



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Chimica

Direttore Prof. Mauro Freccero

Corso di Laurea Magistrale in Chimica

CEMENTI DI TRIMAGNESIO FOSFATO COME SISTEMI PER IL
DRUG DELIVERY: STUDIO DELL'EVOLUZIONE DELLE FASI E
DELLE PROPRIETÀ MECCANICHE E FISICHE

Relatore:
Prof.ssa Marcella Bini

Tesi di Laurea Magistrale di
Matteo Rossini

Anno Accademico 2025/2026

Indice

Abstract.....	3
1. Introduzione	9
1.1 I primi cementi ossei	9
Cementi di polimetil-metacrilato (PMMA)	9
Cementi di calcio fosfato (CPCs)	10
1.2 Cementi di magnesio fosfato	10
1.3 Processo di rigenerazione ossea nei MPCs	11
1.4 Cementi ossei come drug delivery systems	11
1.5 Cementi di trimagnesio fosfato.....	12
Proprietà e caratteristiche dei TMPCs	14
1.6 Scopo della tesi.....	14
2. Prodotti e sintesi	16
2.1 Trimagnesio fosfato (TMP)	16
Struttura cristallina del TMP	16
Sintesi in fase liquida del TMP.....	17
Sintesi in fase solida del TMP	18
Diffattogramma del TMP	20
2.2 Struvite	21
Struttura cristallina della struvite.....	21
Sintesi in fase liquida della struvite (1).....	22
Sintesi in fase liquida della struvite (2).....	22
Diffattogramma della struvite	23
2.3 Meloxicam.....	24
3. Preparazione dei campioni di cemento	25
3.1 Reazione di formazione	25
3.2 Aggiunta di fosfato	26
Concentrazione.....	26
Rapporto polvere/liquido (P/L).....	26
3.3 Preparazione e selezione delle miscele	27
Selezione dei campioni.....	28
3.4 Aggiunta di farmaco	29
Verifica della compatibilità del farmaco col sistema cementizio	29
Preparazione dei campioni con farmaco	30
3.6 Aggiunta di struvite	31
Preparazione dei campioni con struvite e farmaco.....	31

4. Tecniche di caratterizzazione.....	32
4.1 Diffrazione a raggi X di polveri (XRD)	32
4.2 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)	33
4.3 Microscopia elettronica a scansione (SEM).....	34
Analisi EDS associata alla microscopia SEM.....	35
4.4 Prove di rilascio del farmaco	35
4.5 Prove meccaniche di compressione	36
4.6 Determinazione della densità apparente e porosità	38
Calcolo della porosità percentuale.....	39
4.7 Prove di iniettabilità	40
5. Risultati e discussione	41
5.1 XRD	41
Cementi da solo TMP con e senza farmaco	43
Cementi con aggiunta di struvite e farmaco.....	45
Cementi post-immersione in ambiente fisiologico.....	47
5.2 Risultati del raffinamento col metodo di Rietveld	48
Effetto della concentrazione di fosfato sulle fasi	48
Effetto dell'aggiunta di farmaco sulla stabilizzazione delle fasi	51
Effetto dell'aggiunta di struvite sulla stabilizzazione delle fasi	52
Studio delle fasi dei campioni dopo rilascio del farmaco	55
5.3 FT-IR.....	56
5.4 Microscopia elettronica a scansione (SEM).....	61
Analisi EDS.....	62
5.5 Misure meccaniche.....	65
5.6 Densità apparente e porosità.....	67
5.7 Rilascio di farmaco.....	70
Effetto della concentrazione di fosfato sul rilascio	71
Effetti della struvite aggiunta sul rilascio	71
5.8 Iniettabilità	72
Conclusioni	74
Bibliografia	76

Abstract

Bone defect repair represents one of the major challenges in biomedical engineering, particularly in cases in which the tissue is unable to regenerate spontaneously or is subjected to high mechanical stresses. In this context, bone cements constitute a class of biomaterials of considerable interest, as they can be shaped and applied directly to the defect site, providing temporary support during the early stages of regeneration. Magnesium phosphate cements have attracted increasing attention because they combine rapid setting, good mechanical strength, biodegradability, and the presence of chemical elements compatible with bone metabolism.

The present thesis focuses on the investigation of trimagnesium phosphate-based bone cements, referred to as TMPCs, a subgroup of magnesium phosphate cements that is less studied than the widely investigated calcium phosphate cements. The main objective was to assess the possibility of using these materials not only as temporary bone substitutes, but also as multifunctional systems for the local and controlled delivery of an active pharmaceutical ingredient. Meloxicam, a non-steroidal anti-inflammatory drug, was selected for this purpose because of its potential usefulness in limiting the inflammatory response following surgical procedures.

The cements were prepared using anhydrous trimagnesium phosphate (TMP), $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, also known as farringtonite, and an ammonium phosphate solution. After mixing, the reaction between the solid precursor and the liquid phase led to the formation of hydrated magnesium phosphate phases, mainly struvite ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), which contributes to the development of the cement matrix and to the mechanical properties of the material. Formulations containing preformed struvite were also investigated, with the aim of modifying the reaction kinetics and the final cement structure.

The first part of the experimental work involved the preparation and characterization of the precursors. Liquid-phase and solid-state procedures were compared for the synthesis of TMP. Aqueous coprecipitation initially led to the formation of a mixture of hydrated trimagnesium phosphate phases. Consequently, successive heat treatments were required to obtain the desired anhydrous phase. Although this approach enabled the formation of farringtonite, it was characterized by lower yields, longer processing times, and a significant dependence on pH control and precipitation conditions.

Solid-state synthesis proved more effective for the preparation of TMP. Thermal treatment of the reagents in a muffle furnace, followed by grinding of the product, enabled the formation of a crystalline phase with high yield and good reproducibility. In addition, the procedure was more easily

scalable, allowing gram-scale quantities of material to be prepared. Among the different strategies tested, the synthesis based on the reaction between $\text{Mg}(\text{OH})_2$ and $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ produced the most homogeneous and uniform material and was therefore selected for the preparation of the subsequent cement samples.

Struvite was also synthesized and preliminarily characterized by X-ray powder diffraction. The preparation was based on the reaction between $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ under alkaline conditions. The resulting product showed a diffraction pattern in good agreement with that expected for struvite, allowing it to be used as an additional component in the cement formulations.

Different powder-to-liquid ratios and phosphate-solution concentrations were initially considered for cement preparation. Formulations characterized by a powder-to-liquid ratio of 2.0 showed limited workability because of the reduced amount of liquid available and the rapid progression of the reaction. For this reason, the study was continued using a powder-to-liquid ratio of 1.5, which provided a better compromise between workability, homogeneity, and sample reproducibility.

Two ammonium phosphate concentrations were mainly selected, namely 3.5 M and 2.0 M. The 3.5 M formulation produced more compact and mechanically stronger cements, whereas the 2.0 M formulation led to more porous matrices with lower mechanical performance. The differences between the two compositions were already evident during specimen preparation: cements prepared with 3.5 M phosphate appeared more cohesive and resistant, whereas those obtained using 2.0 M phosphate were more friable, while still maintaining sufficient cohesion for subsequent characterization.

Meloxicam-containing samples were prepared by adding 6 mg of the drug to 600 mg of TMP before mixing with the phosphate solution. The compatibility of the active pharmaceutical ingredient with the cementitious system was assessed by Fourier-transform infrared spectroscopy. In the meloxicam-containing samples, bands attributable to the drug were observed, with no evidence of decomposition or significant chemical transformation during cement preparation. The incorporation of meloxicam was also confirmed by EDS analysis through the identification of the sulphur signal, which is characteristic of the molecule.

The presence of the drug did not prevent the formation of the main crystalline phases of the cement. XRD analyses showed reflections associated with farringtonite, struvite, and newberyite in the meloxicam-loaded samples as well. From a qualitative point of view, the addition of the drug did not result in the appearance of clearly distinguishable new crystalline phases. However, quantitative

analysis by Rietveld refinement showed that meloxicam can affect the phase balance and, in particular, the amount of struvite formed during cement maturation.

The structural evolution of the cements was investigated after 1, 7, and 30 days from preparation. The results showed that the setting reaction did not lead to the complete conversion of TMP into struvite but proceeded partially and progressively. Significant amounts of residual farringtonite were generally observed in the matured samples, together with struvite and newberyite. Struvite formation mainly occurred during the early stages following mixing, whereas at later times the system tended toward a more stable state, although limited phase transformations continued to take place.

Phosphate concentration played a decisive role in phase formation. The 3.5 M solution promoted greater struvite precipitation than the 2.0 M solution, resulting in a more compact and consolidated matrix. In the lower-concentration samples, the amount of struvite was lower, and the final structure remained more porous. This compositional difference was consistent with the microscopic observations, the mechanical testing results, and the drug-release profiles.

During prolonged maturation, transformation and dehydration phenomena involving the hydrated phases were also observed. Dittmarite, a less hydrated phase associated with the loss of part of the water of crystallization from struvite, appeared in samples containing preformed struvite. After immersion in a physiological environment, bobierrite formation was also observed, likely as a result of the hydration of residual TMP. These findings demonstrate that TMPCs do not constitute static systems after setting but continue to evolve depending on the surrounding environment and the availability of water.

The addition of preformed struvite did not produce the generalized increase in new struvite formation that had initially been hypothesized. Instead, its effect depended on the phosphate concentration and on the microstructure of the base formulation. In the samples containing 3.5 M phosphate, the addition of struvite promoted the formation of a more irregular and porous structure without providing a significant improvement in mechanical properties. In some cases, the added struvite underwent dehydration, leading to the formation of dittmarite.

SEM images revealed morphological differences among the various formulations. The TMP_1535 sample exhibited a relatively compact and homogeneous microstructure, consistent with its higher measured strength. In contrast, TMP_1520 showed a more open structure with a greater presence of pores. Samples containing preformed struvite exhibited more irregular and less dense morphologies,

whereas the simultaneous addition of struvite and meloxicam led to changes in grain size and distribution.

EDS analyses confirmed the presence of the main elements in the cement matrix, namely magnesium, phosphorus, and oxygen. The magnesium-to-phosphorus ratio was consistent with the predominance of phases characterized by an Mg/P ratio close to 1, such as struvite and newberyite, rather than farringtonite, whose stoichiometric ratio is higher. In the meloxicam-containing samples, the sulfur signal was detected, confirming the presence of the drug. After immersion in PBS, the sulfur signal was still detectable, indicating that meloxicam release was not complete over the investigated period.

The mechanical properties were evaluated through compression tests and determination of Young's modulus. The TMP_1535 sample exhibited significantly higher strength than TMP_1520, in agreement with its greater amount of struvite and more compact microstructure. The addition of meloxicam did not significantly modify the strength of the sample prepared with 3.5 M phosphate. In the 2.0 M formulation, however, the drug addition led to an increase in the amount of struvite and a consequent improvement in mechanical properties compared with the corresponding reference sample.

The addition of struvite produced different effects on compressive strength and elastic modulus. In the TMP_Struv_1535 sample, the compressive strength was comparable to that of TMP_1535, whereas Young's modulus was lower. This behavior suggests that the addition of struvite did not compromise the material's ability to withstand the maximum applied load but made the matrix more deformable and less stiff. This interpretation is consistent with the more irregular morphology observed by SEM.

Apparent porosity confirmed the correlation between composition, microstructure, and mechanical behavior. The TMP_1535 sample showed the lowest porosity, approximately 12%, whereas TMP_1520 reached a value close to 35%. The addition of meloxicam to the 3.5 M system increased the porosity to approximately 23%, while the simultaneous addition of struvite and the drug increased it to above 36%. In the samples prepared with 2.0 M phosphate, porosity values were generally around 34%.

These results indicate that increasing the phosphate concentration promotes the formation of a denser and more compact matrix, whereas decreasing the concentration produces a more open structure. Increased porosity may be advantageous for drug transport, but it simultaneously tends to reduce the

strength and stiffness of the cement. Conversely, a more compact structure improves mechanical performance but limits the diffusion of the active ingredient into the dissolution medium.

Meloxicam release was investigated in phosphate-buffered saline at pH 7.4 and 37 °C for seven days. All samples showed an initial stage characterized by relatively rapid drug release, followed by a progressive decrease in the release rate. This behavior is consistent with the presence of a fraction of meloxicam exposed at the surface or weakly retained within the matrix, which is responsible for the initial release, and a more strongly incorporated fraction that is released more slowly through diffusion.

The total amount of drug released was strongly dependent on the formulation. The TMP_MLX_1535 sample, characterized by the highest compactness, released approximately 35% of the meloxicam after seven days. The addition of struvite to the same formulation increased the release to approximately 57%, in agreement with the increase in porosity and the greater microstructural heterogeneity.

Samples prepared with 2.0 M phosphate showed substantially higher drug release. The TMP_MLX_1520 sample reached approximately 88% cumulative release, whereas TMP_Struv_MLX_1520 reached approximately 85%. In these formulations, the high porosity facilitated penetration of the dissolution medium and diffusion of meloxicam toward the external solution. The addition of struvite did not substantially modify the final amount released in the 2.0 M samples, but it affected the initial release rate, probably as a result of differences in pore and grain organization.

Overall, the results show that phosphate concentration is the main parameter governing both the mechanical properties and the drug-release behavior. The 3.5 M formulation appears more suitable when a compact and mechanically resistant cement with slow and prolonged drug release is required. Conversely, the 2.0 M formulation is more effective when the primary objective is to promote meloxicam release, although this occurs at the expense of mechanical strength and matrix compactness.

Injectability tests were also performed to assess the possibility of administering the cement through a syringe. The system prepared with 3.5 M phosphate began to set after approximately three and a half minutes and exhibited a useful injection window of roughly 10–15 minutes. After this interval, the material became too hardened and friable to be effectively extruded. The 2.0 M system showed a longer working time, remaining injectable for up to approximately 25 minutes. The addition of

meloxicam did not noticeably affect the setting and hardening times, whereas the presence of preformed struvite made injection more difficult because part of the additive remained suspended and contributed to syringe obstruction.

Considering the results as a whole, trimagnesium phosphate-based cements proved to be versatile and tunable materials. Controlling the phosphate concentration makes it possible to direct the cement behavior toward either higher mechanical strength or greater porosity and drug-release capacity. Meloxicam incorporation was compatible with the cementitious system and enabled significant local drug release without preventing the formation of the main cement phases.

The study also showed that the addition of preformed struvite is not an effective strategy for increasing the amount of binding phase or improving mechanical properties. Nevertheless, it may be useful for modifying the microstructure, increasing porosity in specific formulations, and influencing drug-release kinetics. Its use should therefore be evaluated according to the intended application and the required balance among injectability, strength, porosity, and drug release.

In conclusion, the investigated TMPCs represent a promising platform for the development of multifunctional bone cements. The 3.5 M phosphate formulation showed the most favorable structural and mechanical properties, whereas the 2.0 M formulation exhibited the most suitable behavior for meloxicam release. Controlling the composition and microstructure therefore makes it possible to design the material according to the intended application, making these cements of interest for future use in bone regeneration and local drug delivery.

Future research should focus on optimizing the cement composition and defining formulations capable of simultaneously providing adequate mechanical properties and controlled release of the active ingredient. The effects of different meloxicam and struvite contents should be evaluated, together with additional powder-to-liquid ratios, while the specimen-preparation procedure should be improved to reduce experimental variability. Further studies should also investigate phase stability in physiological conditions, degradation kinetics, pore distribution and interconnectivity, and the *in vitro* cytocompatibility of the materials.

1. Introduzione

La riparazione dei difetti ossei e il ripristino della funzione meccanica dello scheletro hanno rappresentato, per decenni, una delle principali sfide della chirurgia ortopedica. La richiesta di materiali capaci di fornire stabilità, versatilità e biocompatibilità ha portato allo sviluppo dei cementi ossei (Figura 1), una classe di biomateriali che è stata in grado di sostituire le tradizionali tecniche di riparazione ossea, come l'utilizzo di viti, fili e placche metalliche.



Figura 1: esempi di riparazione ossea con cementi iniettabili

1.1 I primi cementi ossei

Cementi di polimetil-metacrilato (PMMA)

Storicamente, il PMMA si è affermato come uno dei primi cementi ossei ampiamente utilizzati in ortopedia, soprattutto grazie alla sua elevata resistenza meccanica, alla rapida polimerizzazione e alla capacità di trasmettere efficacemente i carichi¹. Tuttavia, il suo successo clinico è stato accompagnato da limiti importanti:

- il materiale può liberare monomero residuo potenzialmente tossico
- presenta una rigidità superiore a quella dell'osso, con possibili effetti sfavorevoli sulla distribuzione degli sforzi e sul rischio di fratture secondarie.

In altre parole, il PMMA ha risolto il problema della stabilizzazione immediata, ma non quello della rigenerazione biologica del tessuto².

Cementi di calcio fosfato (CPCs)

A differenza del PMMA, i cementi a base di fosfato di calcio (CPCs) si sono rivelati in grado di imitare maggiormente la chimica minerale dell'osso e offrire un materiale biodegradabile, in grado di degradarsi naturalmente nel tempo, una volta terminato il processo di riparazione. Questi cementi hanno trovato larga applicazione come filler per difetti ossei, in particolare quando è necessario colmare fratture o supportare la guarigione di lesioni. Il loro principale punto di forza, rispetto al PMMA, è la biocompatibilità, cioè la capacità di interagire con il tessuto ospite senza risultare citotossico per l'ambiente cellulare. Al tempo stesso, però, molti sistemi a base di fosfato di calcio mostrano limiti meccanici, cinetiche di presa lente o fragilità strutturale, che ne riducono l'impiego clinico a scapito dei tradizionali supporti metallici o ceramici³.

1.2 Cementi di magnesio fosfato

Nella ricerca di materiali ossei sempre più performanti, si è sviluppato l'interesse verso i cementi a base di fosfato di magnesio, nati inizialmente in ambito tecnico-civile e, in seguito, esplorati per applicazioni biomediche. Questi materiali hanno attirato attenzione perché combinano una presa rapida, buone resistenze, bassa contrazione e una chimica compatibile con quella dell'ambiente cellulare, dato che magnesio e fosforo sono entrambi elementi fisiologicamente rilevanti. Con questa categoria di materiali è possibile combinare le principali caratteristiche di robustezza meccanica e biocompatibilità, tipiche dei loro predecessori PMMA e CPCs⁴. Inoltre, recenti studi mostrano, tramite studi in vivo, che i cementi di magnesio fosfato sono in grado di promuovere, a loro volta, la rigenerazione del tessuto osseo.

Proprio grazie a queste caratteristiche, i cementi di magnesio fosfato rappresentano oggi il campo di maggior interesse negli studi relativi ai cementi ossei. In particolare, risultano interessanti perché possono unire rapidità di presa, resistenza iniziale e biodegradabilità, colmando il divario tra materiali strutturali e materiali rigenerativi. L'attenzione però si è gradualmente spostata dalla necessità di ottenere un materiale puramente strutturale, alla ricerca di un materiale attivo, non solo capace quindi di colmare una frattura, ma anche di partecipare alla sua riparazione biologica

1.3 Processo di rigenerazione ossea nei MPCs

Il fenomeno alla base della rigenerazione ossea viene chiamato osteoconduttività. Il cemento una volta indurito, fornisce un substrato minerale rigido e stabile, in grado di sostenere la colonizzazione da parte delle cellule ossee e la deposizione di nuova matrice extracellulare. La superficie del materiale funge da guida per la crescita tissutale, permettendo al tessuto osseo di infiltrarsi progressivamente all'interno e attorno alla matrice cementizia permettendogli di colmare aree anche molto vaste. Questo comportamento è particolarmente utile in fratture di dimensioni critiche, nelle quali il solo processo rigenerativo fisiologico non sarebbe sufficiente a ristabilire la continuità ossea.

Un altro elemento chiave è il rilascio di ioni magnesio. Il magnesio è un elemento biologicamente attivo, coinvolto in numerosi processi cellulari e metabolici, inclusi quelli legati alla generazione del tessuto osseo. Il rilascio di Mg^{2+} da parte del cemento può stimolare l'attività degli osteoblasti, favorire la mineralizzazione della matrice ossea e contribuire a creare un microambiente favorevole alla rigenerazione. Inoltre, il magnesio sembra influenzare anche la risposta immunitaria iniziale, modulando l'attività dei macrofagi e riducendo l'insorgenza di una risposta infiammatoria eccessiva, che potrebbe altrimenti ostacolare il processo di guarigione⁵.

Infine, un ruolo decisivo è svolto dalla degradazione controllata del cemento. I cementi di magnesio fosfato non sono materiali permanenti: grazie al loro elevato grado di biodegradabilità svolgono la funzione di impalcature temporanee destinate a essere sostituite gradualmente dal tessuto osseo. La loro dissoluzione parziale, se sufficientemente bilanciata, libera spazio per la formazione di nuovo tessuto osseo e contemporaneamente mantiene un supporto meccanico durante le fasi iniziali della guarigione. Questo equilibrio tra resistenza iniziale e riassorbimento è uno degli aspetti più importanti nella progettazione del materiale, poiché una degradazione troppo lenta ostacolerebbe il rimodellamento, mentre una degradazione troppo rapida comprometterebbe la stabilità del difetto⁶.

1.4 Cementi ossei come drug delivery systems

L'impatto clinico di queste diverse categorie di cementi è stato notevole perché sono stati in grado di risolvere problematiche urgenti della pratica medica. Il PMMA ha reso possibile la stabilizzazione immediata, riducendo il rischio di fallimento meccanico. I cementi di calcio hanno migliorato la gestione dei difetti ossei, offrendo materiali più affini al tessuto osseo e riassorbibili. I cementi di magnesio, infine, hanno aperto la strada a sistemi che possono combinare supporto meccanico e

biocompatibilità, risultando promettenti per applicazioni in cui è necessario un materiale che, non solo sia in grado di riparare fratture, ma che accompagni anche la rigenerazione.

Un ulteriore passo avanti compiuto in questo ambito è stata anche l'introduzione dei cementi ossei come sistemi di drug delivery, cioè come sistemi per il trasporto di farmaci nell'organismo e il loro successivo rilascio controllato in ambiente fisiologico in un sito target. Infatti, la loro struttura porosa e la capacità di adsorbimento superficiale vengono sfruttate per il caricamento di varie tipologie di farmaco, da antibiotici e antiinfiammatori fino ad antitumorali, conferendo perciò a questi materiali anche un aggiuntivo ruolo terapeutico⁷.

1.5 Cementi di trimagnesio fosfato

I cementi di trimagnesio fosfato sono normalmente ottenuti dalla reazione di MgO trattato termicamente (MgO dead burned) con l'aggiunta di una soluzione di fosfato di ammonio o di potassio, in modo da generare una pasta cementizia a base di un minerale chiamato "struvite" ($(\text{NH}_4)\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) o K-struvite (quando si impiega il fosfato di potassio).

