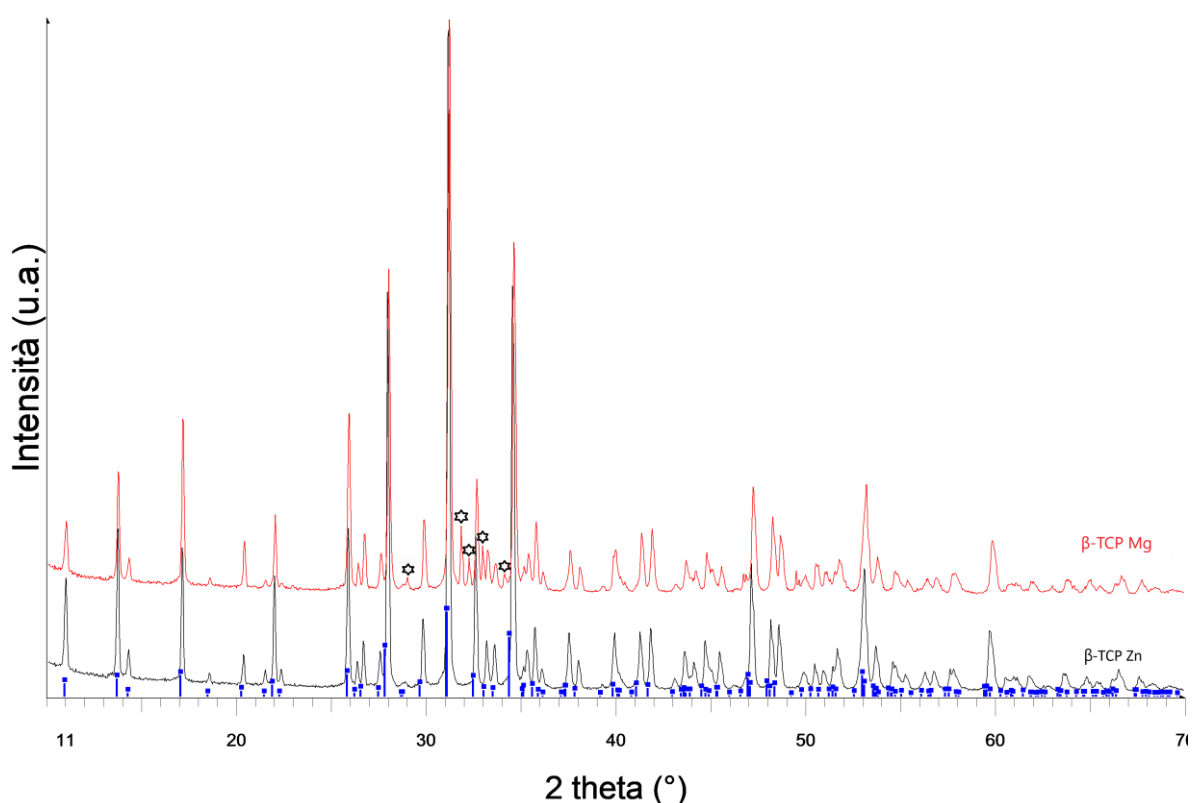
**Figura 24.** Campione di cemento a base di brushite sintetizzato e modellato in forma cilindrica

## Capitolo 4

### Risultati della caratterizzazione dei $\beta$ -TCP

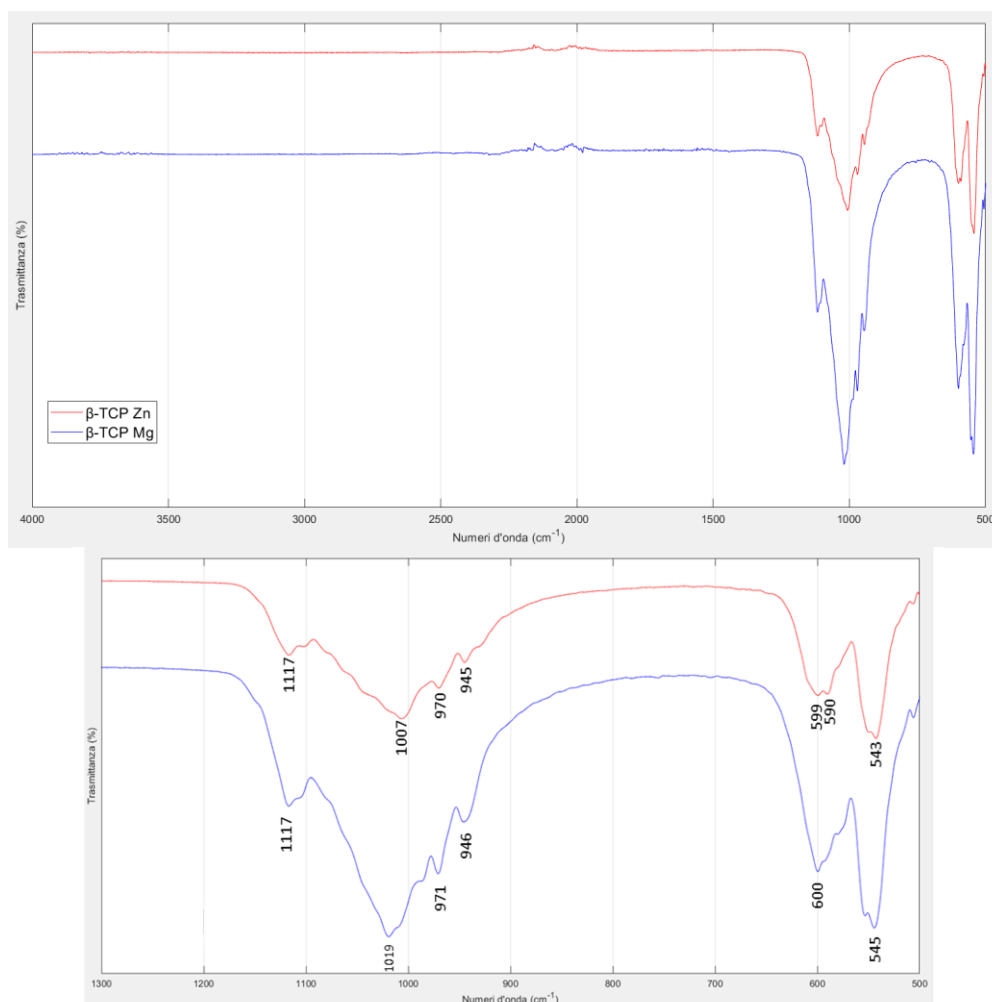
#### 4.1 Misure a raggi X

La Fig. 25 riporta i diffrattogrammi dei  $\beta$ -TCP drogati zinco (curva nera) e magnesio (curva rossa). Il campione drogato con zinco ( $\beta$ -TCP Zn) risulta in buon accordo con la fase  $\beta$ -TCP pura in quanto tutti i picchi sperimentali trovano corrispondenza con le barre, mentre il campione drogato magnesio ( $\beta$ -TCP Mg) presenta impurezze attribuibili alla fase HA. Questo può essere dovuto a disomogeneità locali durante la fase di sintesi, in quanto le differenze nella stechiometria tra i due composti sono davvero minime. Infatti, il rapporto tra Ca e P nel  $\beta$ -TCP è di 1.5, mentre nella HA è di 1.67.



**Figura 25.** Pattern XRD di campioni  $\beta$ -TCP Mg e  $\beta$ -TCP Zn. Le barre blu indicano le posizioni attese dei picchi del  $\beta$ -TCP, i simboli a stella rappresentano i picchi principali della fase HA

## 4.2 Misure FT-IR

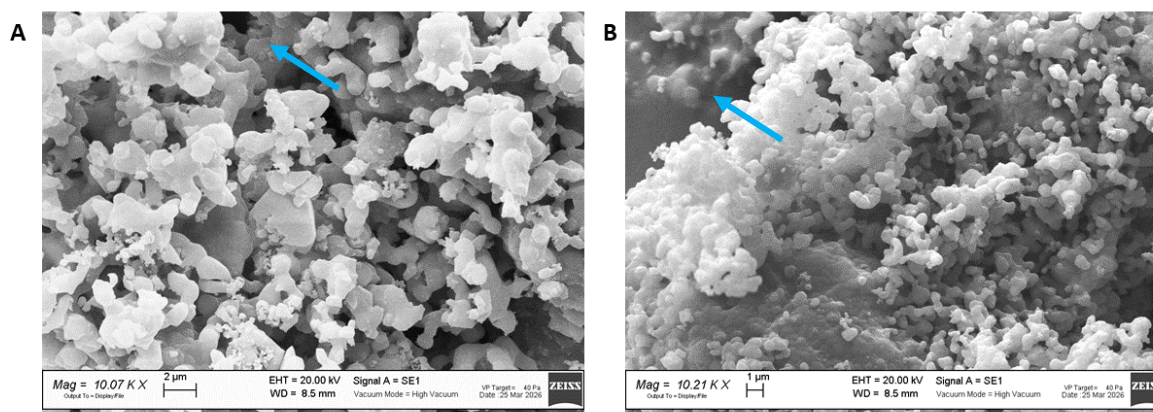


**Figura 26.** Spettro FT-IR dei  $\beta$ -TCP drogati zinco e magnesio nell'intero intervallo di numeri d'onda e uno zoom nell'intervallo 1300-500  $\text{cm}^{-1}$  con l'indicazione dei principali assorbimenti

La Fig. 26 mostra gli spettri FT-IR dei  $\beta$ -TCP drogati sia nell'intervallo completo che in un range ristretto per evidenziare meglio le bande caratteristiche. Lo ione fosfato libero  $\text{PO}_4^{3-}$ , caratterizzato da una simmetria puntiforme  $T_d$  (tetraedrica) ideale, presenta quattro modi di vibrazione: lo stiramento antisimmetrico e simmetrico a circa 1082  $\text{cm}^{-1}$  e 980  $\text{cm}^{-1}$  e il bending antisimmetrico e simmetrico a circa 567  $\text{cm}^{-1}$  e 420  $\text{cm}^{-1}$ , rispettivamente. Negli spettri ottenuti, la banda tra 900 e 1000  $\text{cm}^{-1}$  è attribuibile allo stiramento del gruppo  $\text{PO}_4^{3-}$ , mentre i picchi tra 540 e 600  $\text{cm}^{-1}$  sono associati alle vibrazioni di bending del gruppo  $\text{PO}_4^{3-}$ . Questi valori sono coerenti con quanto riportato in letteratura [19]. Shift e variazioni di intensità delle bande relative ai gruppi fosfato indicano modifiche della struttura cristallina causate sia dall'incorporazione degli ioni dopanti che dalle condizioni di sintesi e trattamento delle polveri. La maggiore intensità delle bande nel caso del drogaggio magnesio potrebbe essere compatibile anche con la presenza della fase HA, come rilevato dalla misura di diffrazione, che ha assorbimenti analoghi alla fase principale  $\beta$ -TCP.

### 4.3 Misure SEM/EDS

La Fig. 27 mostra le immagini ottenute mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) dei campioni di  $\beta$ -TCP. Nel caso del  $\beta$ -TCP drogato con zinco (Fig. 27A), la polvere presenta particelle di morfologia irregolare e di dimensioni piuttosto elevate, dell'ordine dei micron (vedi barra nella parte bassa della immagine). Al contrario, nel  $\beta$ -TCP drogato con magnesio (Fig. 27B), le particelle risultano più fini e caratterizzate da una morfologia più regolare, pressoché sferica. Particolarmente nel campione drogato con Mg sono presenti zone in cui i grani sembrano fusi (vedi frecce azzurre), probabilmente a causa dell'alta temperatura di sinterizzazione utilizzata (1000 °C), che per questo campione può essere prossima a quella di fusione.



**Figura 27.** Immagini SEM dei campioni di  $\beta$ -TCP. A) drogato con zinco, B) drogato con magnesio

La composizione elementare dei  $\beta$ -TCP è stata determinata mediante analisi EDS per verificare l'accordo con i dati stechiometrici. I valori ottenuti sono riportati nelle Tabelle 1 e 2.

	Ca	P	Zn
$\beta$ -TCP Zn	16	10,9	0,6

**Tabella 1.** Percentuali atomiche di calcio, fosforo e zinco presenti nel  $\beta$ -TCP drogato zinco. I valori sono la media dei risultati in tre punti diversi del campione.

	Ca	P	Mg
$\beta$ -TCP Mg	12,1	8,9	0,7

**Tabella 2.** Percentuali atomiche di calcio, fosforo e magnesio presenti nel  $\beta$ -TCP drogato magnesio. I valori sono la media dei risultati in tre punti diversi del campione

I valori riportati nelle tabelle mostrano che il rapporto Ca/P determinato con EDS, che nella fase  $\beta$ -TCP drogata dovrebbe valere 1.45 come da stechiometria (vedi sezione 3.1.1), è del tutto in linea col valore atteso, considerando anche l'errore della misura, a dimostrazione che la fase si è correttamente formata. Le percentuali assolute degli elementi però si discostano da quelle attese, tranne per i droganti. Si può fare il calcolo delle percentuali

atomiche attese per la fase in esame in questo modo: 13 atomi in totale nella fase  $\beta$ -TCP, per il Ca la quantità stechiometrica è pari a  $2.9/13 = 22$  at%, per il P  $2/13 = 15$  at% e per il drogante  $0.1/13 = 0.7$  at%. È noto che le misure EDS sono sensibili alla preparazione del campione, alla quantità di campione analizzata e che hanno un errore di misura piuttosto elevato. Nel caso in esame, la conformazione delle polveri e il numero atomico non troppo elevato degli elementi presenti possono aver provocato questi scostamenti dai valori attesi.