L'indurimento inizia appena il fosfato entra in contatto con i componenti solidi. In questa fase MgO si idrata e si dissolve in modo parziale, liberando ioni magnesio in soluzione; contemporaneamente il fosfato si dissolve e l'ambiente si arricchisce di ioni H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , Mg^{2+} e, nei sistemi con ammonio o potassio, degli ioni corrispondenti. Quando la soluzione raggiunge la supersaturazione, nucleano e crescono cristalli di fosfato di magnesio idrato (struvite), che si intrecciano tra loro fino a formare una rete rigida continua (Figura 2). La rapidità di questo processo spiega il breve tempo di presa tipico dei MPC, spesso nell'ordine di pochi minuti o decine di minuti, a seconda della reattività dell'MgO e dell'uso di ritardanti.⁸

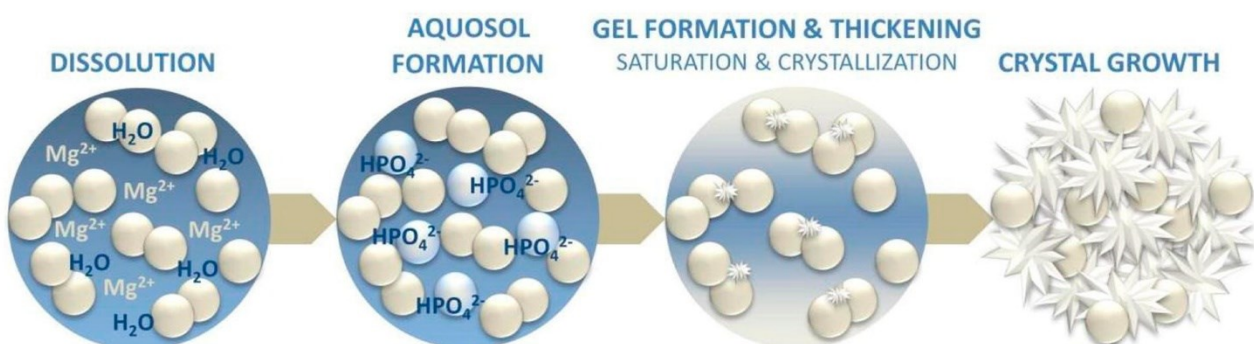


Figura 2: processo di formazione e indurimento di un MPC

La precipitazione della struvite e la sua quantità sono cruciali nella fase di indurimento del cemento; perciò, la maggior parte degli studi in letteratura si concentra sull'ottimizzazione di questa fase. La precipitazione della struvite, se troppo repentina, comporta l'impossibilità di lavorare la pasta cementizia, che indurisce troppo rapidamente e, di conseguenza, una minor efficacia del processo di riparazione del tessuto osseo sottoposto alla procedura medica,

A tal proposito, è pratica comune aggiungere al MgO una serie di additivi che vadano a modulare la velocità di formazione della struvite. Uno di questi è il trimagnesio fosfato (TMP) anche chiamato “farringtonite” ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$). (Figura 3).

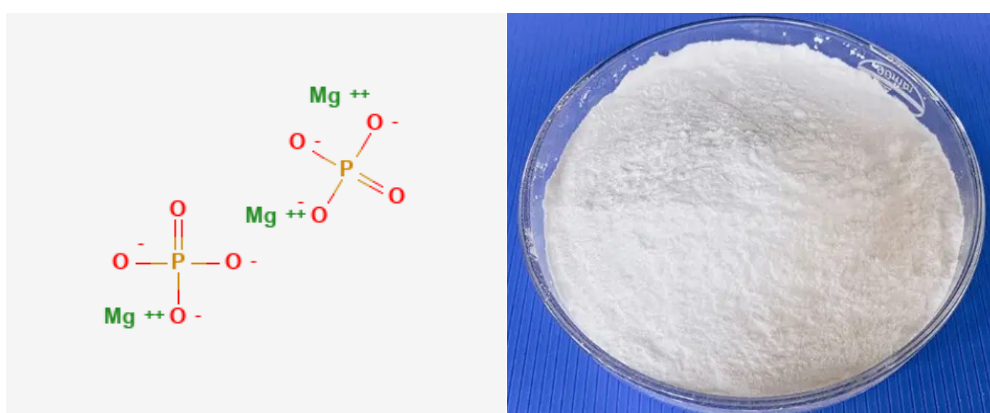


Figura 3: Trimagnesio fosfato, struttura chimica e campione in polvere ottenuto in laboratorio

L'aggiunta di trimagnesio fosfato al sistema MgO–fosfato riduce la velocità di presa poiché limita la rapidità dei processi di dissoluzione e precipitazione responsabili della formazione delle fasi idrate leganti. In questo modo diminuisce la velocità di nucleazione dei cristalli di struvite e si ottiene un prolungamento del tempo di lavorabilità⁹. Questo fenomeno permette all'operatore sanitario di poter modellare la pasta cementizia per un intervallo di tempo maggiore, senza rischiare che l'indurimento avvenga prima del completamento della totalità dell'operazione.

Il comportamento ritardante del TMP ha portato gli studiosi, negli ultimi anni, a concentrarsi su questo specifico minerale, esplorando la possibilità di utilizzarlo singolarmente nella miscela cementizia, non più come semplice additivo del MgO dead burned, ma come vera e propria base per generare una sottocategoria dei cementi di magnesio fosfato: i cementi di trimagnesio fosfato (TMPCs).

Proprietà e caratteristiche dei TMPCs

Sebbene simili all'apparenza, la principale differenza tra i TMPCs e gli MPCs risiede nella nucleazione. Il TMP, una volta mescolato con il fosfato di ammonio, sviluppa struvite con una nucleazione nettamente più lenta, riducendo il rischio di fratture durante l'indurimento e portando, in generale, ad un prodotto con una struttura meno disordinata, più compatta e composta da grani per lo più uniformi. Ciò significa che il cemento risultante, avrà un minor grado di porosità, rispetto ad uno derivante dal MgO. I principali vantaggi di questa tipologia di struttura sono due:

- Maggiore resistenza meccanica
- Minor velocità di rilascio di farmaci

Entrambi questi aspetti permettono ai TMPCs di poter godere di una certa rilevanza in ambito biomedico, rappresentando quindi una valida alternativa a tutti i sistemi di cementi ossei già storicamente affermati e diffusi. Le possibili applicazioni sono quindi duplici: è possibile utilizzare questo cemento come sostituto osseo ad elevata resistenza meccanica, per applicazioni in zone dove il tessuto danneggiato è sottoposto a maggiori sforzi meccanici; inoltre, un rilascio lento dei farmaci eventualmente caricati, permette ai TMPCs di agire come sistemi a rilascio controllato e ultra-prolungato, in grado di accelerare la guarigione delle aree sottoposte intervento chirurgico e di mantenerne costante nel tempo il recupero anche fino a un mese dopo la procedura medica.

1.6 Scopo della tesi

Lo scopo della tesi nasce dall'osservazione di una limitata disponibilità di articoli scientifici riguardanti i cementi a base di trimagnesio fosfato (TMPCs). In particolar, l'attenzione di questo progetto si concentra sul loro possibile impiego come sistemi di drug delivery per il rilascio controllato di farmaci. Sebbene questa pratica stata ampiamente studiata nei sistemi a base di fosfato di calcio e, più recentemente, nei cementi di magnesio fosfato, per i sistemi TMPC la letteratura disponibile risulta ancora scarsa o assente.

In questo contesto, il presente lavoro si propone di esplorare la possibilità di incorporare un farmaco antiinfiammatorio "Meloxicam" all'interno di una matrice TMPC, con l'obiettivo di valutarne la fattibilità dal punto di vista della stabilità strutturale e di comprenderne l'effetto sulle proprietà del materiale. L'attenzione è quindi rivolta non soltanto alla preparazione del sistema, ma anche alla sua potenziale evoluzione verso applicazioni più avanzate in ambito biomedico, in linea con l'interesse crescente verso cementi ossei funzionalizzati.

Il lavoro sperimentale è stato articolato secondo una serie di passaggi successivi. In primo luogo, è stata affrontata la ricerca di diverse strategie di sintesi del materiale, in particolare della fase TMP e della struvite, in modo da valutare quella più efficace, con particolare attenzione alla riproducibilità e alla scalabilità. Successivamente, è stato condotto uno studio delle fasi che si sviluppano durante il processo di indurimento del cemento in ambiente controllato, mediante tecniche di diffrazione a raggi X, al fine di seguire l'evoluzione mineralogica del cemento e identificare i principali prodotti di reazione. L'incorporazione del farmaco all'interno della matrice cementizia è stata verificata mediante spettroscopia infrarossa, così da cogliere eventuali interazioni con le fasi inorganiche del sistema. Sono state inoltre studiate le proprietà meccaniche tramite prove di compressione, necessarie per valutare l'effetto delle varie formulazioni sulla resistenza del materiale.

Un ulteriore aspetto affrontato nel corso della tesi riguarda il comportamento del cemento in ambiente fisiologico, con particolare riferimento al rilascio del farmaco nel tempo. Tale fase dello studio risulta fondamentale per comprendere se il sistema possa effettivamente operare non solo come materiale di supporto, ma anche come possibile matrice per un rilascio controllato del principio attivo.

Nel corso dell'attività sperimentale, inoltre, si sono potute effettuare alcune osservazioni interessanti. In particolare, è emersa l'ipotesi che alcuni sottoprodotti di reazione possano essere impiegati come additivi capaci di modulare la precipitazione di fase struvitica durante il processo di indurimento. Questa considerazione apre un interessante spunto progettuale: la possibilità di orientare il comportamento del cemento verso una maggiore compattezza, e quindi verso un miglioramento delle proprietà meccaniche, oppure verso un aumento della porosità, con il potenziale vantaggio di favorire il rilascio del farmaco.

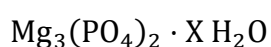
La tesi si colloca quindi in una prospettiva esplorativa, nella quale lo studio dei diversi sistemi di TMPC non si limita alla sola formulazione di un cemento drug-loaded, ma si estende alla comprensione dei fattori che ne governano la struttura, le prestazioni e le possibili prospettive di ottimizzazione. In questo senso, il lavoro intende fornire una base sperimentale utile per eventuali sviluppi futuri nel campo dei cementi ossei a base di trimagnesio fosfato.

2. Prodotti e sintesi

In questa sezione vengono riportati i principali materiali utilizzati per la preparazione dei campioni di cemento con le rispettive sintesi; le tecniche di caratterizzazione verranno invece descritte nel capitolo successivo.

2.1 Trimagnesio fosfato (TMP)

Il trimagnesio fosfato è un fosfato inorganico di magnesio con formula generale:



In ambito chimico, esso può presentarsi in forma anidra oppure idrata, con diversi gradi di idratazione; la forma anidra si presenta come polvere cristallina bianca (Figura 3). Dal punto di vista mineralogico, la forma anidra è effettivamente il cemento di maggior interesse ed è anche noto col nome mineralogico di “farringtonite”: $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$

Struttura cristallina del TMP

La farringtonite presenta una struttura monoclinica, con gruppo spaziale $P2_1/m$. Le forme idrate mostrano invece una situazione strutturale più complessa, con la possibilità di coesistenza di diversi tipi di reticoli cristallini. Questa complessità strutturale è coerente con la notevole capacità del sistema di incorporare acqua di cristallizzazione¹⁰.

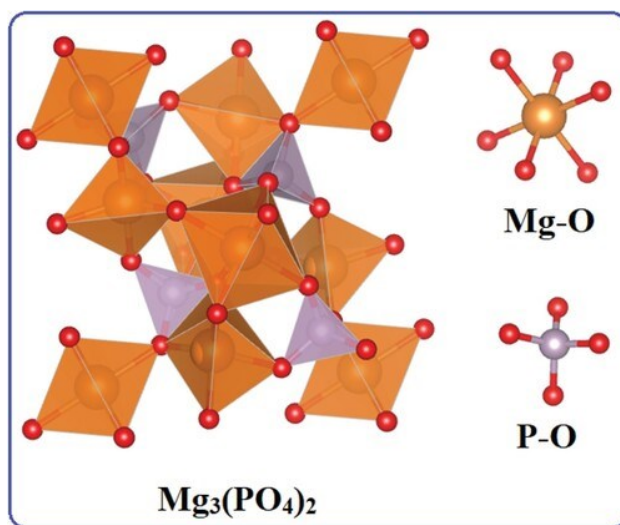


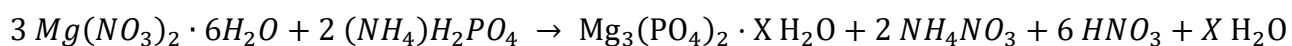
Figura 4: struttura cristallina del TMP¹¹

Sintesi in fase liquida del TMP

La sintesi della fase anidra durante la tesi è stata affrontata mediante due differenti approcci sperimentali, al fine di individuare una procedura realmente efficace per l'ottenimento del materiale desiderato in forma pura. In tutte le reazioni scelte, a prescindere dalla modalità, si impiegheranno una fonte di magnesio e una di fosfato.

In una prima fase è stata esplorata la via liquida, scelta per la sua apparente semplicità e per la possibilità di favorire una buona omogeneità del prodotto finale.

La prima sintesi individuata è stata estratta dall'articolo¹² : si tratta di una sintesi per coprecipitazione a pH controllato secondo la reazione seguente.



Trattandosi di una reazione di scambio ionico in ambiente acquoso a sua efficacia migliora per concentrazione basse di reagente poiché la sovrasaturazione viene raggiunta in modo più controllato, favorendo una nucleazione più omogenea e riducendo la formazione di aggregati indesiderati. Le quantità di reagente necessario sono state calcolate sulla base dell'ottenimento di 300 mg di prodotto.

Sono stati disciolti 880 mg di $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ in 20 mL di acqua distillata e 263 mg di $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ in altrettanta acqua distillata, ottenendo due soluzioni distinte che sono state poste sotto agitazione, poi la soluzione di fosfato è stata versata goccia a goccia in quella di magnesio. Al termine dell'aggiunta, il pH è stato aggiustato a circa 11 tramite NaOH 1.5 M. Dopodiché, la soluzione ottenuta è stata lasciata riposare un'ora a temperatura ambiente. Al termine della precipitazione, il prodotto è stato centrifugato per 3 volte con acqua distillata ed infine essiccato in stufa a 60 °C per una notte.

Il prodotto finale ottenuto, come dimostrato dal controllo mediante XRD, non è la farringtonite ma una miscela di forme idrate del trimagnesio fosfato, tra cui risultano prevalenti le forme penta, otta e deca-idrate. Per questo motivo, al termine della procedura sintetica, è stato necessario effettuare dei trattamenti termici per disidratare il prodotto ottenuto.

- Trattamento in forno per 12 h a 400 °C:

La disidratazione del prodotto non è avvenuta con successo. Dal diffrattogramma, non sono distinguibili i picchi del TMP ma sembra evidente la formazione di un prodotto amorfo.

- Trattamento in forno per 12 h a 700 °C

il diffrattogramma ha evidenziato la formazione del prodotto disidratato di interesse assieme alla fase $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$. La presenza del TMP è incoraggiante ma rimane il problema della presenza del prodotto secondario indesiderato.

- Trattamento in forno per 12 h a 900 °C

il diffrattogramma non ha evidenziato particolari differenze rispetto al diffrattogramma del campione trattato a 700°C.

- Trattamento in forno per 24 h a 200°C

il diffrattogramma ottenuto mostra un fondo elevato, ma l'assenza di picchi indice di fasi cristalline, a parte un singolo picco difficilmente interpretabile. Non sembra presente la fase $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, a suggerire che fino a 200°C è possibile disidratare il campione di partenza ma forse la temperatura non è sufficiente a far avvenire la transizione di fase a TMP.

- Trattamento in forno per 12 h a 200°C e 12 h a 700°C

Dal diffrattogramma, sono evidenti i picchi del TMP, dimostrando l'effettiva riuscita della disidratazione del prodotto e l'ottenimento di farringtonite pura.

Al termine del trattamento termico, la resa globale variava tra il 50 e il 60%.

Sintesi in fase solida del TMP

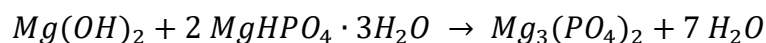
La sintesi di TMP per via liquida non è stata efficace a causa della poca scalabilità, dell'eccessiva durata del processo e della dipendenza dalle condizioni di reazione. L'oscillazione del pH durante il processo, dovuta alla liberazione di HNO_3 , rende difficile la precipitazione controllata del TMP, portando spesso alla formazione di un prodotto completamente amorfo.

Alla luce di tali evidenze, si è reso necessario orientare la ricerca verso una seconda strategia, basata sulla sinterizzazione, ritenuta più idonea a promuovere la formazione della fase anidra. e che per i fosfati può risultare molto più efficace.

Sono state sperimentate 3 sintesi per via solida, al fine di verificare la possibilità di ottenere fasi TMP che potessero portare a variazioni nella fase di preparazione dei campioni di cemento. Per tutte le tre sintesi il trattamento termico è stato effettuato con le stesse modalità. La sinterizzazione è avvenuta in muffola, in atmosfera d'aria, col campione in navicelle di allumina, macinando preventivamente

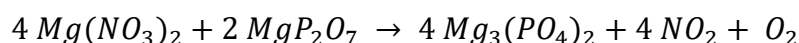
in un mortaio d'agata i reagenti. Il riscaldamento è stato impostato in modo da raggiungere la temperatura di 1100 °C con isoterma di 11 h, con una rampa di salita e discesa a T ambiente di 10 °C/ minuto.

- Sintesi 1 ¹³:



Per ottenere circa 600 mg di TMP, si macinano nel mortaio 66.61 mg di Mg(OH)₂ (Sigma Aldrich) con 398 mg di MgHPO₄·3H₂O (Sigma Aldrich). I reagenti vengono mescolati per circa 10 minuti in mortaio, poi messi in navicella di allumina. Al termine del trattamento termico, il prodotto di sinterizzazione viene rimosso dalla navicella e macinato nuovamente in mortaio di agata.

- Sintesi 2 ¹⁴:

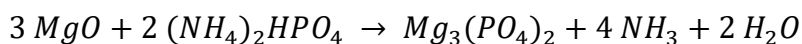


La reazione, in questo caso, è presa dall'articolo¹³ utilizzando i corrispettivi reagenti di magnesio invece di quelli di calcio. Sebbene il procedimento sia il medesimo della prima sintesi, il prodotto della sintesi 2 presenta spesso, alla fine del trattamento, colorazioni anomale: talvolta si presenta completamente rosato, mentre in altre occasioni vengono evidenziate maculazioni rossastre. Nonostante questo fenomeno, il TMP della sintesi 2, da successive prove di diffrazione, non mostrerà alcun picco associabile a sottoprodotti (Figura 5).



Figura 5: navicelle di allumina contenenti TMP dalla sintesi 2 con colorazioni anomale

- Sintesi 3 ¹⁵:



Questa sintesi si è rivelata soddisfacente da un punto di vista operativo, restituendo un prodotto paragonabile a quello della sintesi 1; tuttavia, dalle analisi di diffrazione, è emersa la presenza di alcuni picchi associabili al pirofosfato di magnesio (MgP_2O_7), dovuti probabilmente alla presenza di eccesso di MgO. Questa sintesi si è rivelata particolarmente sensibile alla stechiometria dei reagenti, rendendo il prodotto, seppur con una buona resa, meno puro rispetto alle altre sintesi.

In tutte e tre le sintesi, la resa era quasi quantitativa (circa 90-95%). Inoltre, la possibilità di usare più navicelle nella muffola ha reso scalabile la sintesi di TMP, permettendo di sintetizzare fino a 4800 mg di prodotto per volta.

Inizialmente, le tre sintesi sono state realizzate in parallelo, studiando le possibili differenze nella formazione delle fasi usando i tre diversi TMP nella preparazione dei campioni di cemento. Una volta verificato che il comportamento era il medesimo a prescindere dal TMP usato, si è deciso di portare avanti solo la sintesi 1, che si è rivelata quella con il prodotto più uniforme e omogeneo.

Diffattogramma del TMP

Il TMP è stato analizzato tramite tecnica di diffrazione a raggi X per verificare la purezza.

La figura 6 mostra i picchi caratteristici del pattern di diffrazione del TMP puro:

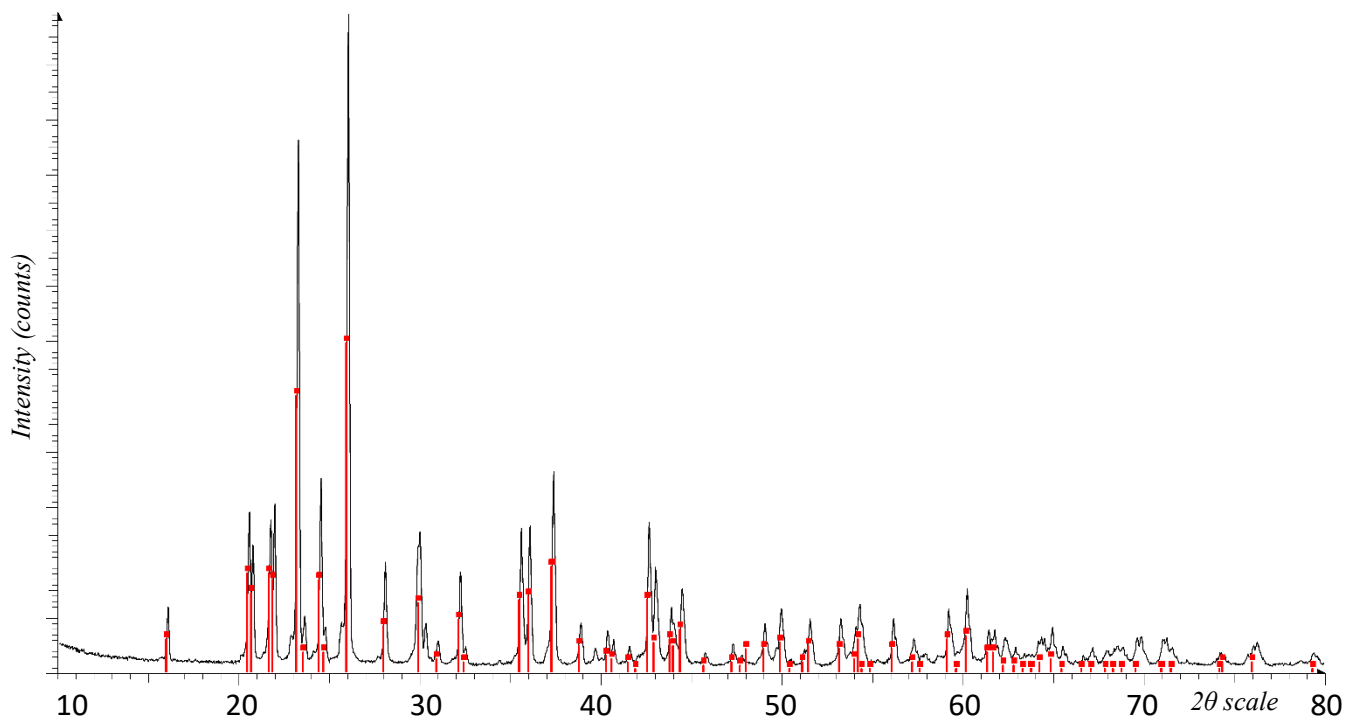


Figura 6: pattern di diffrazione del TMP. Le barre rosse indicano le posizioni attese per la farringtonite.

2.2 Struvite

La struvite è un fosfato idrato di magnesio e ammonio, con formula chimica:



noto sia come minerale naturale sia come fase di interesse in ambito tecnologico e ambientale. In letteratura è spesso considerata rilevante in diversi processi di cementificazione. La sua formazione è influenzata in modo marcato da parametri come pH, concentrazione ionica e temperatura, che ne determinano stabilità e cinetica di crescita¹⁶.

Struttura cristallina della struvite

Dal punto di vista strutturale, la struvite cristallizza nel sistema ortorombico, con gruppo spaziale $\text{Pmn}2_1$. La struttura è costruita da tetraedri PO_4 , ottaedri $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6$ molto distorti e gruppi NH_4^+ , tenuti insieme da una fitta rete di legami a idrogeno¹⁷. Questa particolare tipologia di struttura garantisce il fenomeno della presa del cemento, una volta che il TMP reagisce con il fosfato. (Figura 7).

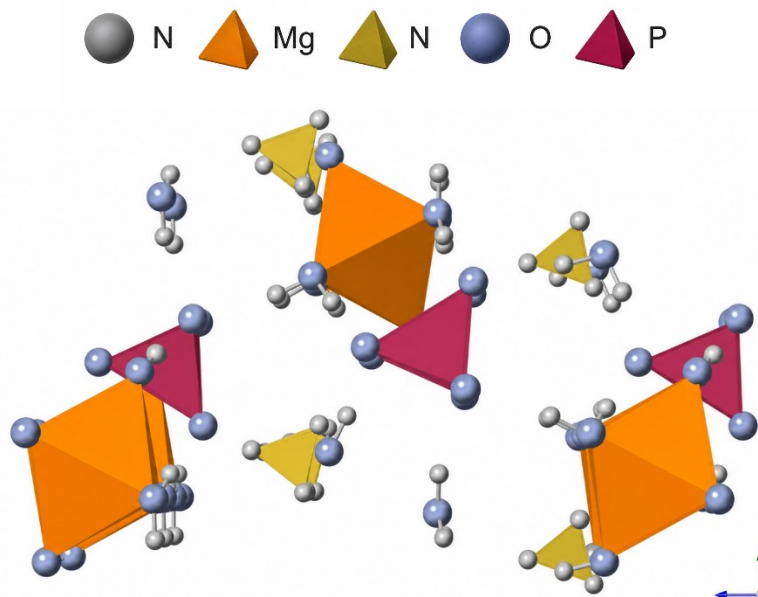
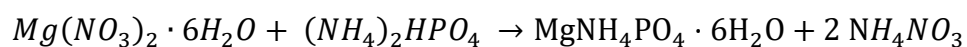


Figura 7: struttura cristallina della struvite

Sintesi in fase liquida della struvite (1)

La struvite è stata ottenuta per caso durante un tentativo di sintesi della fase TMP. L'idea iniziale era quella di usare, durante la sintesi in fase liquida del TMP, al posto del reagente $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, la sua variante bibasica $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Tale scelta era finalizzata all'ottimizzazione della reazione di sintesi liquida del TMP: utilizzando un prodotto con 2 molecole di NH_4^+ , avremmo dovuto limitare lo sviluppo di HNO_3 durante il processo, rendendo il controllo del pH facilitato durante la fase di riposo. Il prodotto ottenuto però si è rivelato essere proprio la struvite pura.



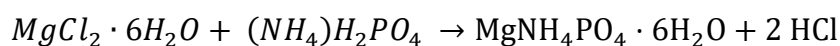
La struvite, ottenuta in questo modo, è stata poi utilizzata come additivo alla fase TMP durante la formazione del cemento per modulare la porosità. La procedura sintetica utilizzata, presenta le medesime condizioni sperimentali della sintesi in fase liquida del TMP, con le stesse tempistiche, condizioni di pH e temperatura.

Sintesi in fase liquida della struvite (2)

Sebbene la prima procedura fosse stata inizialmente considerata idonea alla preparazione della struvite, le prove condotte nel corso della tesi hanno mostrato che il metodo non risultava

sufficientemente efficace e riproducibile. In particolare, non è stato possibile ottenere sistematicamente un prodotto composto esclusivamente da fase struvitica.

Per questo motivo, il protocollo è stato abbandonato e sostituito con una procedura alternativa¹⁸. Tale metodo è stato quindi utilizzato per tutte le successive sintesi della struvite.



Circa 243.96 mg di $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sono stati disciolti in 20 mL di acqua distillata, e 138.04 mg di $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ in altrettanta acqua distillata, ottenendo due soluzioni distinte. Le due soluzioni sono state poste sotto agitazione e la soluzione di magnesio è stata aggiunta goccia a goccia in quella di magnesio. Al termine dell'aggiunta, il pH è stato aggiustato a circa 12-13, per mantenere più stabilmente l'equilibrio di precipitazione della struvite. La soluzione è stata mantenuta sotto agitazione per 30 minuti a temperatura ambiente; dopodiché, è stata lasciata riposare per un'ora, sempre a temperatura ambiente. Al termine della precipitazione, il prodotto è stato centrifugato per 3 volte con lavaggio con acqua distillata; al termine è stato essiccato in stufa a 60 °C per una notte.

Diffrattogramma della struvite

La struvite ottenuta è stata analizzata tramite tecnica di diffrazione a raggi X (Fig. 8)

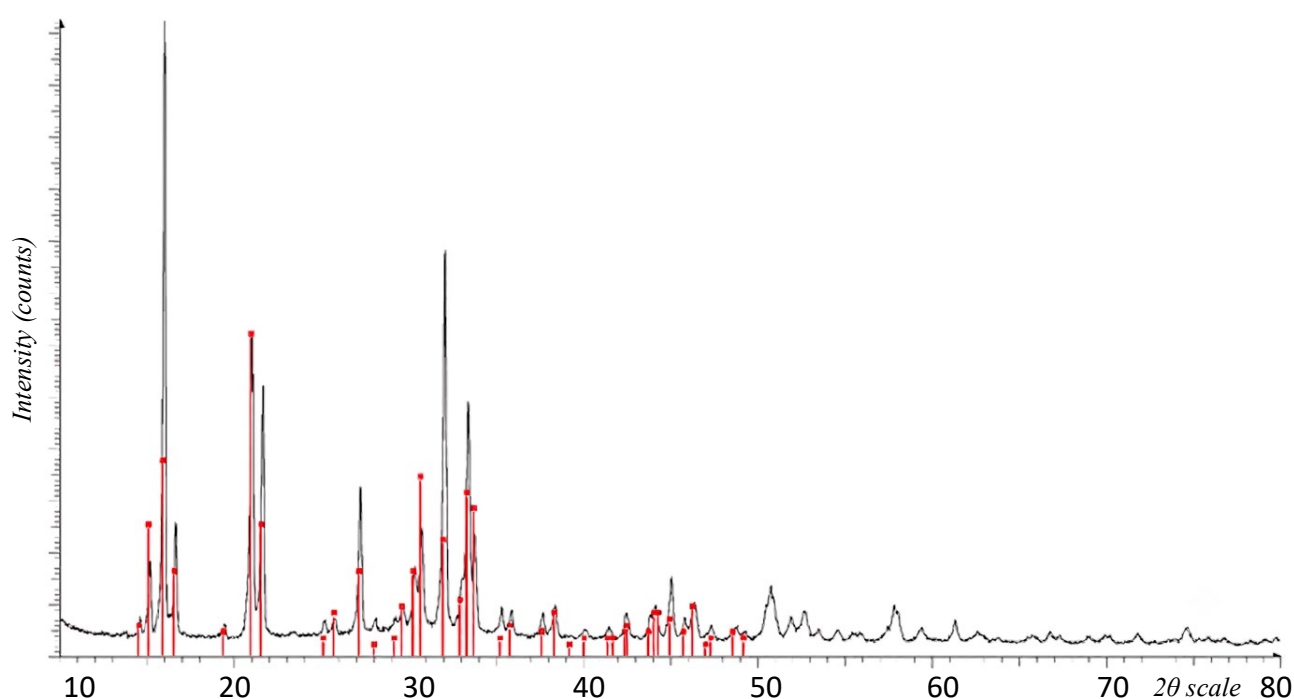


Figura 8: pattern di diffrazione della struvite. Le barre rosse indicano i picchi attesi per la struvite.

Tutti i picchi trovano accordo con quelli attesi per la fase (la scheda riporta solo picchi fino a circa 50° ma si vede che l'accordo è ottimo).

2.3 Meloxicam

Il meloxicam (Figura 9) è un farmaco antinfiammatorio. Viene impiegato nel trattamento sintomatico del dolore e dell'infiammazione associati soprattutto a disturbi muscolo-scheletrici, osteoartrite e artrite reumatoide. Rispetto agli antinfiammatori tradizionali, che inibiscono in modo meno selettivo le isoforme della cicloossigenasi, il meloxicam mostra una preferenza per l'inibizione della cicloossigenasi-2 (COX-2). In questo modo limita la trasformazione dell'acido arachidonico nei precursori delle prostaglandine, mediatori coinvolti nei processi infiammatori. La diminuzione della sintesi di queste molecole è alla base dei principali effetti farmacologici del meloxicam, tra cui la riduzione dell'infiammazione e dell'intensità del dolore¹⁹.

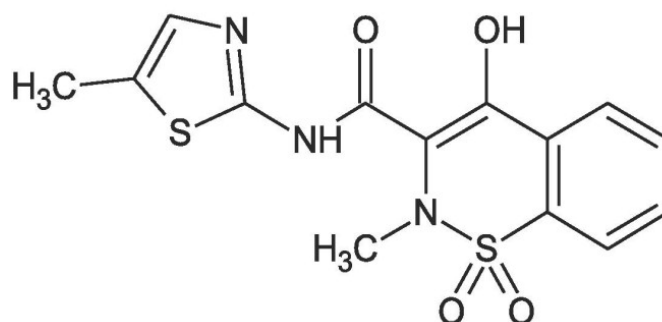


Figura 9: struttura molecolare del Meloxicam

Lo sviluppo di formulazioni farmaceutiche a base di meloxicam è reso complesso dalla sua scarsa solubilità. Il farmaco è praticamente insolubile in acqua, poiché la sua struttura molecolare, caratterizzata da porzioni poco polari, non interagisce in maniera favorevole con le molecole del solvente. Anche in alcuni solventi organici, come etanolo e metanolo, presenta una solubilità limitata, mentre risulta maggiormente solubile in dimetilformammide e dimetilsolfossido. È stato inoltre osservato che la solubilità del meloxicam aumenta al crescere del pH della soluzione.

Dal punto di vista cristallografico, per il meloxicam sono state descritte cinque forme polimorfiche, indicate come Forme I, II, III, IV e V. Tuttavia, soltanto la Forma I, caratterizzata dalla configurazione enolica, e la Forma IV monoidrata, nota anche come forma zwitterionica o MH, sono state

completamente caratterizzate a livello strutturale. La Forma I è considerata la più stabile, ed è pertanto la forma più utilizzata nello sviluppo di prodotti farmaceutici ma è anche quella con la minore solubilità. In alcuni medicinali commerciali è stata rilevata la coesistenza della Forma I con la forma monoidrata MH.

La perdita dell'acqua di cristallizzazione dalla forma MH può determinare la stabilizzazione della Forma V, con possibili conseguenze sulla purezza e sulle proprietà del prodotto finale. La Forma V può originarsi durante processi produttivi caratterizzati dalla presenza di umidità: in tali condizioni può formarsi inizialmente la fase monoidrata, che successivamente può trasformarsi nella forma anidra, spontaneamente oppure durante l'essiccamento²⁰.

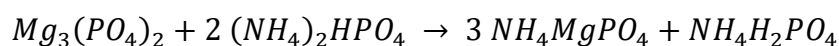
3. Preparazione dei campioni di cemento

Dopo avere ottenuto le materie prime si passa alla preparazione dei campioni di cemento. In questo capitolo vengono descritte le procedure operative per la formulazione di provini destinati successivamente a caratterizzazioni strutturali, fisiche, meccaniche e farmaceutiche.

Variando alcuni parametri chiave, singolarmente o combinati, è stato possibile studiare il contributo di ciascuno di essi sulla cinetica della reazione e sull'evoluzione delle fasi cristalline. Questo approccio è fondamentale per ottimizzare la formulazione del cemento, garantendo il compromesso ideale tra proprietà meccaniche, tempi di lavorabilità e capacità di rilascio del farmaco.

3.1 Reazione di formazione

La sintesi dei TMPCs si basa sulla reazione acido-base tra TMP e un fosfato solubile, tipicamente fosfato di ammonio, in ambiente acquoso. Da questa reazione si generano diverse fasi:



- $Mg_3(PO_4)_2$: il reagente di partenza, chiamato farringtonite.
- NH_4MgPO_4 : la struvite, il prodotto di interesse, responsabile dell'indurimento del cemento e delle sue conseguenti proprietà meccaniche.
- $NH_4H_2PO_4$: bifosfammite, un prodotto secondario della reazione, presente solo quando la concentrazione del fosfato reagente è piuttosto elevata ma generalmente in quantità inferiore all'1% in peso.

Dalla reazione si genera spesso anche un'ulteriore fase chiamata newberyite (MgHPO_4) che rappresenta, assieme a farringtonite e struvite, la terza fase per quantità in peso.

Dalla variazione dei singoli parametri nella miscela iniziale di TMP e fosfato (rapporto polvere/liquido e concentrazione della fase fosfato), si può verificare il cambiamento nella formazione di struvite e, di conseguenza, correlarlo alle proprietà meccaniche.

3.2 Aggiunta di fosfato

Il primo parametro importante per la formazione della struvite è la quantità di fosfato aggiunto e la sua concentrazione. Per massimizzare la precipitazione di struvite, come evidente dalla reazione (1) della sintesi in fase liquida della struvite, si è scelto di utilizzare il fosfato $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ che contiene due molecole di $(\text{NH}_4)^+$.

Concentrazione

Sono state preparate e utilizzate tre soluzioni di fosfato dibasico a diversa concentrazione: 3.5 M, 2.0 M e 1.0 M, sulla base di articoli di letteratura¹².

Una concentrazione maggiore del fosfato dovrebbe favorire lo scambio dell' $(\text{NH}_4)^+$ nel TMP, portando a una maggior quantità di struvite e quindi un cemento finale più resistente; al contrario, una concentrazione minore, permetterebbe una precipitazione di una minor quantità di struvite rallentando la velocità di indurimento e portando ad un cemento dalle prestazioni meccaniche inferiori ma con una maggior maneggevolezza.

Fin dalle prove iniziali, si è notato come la concentrazione 3.5 M e 2.0 M abbiano prodotto campioni di cemento notevolmente diversi, già al solo tatto: i primi molto resistenti, i secondi friabili ma sufficientemente compatti da non scomporsi. I cementi ottenuti con il fosfato 1.0 M, invece, si sono dimostrati insoddisfacenti poiché si sgretolavano troppo facilmente, perciò non sono stati portati avanti.

Rapporto polvere/liquido (P/L)

Il secondo parametro importante nella formazione del cemento è il rapporto polvere liquido che si impiega in fase di sintesi. Per questa tipologia di cementi in letteratura sono stati proposti due diversi rapporti polvere/liquido: 1.5 g/mL e 2.0 g/mL. Un valore del rapporto P/L minore indica una maggiore quantità di fase liquida (in tal caso il fosfato) aggiunto a parità di TMP.

Nei normali cementi Portland, usati nell'edilizia, la reazione è una semplice idratazione. L'acqua aggiunta non va a reagire effettivamente con il cemento, ma agisce solo come ambiente di reazione dove avviene la transizione di fase. Per questo motivo, l'acqua in eccesso evapora al termine della reazione e un'eccessiva quantità porta alla formazione di bolle d'aria che compromettono la densità della struttura finale del cemento indurito.

Al contrario, nei cementi struvitici, il fosfato aggiunto reagisce con la polvere di magnesio scambiando ioni ammonio; perciò, aumentando la quantità di liquido (abbassando il P/L) si massimizza la quantità di struvite che precipita e, di conseguenza, la durezza finale del cemento. Il rapporto 1.5 dovrebbe generare un cemento dalle migliori prestazioni meccaniche, mentre il 2.0 un cemento più maneggevole a parità di concentrazione del fosfato.

3.3 Preparazione e selezione delle miscele

Basandosi sulla quantità di fosfato da aggiungere, sono possibili quattro combinazioni dei parametri elencati (tabella A):

	P/L (g/mL)	Conc. (M)
TMP_1535	1.5	3.5
TMP_1520	1.5	2.0
TMP_2035	2.0	3.5
TMP_2020	2.0	2.0

Tabella A – Formulazioni di cemento realizzate e sigla con cui verranno indicate nel seguito della tesi

Tutte e quattro le formulazioni sono state testate producendo campioni di cemento di forma cilindrica con procedura standard e usando le medesime quantità di TMP (Figura 10).

Sono stati pesati 600 mg di TMP puro, che sono stati inseriti all'interno di uno stampo cilindrico di gomma posto su un supporto di materiale plastico. Dopodiché, tramite l'uso di una micropipetta, è stata aggiunta la quantità esatta di fosfato (con la corrispettiva concentrazione) secondo il rapporto P/L desiderato. Per il rapporto 1.5 g/mL, per una quantità di 600 mg di TMP, sono stati aggiunti 200 μ L di fosfato; per il rapporto 2.0 g/mL, 150 μ L. Una volta aggiunto il fosfato, liquido e polvere sono stati mescolati tramite l'uso di un'asticella di metallo sottile, cercando di evitare perdite di materiale. Dopo il miscelamento, il prodotto è stato lasciato riposare per circa 3-4 minuti, per far iniziare la

precipitazione della struvite, e poi è stato inserito nello stampo un pistone in plastica, necessario per pressare il materiale cementizio durante l'indurimento e massimizzarne le proprietà meccaniche. Lo stampo è stato lasciato riposare una notte in stufa a 37 °C, per simulare la temperatura corporea. Il giorno successivo, il campione di cemento indurito viene rimosso dallo stampo cilindrico e rimesso in stufa in attesa delle successive prove di caratterizzazione.



Figura 10: campioni cilindrici di TMP con vari rapporti P/L

Selezione dei campioni

Le formulazioni caratterizzate da un rapporto polvere/liquido pari a 2 si sono dimostrate più difficili da lavorare rispetto a quelle con P/L 1.5, principalmente a causa della ridotta quantità di liquido disponibile durante l'impasto. Anche la lavorazione di maggiori quantità di polveri e la successiva ripartizione negli stampi è risultata comunque difficoltosa a causa del limitato tempo di presa. Per tale motivo, i campioni con P/L 2 sono stati esclusi dallo studio che è proseguito solo con quelli con P/L 1.5, che hanno garantito un miglior compromesso tra lavorabilità, omogeneità dell'impasto e riproducibilità dei campioni.

Sulla base di queste osservazioni, le formulazioni selezionate per il prosieguo dello studio sono quelle caratterizzate da un rapporto liquido/polvere pari a 1.5, mantenendo come unica variabile la concentrazione della soluzione di fosfato (3.5 M e 2.0 M). Questa scelta consente di indirizzare l'attenzione sugli effetti della sola concentrazione del reagente fosfato sulla formazione delle fasi e sulle proprietà finali del materiale, garantendo al contempo una comparazione più chiara e diretta tra i diversi sistemi.

3.4 Aggiunta di farmaco

Una volta definiti i rapporti polvere/liquido e la concentrazione della soluzione di fosfato più idonei, il sistema è stato considerato ottimizzato per introdurre la variabile funzionale successiva, rappresentata dall'aggiunta del farmaco. Questo passaggio consente di valutare in modo controllato l'effetto del principio attivo sulla formazione delle fasi cristalline e sulle proprietà finali del cemento.

Verifica della compatibilità del farmaco col sistema cementizio

Prima di procedere con le formulazioni contenenti il principio attivo alle concentrazioni di interesse, è stata verificata la compatibilità del farmaco con il sistema cementizio.

A tale scopo, è stato preparato un campione di prova contenente una quantità di meloxicam pari a 20 mg, superiore rispetto alla dose giornaliera suggerita che è di non più di 6 mg al giorno, con il solo obiettivo di confermare la sua presenza nel materiale mediante spettroscopia infrarossa. Questa prova preliminare ha permesso di valutare in modo qualitativo l'effettiva rilevabilità del farmaco nella matrice cementizia e il mantenimento della sua struttura, costituendo un passaggio iniziale utile per le successive formulazioni a più basso contenuto di principio attivo. Si è scelto di preparare un campione di TMP_1520.

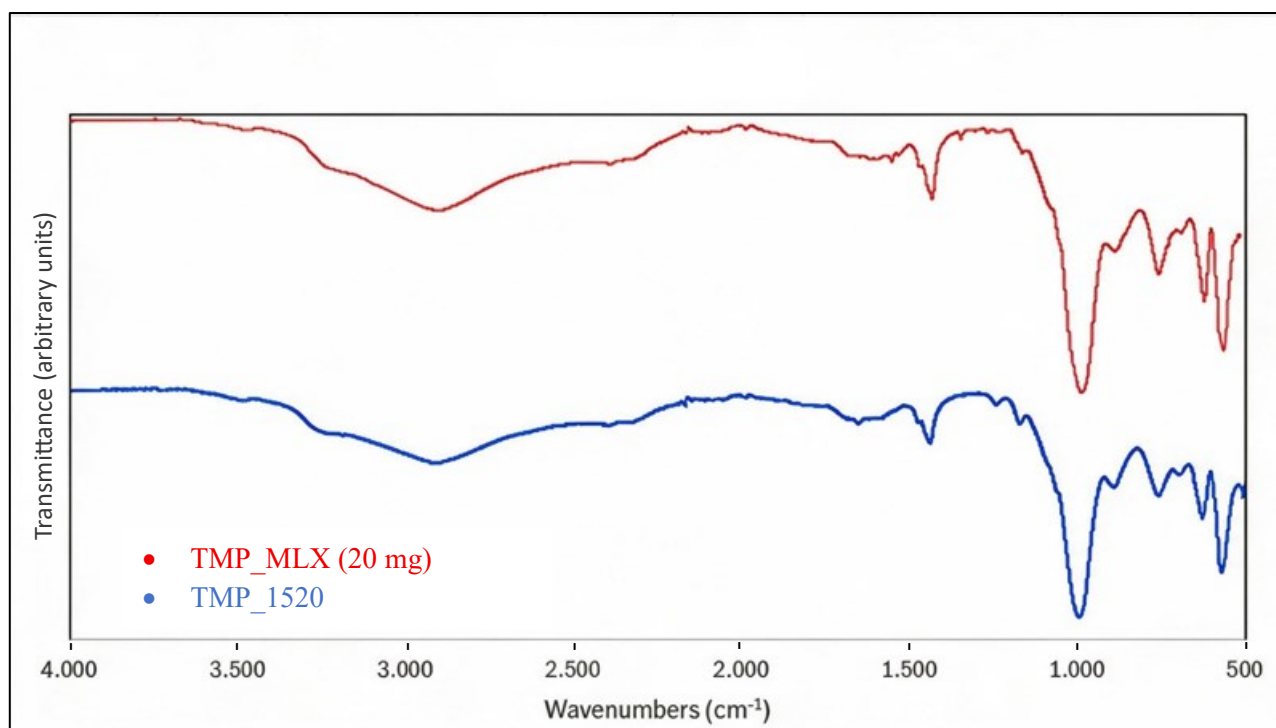


Figura 11: Confronto degli spettri FT-IR del campione TMP-1520 con e senza farmaco

In Fig. 11 è riportato il confronto tra lo spettro del cemento puro e quello con aggiunta di farmaco.

Come si può notare, nel campione contenente il farmaco compare un debole picco a 1551 cm^{-1} , più altri deboli picchi a circa 1376 e 1312 cm^{-1} attribuibili al Meloxicam.²⁰

Questo risultato indica che l'incorporazione del farmaco nel sistema è effettivamente possibile e che il materiale è in grado di accoglierne una quantità rilevabile senza variazioni nella struttura del cemento né del farmaco. Di conseguenza, viene quindi dato per scontato che lo stesso risultato sia valido anche per quantità inferiori di farmaco, pari a 6 mg, la quantità che sarà in seguito impiegata.

Preparazione dei campioni con farmaco

Una volta stabilita la compatibilità del farmaco col sistema, sono stati preparati i campioni di cemento, caricati con il Meloxicam. La modalità di preparazione è analoga a quella prevista per i campioni di solo TMP.

Ai 600 mg di TMP, vengono aggiunti 6 mg di Meloxicam tramite miscelazione meccanica con mortaio di agata. Il processo consiste nella macinazione di TMP con la giusta quantità di farmaco per circa 10 minuti fino alla completa omogeneizzazione, riconoscibile grazie alla diffusione della colorazione giallognola del farmaco a tutta la polvere che in partenza è bianca. Dopodiché, alla

miscela è stata aggiunta la quantità di $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ in base ai rapporti P/L 1.5 e 2.0 g/mL. In questo modo, sarà possibile evidenziare gli effetti dell'aggiunta del farmaco nella formazione delle fasi durante l'indurimento.

	P/L (g/mL)	Conc. (M)	Meloxicam (mg)
TMP_1535	1.5	3.5	/
TMP_1520	1.5	2.0	/
TMP_MEL_1535	1.5	3.5	6
TMP_MEL_1520	1.5	2.0	6

Tabella B – Composizione dei campioni di cemento impiegati nel lavoro di tesi e relativi acronimi

3.6 Aggiunta di struvite

Nel tentativo di ottenere un composto cementizio con proprietà meccaniche ancora migliori, è stato ipotizzato che l'aggiunta di struvite alla miscela iniziale dei reagenti potesse influenzare positivamente il processo di idratazione e che le particelle di struvite potessero agire come siti preferenziali di nucleazione per la precipitazione di ulteriore fase struvite. Infatti, la sua parziale dissoluzione avrebbe potuto modificare localmente la concentrazione degli ioni magnesio e fosfato, influenzando la cinetica di reazione e l'equilibrio tra le diverse fasi. Inoltre, l'introduzione di struvite preformata avrebbe potuto accelerare la formazione della struttura cementizia e contribuire alla densificazione della microstruttura, con possibili effetti positivi sulle proprietà meccaniche del materiale.