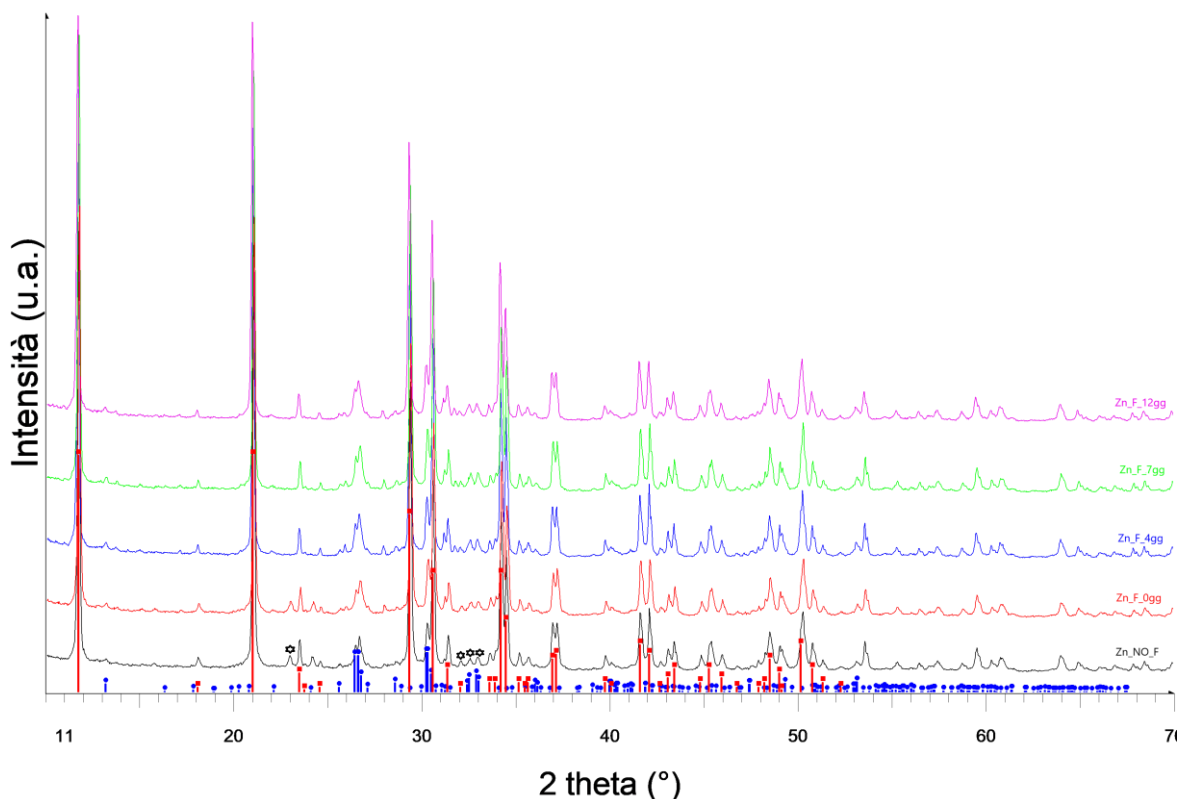
In conclusione, le varie misure effettuate sui  $\beta$ -TCP hanno mostrato la loro corretta formazione e composizione elementare. La morfologia risulta leggermente diversa tra i campioni, ad indicare quindi un effetto del drogante, che, seppur presente in bassa quantità, si riflette anche sulla purezza, meno elevata nel caso del drogaggio con magnesio.

# Capitolo 5

## Risultati della caratterizzazione dei biocementi

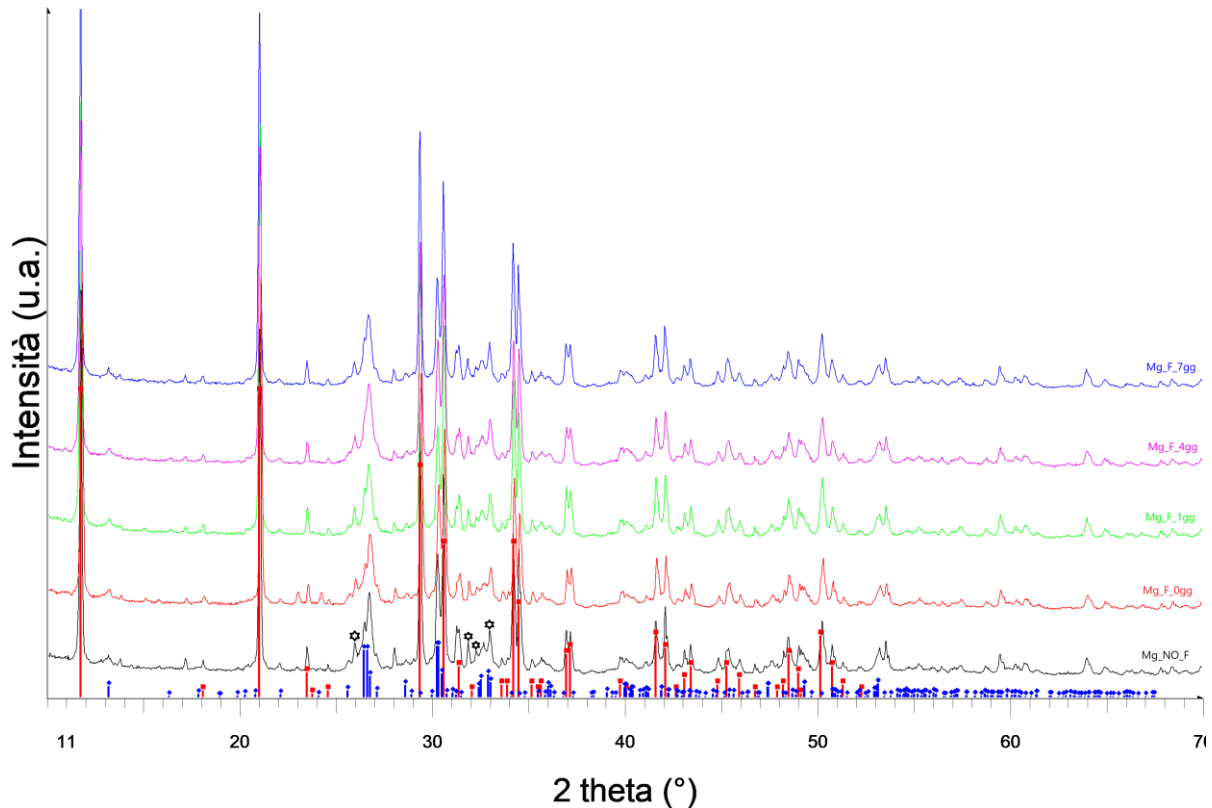
### 5.1 Misure a raggi X

La Fig. 28 mostra i diffrattogrammi dei cementi drogati con zinco senza farmaco, caricati con farmaco e dopo immersione per diversi giorni in PBS (e conseguente rilascio del farmaco). Tale confronto può consentire di valutare l'evoluzione della composizione del materiale nel tempo durante l'immersione nell'ambiente acquoso. La fase principale è in tutti i casi la brushite, come atteso e come evidente dall'accordo con le barre delle posizioni teoriche. La presenza di monetite come fase secondaria principale è ampiamente riportata anche in letteratura nei CPC, in quanto essa può derivare dalla trasformazione della brushite nella corrispondente fase anidra, in funzione delle condizioni di sintesi e dei parametri di reazione [20]. Una certa evoluzione dei pattern e quindi delle fasi presenti col tempo di immersione è evidente alla semplice osservazione, ma sarà opportunamente quantificata in seguito (sezione 5.1.1).



**Figura 28.** Diffrattogrammi dei campioni drogati zinco senza farmaco e con farmaco al variare del tempo di immersione. Le barre rosse corrispondono ai picchi attesi per la fase brushite mentre le barre blu e le stelle indicano i picchi di monetite e  $\alpha$ -TCP rispettivamente.

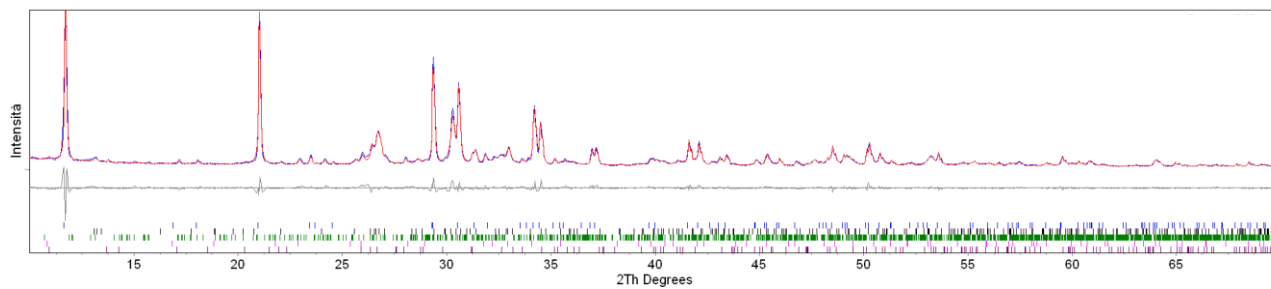
La Fig. 29 mostra i diffrattogrammi dei campioni di cemento drogati magnesio. Si osserva che, con l'aumentare dei giorni di immersione, l'intensità dei picchi associati alla brushite e alla monetite rimane sostanzialmente costante suggerendo una buona stabilità delle fasi principali nel materiale. Ad una prima osservazione e confronto tra le due serie di campioni sembra di poter affermare che la fase monetite sia più presente nei campioni drogati magnesio.



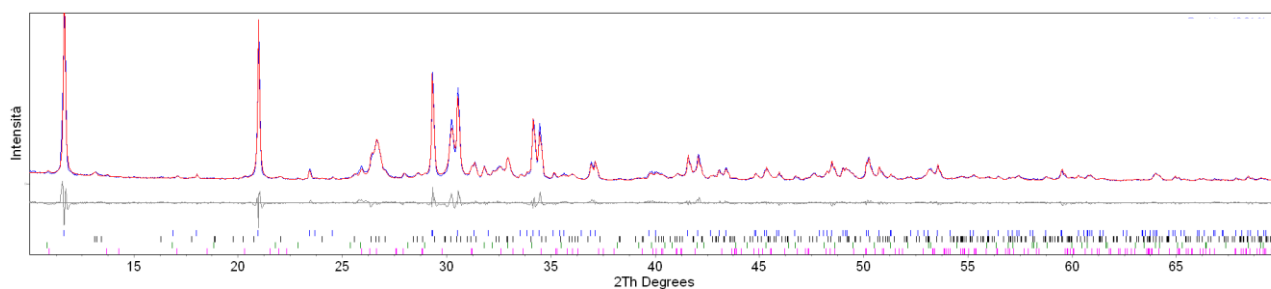
**Figura 29.** Diffrattogrammi dei campioni drogati magnesio senza farmaco e con farmaco a diversi tempi di immersione. Le barre blu indicano le posizioni caratteristiche della monetite mentre le barre rosse quelle della brushite. I simboli a stella evidenziano i principali picchi attribuibili alla fase HA.

### 5.1.1 Raffinamento strutturale mediante metodo di Rietveld

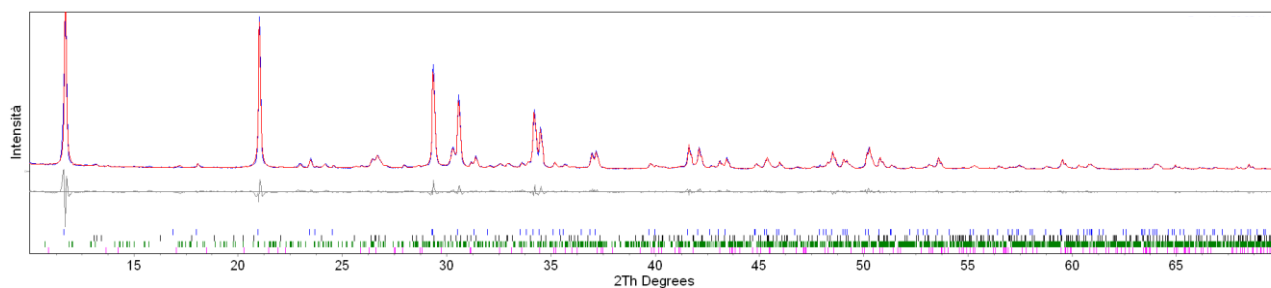
Per ottenere dati quantitativi riguardo alle fasi presenti nei diversi campioni che sono state solo evidenziate in modo qualitativo nelle immagini 28 e 29, è stato utilizzato il raffinamento strutturale mediante metodo di Rietveld, discusso nella sezione 2.1.1. Di seguito (Figure 30-33) sono riportati alcuni esempi di raffinamento sui campioni drogati non immersi e dopo quattro giorni di immersione. Le fasi che si sono stabilizzate, quasi in tutti i casi sono la brushite, la monetite, l'idrossiapatite e le due forme polimeriche  $\alpha$ -TCP e  $\beta$ -TCP, quest'ultimo probabilmente residuo della reazione essendo uno dei reagenti. Al termine del raffinamento è stata raggiunta in tutti i casi una corrispondenza soddisfacente tra dati sperimentali (pattern blu) e calcolati (pattern rosso) come ben dimostrato dalla linea grigia che rappresenta la differenza tra i due.



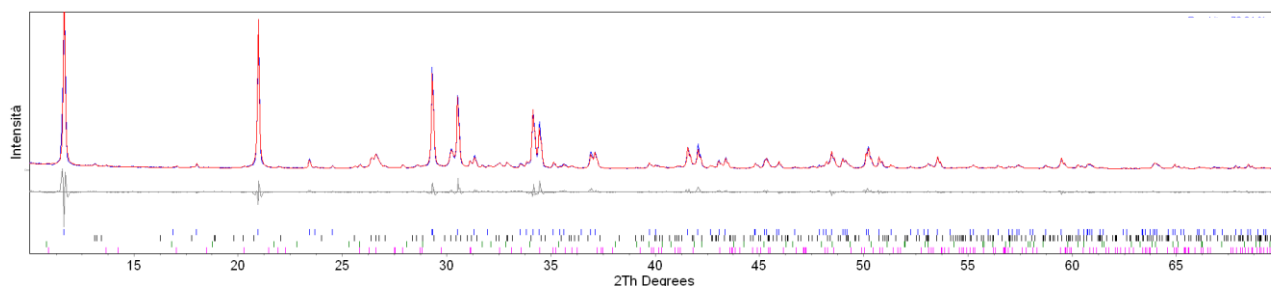
**Figura 30.** Risultato del raffinamento del biocemento drogato magnesio non immerso



**Figura 31.** Risultato del raffinamento del biocemento drogato magnesio al quarto giorno di immersione



**Figura 32.** Risultato del raffinamento del biocemento drogato zinco non immerso



**Figura 33.** Risultato del raffinamento del biocemento drogato zinco al quarto giorno di immersione

Nelle Tabelle 3 e 4 sono riportate tutte le percentuali in peso delle fasi determinate per ogni tipologia di cemento studiato nel presente lavoro. La Tabella 3 mette in evidenza che per la serie drogata con zinco la fase prevalente brushite sembra diminuire nel corso dell'immersione. La fase  $\alpha$ -TCP presente nei cementi non immersi, invece scompare e al suo posto si osserva dopo 4 giorni la formazione di idrossiapatite. La presenza di questa fase, che è simile alla componente minerale dell'osso è certamente un dato rilevante che suggerisce che questi cementi stimolino la sua formazione e quindi possano essere più facilmente osseointegrati. Tale effetto è confermato in letteratura: i cementi modificano la loro morfologia e composizione dopo l'immersione e, in particolare, dopo 60 giorni di immersione le fasi presenti risultano essere DCPD e HA [21]. L'aggiunta del farmaco sembra inibire la reazione di formazione della brushite, in quanto, come evidente in Tabella 3 la percentuale di  $\beta$ -TCP passa da 1.3% per il cemento non caricato a 4.1% nel caso di caricamento, valore che poi si mantiene al progredire del tempo di immersione. Anche la fase monetite, una impurezza sempre presente nei cementi brushitici, aumenta all'aggiunta del farmaco e si mantiene poi invariata durante l'immersione in PBS. La brushite quindi sembra convertirsi in monetite.