Preparazione dei campioni con struvite e farmaco

Poiché non erano disponibili in letteratura indicazioni sulla quantità ottimale di struvite da aggiungere alla miscela iniziale, si è scelto di introdurre una quantità di struvite pari al 10% in peso della massa di TMP.

La struvite è stata preparata per reazione di coprecipitazione, nelle modalità descritte nel capitolo 2.2. Invece degli usuali 600 mg di TMP, sono stati impiegati 540 mg di TMP e 60 mg di struvite: i due reagenti sono stati macinati a mano per circa 10 minuti. Dopodiché, i campioni sono stati preparati nelle medesime modalità dei cementi con solo TMP, aggiungendo la giusta quantità di $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ per rispettare i rapporti P/L 1.5 e 2.0. Oltre ai campioni con la sola aggiunta di struvite sono stati anche preparati quelli con aggiunta di 6 mg di farmaco come già descritto per il campione di cemento senza struvite.

	P/L (g/mL)	Conc. (M)	Meloxicam (mg)	Struvite (mg)
TMP_1535	1.5	3.5	/	/
TMP_1520	1.5	2.0	/	/
TMP_MLX_1535	1.5	3.5	6	/
TMP_MLX_1520	1.5	2.0	6	/
TMP_Struv_1535	1.5	3.5	/	60
TMP_Struv_1520	1.5	2.0	/	60
TMP_Struv_MLX_1535	1.5	3.5	6	60
TMP_Struv_MLX_1520	1.5	2.0	6	60

Tabella C – composizione dei campioni finali studiati nel lavoro di tesi con le rispettive sigle

4. Tecniche di caratterizzazione

Nel seguente capitolo verranno trattate le tecniche di analisi, e le modalità operative delle strumentazioni usate per la caratterizzazione di tutti i campioni sintetizzati. I risultati, combinati tra loro, permetteranno di effettuare delle osservazioni su vari aspetti della formazione dei cementi e di stabilire tendenze legate alle loro formulazioni.

4.1 Diffrazione a raggi X di polveri (XRD)

Lo studio dettagliato delle fasi cristalline è stato effettuato mediante diffrazione a raggi X di polveri (XRD, *X-Ray Diffraction*) sia sui precursori, che sui cementi appena preparati sia durante l'invecchiamento così come dopo immersione e rilascio di farmaco. Questa tecnica è stata utilizzata con l'obiettivo di identificare le fasi cristalline presenti nei campioni e di valutare le eventuali modifiche della composizione mineralogica in funzione della formulazione e del trattamento applicato.

Lo scopo era anche quello di trovare una possibile correlazione con le proprietà meccaniche determinate.

Nel seguito, poiché i diffrattogrammi raccolti sono molti e spesso piuttosto simili si è deciso di mostrare soltanto i diffrattogrammi XRD dei campioni con concentrazione del fosfato 3.5 M e il P/L 1.5.

L'analisi è stata condotta a livello qualitativo per identificare le fasi cristalline e valutare l'evoluzione del sistema durante il processo di maturazione. Poiché però le differenze spesso erano minime si è deciso di effettuare anche una analisi quantitativa applicando il raffinamento mediante metodo di Rietveld, per avere una maggiore precisione e rigore.

Tale procedura consentirà di costruire un modello cristallografico del diffrattoگرامma calcolato basato sulle fasi presenti da confrontare con quello sperimentale. Per ottenere il miglior confronto possibile si lasciano variare diversi parametri quali coefficienti di background, fattore di scala, parametri reticolari, dimensione dei cristalliti e anche posizioni atomiche e fattori termici. Nella tesi l'attenzione è stata però focalizzata unicamente a cercare di minimizzare la differenza tra i pattern inserendo tutte le fasi presenti e l'unico dato che verrà discusso sarà la percentuale delle fasi, per individuare andamenti con la formulazione del cemento.

Nel presente lavoro di tesi, le analisi di diffrazione delle polveri 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° e 80° , in modalità continuo (step circa 0.03°) e tempo di conteggio di 0.5 secondi per step. La fenditura scelta è quella di 1 mm e il coltello per rimuovere la radiazione diffusa è stato posto ad altezza di 3 mm.

4.2 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)

La spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier, indicata con l'acronimo FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), è stata utilizzata per caratterizzare la composizione chimica e la struttura molecolare dei campioni analizzati. Questa tecnica permette di studiare il modo in cui la radiazione infrarossa interagisce con il materiale, fornendo informazioni relative ai legami chimici e ai gruppi funzionali presenti.

Nel lavoro di tesi, l'analisi FT-IR è stata impiegata per valutare la presenza del farmaco e per verificare l'eventuale comparsa di variazioni strutturali associate all'introduzione della struvite così come alla evoluzione delle fasi. Il confronto tra i diversi campioni consente infatti di osservare eventuali modifiche nelle bande di assorbimento, nella loro posizione, intensità o forma.

I campioni sono stati analizzati a seguito di maturazione di 30 giorni, dopo essere stati polverizzati in mortaio d'agata.

È importante ricordare che la tecnica FT-IR non consente sempre di identificare univocamente una fase cristallina. Per questo motivo, i risultati devono essere discussi e interpretati con altre tecniche quali la diffrazione a raggi X, che fornisce informazioni più specifiche sull'ordine cristallino e sulle fasi presenti.

Le misure spettroscopiche sono state effettuate in modalità di riflettanza, 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 cm^{-1} .

4.3 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

La microscopia elettronica a scansione, indicata con l'acronimo SEM (Scanning Electron Microscopy), è stata utilizzata per esaminare la morfologia e la microstruttura dei campioni di cemento. Questa tecnica consente di osservare la superficie del materiale ad alti ingrandimenti, permettendo di analizzare la forma, la distribuzione e la dimensione dei grani.

L'analisi SEM è stata impiegata per verificare porosità, compattezza, morfologia dei cristalli, presenza di microfratture e qualità dell'interfaccia tra le fasi poiché tali caratteristiche possono influenzare significativamente le proprietà meccaniche, la stabilità e la durabilità del cemento.

Per l'analisi, dai cilindretti maturati sono state prelevate porzioni caratterizzate da una superficie il più possibile piana, in modo da facilitare il fissaggio sul supporto. Particolare attenzione è stata rivolta alla selezione di frammenti che presentassero una faccia riconducibile alla superficie interna del cilindretto, ottenuta in seguito alla frattura del campione.

I frammenti selezionati sono stati successivamente fissati sul supporto porta-campione tramite scotch biadesivo, assicurandone la stabilità durante l'osservazione. Trattandosi di campioni inorganici scarsamente conduttivi, è stato necessario procedere con la deposizione di un coating d'oro sulla loro superficie, tramite la tecnica dello sputtering. Il rivestimento d'oro ha reso la superficie conduttiva, limitando l'accumulo di carica elettrostatica e consentendo di ottenere immagini più stabili e dettagliate della microstruttura interna.

L'analisi SEM è stata condotta con un microscopio elettronico a scansione Zeiss EVO MA10 dotato di un rivelatore per elettroni secondari e per spettroscopia a dispersione di energia (EDS) per microanalisi e operante con una tensione di accelerazione del fascio elettronico di 20 kV.

Analisi EDS associata alla microscopia SEM

All'analisi morfologica mediante microscopia elettronica a scansione è stata associata la spettroscopia a dispersione di energia dei raggi X, EDS. L'analisi EDS è stata utilizzata per ottenere informazioni qualitative e quantitative sulla composizione elementare del campione.

L'associazione tra SEM ed EDS permette di correlare direttamente l'aspetto morfologico del campione con la sua composizione chimica locale. In questo modo è possibile verificare la distribuzione degli elementi principali nella matrice cementizia e valutare l'eventuale presenza di fasi segregate.

Nel caso dei campioni analizzati, l'EDS può contribuire a verificare la presenza di elementi quali magnesio, fosforo, ossigeno, oltre agli eventuali elementi associati al farmaco o ad altre componenti della formulazione. In particolare, si è verificata la presenza di zolfo, elemento attribuibile al Meloxicam.

Per le analisi EDS si sono impiegati campioni non sputterati, preparati con le medesime modalità di quelli per il SEM.

4.4 Prove di rilascio del farmaco

Le prove di rilascio del farmaco sono in grado di fornire informazioni sul comportamento del sistema in condizioni fisiologiche.

Prima di procedere con le prove di rilascio del farmaco, il peso dei campioni è stato monitorato giorno per giorno e, una volta stabilizzato, sono stati scelti sei campioni con il peso medio più simile.

Gli studi di dissoluzione in vitro sono stati condotti presso il Dipartimento di Scienze del Farmaco dal gruppo della Prof.ssa Lauretta Maggi, utilizzando un dissolutore Erweka DT600 (GmbH, Germany), costituito da sei contenitori in vetro di forma cilindrica con fondo emisferico, dotati di un coperchio per limitare l'evaporazione del mezzo di dissoluzione. I cilindri di cemento sono stati sottoposti a test di dissoluzione impiegando l'Apparatus I (basket method) [18]. A intervalli di tempo prestabiliti fino a un massimo di 7 giorni sono stati prelevati campioni di soluzione dai vessel termostatati mediante una pompa peristaltica (Esapump Advanced Products s.r.l.), che ha convogliato i campioni nelle celle a flusso di uno spettrofotometro Lambda 25 (PerkinElmer). Le misurazioni sono state effettuate alla lunghezza d'onda di 362 nm a cui assorbe il farmaco. Successivamente, il fluido prelevato è stato reintrodotta nel vessel di origine per garantire la stabilità del volume di

dissoluzione. I valori di assorbanza sono stati registrati ed elaborati mediante un software dedicato alla gestione della dissoluzione e dell'analisi spettrofotometrica (WinLab V6, PerkinElmer, Monza, Italy). Durante il test, il fluido di dissoluzione è rimasto statico, con l'attivazione della rotazione dei vessel ogni 165 minuti, impostata a una velocità di 30 rpm per 15 minuti. L'intero sistema è stato mantenuto a una temperatura costante di 37 ± 0.5 °C. L'analisi è stata condotta utilizzando 500 mL di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS saline) a pH 7.4, valore rappresentativo del pH medio del plasma ¹⁹.

Ogni campione di cemento conteneva 6 mg di Meloxicam e le misure sono state ripetute su 6 provini.

Al termine delle prove di rilascio, i campioni sono stati prelevati, asciugati tramite l'uso di stufa a vuoto fino a peso costante e sottoposti alle stesse caratterizzazioni dei campioni senza farmaco.

4.5 Prove meccaniche di compressione

Dopo la caratterizzazione dei campioni di cemento, sono state compiute prove meccaniche di compressione nelle quali è stata testata la capacità di sopportare un carico applicato lungo una direzione assiale. Questa tipologia di analisi è particolarmente importante per caratterizzare il comportamento meccanico del cemento e per verificare l'effetto della maturazione, della composizione e dell'eventuale aggiunta del farmaco sulle prestazioni del materiale.

Durante la prova, il campione viene sottoposto a un carico crescente fino alla sua rottura. La forza applicata (misurata dallo strumento) e la geometria iniziale del provino permettono di determinare la resistenza a compressione (compressive strenght), generalmente espressa come rapporto tra il carico massimo sopportato e l'area iniziale della sezione trasversale alla quale viene applicato lo stress meccanico:

$$\sigma_c = \frac{F_{\max}}{A_0}$$

Dove σ_c è la resistenza a compressione, $F_{\max}$ il carico massimo applicato prima della rottura e A_0 l'area iniziale della sezione sottoposta al carico.

Una volta registrata la compressive strenght, si procede con il calcolo del modulo di Young (E):

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

Dove ε rappresenta lo strain, ovvero la deformazione che il campione subisce a causa dello stress σ_c

La resistenza a compressione dipende dall'organizzazione interna del materiale. Una matrice compatta e omogenea, caratterizzata da una ridotta presenza di pori e da una buona coesione, tende generalmente a opporsi meglio alla deformazione e alla propagazione delle fratture. Al contrario, porosità elevate possono favorire la rottura del campione. Per questo motivo, i risultati delle prove meccaniche possono essere interpretati insieme alle osservazioni dall'analisi SEM e con le prove di porosità, permettendo di correlare la resistenza misurata con la morfologia e la compattezza del cemento.

Nel presente lavoro, le prove di compressione possono essere utilizzate per confrontare la formulazione contenente il farmaco, la struvite aggiunta o entrambe con il cemento ottenuto esclusivamente da TMP. Tale confronto permette di verificare se l'aggiunta degli additivi in questione vada a influenzare le proprietà strutturali, donando al cemento una maggiore o minore resistenza meccanica complessiva a seconda delle necessità terapeutiche.

Le prove di compressione sui provini cilindrici sono state eseguite mediante una macchina MTS Insight dotata di cella di carico da 10 kN (figura 12).

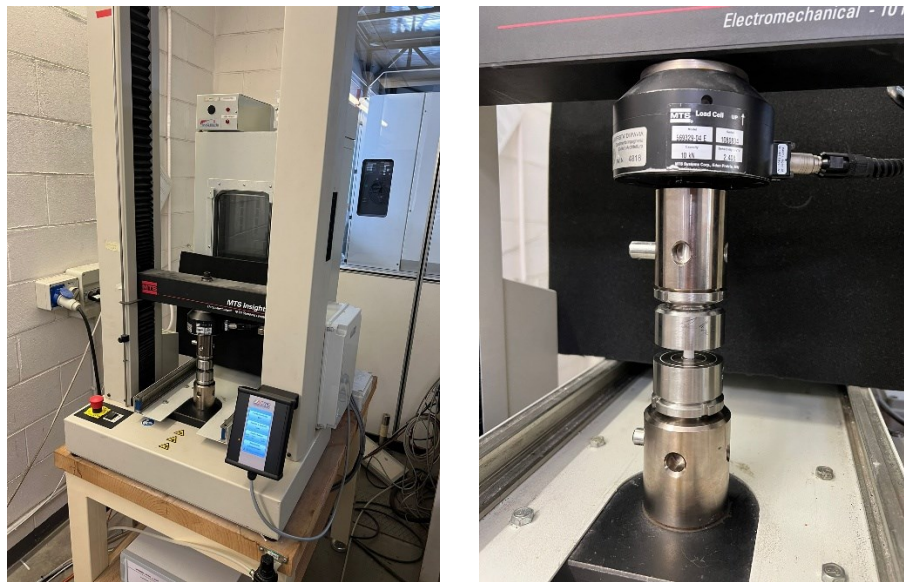


Figura 12: foto della pressa impiegata per le misure meccaniche con dettaglio del campione durante la compressione.

Sono stati testati 5 campioni per ogni formulazione, maturati 30 giorni in stufa a 37 °C, limati al fine di uniformare la superficie di contatto tra il campione e la pressa. La scelta di analizzare cinque repliche ha permesso di determinare il valore medio della resistenza meccanica e la relativa

deviazione standard, fornendo un'indicazione della dispersione dei risultati e della variabilità tra i campioni.

Per ciascuna campione sono state registrate le dimensioni del provino, quali altezza (mm) e diametro (mm), tramite l'utilizzo di un calibro (Figura 13), per il calcolo dell'area della sezione trasversale (mm²). A partire da questi dati è stato quindi possibile determinare per ciascun campione il valore massimo della compressive strenght e il modulo di Young.



Figura 13: misurazione di un provino cementizio con il calibro

4.6 Determinazione della densità apparente e porosità

Per la misura della densità è stato utilizzato il principio di Archimede, andando a sfruttare i vuoti strutturali che si formano durante il processo di maturazione del cemento, i quali risultano più o meno accessibili all'acqua in base alla compattezza della struttura.

Un campione di ogni serie cementizia è stato lasciato intatto e dopo la maturazione di 30 giorni in stufa, i campioni sono stati pesati con una bilancia analitica all'aria e successivamente rivestiti con smalto impermeabile per impedire l'assorbimento di acqua da parte del campione. Dopodiché, i campioni smaltati sono stati ripesati in modo da poter sottrarre il contributo dello smalto dal calcolo della densità apparente. La formula utilizzata per il calcolo è la seguente:

$$p_a = \left[\frac{A}{A - B} \right] (p^0 - d) + d$$

Dove:

- A: peso del campione in aria
- B: peso del campione immerso in acqua
- ρ^0 : densità dell'acqua (1 g/cm^3)
- d : densità dell'aria (0.001 g/cm^3)

Il peso del campione in acqua è stato ricavato tramite l'uso di un apparato strumentale artigianale, in grado di pesare il campione immerso nel liquido senza toccare il fondo del recipiente (Figura 14). Lo strumento si compone di 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.

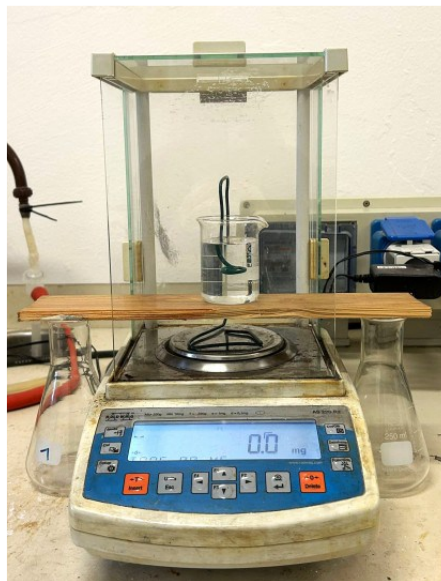


Figura 14: apparato artigianale per la misura del campione immerso in acqua

Calcolo della porosità percentuale

Una volta calcolata la densità apparente è stato possibile calcolare la porosità percentuale del campione tramite la seguente formula:

$$\Phi = \left(1 - \frac{\rho_a}{\rho_s}\right) * 100$$

p_s rappresenta la densità teorica del campione cementizio. Trattandosi di un sistema complesso e composto da numerose fasi, ognuna con una densità diversa, la densità teorica di ogni campione è stata calcolata basandosi sulla percentuale di ogni fase ricavata dal raffinamento Rietveld.

4.7 Prove di iniettabilità

I materiali studiati sono cementi ossei iniettabili. Per questa ragione, la sola valutazione dello stato solido non sarebbe sufficiente a descrivere completamente il comportamento delle formulazioni. È stata quindi presa in considerazione anche la loro iniettabilità.

La valutazione dell'iniettabilità ha permesso di verificare se l'impasto ottenuto dalla miscelazione della polvere con la fase liquida possedesse caratteristiche adeguate a essere caricato in una siringa e successivamente estruso attraverso un ago. Le medesime proporzioni usate per la preparazione dei campioni cementizi sono state utilizzate per le prove di iniettabilità.

A tale scopo, sono state utilizzate due siringhe sterili monouso da 10 mL Jiangsu Kanghua Medical Equipment Co. distribuite dalla Chemil. Si tratta di due siringhe senza ago dotate di un sistema Luer Lock in grado di ospitare un tubo di collegamento che permetta la miscelazione senza necessità di mescolare le componenti in un recipiente separato e trasferirli nella siringa (Figura 15).



Figura 15: apparato strumentale per le prove di iniettabilità

La prova di iniezione ha permesso di verificare il comportamento della formulazione nella fase precedente alla maturazione, quando il cemento deve mantenere una consistenza sufficientemente fluida e omogenea per poter essere manipolato e introdotto nel sito di applicazione.

Il confronto tra i risultati delle due tipologie di valutazione può inoltre chiarire se l'aggiunta del farmaco influenzi soltanto le proprietà del cemento maturato oppure anche la lavorabilità e la facilità di iniezione dell'impasto.

5. Risultati e discussione

Il presente capitolo è dedicato alla discussione dei risultati ottenuti mediante le diverse tecniche di caratterizzazione impiegate nel corso della ricerca. L'interpretazione congiunta dei dati ha consentito di correlare la composizione dei campioni, l'evoluzione delle fasi cristalline, la struttura molecolare, la morfologia e le proprietà del sistema studiato.

5.1 XRD

Per comprendere l'evoluzione delle fasi cristalline durante la reazione di indurimento del cemento, è utile confrontare i diffrattogrammi dei singoli precursori (TMP e struvite, mostrati nelle sezioni 2.1 e 2.2) con quello del materiale cementizio finale. Il diffrattogramma del cemento può essere interpretato come una sovrapposizione dei pattern di diverse fasi (a scopo esemplificativo è stato riportato il diffrattogramma del cemento TMP_1535 dopo il primo giorno di maturazione in figura 16).

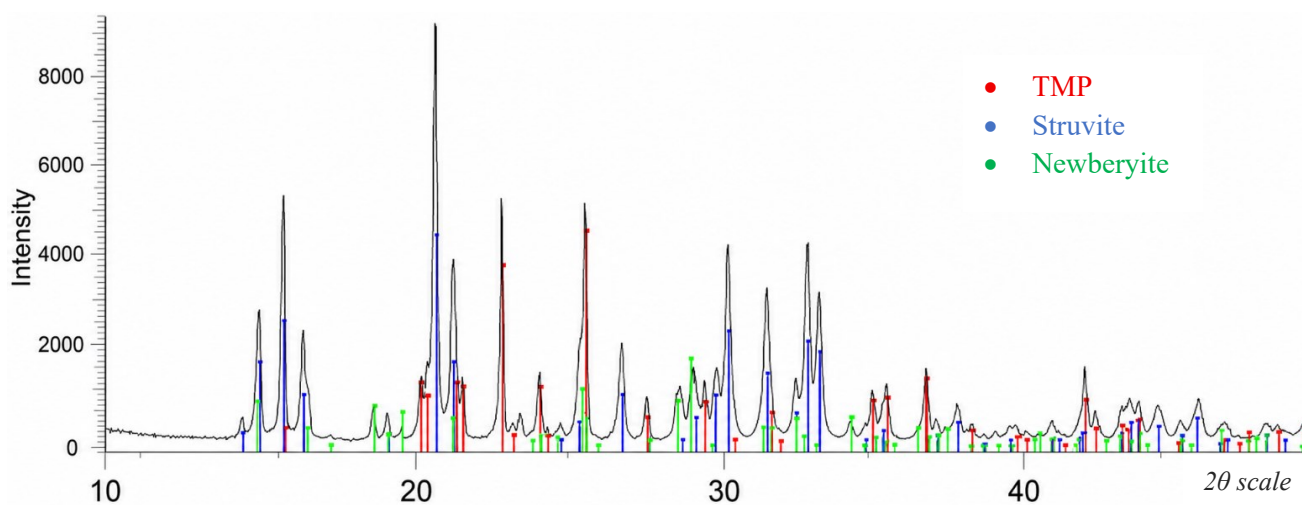


Figura 16: diffrattogramma del cemento TMP_1535 a 1 giorno di maturazione. Le barre colorate mostrano le posizioni attese delle fasi indicate in legenda.

Si osservano ancora i picchi principali del reagente TMP, sebbene con intensità ridotta, indicando che una frazione del precursore non ha reagito completamente mentre è evidente la comparsa di nuovi picchi corrispondenti alla struvite, confermando la formazione di questa fase durante la reazione di indurimento. Inoltre, si notano anche picchi associabili alla fase newberyite benchè probabilmente presente in quantità bassa.

Questo risultato suggerisce la trasformazione parziale del TMP in struvite, in quanto la reazione non procede fino al completamento ma si arresta a uno stato di equilibrio tra TMP residuo e prodotti di reazione.

Cementi da solo TMP con e senza farmaco

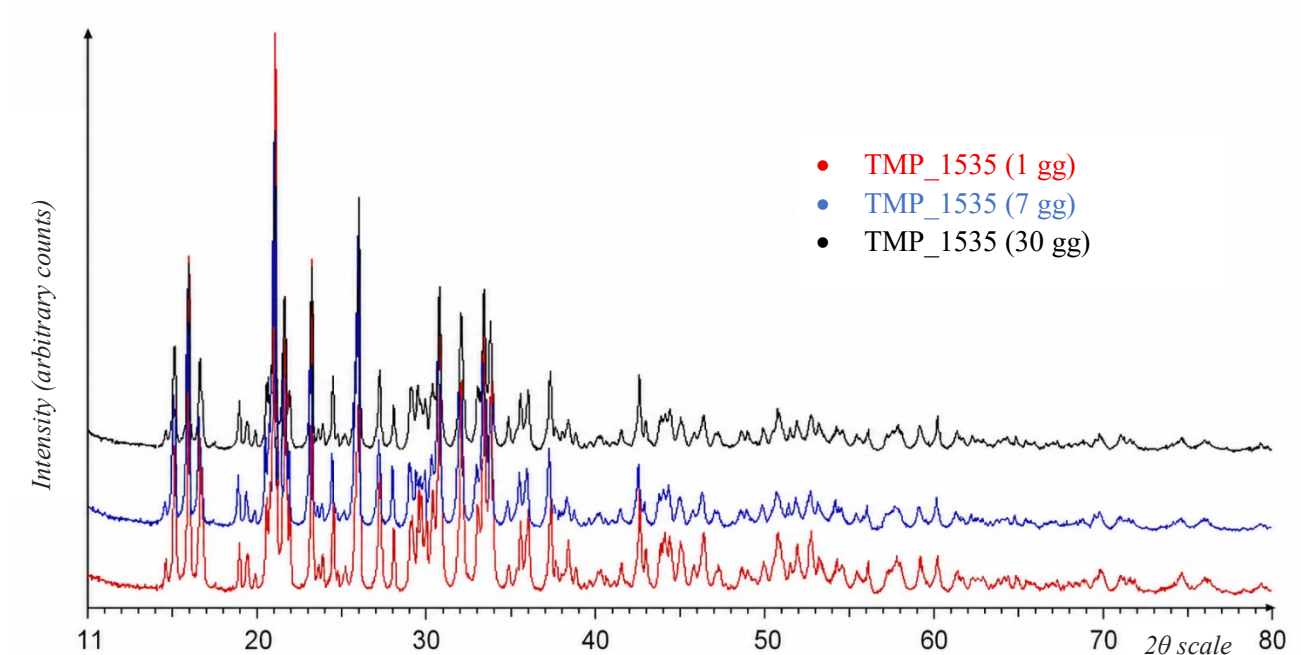


Figura 17: diffratogrammi del cemento TMP 1535 dopo 1-7-30 giorni a 37°C

In figura 17 viene mostrata l'evoluzione dei diffratogrammi del cemento nei giorni. Il diffratogramma rosso, relativo al campione analizzato dopo un giorno, è lo stesso discusso in Figura 16. I diffratogrammi blu e nero, ottenuti rispettivamente dopo una settimana e dopo un mese, conservano sostanzialmente le stesse posizioni dei riflessi principali, confermando la permanenza delle stesse fasi cristalline iniziali.

Non si osserva la comparsa evidente di nuovi picchi, né una scomparsa totale dei riflessi associati al TMP. Il processo di indurimento può quindi essere descritto come una trasformazione progressiva e parziale del precursore, piuttosto che come una conversione completa e immediata in un'unica fase cristallina. All'apparenza sembra che i diffratogrammi siano piuttosto simili, come se la gran parte della reazione avvenga subito dopo la miscelazione, mentre nei giorni successivi le variazioni sembrano più limitate. Servirà una analisi quantitativa per poter avere analizzare nel dettaglio questi andamenti.

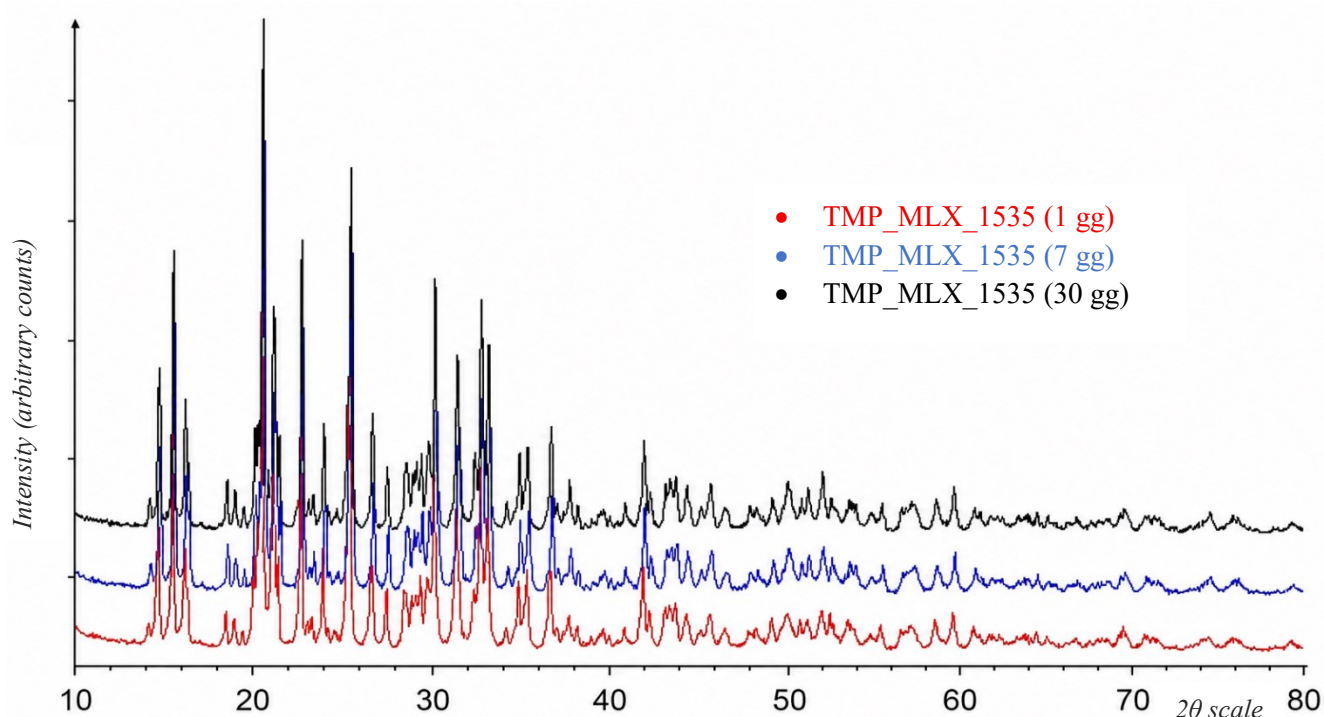


Figura 18: diffrattogrammi del cemento TMP_MLX_1535 raccolti dopo 1-7-30 giorni.

Il confronto tra i diffrattogrammi del cemento a base di solo TMP e quelli ottenuti dopo l'aggiunta del farmaco (Figura 18) non evidenzia differenze apprezzabili nelle fasi cristalline presenti. In particolare, le posizioni dei principali riflessi rimangono sostanzialmente invariate e non si osserva la comparsa di nuovi picchi attribuibili alla formazione di fasi secondarie o a prodotti cristallini derivanti dall'interazione tra il farmaco e la matrice cementizia.

Basandosi esclusivamente sull'analisi qualitativa dei diffrattogrammi, l'aggiunta del farmaco non sembra alterare in modo significativo le fasi cristalline del cemento. Una successiva analisi tramite metodi di raffinamento, tuttavia, porterà a considerazioni sulla variazione percentuale della quantità delle fasi presenti.

Cementi con aggiunta di struvite e farmaco

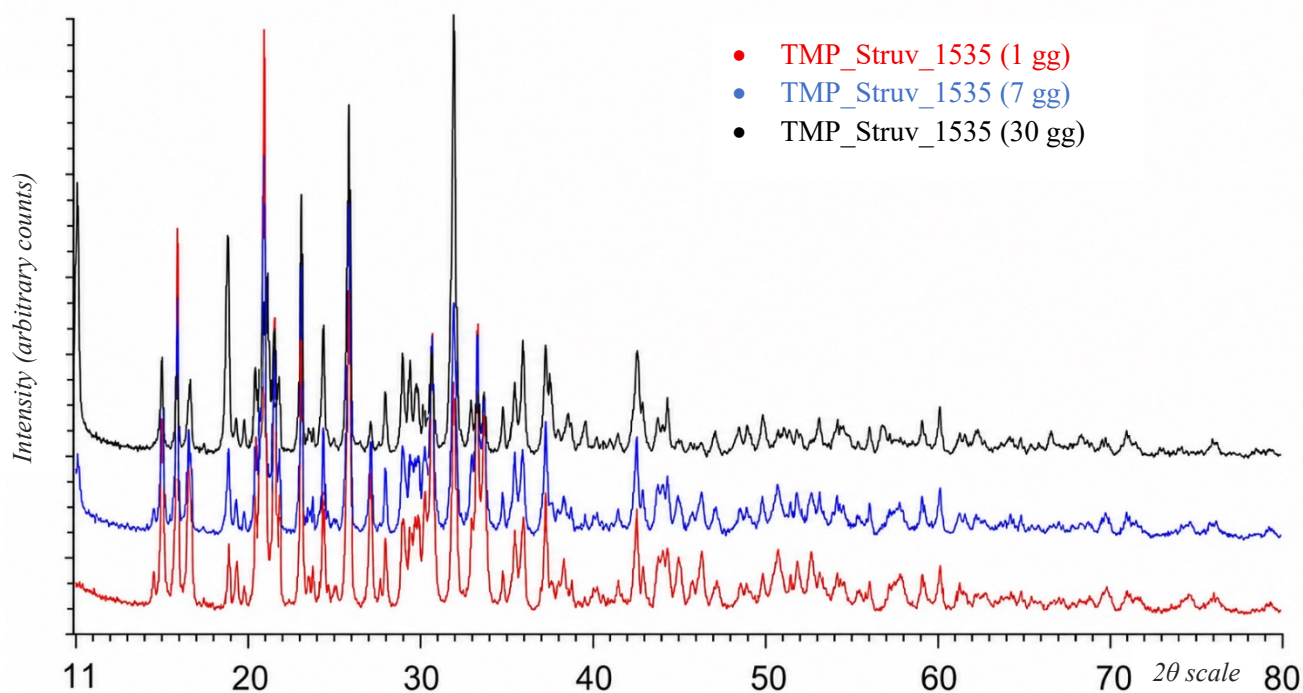
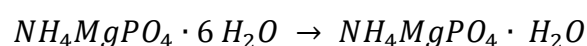


Figura 19: diffrattogrammi del cemento TMP_Struv_1535 raccolti dopo 1-7-30 giorni

I cementi i cui diffrattogrammi sono mostrati in Figura 19 sono stati preparati con aggiunta di struvite assieme alla fase TMP come reagenti (vedi sezione 3.6). A differenza del caso precedente (Figura 18), la serie attuale presenta una differenza evidente nella regione a basso angolo. In particolare, compare un intenso riflesso intorno a 10°, chiaramente distinguibile e di intensità via via crescente nel tempo.

È quindi evidente che l'aggiunta di struvite abbia modificato l'evoluzione del sistema cementizio.

La nuova fase che si è formata prende il nome mineralogico di “dittmarite” e si tratta di una forma disidratata della struvite:



La presenza di dittmarite potrebbe influenzare la microstruttura del cemento durante il processo di maturazione. La perdita dell'acqua di cristallizzazione può lasciare vuoti all'interno della matrice che vanno ad aumentare la porosità complessiva del campione. Di conseguenza, l'aggiunta di struvite pre-sintetizzata nella miscela iniziale di TMP potrebbe contribuire a una diminuzione della densità apparente e a una struttura più aperta e meno compatta.

Questo effetto, può risultare particolarmente rilevante proporzionalmente all'aumento della quantità di dittmarite, poiché una struttura più porosa può comportare un aumento della facilità di incorporazione e dell'attività di rilascio del farmaco, anche se forse un peggioramento delle proprietà meccaniche.

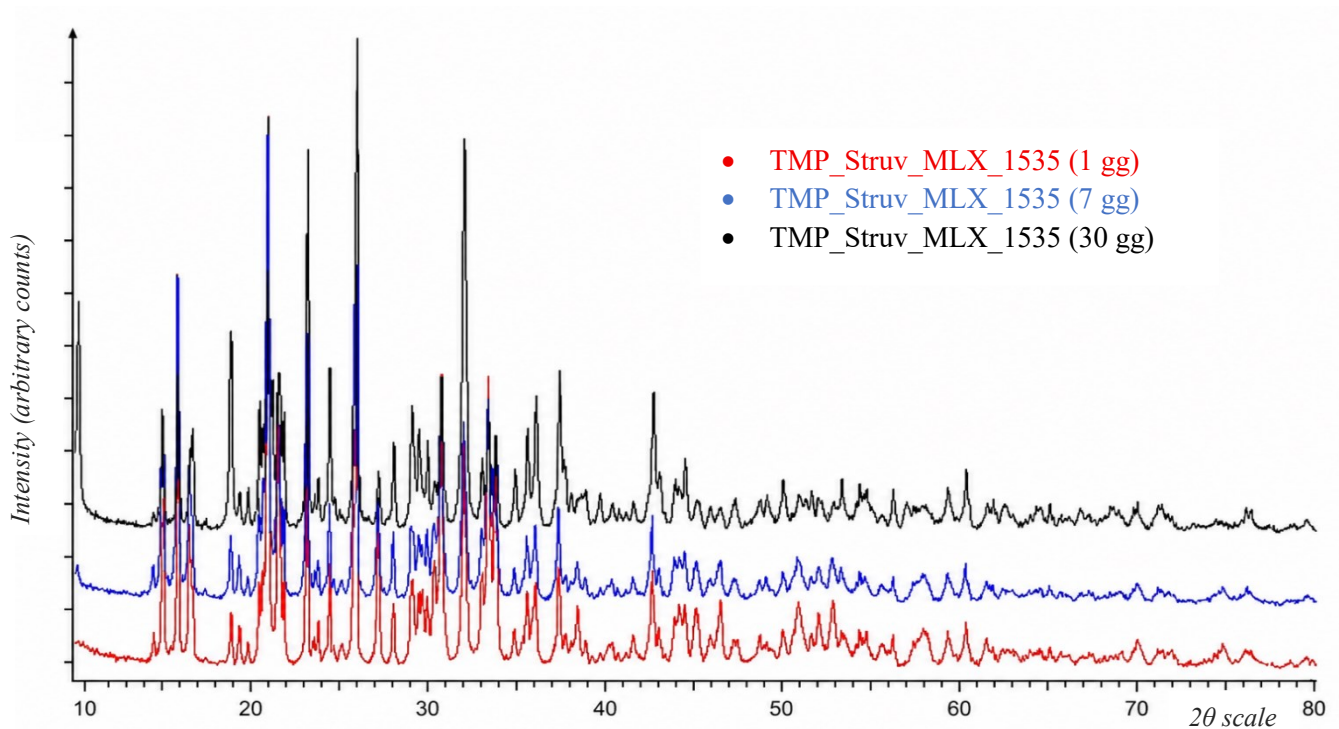


Figura 20: diffattogrammi del campione TMP_Struv_MLX_1535 raccolti dopo 1-7-30 giorni

Anche in questo caso (Figura 20), come nella serie dei diffattogrammi del cemento TMP_MLX_1535 (Figura 18), l'aggiunta di farmaco non ha apportato modifiche sostanziali alle fasi presenti. Troviamo lo stesso andamento della formazione di dittmarite, che aumenta nell'arco dei 30 giorni, e non si può apprezzare lo sviluppo di ulteriori fasi diverse da quelle trattate nei capitoli precedenti. Sembra però che dopo 7 giorni la quantità di dittmarite sia inferiore rispetto al caso precedente, come se la presenza del farmaco ne rallentasse la formazione.

Cementi post-immersione in ambiente fisiologico

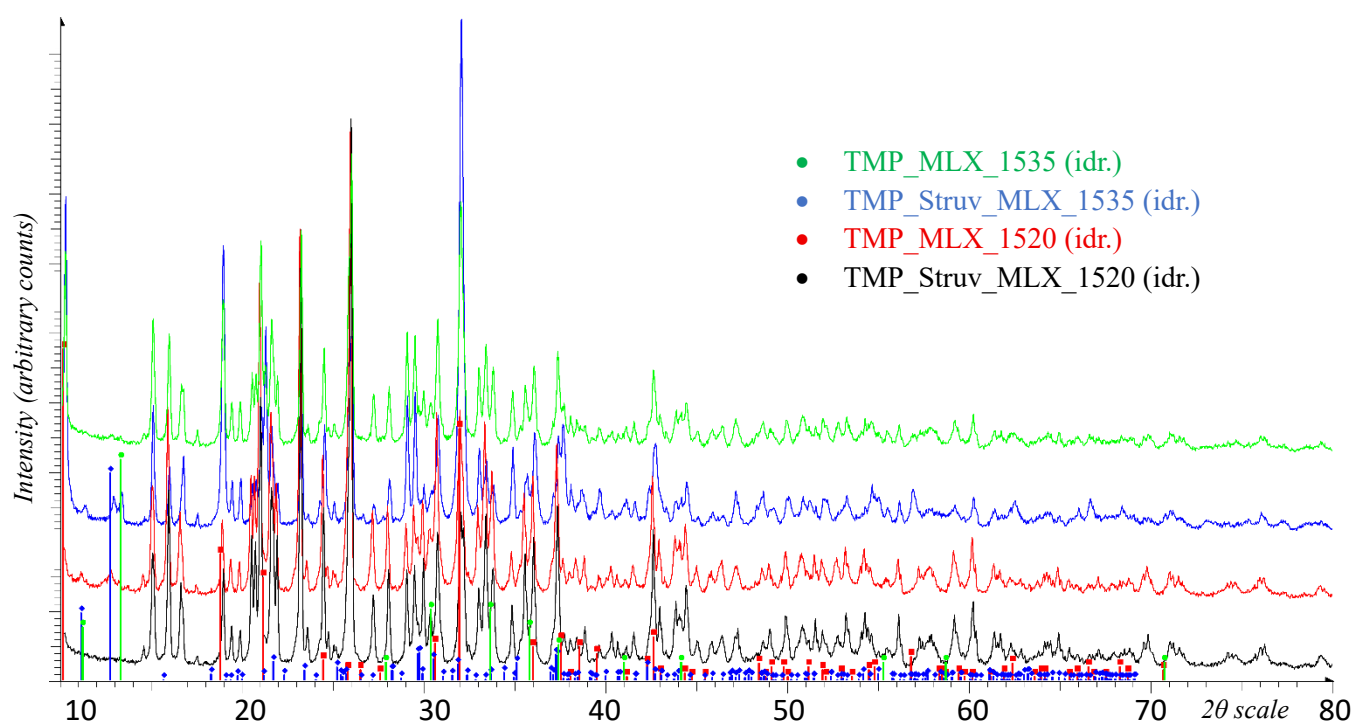
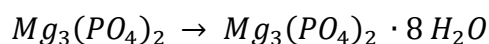


Figura 21: diffattogrammi dei campioni post immersione in ambiente fisiologico

Dall'osservazione della Figura 21 che riporta i diffattogrammi dei campioni dopo le misure di rilascio del farmaco, si può notare che compare, in tutti e quattro in campioni, il picco associato alla dittmarite, fase che compariva solo nei campioni con il fosfato 3.5 M e contenenti la struvite aggiunta.

In questi campioni, si può osservare inoltre la comparsa di un'altra fase chiamata “bobierrite” i cui picchi principali si trovano ad un angolo compreso tra 10° e 15°. Nel campione TMP_Struv_MLX_1535 si può notare uno sdoppiamento dei picchi associati alla bobierrite, dovuto alla presenza sia di bobierrite naturale e bobierrite “sintetica” entrambe con struttura monoclina ma diverso volume di cella e gruppo spaziale.

Questa nuova fase è la farringtonite idratata che passa dalla forma disidratata alla forma ottaidrata:



La comparsa della dittmarite e bobierrite, nei campioni post-idratazione, potrebbe influire sulle proprietà meccaniche al termine del rilascio mostrando andamenti diversi rispetto ai cementi analoghi maturati all'aria.

5.2 Risultati del raffinamento col metodo di Rietveld

Tutti i diffrattogrammi raccolti sono stati impiegati per il raffinamento strutturale col metodo di Rietveld, per ottenere dati quantitativi sull'andamento delle fasi. A titolo d'esempio, in Fig. 22, viene riportato il confronto grafico del raffinamento del campione TMP_1535.

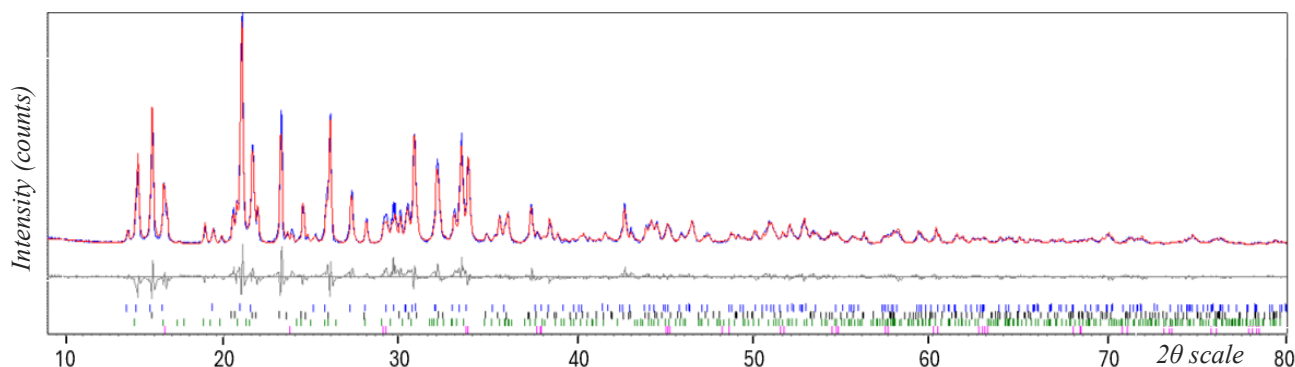


Figura 22: raffinamento strutturale col metodo di Rietveld del cemento TMP_1535. Il pattern blu rappresenta il dato sperimentale, quello rosso il pattern calcolato, la curva grigia la loro differenza mentre le barre colorate la posizione dei picchi delle varie fasi presenti

Si nota dalla curva differenza (Fig. 22) che il risultato del raffinamento è buono: tutte le fasi presenti sono state considerate nel modello calcolato, dimostrando quindi la correttezza dell'analisi qualitativa. Permangono alcuni problemi sulla forma dei picchi, che possono essere legati alla difficoltà nella macinazione del cemento da forma cilindrica a polvere fine e che si ripercuotono in forme scatterate difficili da modellare.

Sono quindi stati estratti i dati strutturali e come detto nella parte sperimentale il dato su cui ci si è concentrati è la percentuale delle diverse fasi che è stata riportata in funzione del tempo nelle Figure 23-29.

Effetto della concentrazione di fosfato sulle fasi

La prima osservazione che si può effettuare riguarda la quantità di struvite formata in funzione della concentrazione iniziale di fosfato impiegata nella formulazione del cemento.