	Brushite	Monetite	$\alpha$ -TCP	$\beta$ -TCP	HAP
Zn_NO_F	80,8	13,7	4,2	1,3	0
Zn_F_0gg	72,7	19,5	3,7	4,1	0
Zn_F_4gg	70,2	21,4	0	6,4	2,0
Zn_F_7gg	71,4	21,0	0	6,2	1,5
Zn_F_12gg	72,2	20,2	0	5,9	1,8

**Tabella 3.** Percentuali in peso delle fasi presenti nei biocementi drogati zinco al variare dei giorni di immersione

	Brushite	Monetite	$\alpha$ -TCP	$\beta$ -TCP	HAP
Mg_NO_F	51,5	28,0	0	14,0	6,5
Mg_F_0gg	46,2	37	2,1	8,4	6,3
Mg_F_1gg	53,5	32,3	0	8,5	5,7
Mg_F_4gg	46	39,4	0	8,5	6,1
Mg_F_7gg	51,4	32,8	0	9,7	6,1

**Tabella 4.** Percentuali in peso delle fasi presenti nei biocementi drogati magnesio al variare del tempo di immersione

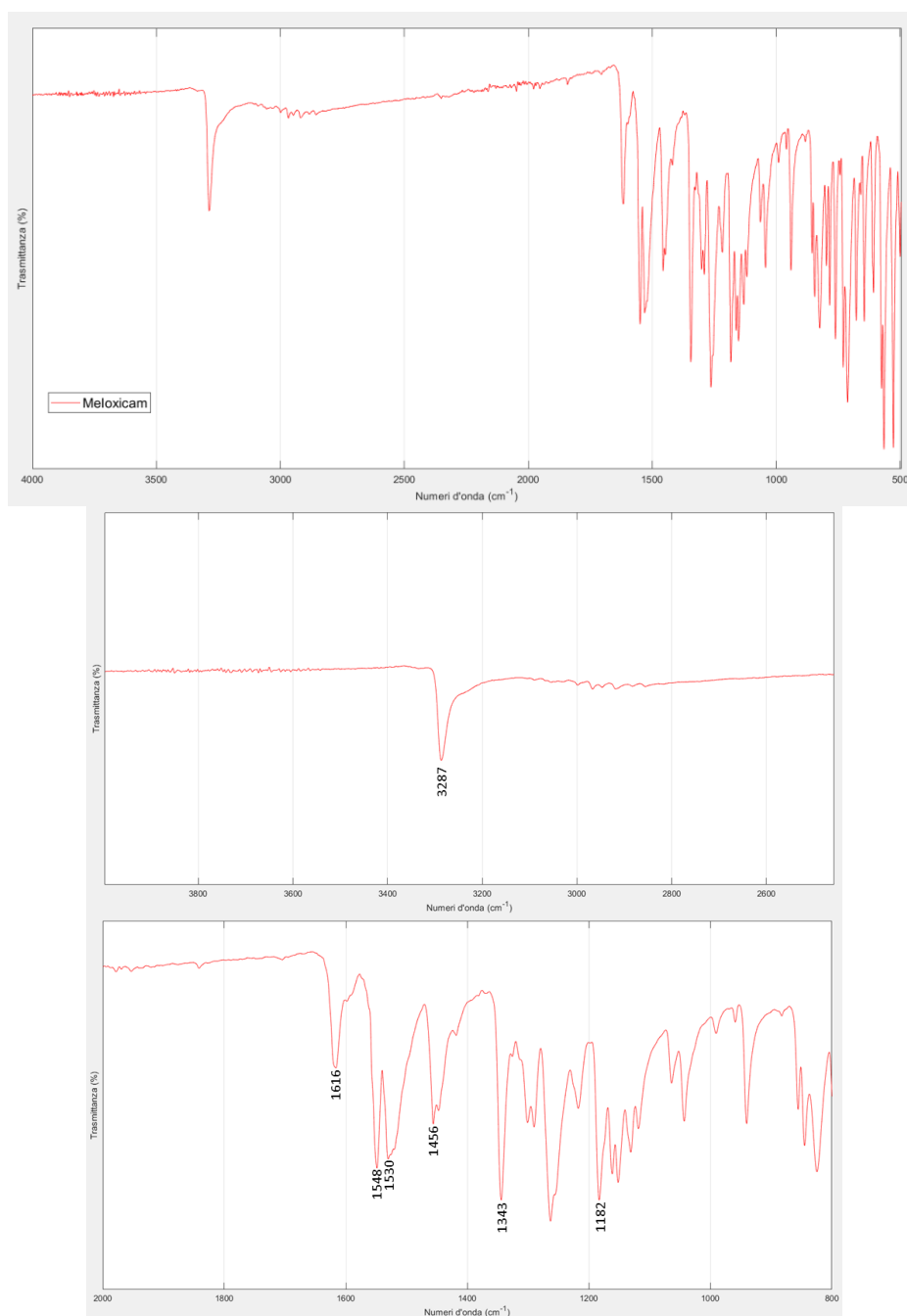
Nel caso dei cementi drogati con magnesio (Tabella 4), è da subito evidente che la fase brushite è presente in quantità minore rispetto a quelli con zinco, mentre aumenta la fase monetite. La fase  $\alpha$ -TCP è presente in bassa quantità solo nel cemento caricato con il farmaco e non immerso. In questa tipologia di cementi il farmaco non sembra inibire la reazione. Il  $\beta$ -TCP non reagito presente in alta quantità all'inizio sembra diminuire una volta aggiunto il farmaco e probabilmente si converte in monetite. La fase idrossiapatite in questo caso è già presente prima dell'immersione in PBS (era già presente anche nella fase  $\beta$ -TCP drogata con magnesio) e quindi nulla si può dire sulla sua eventuale formazione a seguito dell'immersione. Poiché la sua quantità si mantiene sempre intorno al 6% sembra di poter affermare che non ci sia stimolazione nella sua ulteriore formazione.

Sulla base di queste misure sembra che il drogaggio più promettente sia quello con Zn, che stimola in modo più marcato la formazione di idrossiapatite.

## 5.2 Misure FT-IR

Il confronto tra lo spettro del farmaco puro e del complesso cemento-farmaco può permettere dapprima di individuare la eventuale presenza del farmaco, che non è stato possibile evidenziare dalle misure di diffrazione (forse perché si è convertito a fase amorfa o a causa della sua bassa quantità) e nemmeno dalle misure di microscopia. Inoltre, potrebbe essere possibile individuare gli eventuali gruppi funzionali del farmaco coinvolti nei legami con la matrice cementizia. Infatti, se le bande caratteristiche del farmaco risultassero invariate, si potrebbe ipotizzare la presenza di una miscela di fasi in cui brushite e farmaco sono cristallizzati separatamente. Al contrario, la comparsa, scomparsa o variazione delle bande del farmaco potrebbe suggerire l'instaurarsi di interazioni tra i due.

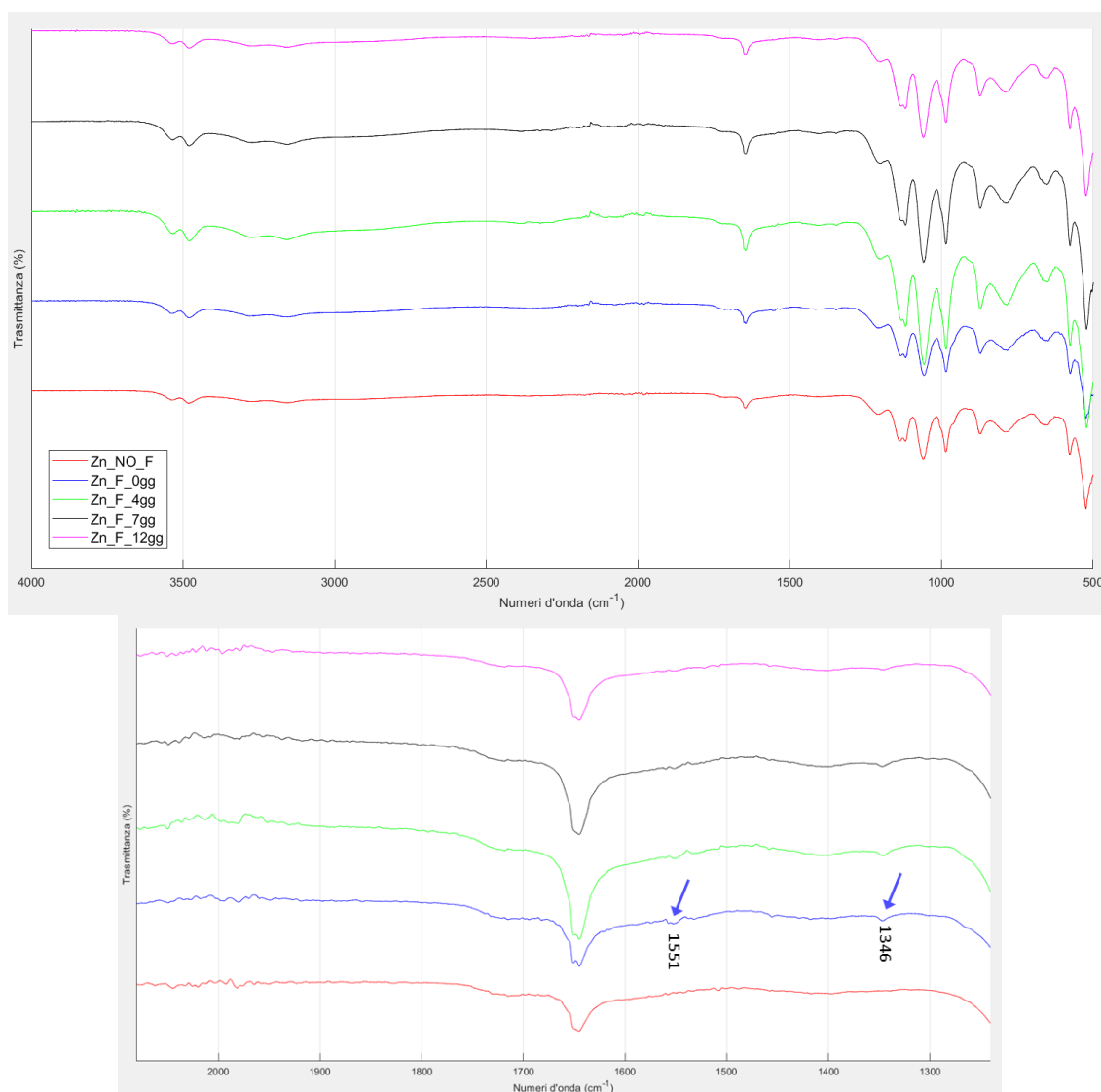
## 5.2.1 Spettro FT-IR del meloxicam



**Figura 34.** Spettro FT-IR del meloxicam nell'intero intervallo di numeri d'onda e relativi ingrandimenti

Nello spettro FT-IR del meloxicam si osservano i principali assorbimenti a 3287 cm<sup>-1</sup> attribuibile allo stiramento del gruppo N-H, a 1616 cm<sup>-1</sup> dovuto allo stiramento del gruppo carbonilico (C=O) amidico, a 1548-1530-1456 cm<sup>-1</sup> riconducibili alle vibrazioni di stiramento dell'anello aromatico, e a 1343 e 1182 cm<sup>-1</sup> corrispondenti rispettivamente allo stiramento asimmetrico e simmetrico del gruppo solfonile (SO<sub>2</sub>). Lo spettro è in accordo con i dati di letteratura [22].

## 5.2.2 Spettri FT-IR dei biocementi drogati con zinco

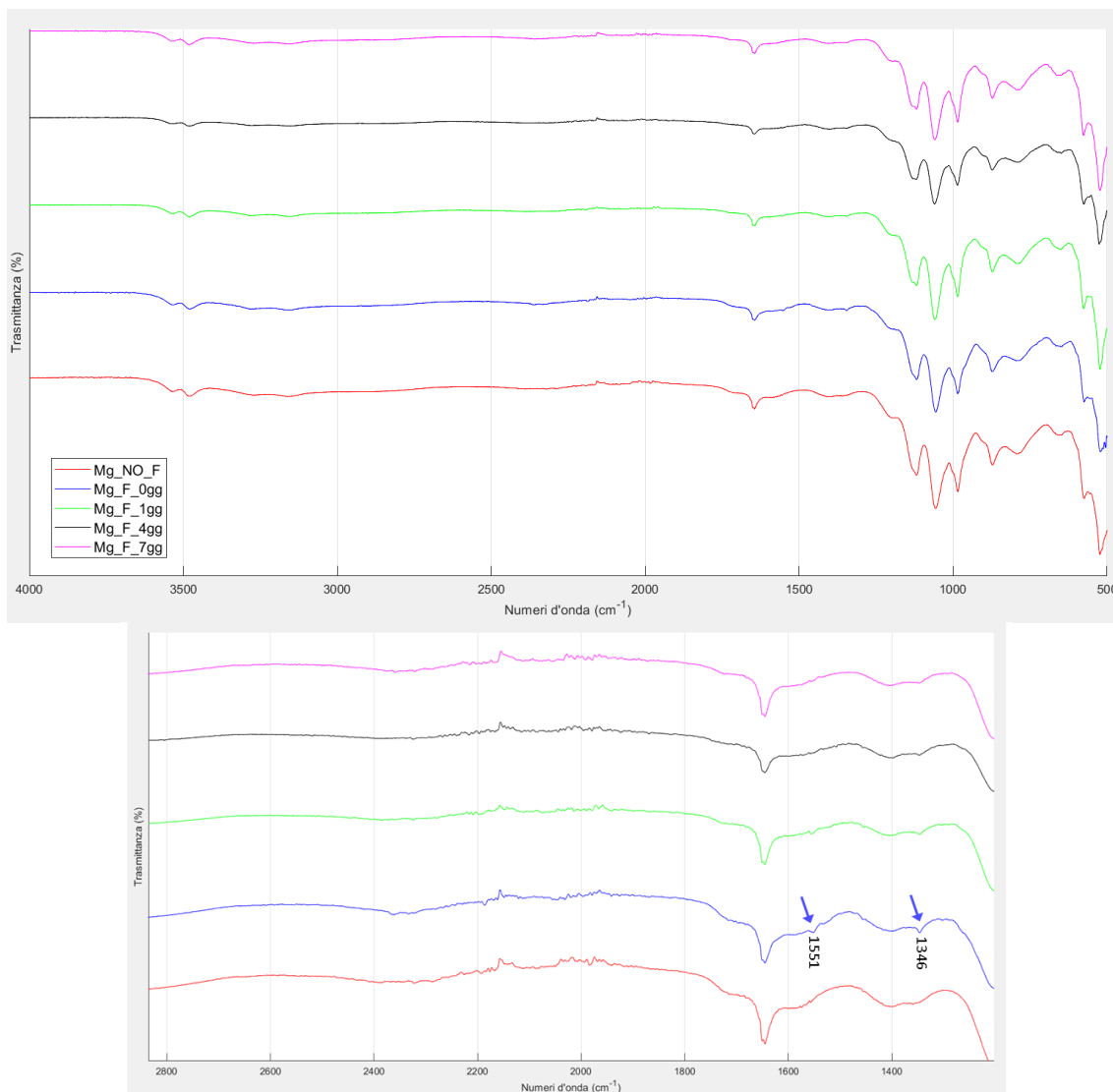


**Figura 35.** Spettri FT-IR dei biocementi drogati zinco nell'intervallo di numeri d'onda completo e relativo ingrandimento

I picchi principali negli spettri FT-IR sono quelli attesi per la fase brushite (Fig. 35). L'allungamento O-H delle molecole d'acqua è responsabile delle bande situate a 3536, 3478, 3278 e 3155  $\text{cm}^{-1}$ . La banda a 1645  $\text{cm}^{-1}$  (molto stretta) può essere assegnata alla flessione O-H delle molecole d'acqua. La banda a 1200  $\text{cm}^{-1}$  è dovuta alla flessione P-O-H nel piano, mentre l'allungamento P-O è caratterizzato da tre bande intense a 1116, 1056 e 984  $\text{cm}^{-1}$ . L'allungamento P-O(H) e l'evoluzione delle molecole d'acqua hanno dato origine rispettivamente a due bande a 871 e 778  $\text{cm}^{-1}$ . La banda a 648  $\text{cm}^{-1}$  è assegnata alla flessione P-O del gruppo  $\text{PO}_4^{3-}$ . Le bande caratteristiche a numeri d'onda 1346 e 1551  $\text{cm}^{-1}$  (benché molto deboli) si possono attribuire al meloxicam (vedi spettro in Fig. 34). È infatti ben evidente che nello spettro del campione senza farmaco (traccia rossa) non sono presenti. Si può osservare una diminuzione dell'intensità della banda associata al farmaco a seguito dell'immersione dei cementi in soluzione (non è più evidente infatti dopo 12 giorni di

immersione), che conferma l'avvenuto rilascio del farmaco in accordo con i risultati riportati nella sezione 5.5 relativi al rilascio del meloxicam.

### 5.2.3 Spettri FT-IR dei biocementi drogati con magnesio

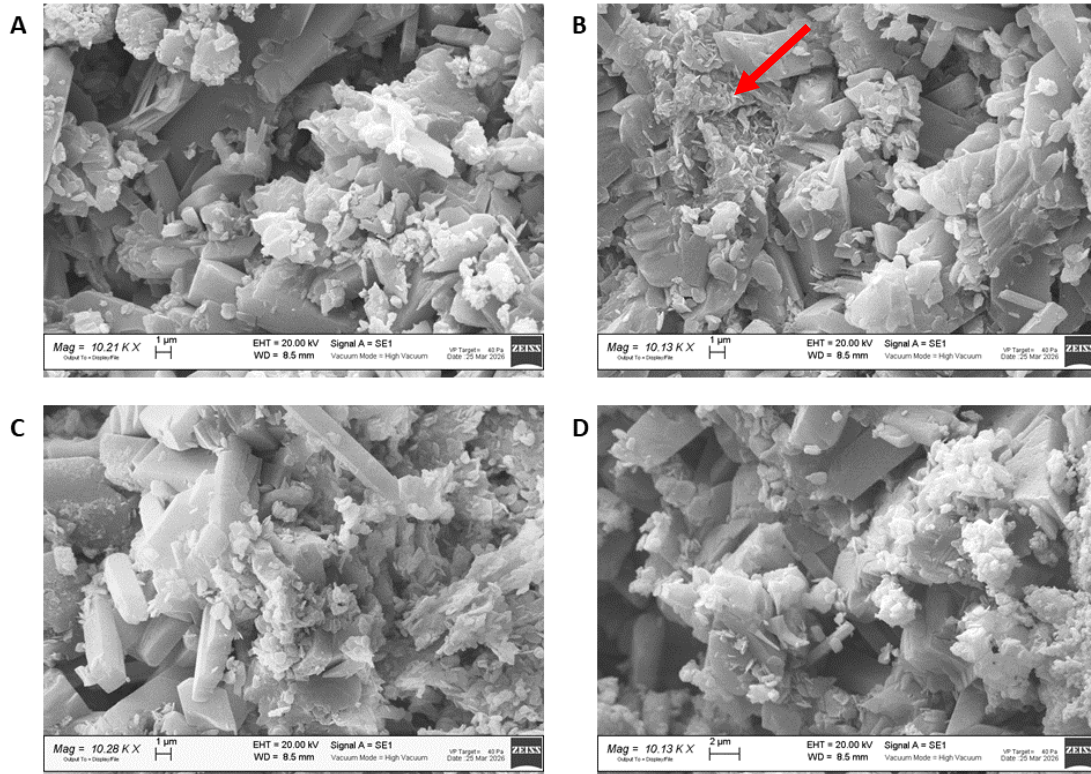


**Figura 36.** Spettri FT-IR dei biocementi drogati magnesio nell'intervallo di numeri d'onda completo e relativo ingrandimento

I picchi principali visibili negli spettri FT-IR sono anche in questo caso attribuibili alla fase brushite (Fig. 36) e l'interpretazione è dunque la medesima. I picchi attribuibili al farmaco a 1346 e 1551  $\text{cm}^{-1}$  sono più netti rispetto al caso del cemento drogato con Zn. Anche in questo caso è possibile osservare una diminuzione del picco relativo al farmaco all'aumentare del tempo di immersione.

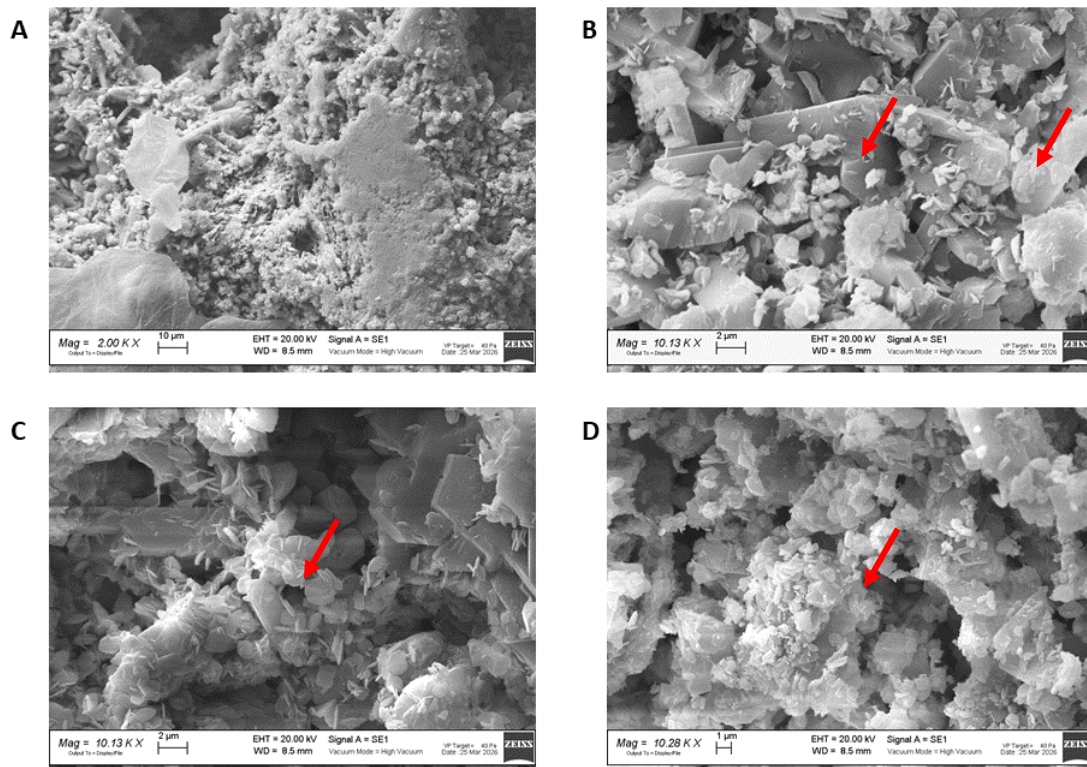
### 5.3 Misure SEM/EDS

L'obiettivo di queste misure sui cementi era esaminare la morfologia e valutare eventuali modifiche indotte dall'immersione in soluzione simulante l'ambiente biologico. I cementi drogati con zinco (Fig. 37) presentano aggregati di grandi dimensioni e non mostrano variazioni significative della morfologia al variare del tempo di immersione. Le tipiche strutture lamellari della brushite non sono ben visibili nelle micrografie, anche se nella Fig. 37 B se ne possono riconoscere alcune (vedi freccia rossa).



**Figura 37.** Immagini SEM dei campioni di cemento drogati con Zn al variare del tempo di immersione. A) Zn\_0gg, B) Zn\_4gg, C) Zn\_7gg, D) Zn\_7gg

Nei cementi drogati con magnesio (Fig. 38), la morfologia è caratterizzata da aggregati estremamente compatti che persistono anche all'aumentare del tempo di immersione. Sulla superficie di tali aggregati si dispongono le tipiche strutture lamellari della brushite (vedi frecce rosse), in questo caso molto evidenti in quasi tutte le immagini.



**Figura 38.** Immagini SEM dei campioni di cemento drogati con Mg. A) Mg\_0gg, B) Mg\_1gg, C) Mg\_4gg, D) Mg\_12gg

Per entrambe le tipologie di cementi si osservano aggregati di grandi dimensioni. Tale comportamento è probabilmente attribuibile al fatto che le polveri di  $\beta$ -TCP sono state sottoposte a macinazione meccanica, processo che le rende particolarmente fini e reattive, favorendo la conseguente formazione di aggregati estesi nel cemento. I vuoti tra i grani visibili in tutte le micrografie sono in linea con i dati relativi alla porosità (vedi sezione 5.4).

La composizione elementare dei cementi drogati con zinco e magnesio è stata determinata mediante analisi EDS. I valori ottenuti sono riportati nelle Tabelle 5 e 6.

	Ca	P	Zn
Zn_F_0gg	10,7	10,5	0,33
Zn_F_4gg	10,1	10,5	0,11
Zn_F_7gg	10,8	10,6	0,08
Zn_F_12gg	10,1	10	0

**Tabella 5.** Percentuali atomiche di calcio, fosforo e zinco presenti nei biocementi drogati zinco

Dall'analisi dei dati dei campioni contenenti zinco (Tabella 5) emerge che le percentuali atomiche di calcio e fosforo rimangono pressoché costanti all'aumentare del tempo di immersione, suggerendo una buona stabilità della struttura della brushite. Il rapporto Ca/P pari ad 1 è in linea con il valore atteso per la brushite ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). In tal caso la percentuale atomica attesa per Ca e P sarebbe di circa 12 at% (8 atomi totali escludendo gli idrogeni,  $1/8 = 12.5$  at% sia per Ca che per P) e quella determinata con EDS è in linea con l'atteso. La percentuale atomica attesa per il drogante è invece pari a circa 3.3 at% e il valore determinato prima dell'immersione è del tutto in linea con l'atteso. È evidente che lo zinco introdotto tende a decrescere al crescere del tempo di immersione e non risulta più rilevabile nei campioni dopo 12 giorni di immersione in soluzione.

	Ca	P	Mg
Mg_F_0gg	9,4	10,34	0,4
Mg_F_1gg	12,7	11,3	0
Mg_F_4gg	10,7	10,4	0
Mg_F_7gg	10,3	10,8	0

**Tabella 6.** Percentuali atomiche di calcio, fosforo e zinco presenti nei biocementi drogati magnesio

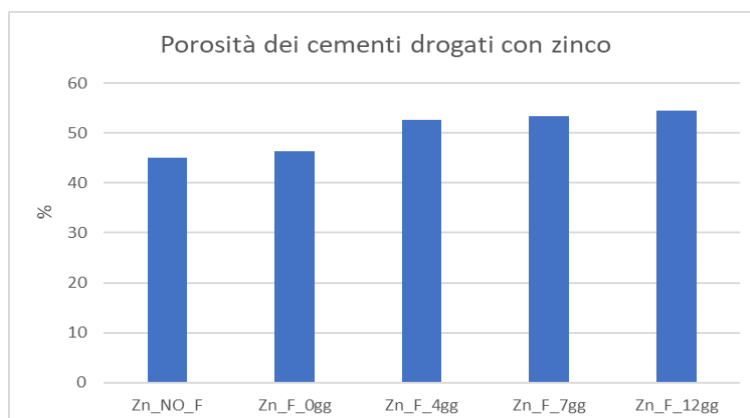
Nei cementi drogati con magnesio (Tabella 6), le percentuali atomiche di calcio e fosforo sono apparentemente più variabili rispetto al caso dello zinco, anche se mantengono un rapporto pari a circa 1 come atteso per la brushite, come già commentato per i campioni drogati con zinco. Il magnesio, che al tempo zero ha la quantità attesa dalla stechiometria, non risulta più rilevabile già dal primo giorno di immersione. Questo comportamento è coerente con l'elevata solubilità del magnesio in soluzione. Le corrette composizioni determinate sui cementi confermano anche in modo indiretto che a loro volta anche le fasi  $\beta$ -TCP impiegate come reagenti avevano la corretta composizione stechiometrica.

#### 5.4 Densità apparente e porosità

L'obiettivo della presente analisi è stato di valutare l'influenza della presenza del farmaco e del tempo di immersione sulla porosità dei cementi. I valori di porosità determinati sui vari cementi prima e dopo immersione in PBS sono riportati nelle Tabelle 7 e 8 e nelle Figure 39 e 40. Il calcolo è stato eseguito come descritto nella sezione 2.5.