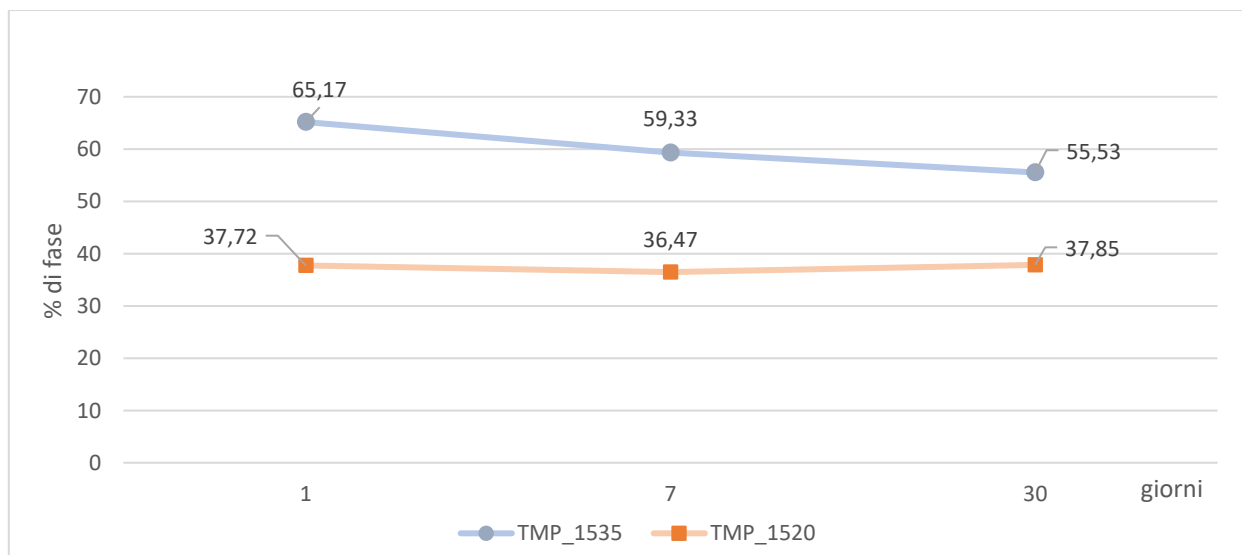


Figura 23: Andamento della % di fase struvite nei campioni TMP_1535 e TMP_1520 nel tempo (1-7-30 giorni)

È subito evidente come l'uso del fosfato 3.5 M porti a una maggior quantità di struvite rispetto alla concentrazione 2.0 M. Il risultato è conforme con quanto atteso¹³ ed è dovuto ad una maggior quantità di fosfato disponibile durante le fasi iniziali del processo. Questo fenomeno si può anche ipotizzare già durante la macinazione dei provini: i campioni di TMP_1535 sono risultati più resistenti rispetto a quelli di TMP_1520 fin dal primo giorno di maturazione, suggerendo quindi che la resistenza meccanica del cemento è associata alla quantità di struvite presente nella struttura.

Tuttavia, si può notare che la struvite nel campione TMP_1535 si riduce gradualmente nel tempo, mentre nel TMP_1520 rimane stabile.

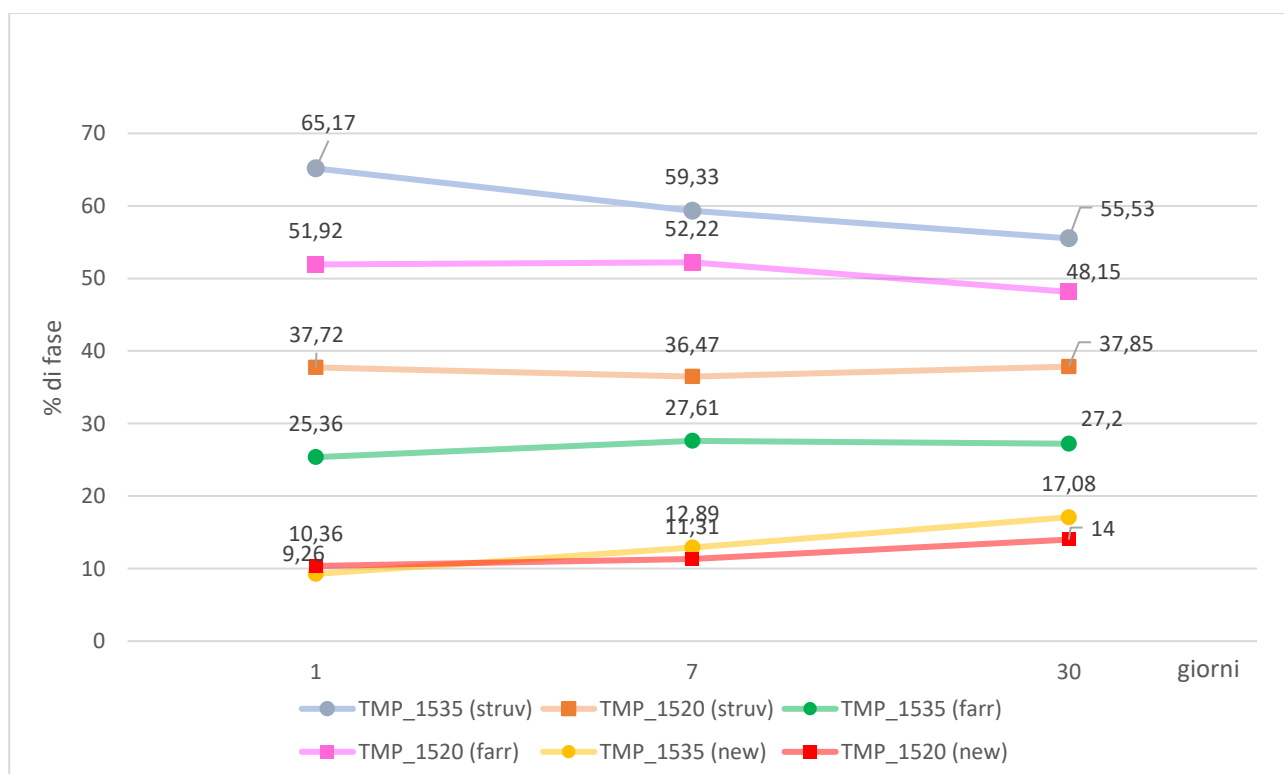


Figura 24: Andamento delle % di tutte le fasi determinate nei campioni TMP_1535 e TMP_1520 (vedi legenda).

Dal grafico che riporta le percentuali di tutte le fasi individuate nei campioni (figura 24) si vede che la struvite nel caso del TMP_1535 (in blu) diminuisce con un conseguente aumento nel tempo della newberyite (in giallo), mentre la farringtonite residua (in verde) rimane pressoché stabile. Al contrario, nel TMP_1520 la newberyite (in rosso) aumenta leggermente, ma non a causa della diminuzione della struvite. In tal caso è la farringtonite residua che reagisce ancora, benché in misura limitata, dopo 30 giorni.

Tale fenomeno è probabilmente associato al pH del sistema: la fase newberyite è infatti favorita in condizioni più acide, mentre la struvite risulta maggiormente stabilizzata a pH più elevato²¹. Nel cemento TMP_1535 la maggior concentrazione di fosfato di ammonio iniziale ha favorito le condizioni di precipitazione basiche della struvite: un conseguente aumento dell'acidità del sistema nel corso della maturazione favorisce la sua trasformazione nella newberyite. Nel TMP_1520 invece, la minor concentrazione del fosfato ha sfavorito fin da subito la precipitazione della struvite mantenendo la sua % stabile nel tempo e favorendo la trasformazione della farringtonite nella newberyite.

I risultati suggeriscono pertanto che le fasi che compongono il sistema non siano influenzate solo dalla concentrazione del fosfato utilizzato ma anche dal pH che si viene a creare nell'ambiente di

reazione, permettendo quindi, tramite la sua regolazione, di stabilizzare diversi prodotti di reazione e quindi influire sulle proprietà meccaniche del cemento finale.

Effetto dell'aggiunta di farmaco sulla stabilizzazione delle fasi

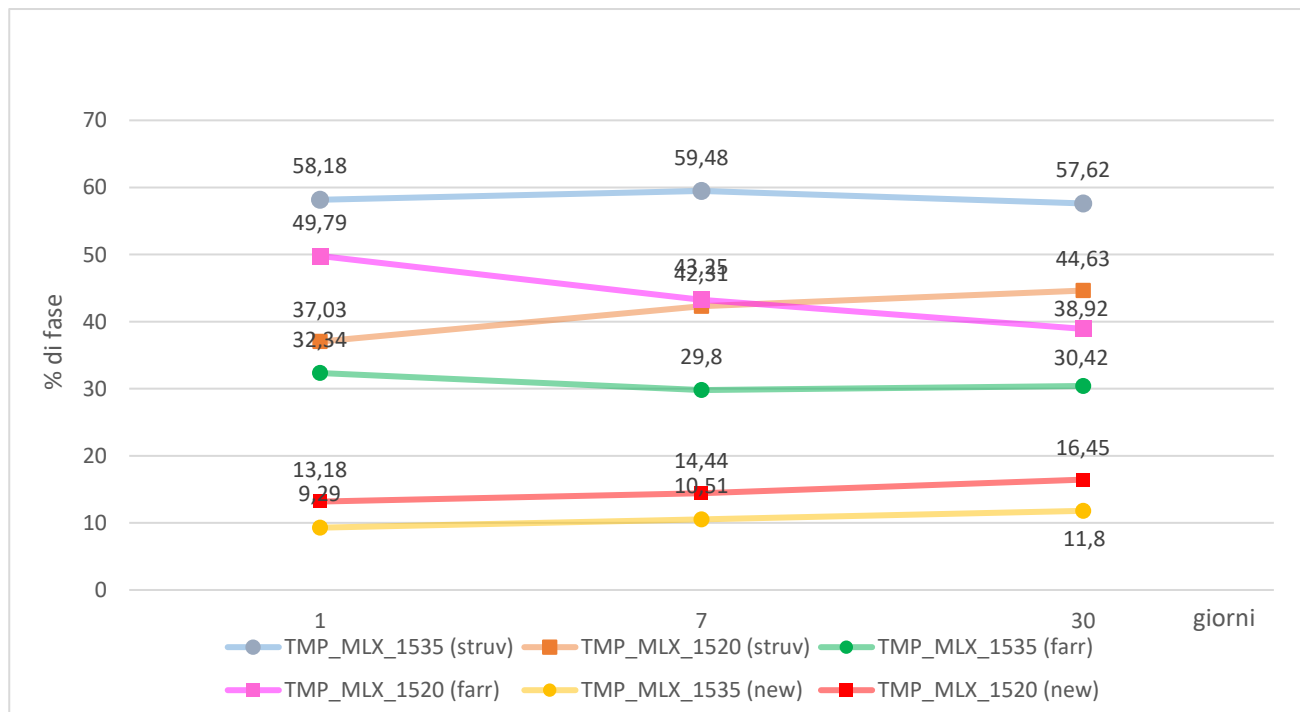


Figura 25: andamento della % di tutte le fasi stabilizzate nei campioni TMP_MLX_1535 e TMP_MLX_1520

Dopo l'aggiunta di farmaco (Figura 25), i campioni TMP_MLX_1535 e TMP_MLX_1520 mostrano un andamento delle fasi contrario rispetto a quello dei campioni privi di meloxicam (Figura 24).

Sebbene la quantità di struvite iniziale sia sensibilmente maggiore nel campione con il fosfato 3.5 M, conformemente alle osservazioni fatte in precedenza, si può osservare una lieve diminuzione della suddetta fase di circa il 5%, mentre la percentuale nel campione con il fosfato 2.0 M rimane invariata. Ciò che però è più interessante è che si può osservare che la percentuale di struvite nel campione TMP_MLX_1535 si stabilizza, mentre nel caso del TMP_MLX_1520 la struvite aumenta nell'arco dei 30 giorni.

Questo comportamento è legato all'azione del farmaco aggiunto che è in grado, anche se presente in piccola quantità, di modificare l'ambiente chimico di reazione. In particolare:

- **TMP_MLX_1535:** Il debole carattere acido del Meloxicam riduce leggermente il pH di reazione iniziale, portando a una diminuzione della quantità di struvite. Tuttavia, durante la fase di maturazione, la sua presenza potrebbe portare a una stabilizzazione del pH, impedendone l'abbassamento e mantenendo le condizioni di stabilità della struvite.

- **TMP_MLX_1520:** Anche se il meccanismo non è chiaro, il Meloxicam non sembra interferire con la formazione iniziale della struvite, ma impedisce, anche in questo caso, la formazione della newberyite, comportando al contempo una successiva trasformazione della farringtonite in struvite, che prosegue nell'arco dei 30 giorni di maturazione.

Effetto dell'aggiunta di struvite sulla stabilizzazione delle fasi

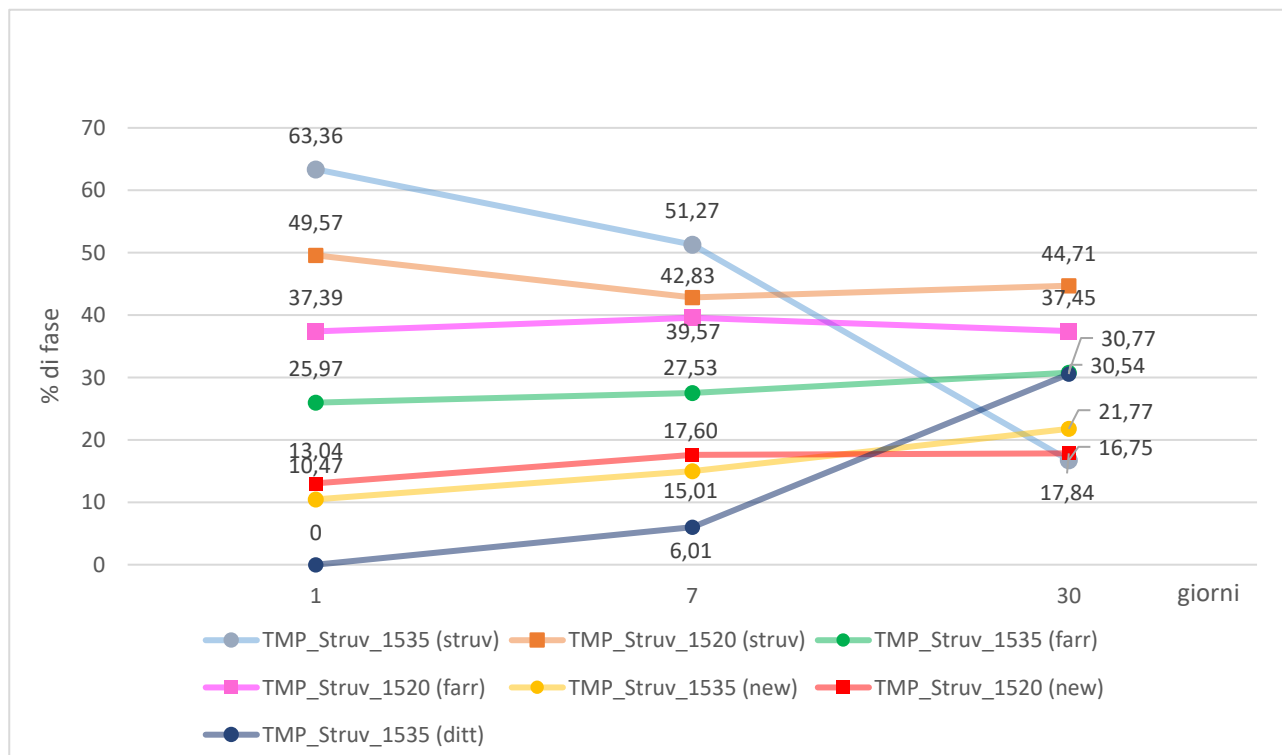


Figura 26: andamento della % delle fasi nei campioni TMP_Struv_1535 e TMP_Struv_1520 nel tempo

L'aggiunta di struvite nella miscela iniziale ha avuto effetti diversi rispetto a quanto atteso (capitolo 3.6).

Nel campione TMP_Struv_1520 (Figura 26) l'andamento delle fasi è comunque in linea con quanto determinato per il campione TMP_1520 (Figura 23), con la differenza del 10% aggiuntivo di struvite. Nel campione TMP_Struv_1535 invece, fino a 7 giorni, il comportamento sembra pressoché analogo a quello del campione TMP_1535 ma dopo 30 giorni la struvite si riduce drasticamente (circa 34%), trasformandosi (come mostrato dai risultati dei diffattogrammi nel capitolo 5.1) principalmente in dittmarite e newberyite, che aumentano rispettivamente del 25% e del 7%.

La dittmarite non si forma inizialmente, ma deriva dalla disidratazione della struvite aggiunta, che sembrerebbe non incorporarsi nella matrice cementizia. Al momento non è stato chiarito come mai questo andamento si noti solo nel campione con il fosfato 3.5 M e non con quello 2.0 M e andrà approfondito mediante ulteriori analisi. Questa osservazione influisce sulla natura del cemento,

rendendo quello con il fosfato 3,5 M più poroso, a causa della perdita d'acqua nella matrice e quello con il fosfato 2.0 M più robusto meccanicamente, grazie alla maggior quantità di struvite.

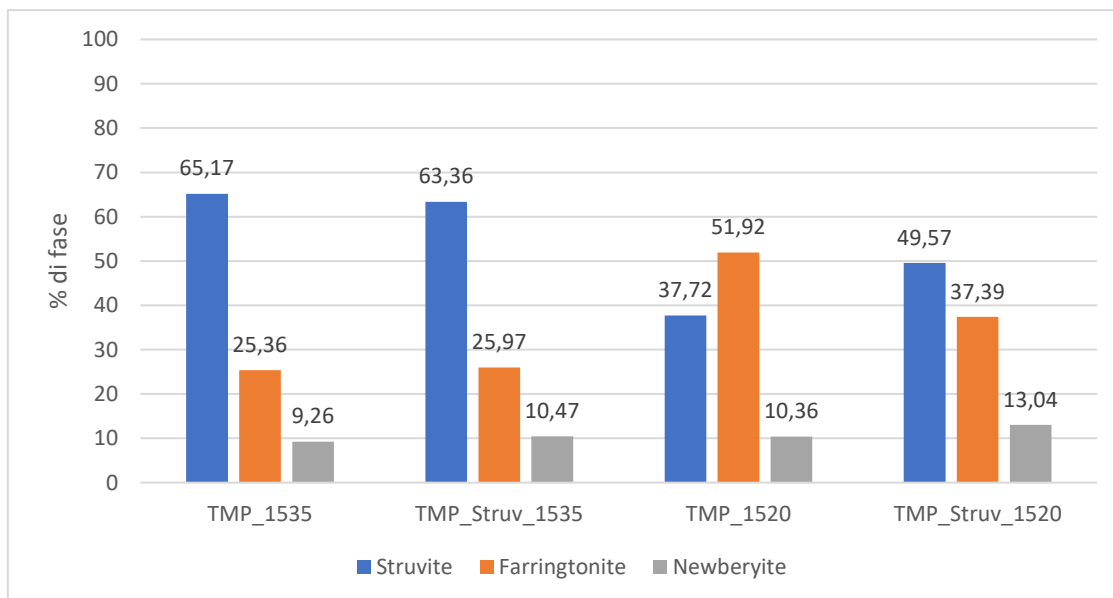


Figura 27: confronto tra le percentuali delle fasi dopo 1 giorno dalla preparazione tra campioni da solo TMP e con struvite aggiunta

Osservando il campione TMP_Struv_1535, (Figura 27) si può notare che al giorno 1, nonostante l'aggiunta del 10% in peso di struvite nella miscela iniziale, il risultato sia perfettamente sovrapponibile al cemento da solo TMP, come se l'aggiunta non avesse influito in alcun modo nella precipitazione delle fasi. Al contrario, nel TMP_Struv_1520, nella distribuzione percentuale delle fasi la % di struvite supera di circa il 10% quella del cemento da solo TMP (Figura 23). In entrambi i casi si può quindi escludere che la struvite aggiunta abbia catalizzato la formazione di struvite aggiuntiva rispetto ai campioni da solo TMP. Addirittura, nel campione 1535 sembra che la formazione di struvite sia stata sfavorita.

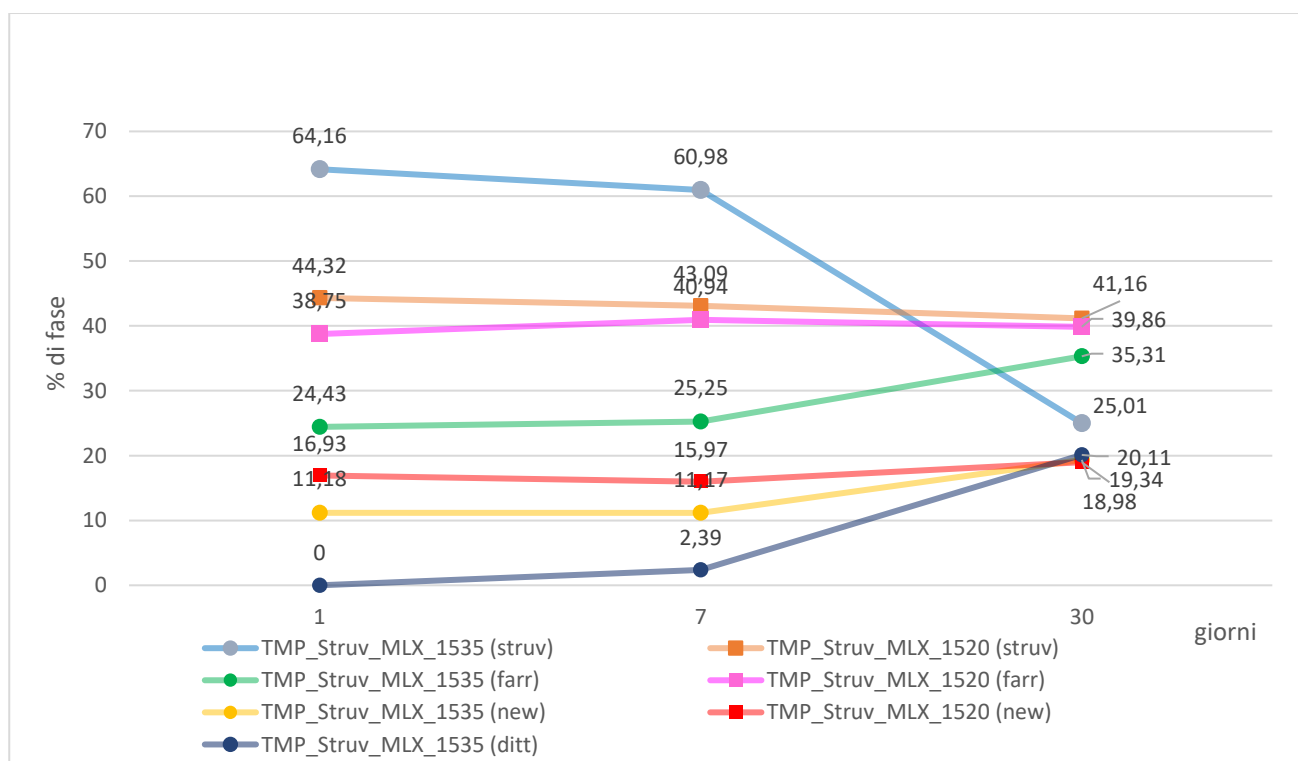


Figura 28: andamento delle percentuali di fase nei campioni TMP_Struv_MLX_1535 e TMP_Struv_MLX_1520

In figura 28 sono riportati i valori percentuali di fase nei campioni di cemento ottenuti con aggiunta di struvite e farmaco nella miscela iniziale. Come atteso l'aggiunta sia di farmaco che di struvite ha effetti misti rispetto a quelli osservati in precedenza.

Si può ancora vedere la drastica trasformazione della struvite in dittmarite (perdita del 35%) come nel campione TMP_Struv_MLX_1535, ma la quantità di dittmarite che si forma è inferiore di circa 10% rispetto al campione TMP-1535. In questo caso, la struvite si trasforma in un misto di farringtonite (aumento del 10%), newberyite (aumento dell'8%) e dittmarite (aumento del 18%), confermando anche in questo caso che il Meloxicam ha apportato modifiche alle condizioni di reazione. L'aumento della dittmarite potrebbe influire come detto sulle proprietà meccaniche.

Nel campione TMP_Struv_MLX_1520 invece la struvite aggiunta sembrerebbe impedire che il farmaco promuova la formazione di struvite nel tempo, come avveniva nel campione TMP_MLX_1520, mantenendo un andamento più simile a quello del TMP_Struv_1520, nel quale la struvite si stabilizza ad un valore pari a quello del cemento da solo TMP con l'aggiunta del 10%.