CAMPIONE	DENSITÀ APPARENTE	POROSITÀ (%)
Zn_NO_F	1,28	45,15
Zn_F_0gg	1,25	46,31
Zn_F_4gg	1,10	52,66
Zn_F_7gg	1,09	53,36
Zn_F_12gg	1,06	54,51

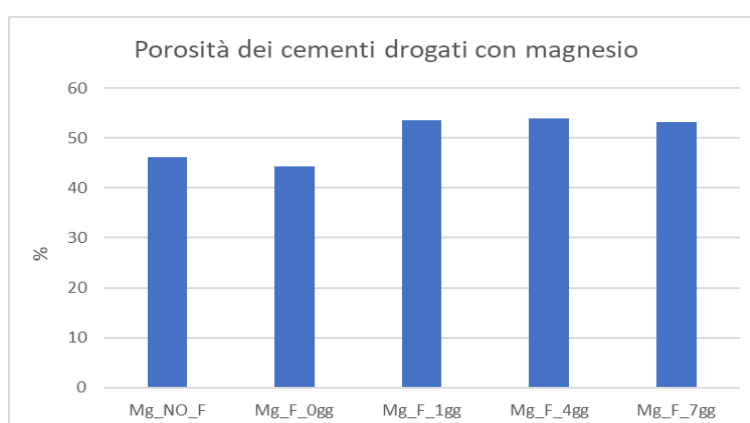
**Tabella 7.** Dati della densità apparente e della porosità dei campioni di cemento drogati zinco



**Figura 39.** Andamento della porosità (%) dei campioni di cemento drogati zinco

CAMPIONE	DENSITÀ APPARENTE	POROSITÀ (%)
Mg_NO_F	1,25	46,16
Mg_F_0gg	1,3	44,33
MG_F_1gg	1,08	53,57
Mg_F_4gg	1,07	53,94
Mg_F_7gg	1,09	53,22

**Tabella 8.** Dati della densità apparente e della porosità dei campioni di cemento drogati magnesio



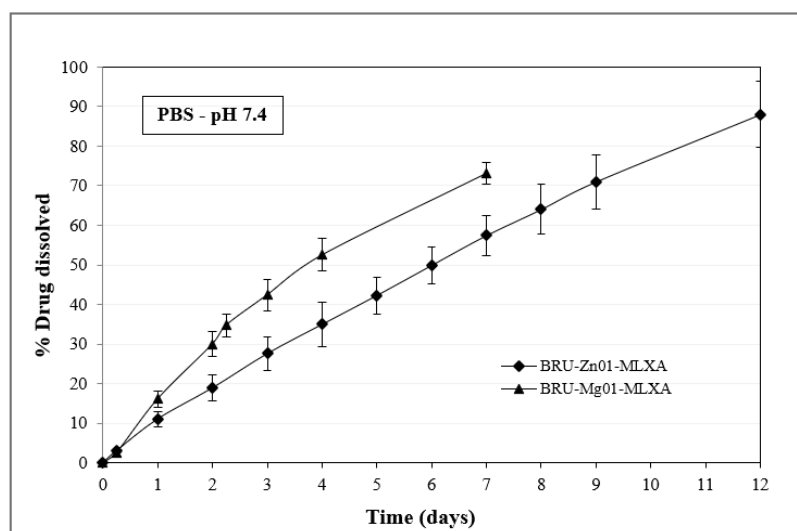
**Figura 40.** Andamento della porosità (%) dei campioni di cemento drogati magnesio

Per entrambe le tipologie di biocemento non si notano significative variazioni di porosità tra cementi con e senza farmaco non immersi, mentre si osserva un aumento della porosità nei cementi immersi rispetto a quelli non immersi. Tale comportamento è coerente con il fatto che, durante l'immersione, il fluido penetra progressivamente all'interno della matrice cementizia, favorendo l'espansione e/o la formazione di pori di dimensioni maggiori. Il

rilascio progressivo del farmaco, benché presente in piccola quantità, può certamente favorire questo processo. Questo incremento della porosità risulta favorevole dal punto di vista biologico, in quanto contribuisce alla creazione di un ambiente maggiormente bioattivo in grado di promuovere la crescita del tessuto osseo. Tuttavia, l'incremento progressivo della porosità può determinare una diminuzione della resistenza meccanica nel tempo contribuendo a rendere il biocemento più fragile. I valori di porosità intorno al 50% circa sono in linea con quelli determinati su campioni di cemento ottenuti in condizioni simili di rapporto tra  $\beta$ -TCP ed MCPM e rapporto liquido/polvere [23].

## 5.5 Analisi del rilascio farmaco

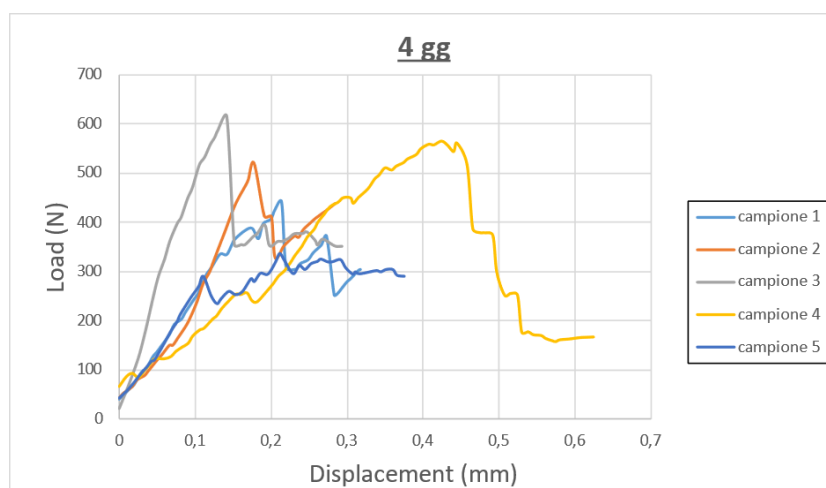
I risultati dei test di dissoluzione (Fig. 41) mostrano, nel caso dei cementi drogati magnesio, un rilascio rapido di farmaco nelle fasi iniziali. Infatti, già al quarto giorno di immersione circa il 50% del farmaco è stato rilasciato, mentre nei giorni seguenti la velocità di rilascio sembra rallentare. Questo non accade nel caso dei cementi drogati zinco dove si osserva un andamento quasi lineare della quantità rilasciata nel tempo. Questo effetto è particolarmente vantaggioso in quanto consente un rilascio del farmaco più controllato e modulabile a seconda delle esigenze specifiche. A parità di tempo di immersione, i cementi drogati zinco risultano più lenti nel rilascio rispetto a quelli drogati magnesio. Ad esempio, prendendo in considerazione il quarto giorno di immersione, i cementi drogati zinco hanno rilasciato circa il 35% di meloxicam contro il 50% circa dei cementi drogati magnesio. Il rilascio totale del farmaco avviene comunque dopo circa 12 giorni per entrambe le serie di campioni.



**Figura 41.** Profilo di rilascio del farmaco dei cementi drogati con zinco e magnesio

## 5.6 Prove meccaniche

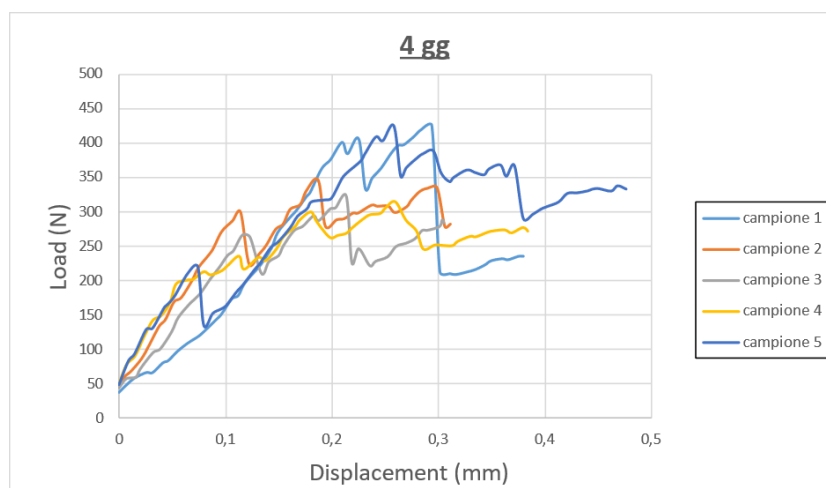
Le analisi relative alle misure di compressione sono state condotte seguendo le procedure riportate nella sezione 2.6. La Fig. 42 mostra, a titolo di esempio, le curve di resistenza alla compressione di cinque repliche di provini di biocemento drogati con zinco e immersi in soluzione per 4 giorni. Le curve mostrano un primo tratto lineare e un picco di carico corrispondente alla prima rottura ben distinguibili, sebbene siano evidenti alcune differenze riguardo al valore di carico di picco massimo e pendenza del tratto lineare tra i diversi provini. Rispetto alla curva teorica di compressione, si osserva come la variabilità nella preparazione dei campioni determini andamenti differenti delle curve sperimentali. La presenza di numerose discontinuità o salti lungo le curve è causata dalla presenza di difetti strutturali interni, come la porosità. Il post processing effettuato ha permesso di ottenere tratti iniziali di curva validi dai quali è stato possibile ricavare i parametri di nostro interesse (CS e modulo elastico). In Appendice A4 vengono riportati i grafici relativi alle misure di compressione effettuati su repliche di biocemento drogati con zinco senza farmaco e con farmaco al variare dei giorni di immersione.



**Figura 42.** Curve di resistenza alla compressione dei provini di cemento Zn\_F\_4gg

La Fig. 43 mostra, invece, un esempio di curve di resistenza alla compressione relative a cinque repliche di provini di biocemento drogato con magnesio immersi in soluzione per 4 giorni. Le curve presentano complessivamente un andamento qualitativamente simile, sebbene siano evidenti alcune differenze analoghe alle curve mostrate in Fig. 42. In generale, il carico di picco considerato per il calcolo del compressive strength è ottenuto dal primo picco della curva in quanto i picchi successivi non sono considerati validi perché rappresentano danni strutturali successivi al primo. Inoltre, in prove come quelle relative al primo e al secondo campione in Figura 43, risulta evidente che, dopo il primo picco, si osserva un decadimento della forza, probabilmente dovuto alla porosità del materiale, seguito da un successivo aumento della forza a causa dell'accumulo di residui del provino durante la prova che contribuiscono a opporre maggiore resistenza. Anche in questo caso risulta quindi opportuno non tenere in considerazione i valori forza-spostamento successivi al primo picco registrato. In Appendice A5 vengono riportati i grafici relativi alle misure di

compressione effettuati su repliche di biocemento drogati con magnesio senza farmaco e con farmaco al variare dei giorni di immersione.



**Figura 43.** Curve di resistenza alla compressione dei provini di cemento Mg\_F\_4gg

Le tabelle sottostanti riportano i valori di picco massimo (Tabelle 9, 12), compressive strength (Tabelle 10, 13) e modulo elastico (Tabelle 11, 14) per le diverse tipologie di campioni. Dalle Tabelle sono stati scartati, per il calcolo di media e deviazione standard, i valori evidenziati in rosso, in quanto superiori o inferiori ai limiti definiti dall'analisi dei quartili.

Picco [N]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	MEDIA	SD
Zn_F_0gg	453,2	450,8	764,3	577,8	638,8	833,0	-	-	-	619,6	187,2
Zn_NO_F	584,1	591,8	821,6	964,5	470,7	341,8	351,4	257,9	741,2	569,5	238,8
Zn_F_4gg	334,2	521,2	616,0	252,6	290,1	-	-	-	-	402,8	157,7
Zn_F_7gg	289,3	228,5	206,5	235,6	293,5	-	-	-	-	250,7	38,7
Zn_F_12gg	392,2	242,1	266,2	233,5	355,6	-	-	-	-	297,9	71,6

**Tabella 9.** Picchi di carico massimo per biocementi drogati con zinco

Compressive strength [MPa]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	MEDIA	SD
Zn_F_0gg	9,7	9,9	16,6	12,4	13,8	18,1	-	-	-	13,4	4,1
Zn_NO_F	12,6	12,8	17,5	21,2	10,2	7,5	7,5	5,6	16,0	12,3	5,2
Zn_F_4gg	7,3	11,2	13,2	5,4	6,2	-	-	-	-	8,7	3,4
Zn_F_7gg	6,1	4,9	4,4	5,1	6,3	-	-	-	-	5,4	0,8
Zn_F_12gg	8,4	5,2	5,6	5,0	7,5	-	-	-	-	6,4	1,5

**Tabella 10.** Valori di compressive strength per biocementi drogati con zinco

Modulo elastico [MPa]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	MEDIA	SD
Zn_F_0gg	689,6	416,8	1290,1	904,4	1181,5	809,2	-	-	-	881,9	321,1
Zn_NO_F	458,1	508,4	1145,8	1360,8	484,8	863,0	370,6	505,7	670,9	707,6	344,6
Zn_F_4gg	452,8	368,4	1025,9	264,5	386,8	-	-	-	-	368,1	78,0
Zn_F_7gg	229,6	194,1	173,3	277,7	458,0	-	-	-	-	218,7	45,7
Zn_F_12gg	490,6	405,7	87,1	491,2	615,8	-	-	-	-	500,8	86,5

*Tabella 11. Valori di modulo elastico per biocementi drogati con zinco*

Picco [N]	1	2	3	4	5	6	7	MEDIA	SD
Mg_F_0gg	513,9	355,3	349,9	415,2	422,2	357,8	424,2	387	36
Mg_NO_F	522,2	640,5	382,8	697,4	232,5	334,4	-	468	182
Mg_F_1gg	455,4	325,2	564,7	367,6	381,6	-	-	419	94
Mg_F_4gg	401,1	299,7	263,4	200,0	220,5	-	-	277	79
Mg_F_7gg	342,5	284,8	316,1	201,9	470,5	-	-	323	98

*Tabella 12. Picchi di carico massimo per biocementi drogati con magnesio*

Compressive strength [MPa]	1	2	3	4	5	6	7	MEDIA	SD
Mg_F_0gg	11,2	7,6	7,6	9,0	9,1	7,7	9,0	8,3	0,8
Mg_NO_F	11,1	13,8	8,3	15,0	5,0	7,2	-	10,1	3,9
Mg_F_1gg	10,2	7,0	11,9	7,9	8,2	-	-	9,0	2,0
Mg_F_4gg	8,6	6,5	5,7	4,4	4,8	-	-	6,0	1,7
Mg_F_7gg	7,3	6,0	6,6	4,4	10,1	-	-	6,9	2,1

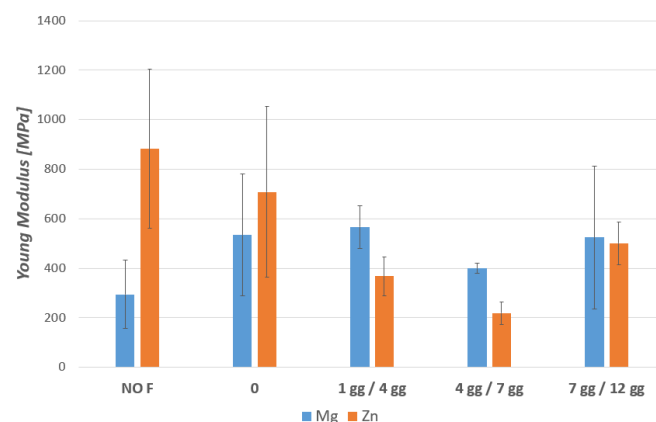
*Tabella 13. Valori di compressive strength per biocementi drogati con magnesio*

Modulo elastico [MPa]	1	2	3	4	5	6	7	MEDIA	SD
Mg_F_0gg	1016,9	389,2	154,2	398,5	238,0	454,2	132,7	294,45	137,4
Mg_NO_F	466,0	744,9	331,9	909,5	268,6	482,2	-	533,84	246,6
Mg_F_1gg	693,4	523,9	505,1	544,2	1020,7	-	-	566,64	86,0
Mg_F_4gg	382,1	421,9	293,7	515,7	394,3	-	-	399,44	20,4
Mg_F_7gg	641,2	721,7	289,5	151,4	816,3	-	-	524,01	288,1

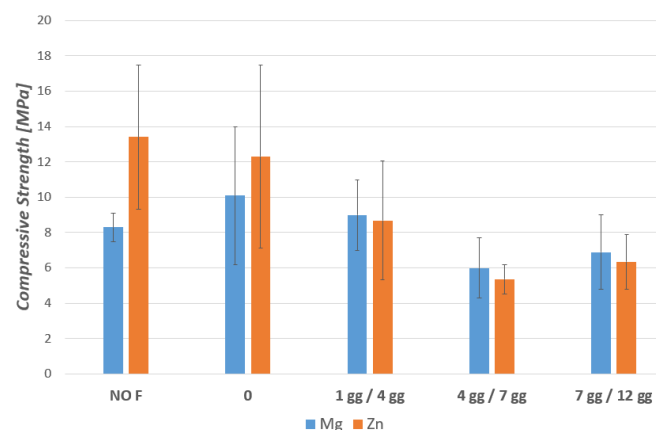
*Tabella 14. Valori di modulo elastico per biocementi drogati con magnesio*

In Fig. 44 e 45 sono riportati il modulo di Young e il compressive strength dei cementi drogati con zinco e magnesio. Nel caso dei cementi drogati con zinco l'analisi dei parametri meccanici evidenzia che, all'aumentare dei giorni di immersione, si osserva una progressiva diminuzione del picco di carico massimo sopportato dal provino. Questo comportamento risulta coerente con i dati di porosità (vedi sezione 5.4) nei quali si evidenzia un incremento della porosità all'aumentare del tempo di immersione. L'aumento della porosità implica una maggiore presenza di vuoti all'interno della struttura del materiale, di conseguenza il

materiale diventa più fragile e meno resistente. All'aumentare dei giorni di immersione, si osserva la concomitante diminuzione del modulo di Young. Ciò è in linea con i risultati attesi: il materiale diventa più poroso, di conseguenza risulta meno rigido e più facilmente deformabile. Al contrario, per i cementi drogati magnesio, dall'analisi complessiva dei dati non emerge un trend definito di diminuzione o aumento dei parametri meccanici all'aumentare dei giorni di immersione, anche considerando le deviazioni standard ottenute. Possiamo notare che però tra CS e modulo elastico c'è una correlazione: aumentano e diminuiscono in modo simile all'aumentare dei giorni di immersione sia per Mg che Zn (ad esempio il CS diminuisce in entrambe le tipologie di cementi e poi nell'ultimo giorno di immersione tende a risalire). Non sono evidenti grosse differenze nei valori assoluti del modulo di Young tra drogaggio Zn e Mg tranne in assenza di immersione, dove sembra più resistente il campione con Zn. In letteratura, infatti, è noto che l'aggiunta di Mg ai cementi brushitici comporta una diminuzione della resistenza a compressione, diminuzione che risulta più marcata all'aumentare della concentrazione di Mg nei cementi [24]. Una volta immersi, le differenze tendono a ridursi e, all'aumentare dei giorni di immersione, si osserva un'inversione del trend, con i cementi drogati Mg che mostrano un modulo di Young superiore.



**Figura 44.** Medie e deviazioni standard del modulo di Young per le diverse tipologie di campioni



**Figura 45.** Medie e deviazioni standard del CS per le diverse tipologie di campioni

## Conclusione

In conclusione, il presente lavoro di tesi ha dimostrato che i biocementi drogati con zinco e magnesio rappresentano una valida opzione per applicazioni cliniche mirate alla rigenerazione di difetti ossei. È stato dimostrato che la fase brushite si forma facilmente partendo dai giusti rapporti delle fasi  $\beta$ -TCP ed MCPM e che l'aggiunta del drogante non interferisce con la formazione della fase attesa. Le due tipologie di cementi studiati hanno mostrato differenze morfologiche, chimiche-composizionali e meccaniche evidenziando come anche piccole quantità di drogante e farmaco possano influenzare in modo rilevante le proprietà finali del materiale. In particolare, nei cementi drogati con zinco è stata osservata, in seguito all'immersione, la formazione di idrossiapatite, principale componente minerale dell'osso. Questo risultato suggerisce una potenziale capacità di tali cementi di stimolare la formazione ossea e di favorire l'osseointegrazione. Tuttavia, l'aggiunta del farmaco sembra inibire la formazione della brushite, favorendo invece l'aumento della fase secondaria. Nel caso dei cementi drogati magnesio, la fase brushite risulta presente in quantità minore e l'aggiunta del farmaco non sembra influenzarne in modo significativo la formazione. Il tempo di presa, uno dei principali limiti dei cementi brushitici, risulta adeguato per entrambe le serie di campioni, indicando un miglioramento delle prestazioni complessive del materiale, grazie anche all'aggiunta dell'acido citrico come ritardante.

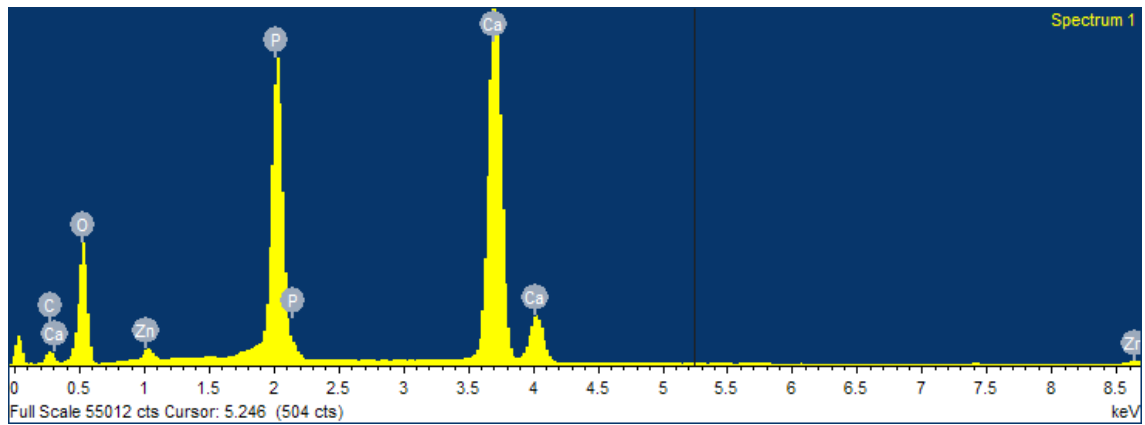
Entrambe le tipologie di cementi sono risultate idonee al caricamento e conseguente rilascio locale di meloxicam, un farmaco antinfiammatorio non steroideo poco studiato finora a causa della sua scarsa solubilità in acqua. Il meloxicam viene rilasciato in modo graduale, evitando potenziali effetti tossici legati a un rilascio immediato, e totalmente entro 12 giorni, seppur con differenti cinetiche di rilascio tra la serie zinco e magnesio.

Da tutte le misure effettuate si può affermare che il drogaggio con zinco sembra quello maggiormente efficace nella formazione di un cemento più puro, con migliori caratteristiche meccaniche e soprattutto con una cinetica di rilascio del meloxicam più lineare e graduale.

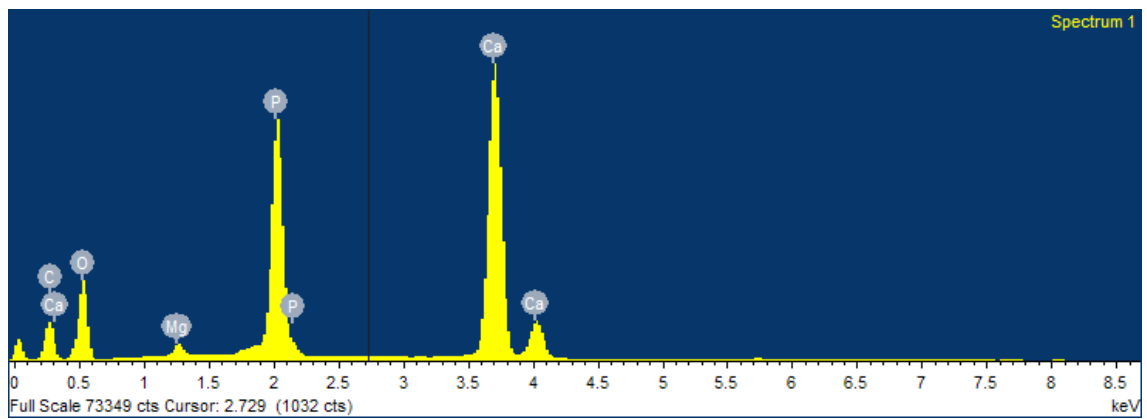
Le prospettive future riguardano l'ottimizzazione delle prestazioni dei biocementi in funzione della quantità di drogante e di farmaco incorporato. Un ulteriore aspetto concerne la necessità di avere una procedura standardizzata per la preparazione dei provini, in grado di garantire maggiore riproducibilità e affidabilità dei risultati.

# Appendice A

## A1. Spettro EDS dei $\beta$ -TCP



*Figura A 1. Spettro EDS del  $\beta$ -TCP Zn*



*Figura A 2. Spettro EDS del  $\beta$ -TCP Mg*

## A2. Spettro EDS dei biocementi drogati zinco

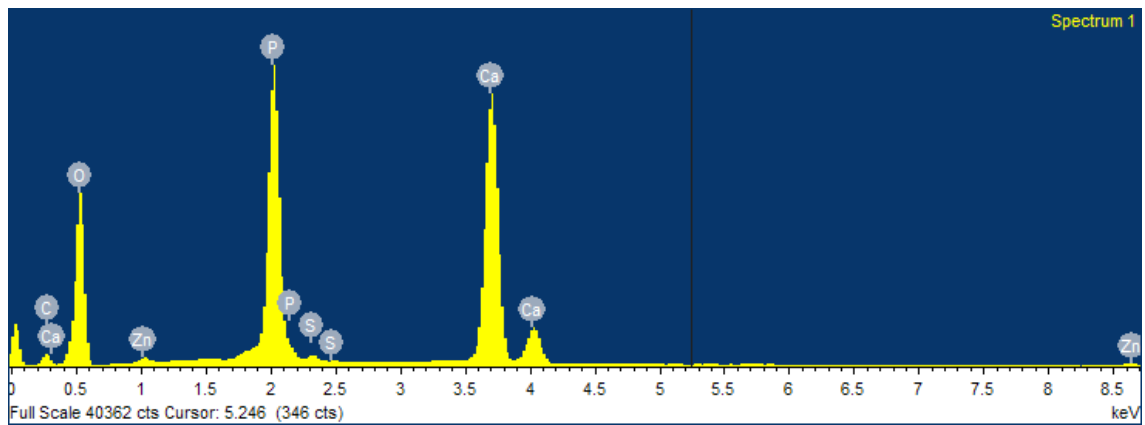


Figura A 3. Spettro EDS del cemento Zn\_F\_Ogg

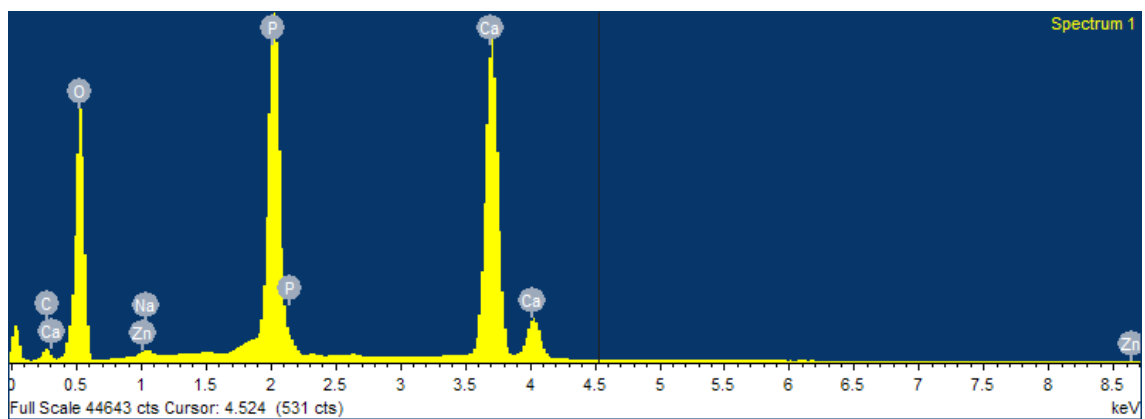


Figura A 4. Spettro EDS del cemento Zn\_F\_4gg

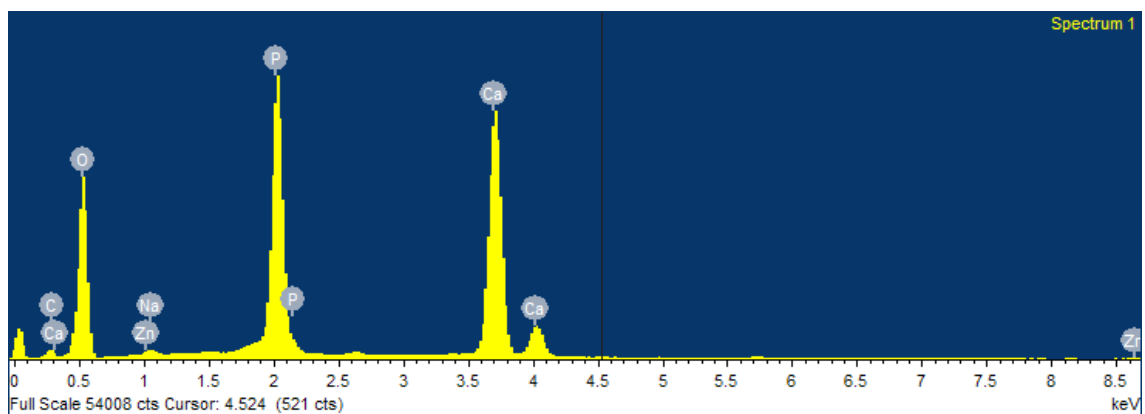
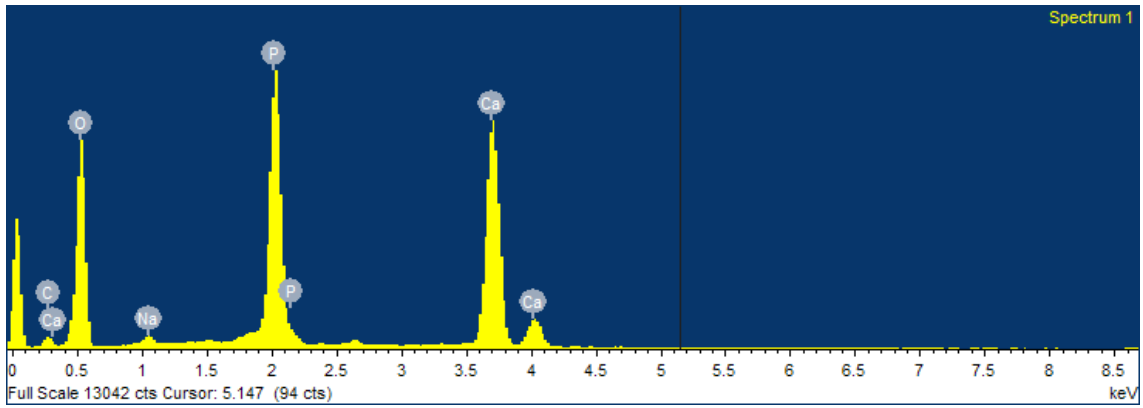
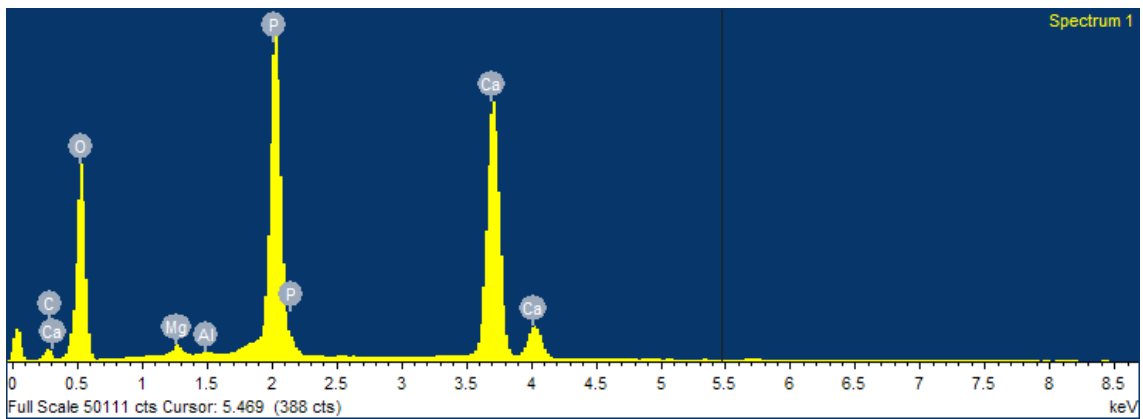