Studio delle fasi dei campioni dopo rilascio del farmaco

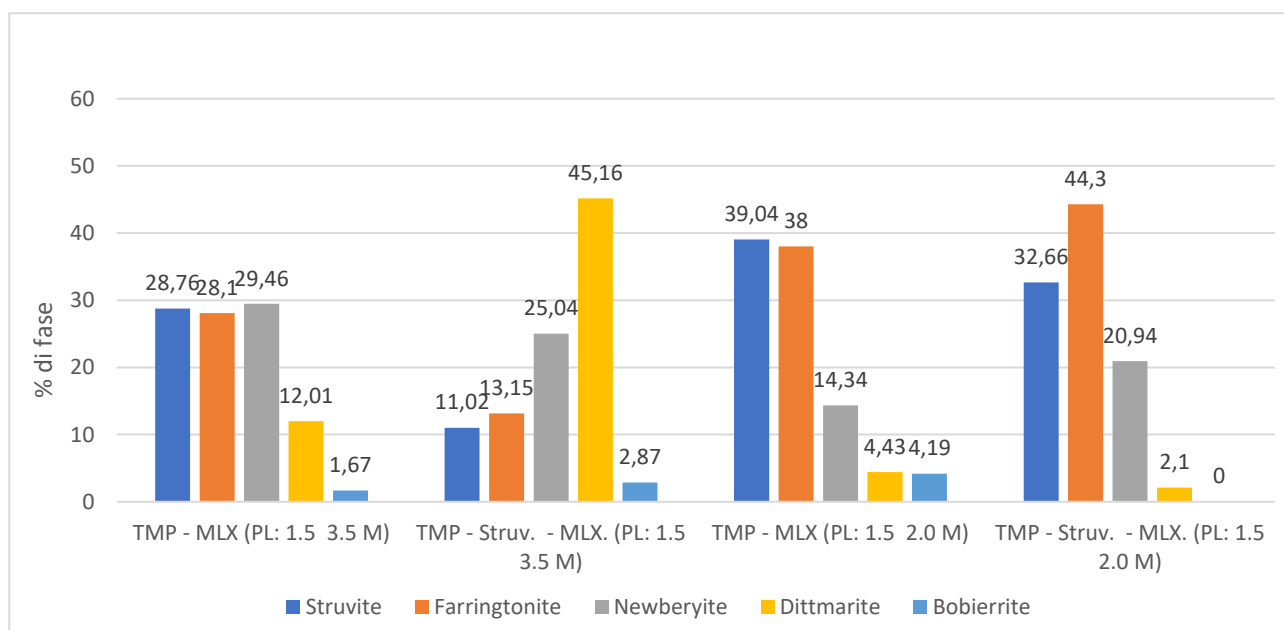


Figura 29: percentuali di fase nei campioni dopo le prove di rilascio in ambiente fisiologico

Dalla figura 29 si possono osservare le evoluzioni delle fasi dei campioni contenenti farmaco, dopo essere stati immersi nella soluzione fisiologica per 7 giorni per le prove di rilascio.

L'effetto più evidente è la formazione di dittmarite che si forma sia nel campione TMP_MLX_1535 che nel TMP_MLX_1520 (anche se in quantità ridotta). L'altro fenomeno già discusso qualitativamente dai relativi diffrattogrammi al capitolo 5.1 è la formazione della bobierite. La formazione di dittmarite è, anche in questo caso, maggiore per i campioni con il fosfato 3.5 M e si registra una proporzionale perdita di struvite. Al contrario invece, la diminuzione della struvite risulta nettamente inferiore per i campioni con il fosfato 2.0 M.

Da questa analisi è evidente che i campioni di cemento, quando inseriti in ambiente fisiologico, possano subire trasformazioni diverse rispetto a quelle avvenute durante la loro maturazione all'aria. Queste trasformazioni potrebbero influire sulle loro resistenze meccaniche al termine del periodo terapeutico e sulla biodegradabilità. Questo fenomeno andrà approfondito mediante uno studio sulle resistenze meccaniche dei cementi durante una maturazione in ambiente fisiologico.

Dalle successive analisi, sarà possibile correlare le proprietà meccaniche e fisiche con le fasi osservate dalle misure XRD.

5.3 FT-IR

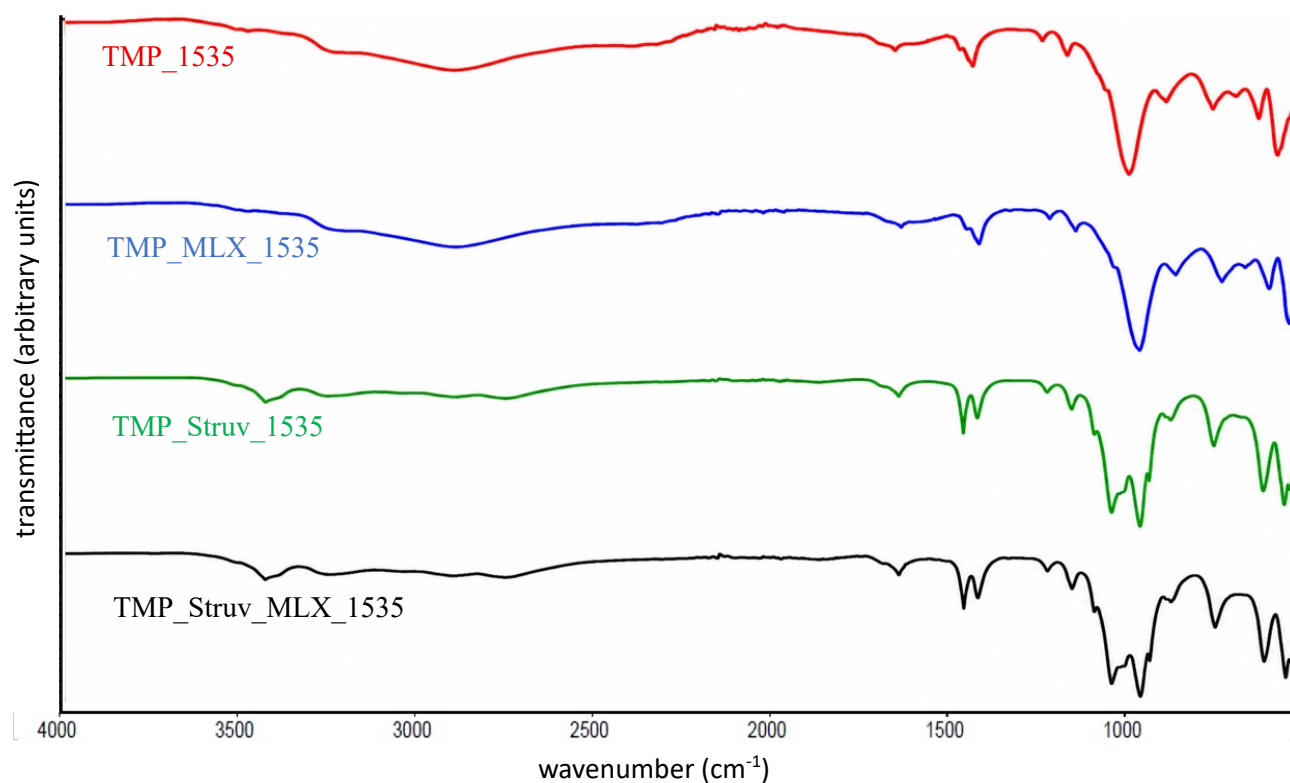


Figura 30: spettri IR dei campioni con fosfato 3.5 M

Osservando la figura 30 che riporta gli spettri FT-IR dei campioni con composizione 1535, si può confermare quanto stabilito con le analisi XRD (capitolo 5.1). La struvite aggiunta nel campione TMP_Struv_1535 (in verde) provoca un'evidente variazione dello spettro IR rispetto al campione da solo TMP (in rosso). Di seguito vengono riportati gli spettri IR delle fasi struvite e dittmarite (Figura 31) presi dalla letteratura, per poter supportare la trattazione degli spettri IR dei cementi in questione.

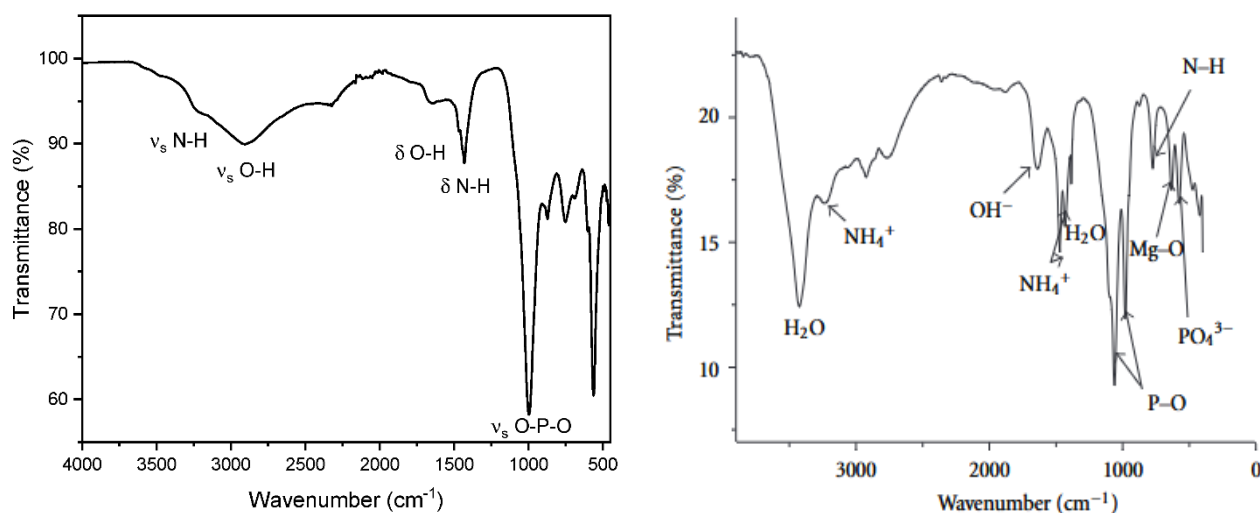


Figura 31: a sinistra lo spettro IR della struvite²², a destra quello della dittmarite²³

Lo spettro infrarosso consente di identificare in modo chiaro le principali unità strutturali presenti nei reticoli cristallini, in particolare i gruppi fosfato, l'ammonio e le molecole d'acqua di cristallizzazione. Nel caso della struvite e della dittmarite, le bande più significative si collocano in regioni caratteristiche dello spettro IR. In generale, la regione compresa tra circa 1100 e 900 cm^{-1} è dominata dalle vibrazioni di stretching del fosfato, mentre le bande a più alti numeri d'onda, comprese tra circa 3500 e 2400 cm^{-1} , sono associate alle vibrazioni di stretching dell'acqua e dell'ammonio; infine, la regione intorno a 1650 cm^{-1} è tipicamente attribuita al bending dell'acqua e quella compresa tra circa 1500 e 1400 cm^{-1} alle vibrazioni di bending dell' NH_4^+ .

Per quanto riguarda i gruppi fosfato, la banda osservata intorno a 1061 o 1054 cm^{-1} può essere assegnata allo stretching asimmetrico del legame P–O all'interno dell'unità PO_4 . La banda intorno a 979 o 990 cm^{-1} viene anch'essa attribuita alle vibrazioni del gruppo fosfato, in particolare a componenti dello stretching P–O che riflettono una seconda modalità vibrazionale dell'unità PO_4 . La presenza di entrambe le bande conferma la presenza di interni vibrazionali non equivalenti. Infine, il segnale attorno a 576 o 570 cm^{-1} è comunemente assegnato alle vibrazioni di bending del gruppo fosfato.

La regione ad alto numero d'onda è invece dominata dalle vibrazioni di stretching dell'acqua e dell'ammonio. Le bande comprese tra circa 3250 e 2400 cm^{-1} sono attribuite alle vibrazioni di stretching dell' NH_4^+ , che in questi sistemi risultano spesso molto larghe a causa della forte interazione con il reticolo cristallino e dei legami a idrogeno con le molecole d'acqua. La larghezza di queste bande è indicativa dell'eterogeneità dell'ambiente locale e della presenza di più configurazioni vibrazionali sovrapposte. Nella struvite, in particolare, l'ammonio è parte integrante della struttura e contribuisce in modo significativo al profilo spettrale di questa regione. La banda intorno a 3500 cm^{-1} , invece, è attribuita alle vibrazioni di stretching del gruppo O–H delle molecole d'acqua di cristallizzazione. La banda a circa 1630 o 1641 cm^{-1} corrisponde invece alla vibrazione di bending dell'acqua.

Nel caso della dittmarite, che rappresenta una fase meno idratata rispetto alla struvite, la presenza di acqua strutturale è minore, ma le bande residue di OH e NH_4^+ rimangono comunque ben distinguibili e consentono di riconoscere il carattere monoidrato del composto. La banda a 633 cm^{-1} attribuita al legame Mg–O rappresenta inoltre un ulteriore contributo utile per confermare l'organizzazione del reticolo e la presenza di coordinazione tra il magnesio e gli ossigeni del fosfato o dell'acqua.

Nel campione puro, lo spettro mostra una banda larga nella regione ad alto numero d'onda (2850–3000 cm^{-1}), associata alle vibrazioni di stretching dell'acqua di cristallizzazione e dell'ammonio. La diminuzione del contributo attribuito all'acqua nel campione con struvite aggiunta può essere letta come una conseguenza della disidratazione della struvite verso dittmarite.

Un secondo aspetto importante riguarda la regione tra circa 975 e 1100 cm^{-1} , in cui il picco intorno a 990 cm^{-1} nel cemento puro viene affiancato da un ulteriore massimo a circa 1054 cm^{-1} nei campioni con struvite. La precedente discussione degli spettri IR delle fasi pure struvite e dittmarite ci consente di assegnare questi due picchi a entrambe le fasi, suggerendo quindi che la banda sdoppiata indica la presenza di dittmarite e struvite (Figura 31).

Ancora più significativo è il comportamento della regione compresa tra circa 1430 e 1470 cm^{-1} . Nel cemento puro prevale il segnale intorno a 1430 cm^{-1} , mentre nei campioni con struvite aggiunta compare con maggiore evidenza anche il contributo a 1470 cm^{-1} . Anche questa differenza è pienamente compatibile con la presenza di struvite e dittmarite.

La compatibilità del Meloxicam con il sistema cementizio è già stata confermata nel capitolo 3.4 con lo spettro IR di un campione contenente 20 mg di farmaco; i soli 6 mg contenuti nel campione TMP_MLX_1535 non permettono di poter distinguere i picchi a 1551 cm^{-1} e a 1376 cm^{-1} che si potevano apprezzare nella figura 11.

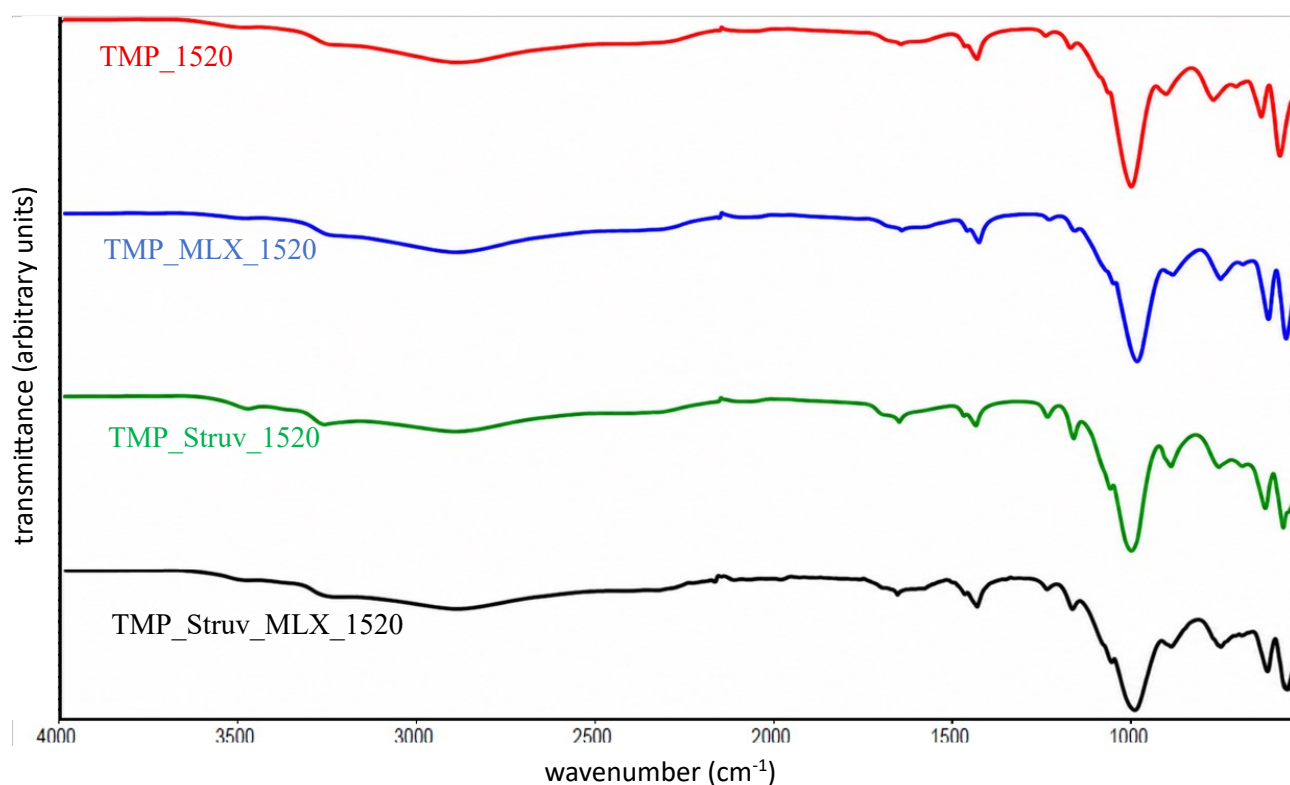


Figura 32: spettri IR dei campioni con fosfato 2.0 M

Anche per i campioni con il fosfato 2.0 M (Figura 32) si riconferma quanto detto nell'analisi XRD. L'aggiunta di struvite nel campione TMP_Struv_1520 (in verde) non porta alla formazione di dittmarite; perciò, tutti gli spettri IR dei campioni di questa tipologia risultano perfettamente sovrapponibili. Si nota anche la differenza coi campioni precedenti (Fig. 30) soprattutto nella zona intorno ai 1000 cm⁻¹ e 1450 cm⁻¹ dove non sono visibili i picchi della fase dittmatite. Anche in questo caso, il farmaco non è apprezzabile.

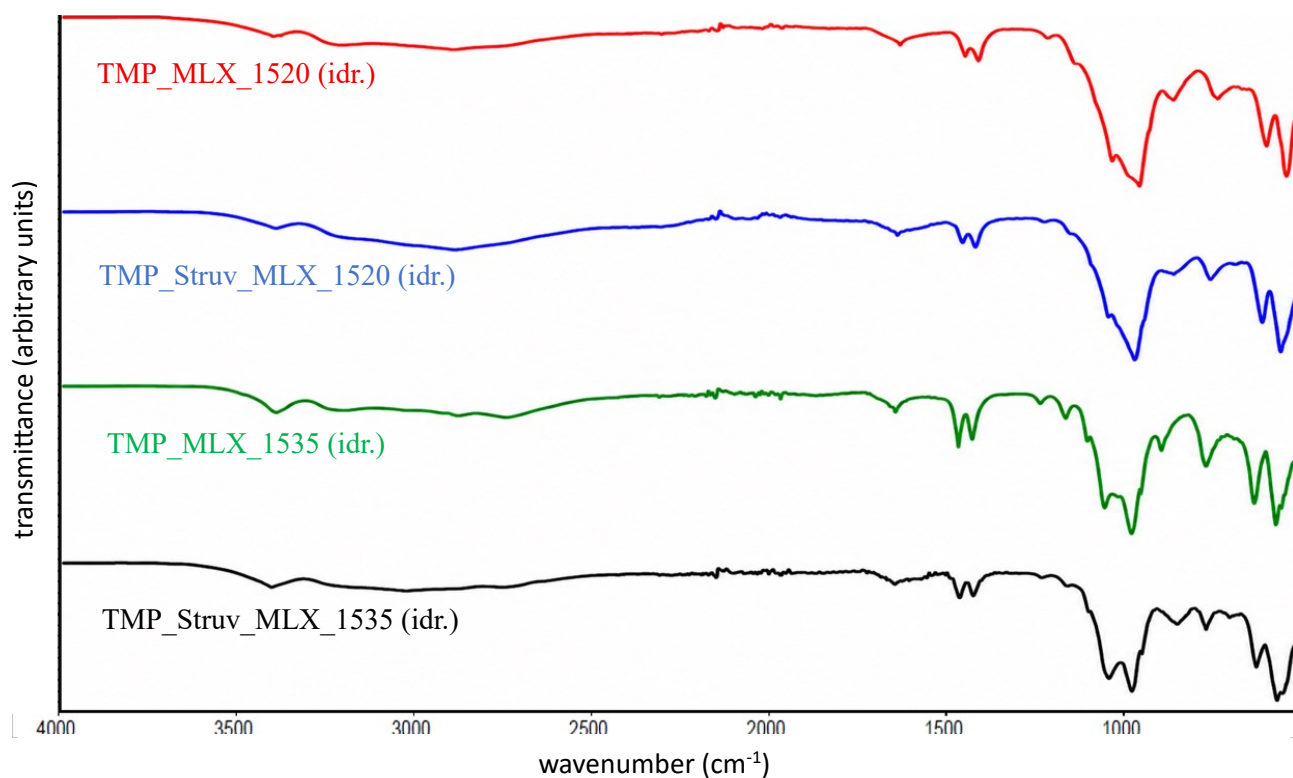


Figura 33: spettri IR dei campioni dopo il rilascio del farmaco

Osservando i campioni post idratazione (Figura 33) si può osservare in tutti quanti la formazione della dittmarite, come evidenziato nel capitolo 5.1. I campioni con il fosfato 2.0 M (curve rosso e blu) sono quelli in cui se ne forma meno, poiché il picco intorno a 1000 cm^{-1} ha solo una debole spalla tipica della fase dittmarite. Gli spettri dei campioni con il fosfato 3.5 M invece (curve nero e verde), ricordano quelli già discussi in precedenza (Figura 30).