Figura A 5. Spettro EDS del cemento Zn\_F\_7gg

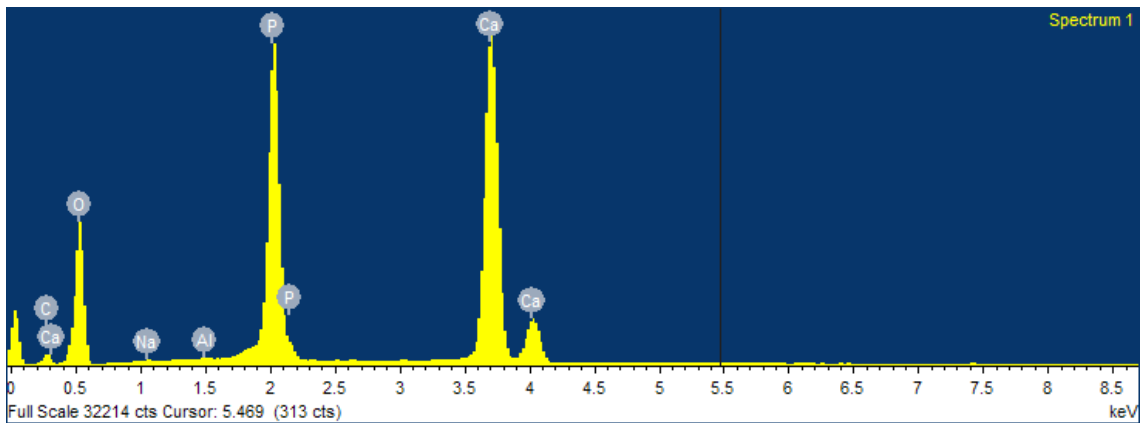


*Figura A 6. Spettro EDS del cemento Zn\_F\_12gg*

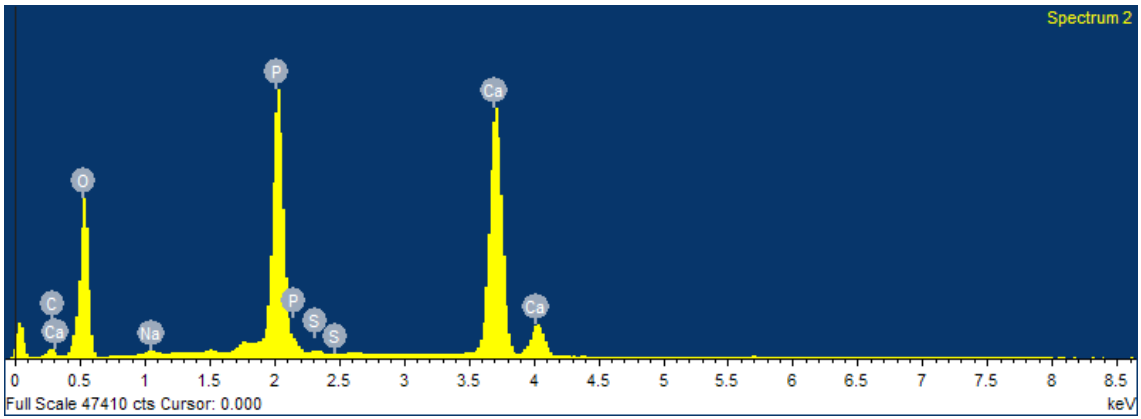
### A3. Spettro EDS dei biocementi drogati magnesio



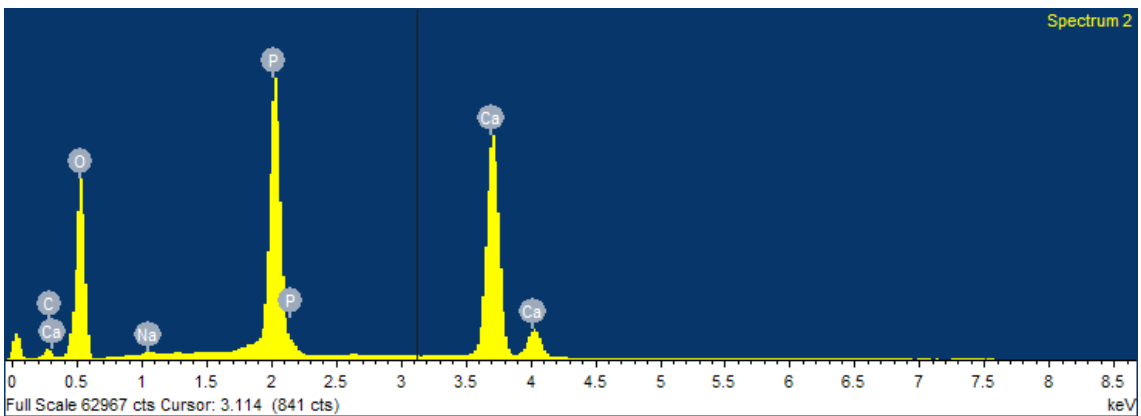
*Figura A 7. Spettro EDS del cemento Mg\_F\_0gg*



*Figura A 8. Spettro EDS del cemento Mg\_F\_1gg*

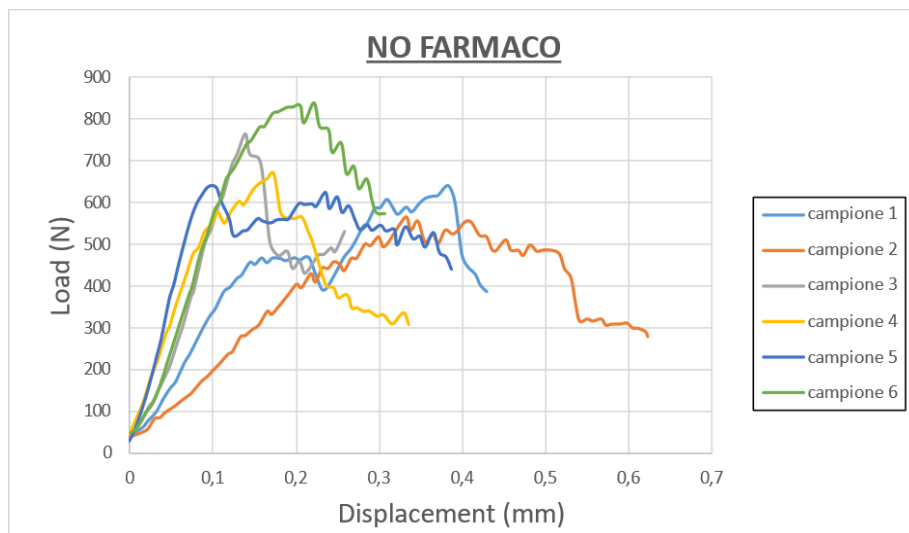


**Figura A 9.** Spettro EDS del cemento Mg\_F\_4gg

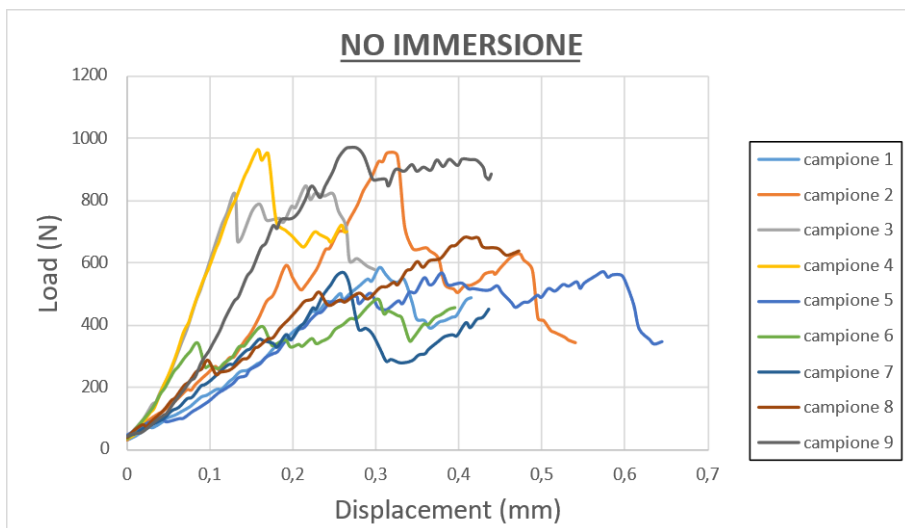


**Figura A 10.** Spettro EDS del cemento Mg\_F\_7gg

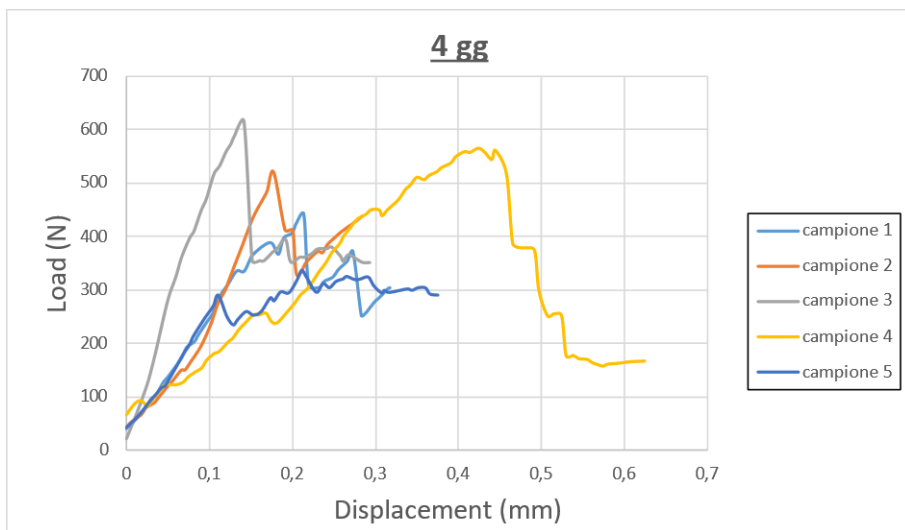
#### A4. Curve di resistenza alla compressione dei biocementi drogati zinco



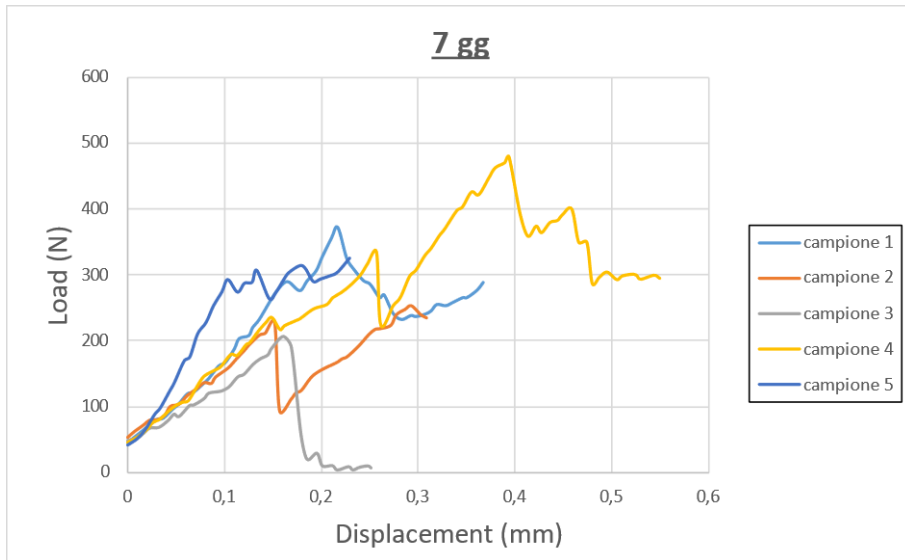
**Figura A 11.** Curve di resistenza alla compressione dei provini di cemento Zn\_NO\_F



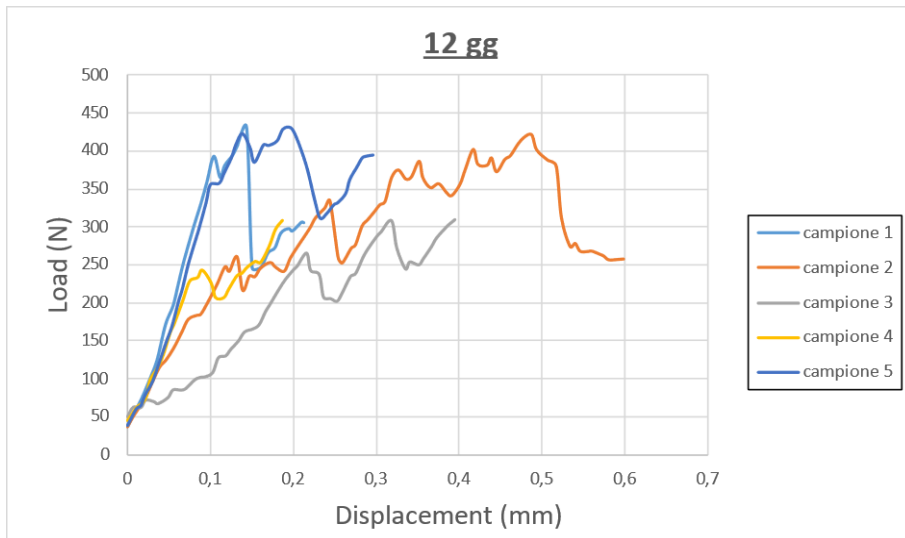
**Figura A 12.** Curve di resistenza alla compressione dei provini di cemento Zn\_F\_0gg



**Figura A 13.** Curve di resistenza alla compressione dei provini di cemento Zn\_F\_4gg

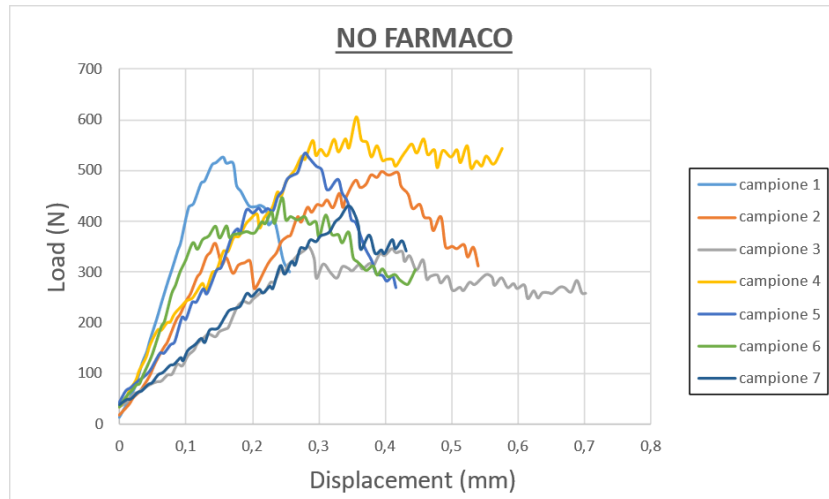


**Figura A 14.** Curve di resistenza alla compressione dei provini di cemento Zn\_F\_7gg

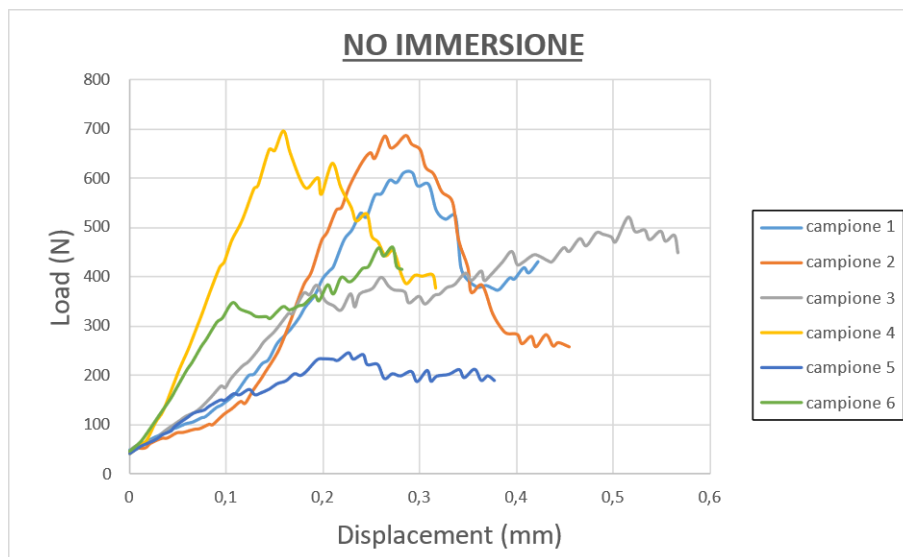


**Figura A 15.** Curve di resistenza alla compressione dei provini di cemento Zn\_F\_12gg

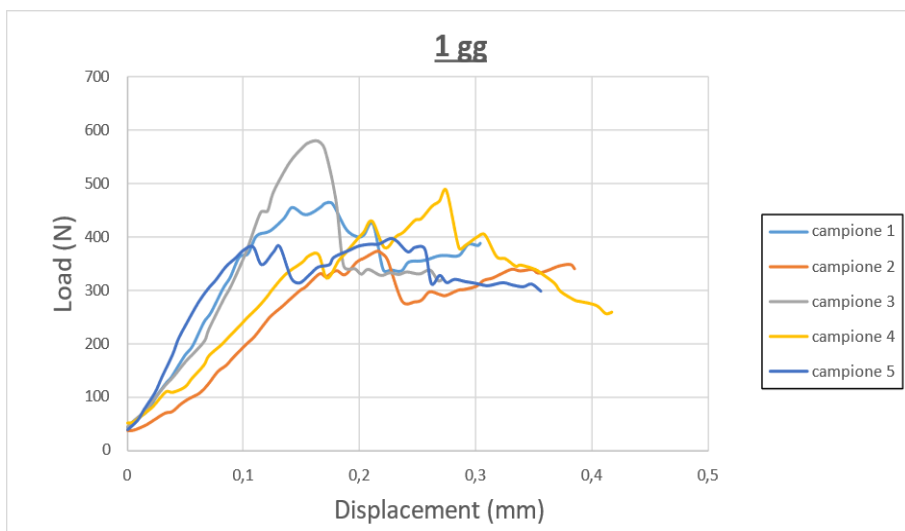
## A5. Curve di resistenza alla compressione di cementi drogati magnesio



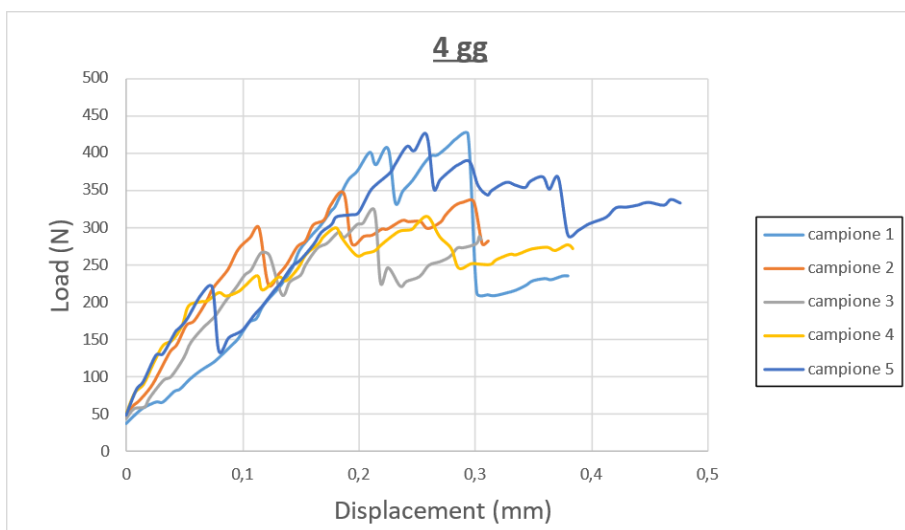
**Figura A 16.** Curve di resistenza alla compressione dei provini di cemento Mg\_NO\_F



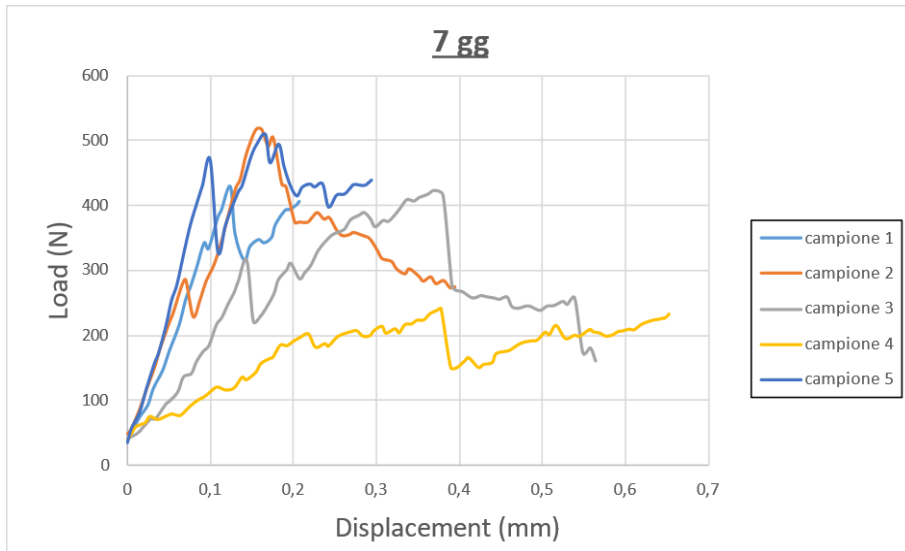
**Figura A 17.** Curve di resistenza alla compressione dei provini di cemento Mg\_F\_Ogg



**Figura A 18.** Curve di resistenza alla compressione dei provini di cemento Mg\_F\_1gg



**Figura A 19.** Curve di resistenza alla compressione dei provini di cemento Mg\_F\_4gg



**Figura A 20.** Curve di resistenza alla compressione dei provini di cemento Mg\_F\_7gg

## Bibliografia e sitografia

- [1] J. Lu, H. Yu, and C. Chen, "Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: a review," *RSC Adv.*, vol. 8, no. 4, pp. 2015–2033, 2018, doi: 10.1039/C7RA11278E.
- [2] K. Hurle, J. M. Oliveira, R. L. Reis, S. Pina, and F. Goetz-Neunhoeffler, "Ion-doped Brushite Cements for Bone Regeneration," *Acta Biomater.*, vol. 123, pp. 51–71, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2021.01.004.
- [3] A. Sugawara, K. Asaoka, and S.-J. Ding, "Calcium phosphate-based cements: clinical needs and recent progress," *J Mater Chem B*, vol. 1, no. 8, pp. 1081–1089, 2013, doi: 10.1039/C2TB00061J.
- [4] L. C. Chow, "Next generation calcium phosphate-based biomaterials," *Dent. Mater. J.*, vol. 28, no. 1, pp. 1–10, 2009, doi: 10.4012/dmj.28.1.
- [5] M.-P. Ginebra, C. Canal, M. Espanol, D. Pastorino, and E. B. Montufar, "Calcium phosphate cements as drug delivery materials," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 12, pp. 1090–1110, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.01.008.
- [6] E. Charrière, S. Terrazoni, C. Pittet, P. Mordasini et al., "Mechanical characterization of brushite and hydroxyapatite cements," *Biomaterials*, vol. 22, no. 21, pp. 2937–2945, Nov. 2001, doi: 10.1016/S0142-9612(01)00041-2.
- [7] S. Pina and J. M. F. Ferreira, "Brushite-Forming Mg-, Zn- and Sr-Substituted Bone Cements for Clinical Applications," *Materials*, vol. 3, no. 1, pp. 519–535, Jan. 2010, doi: 10.3390/ma3010519.
- [8] J. Epp, "X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization," in *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Method*, pp. 81–124. doi: 10.1016/B978-0-08-100040-3.00004-3.
- [9] K. Al-Amin, M. Kawsar, M. T. R. B. Mamun, and M. Sahadat Hossain, "Fourier transform infrared spectroscopic technique for analysis of inorganic materials: a review," *Nanoscale Adv.*, vol. 7, no. 21, pp. 6677–6702, 2025, doi: 10.1039/D5NA00522A.
- [10] Y. R. Herrero, K. L. Camas, and A. Ullah, "Characterization of biobased materials," in *Advanced Applications of Biobased Materials*, Elsevier, 2023, pp. 111–143. doi: 10.1016/B978-0-323-91677-6.00005-2.
- [11] C. Sirasitthichoke, S. Perivilli, M. R. Liddell, and P. M. Armenante, "Experimental determination of the velocity distribution in USP Apparatus 1 (basket apparatus) using Particle Image Velocimetry (PIV)," *Int. J. Pharm. X*, vol. 3, p. 100078, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.ijpx.2021.100078.

- [12] J. C. Atherton, "Acid–base balance: maintenance of plasma pH," *Anaesth. Intensive Care Med.*, vol. 7, no. 11, pp. 427–431, Nov. 2006, doi: 10.1053/j.mpaic.2006.09.001.
- [13] "Principi fondamentali delle prove di compressione | Quality Magazine." Accessed: Mar. 29, 2026. [Online]. Available: <https://www.qualitymag.com/articles/98320-compression-testing-fundamentals>
- [14] "true stress true strain curve 1 | Total Materia." Accessed: Mar. 29, 2026. [Online]. Available: <https://www.totalmateria.com/it/articles/true-stress-true-strain-curve-1/>
- [15] M. Bohner, B. L. G. Santoni, and N. Döbelin, "β-tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties," *Acta Biomater.*, vol. 113, pp. 23–41, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2020.06.022.
- [16] "Meloxicam | C14H13N3O4S2 | CID 54677470 - PubChem." Accessed: Mar. 29, 2026. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/meloxicam>
- [17] M. Antonio, R. L. Carneiro, and R. M. Maggio, "A comparative approach of MIR, NIR and Raman based chemometric strategies for quantification of Form I of Meloxicam in commercial bulk drug," *Microchem. J.*, vol. 180, p. 107575, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.microc.2022.107575.
- [18] N. Seedher and S. Bhatia, "Solubility enhancement of cox-2 inhibitors using various solvent systems," *AAPS PharmSciTech*, vol. 4, no. 3, pp. 36–44, Sep. 2003, doi: 10.1208/pt040333.
- [19] B. Chen, Z. Zhang, J. Zhang, Q. Lin, and D. Jiang, "Fabrication and mechanical properties of β-TCP pieces by gel-casting method," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 28, no. 7, pp. 1052–1056, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.msec.2007.04.034.
- [20] F. Tamimi, Z. Sheikh, and J. Barralet, "Dicalcium phosphate cements: Brushite and monetite," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 2, pp. 474–487, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.actbio.2011.08.005.
- [21] I. V. Fadeeva, M. A. Goldberg, I. I. Preobrazhensky, G. V. Mamin *et al.*, "Improved cytocompatibility and antibacterial properties of zinc-substituted brushite bone cement based on β-tricalcium phosphate," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 32, no. 9, p. 99, Sep. 2021, doi: 10.1007/s10856-021-06575-x.
- [22] V. Friuli, L. Maggi, G. Bruni, F. Caso, and M. Bini, "Hydroxyapatite Nanorods Based Drug Delivery Systems for Bumetanide and Meloxicam, Poorly Water Soluble Active Principles," *Nanomaterials*, vol. 14, no. 1, p. 113, Jan. 2024, doi: 10.3390/nano14010113.
- [23] J. Engstrand, C. Persson, and H. Engqvist, "The effect of composition on mechanical properties of brushite cements," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 29, pp. 81–90, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.jmbbm.2013.08.024.

- [24] S. Fleck and S. Vahabzadeh, "Magnesium-Substituted Brushite Cement: Physical and Mechanical Properties," *Crystals*, vol. 14, no. 3, p. 222, Feb. 2024, doi: 10.3390/cryst14030222.