5.4 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

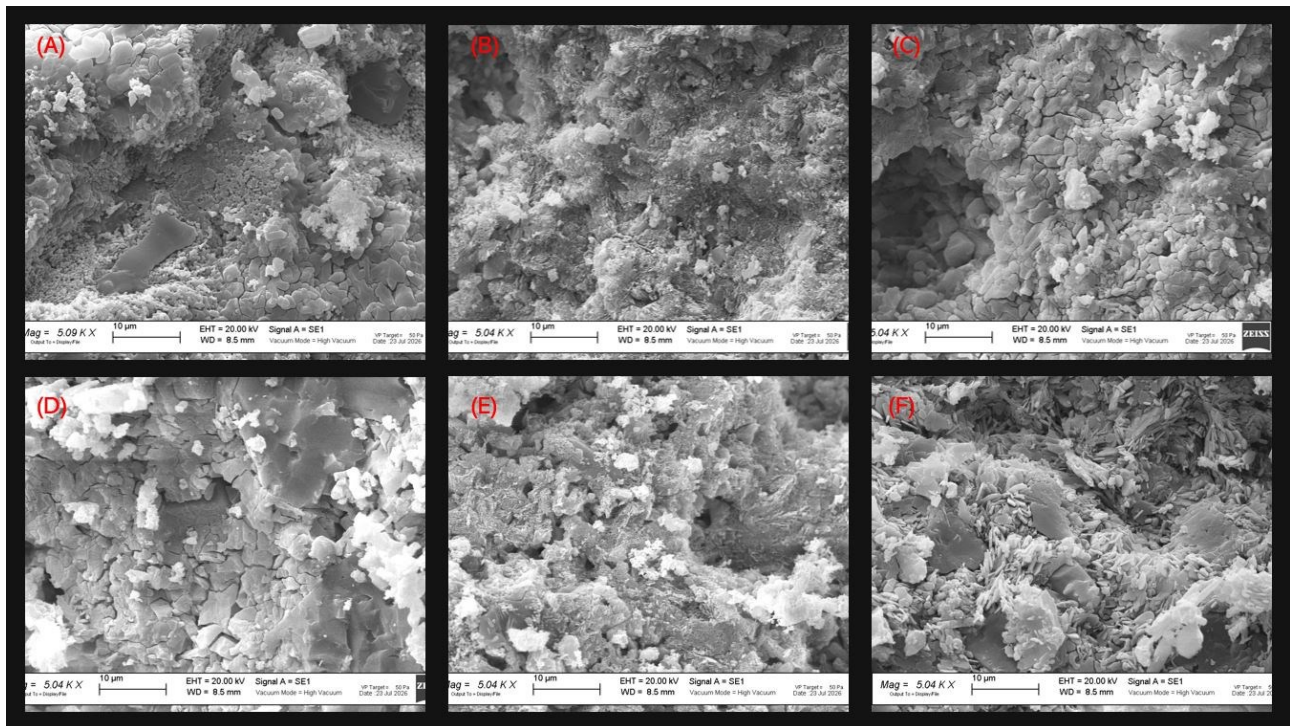


Figura 34: immagini SEM dei campioni con fosfato 3.5 M. TMP_1535 (A) , TMP_Struv_1535 (B) , TMP_MLX_1535 (C) , TMP_MLX_1535 (post idr.) (D) , TMP_Struv_MLX_1535 (E), TMP_Struv_MLX_1535 (post idr.) (F)

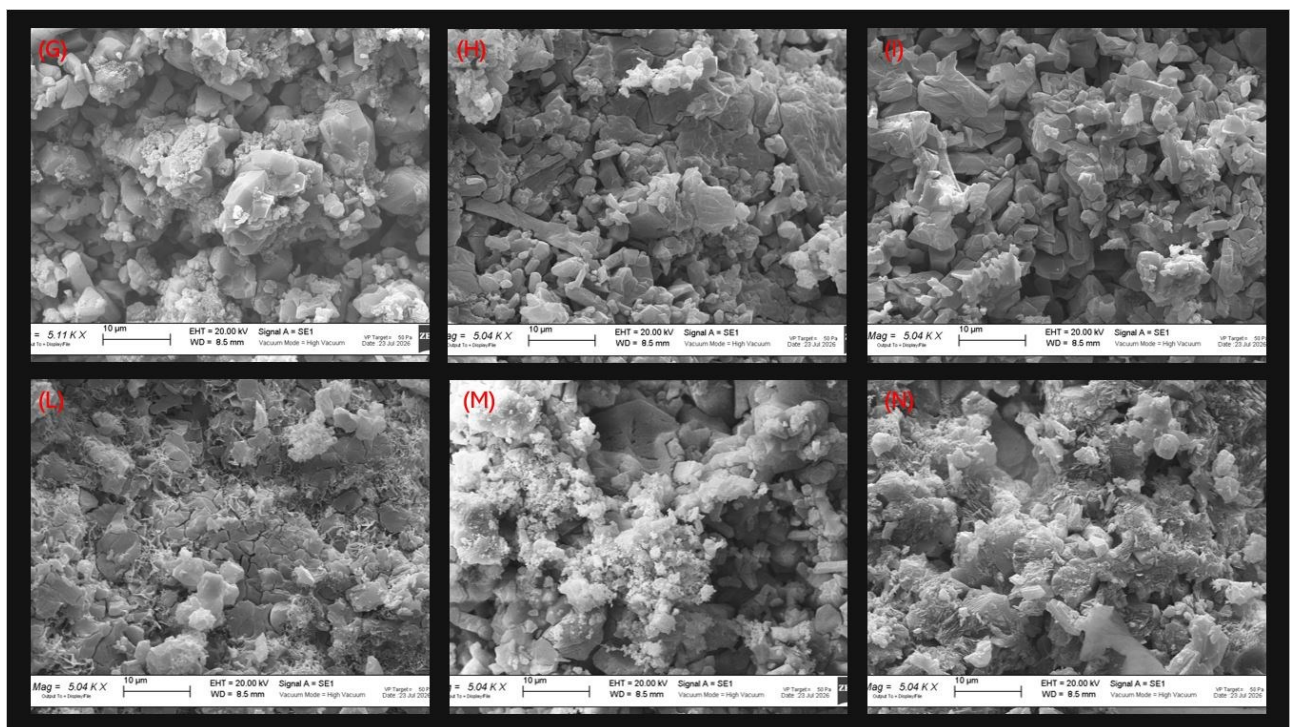


Figura 35: immagini SEM dei campioni con fosfato 2.0 M. TMP_1520 (G) , TMP_Struv_1520 (H) , TMP_MLX_1520 (I) , TMP_MLX_1520 (post idr.) (L) , TMP_Struv_MLX_1520 (M), TMP_Struv_MLX_1520 (post idr.) (N)

Dall'osservazione delle immagini ottenute tramite microscopia elettronica a scansione si può subito notare una differenza netta tra i due sistemi: i cementi ottenuti con fosfato 3.5 M (Figura 34) formano in generale una matrice più continua, coesa e densa, mentre quelli preparati con fosfato 2.0 M (Figura 35) appaiono più granulari, discontinui e con una porosità più marcata.

Si possono inoltre notare delle differenze all'interno delle stesse categorie di cemento. L'aggiunta manuale di struvite (Fig. 34-35, B e H) tende a rendere la microstruttura più eterogenea, introducendo aggregati particellari e interrompendo la continuità della matrice. Nei campioni a 3.5 M questo effetto sembrerebbe essere in parte compensato dalla maggiore formazione di struvite durante la fase di maturazione, che riesce a inglobare e collegare meglio le particelle di struvite aggiunta. Nei campioni 2.0 M, invece, la struvite sembra frammentare ancora di più la struttura rispetto al campione puro (G), diminuendo ancora di più la densità complessiva.

L'introduzione del farmaco (Fig. 34-35, C e I) modifica anche la morfologia della matrice, come già evidenziato anche nello studio di fase. Nei cementi 3.5 M la struttura rimane compatta e non sono visibili particolari differenze rispetto al campione non caricato (Fig. 34, A). Quando la concentrazione è 2.0 M il farmaco sembra accentuare la separazione tra le particelle, rendendo la superficie più granulare e più simile alla microstruttura del campione contenente la struvite (Fig. 35, H).

I campioni che contengono sia struvite che farmaco (Fig. 34-35, E e M) sembrano mostrare in aggiunta ai grani di dimensione maggiore una componente più fine.

Molto interessante è la morfologia dei campioni dopo le prove di rilascio (Fig. 34-35 D, F, L, N). L'immersione in soluzione fisiologica induce fenomeni di dissoluzione locale e possibile riprecipitazione di fasi cristalline secondarie evidenti dalla discontinuità strutturale rispetto ai campioni pre-immersione. L'effetto sembra meno presente in Fig. 34 D, mentre nelle immagini F, L ed N, si vede lo sviluppo di una struttura secondaria lamellare: nel caso del campione F è piuttosto evidente mentre è meno marcata, presente come sottili venature, nei campioni L ed N. L'ipotesi più probabile è che sia legata allo sviluppo della dittmarite che, come evidenziato dallo studio di fase, nel campione TMP_Struv_MLX_1535 post idratazione raggiunge un valore del 45%, mentre nei campioni con il fosfato 2.0 M raggiunge un valore nettamente più basso (2.1 – 4.4 %), conforme con la comparsa di sottili venature.

Analisi EDS

L'analisi EDS è stata impiegata principalmente per verificare, dalla presenza del segnale dello zolfo (elemento tipico del farmaco meloxicam), il suo andamento a seguito del rilascio. Si è inoltre verificato che il rapporto tra gli elementi attesi (Mg, P, H, O, N), fosse conforme alla stechiometria

del campione. A titolo d'esempio, gli spettri EDS del campione TMP_1535 sono confrontati con quelli del TMP_MLX_1535 prima e dopo l'immersione in ambiente fisiologico (Figure 36, 37 e 38).

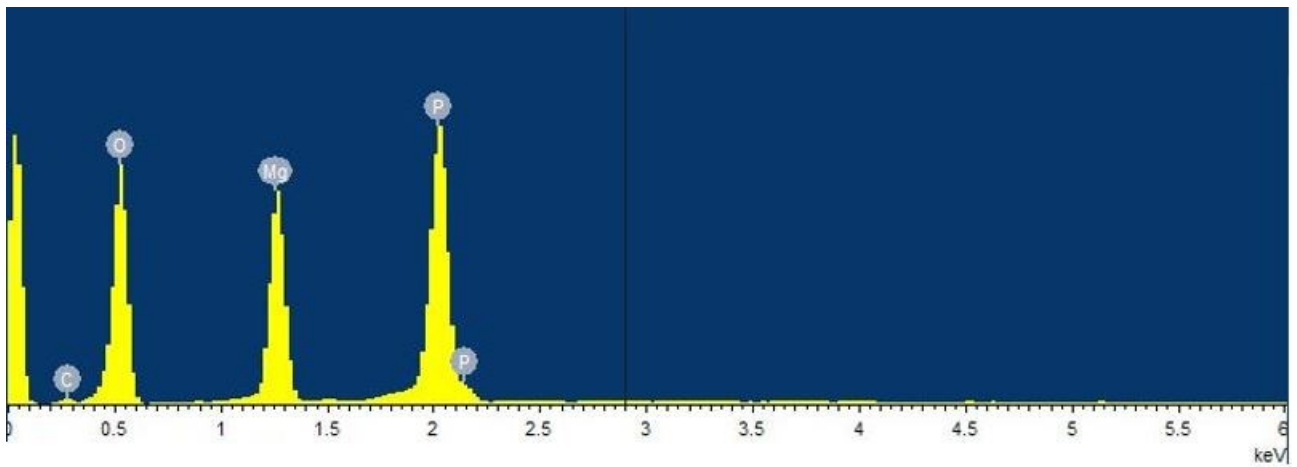


Figura 36: Spettro EDS del campione TMP_1535

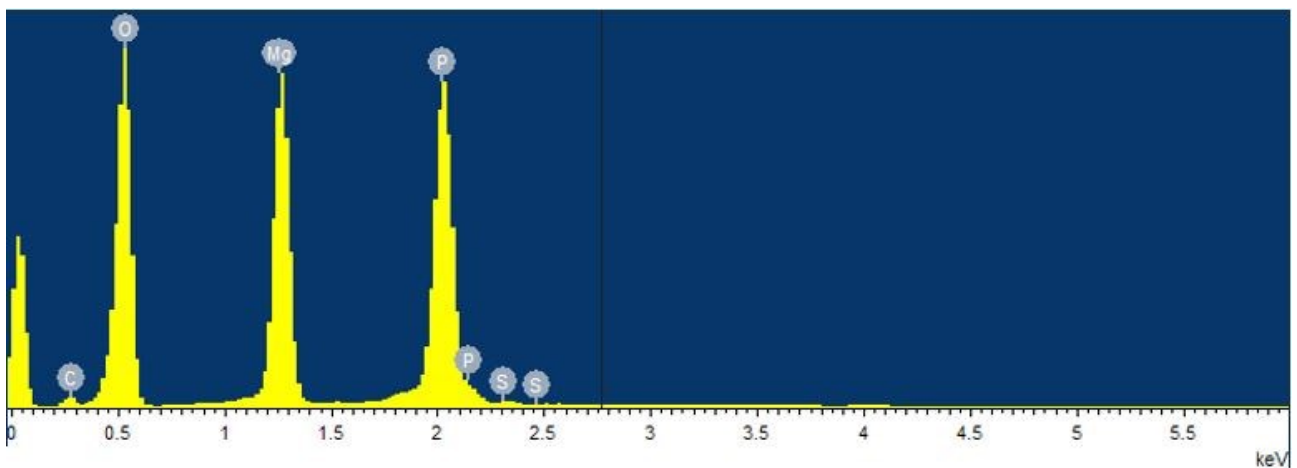


Figura 37: Spettro EDS del campione TMP_MLX_1535

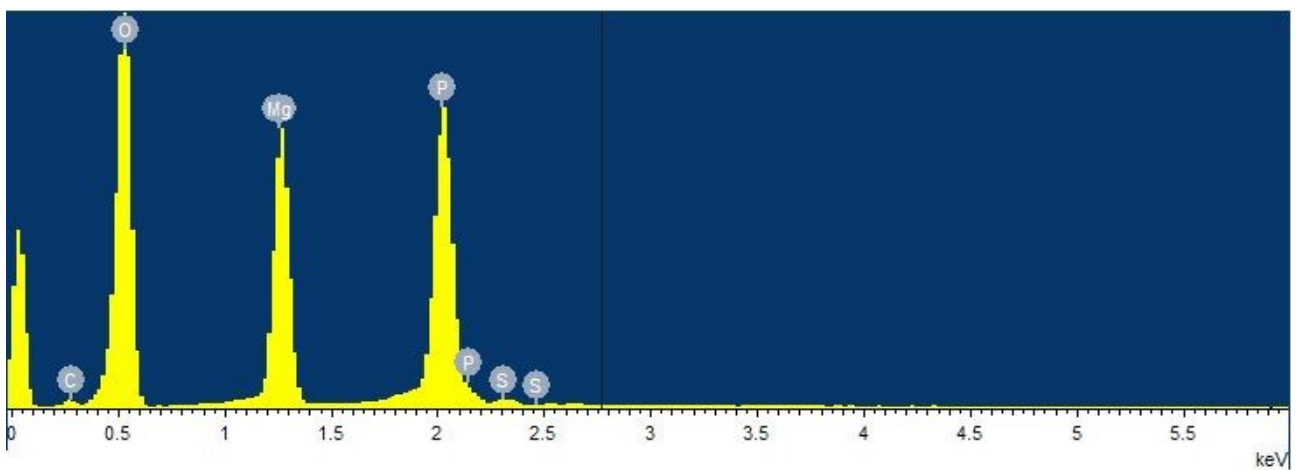


Figura 38: Spettro EDS del campione TMP_MLX_1535 (post idratazione)

Osservando le figure 37 e 38 e confrontandole con la figura 36, si può notare, come atteso, la presenza dello zolfo, elemento attribuibile al Meloxicam. Nel campione analizzato dopo le prove di rilascio si può ancora vedere il picco associato a S, indice che il farmaco non è stato rilasciato completamente durante l'immersione per 7 giorni in PBS.

Poiché l'analisi EDS non è una tecnica di analisi in tracce non è in grado di determinare con precisione piccole quantità di elementi, come appunto lo S, quindi per uno studio accurato della quantità di farmaco saranno necessarie le prove di rilascio. In Tabella D sono riportate le quantità di zolfo determinate, che confermano le osservazioni qualitative fatte sulla base degli spettri.

Per quanto riguarda invece gli elementi principali, tramite l'analisi EDS è stata misurata la loro percentuale (Tabella D) al fine di verificare che i cementi avessero il giusto rapporto tra i vari elementi:

	C	O	Mg	P	S
TMP_1535	11.25	62.97	11.98	13.80	\
TMP_MLX_1535	12.50	63.25	12.89	11.24	0.12
TMP_MLX_1535 (idr.)	8.81	69.08	11.36	10.53	0.22

Tabella D: percentuali atomiche degli elementi contenuti nei campioni analizzati con EDS

Come atteso dalle strutture delle fasi mineralogiche presenti (vedi capitolo 2.1, 2.2, 5.1), il rapporto tra Mg e P risulta circa 1:1, in linea con la riduzione della farringtonite, nella quale il rapporto Mg e P è di 3:2, in favore dello sviluppo di struvite e farringtonite, in cui questo rapporto diventa 1:1. Non è visibile il picco attribuibile all'N, il quale cade in prossimità del picco dell'ossigeno, che risulta essere l'elemento dominante, poiché presente nella maggior quantità in tutte le fasi mineralogiche. Il carbonio è attribuibile al tape utilizzato per la stabilizzazione dei campioni sul supporto.

Inoltre, si può osservare che il Mg non subisce drastiche diminuzioni a seguito della immersione in PBS, indicando che rimane saldo nella struttura del cemento, senza solubilizzarsi in ambiente fisiologico, come invece accade quando viene utilizzato come agente drogante nei cementi di calcio fosfato²⁴.

5.5 Misure meccaniche

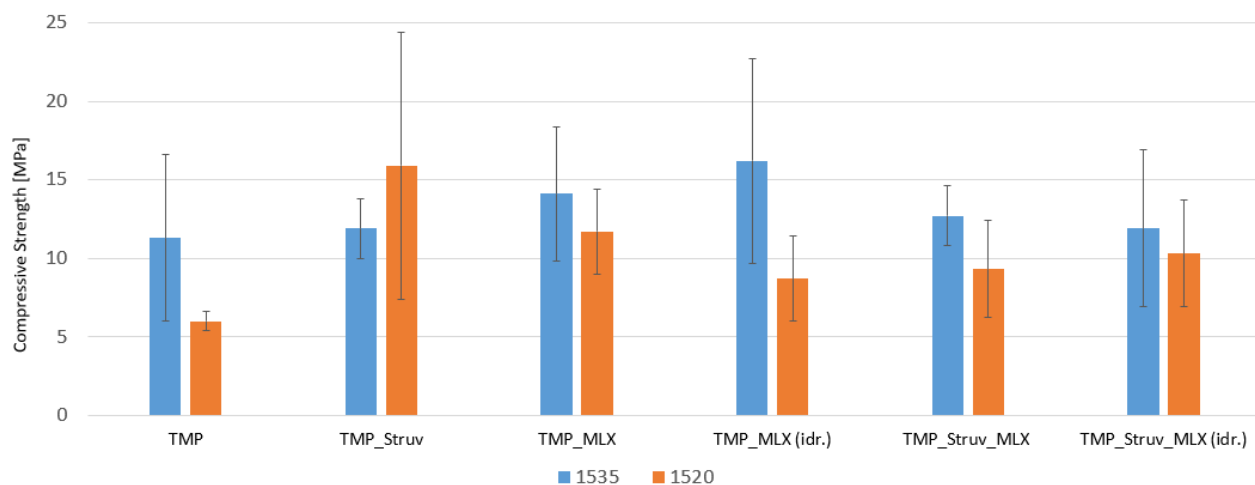


Figura 39: Valori del compressive strenght dei campioni dopo 30 giorni e dopo rilascio del farmaco

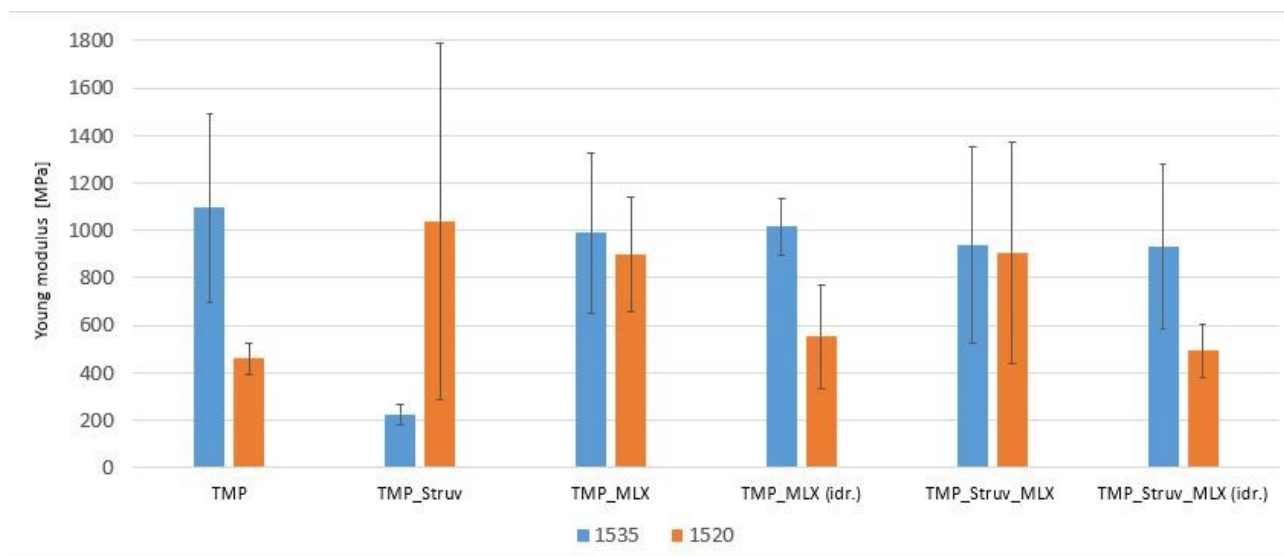


Figura 40: Valori del modulo di Young dei campioni dopo 30 giorni e dopo rilascio del farmaco

Dall'analisi delle figure 39 e 40, si possono apprezzare le differenze tra le resistenze meccaniche delle varie formulazioni dei cementi. La resistenza meccanica, misurata come modulo di Young e come compressive strenght, può fornire una stima abbastanza accurata del comportamento dei campioni e può essere messa in correlazione con i dati di porosità e le immagini SEM. L'analisi meccanica è comunque soggetta a un grado di errore piuttosto elevato (come evidente dalle barre d'errore in figura) legato alla preparazione manuale dei provini.

Il campione TMP_1535 mostra una resistenza meccanica nettamente superiore a quella del campione TMP_1520, in accordo con la maggiore compattezza mostrata dalle immagini SEM (immagine A, figura 34).

Confrontando i dati dei valori del cemento da solo TMP con quelli del campione caricato con farmaco e struvite si nota un andamento in linea con i risultati delle prove precedenti. Il TMP_MLX_1535 mostra una resistenza meccanica piuttosto simile a quello del TMP_1535, probabilmente grazie alla quantità di struvite percentuale simile nei due campioni (circa 55-58%) (vedi figura 24 e 25). Allo stesso modo, si può osservare un incremento della resistenza nel campione TMP_MLX_1520, in linea con l'aumento di struvite rispetto al TMP_1520, come determinato dall'analisi XRD (figura 24 e 25).

Nei campioni contenenti farmaco, dopo il periodo in soluzione fisiologica, il modulo di Young è simile a quello iniziale. Il TMP_MLX_1535 (idr.) perde parte della struvite, che si trasforma in dittmarite (Figura 29) ma ciò non sembra portare a un cambiamento nella resistenza meccanica. Invece, il TMP_MLX_1520 (idr.) vede una diminuzione della resistenza meccanica, dovuta alla perdita della struvite, come evidenziato nell'immagine 29.

Per quanto riguarda i campioni contenenti struvite, la resistenza meccanica del TMP_Struv_1520 è in linea con quella del TMP_MLX_1520 e maggiore di quella iniziale.

La compressive strenght del TMP_Struv_1535 è in linea col campione TMP_1535, mentre il valore del modulo di Young risulta il più basso tra tutti i cementi.

Questo fenomeno potrebbe essere spiegabile osservando le immagini SEM (Figura 34, immagine A, B, E). Il TMP_1535 (A) ha una struttura visibilmente compatta, mentre il TMP_Struv_1535 (B) ha una struttura nettamente più frastagliata e meno densa, dovuta presumibilmente ad una modifica microstrutturale introdotta dalla struvite. Il valore del compressive strenght è simile mentre risulta diverso il comportamento elastico. L'abbassamento drastico del modulo di Young, combinato con l'osservazione dell'immagine SEM, sembrerebbe indicare che la struvite aggiunta porti ad una diminuzione della dimensione dei grani che ha come conseguenza un raggiungimento del carico massimo in modo più graduale, aumentando la deformabilità del cemento contenente la struvite aggiunta. Osservando invece il TMP_Struv_MLX_1535 (E), si potrebbe dire che il farmaco aggiunto porti a un relativo aumento della dimensione dei grani, mantenendo intatta la resistenza meccanica e ristabilendo la rigidità del campione cementizio.

Le resistenze meccaniche dei campioni e degli stessi post immersione sembrano invariate, nonostante la formazione di una notevole quantità di dittmarite. Si potrebbe concludere che, nonostante la disidratazione della struvite porti presumibilmente a un aumento delle porosità, la resistenza meccanica dei campioni non decada a seguito dell'immersione in ambiente fisiologico.

Per confermare questa ipotesi, i risultati delle prove meccaniche andranno analizzati in funzione dei risultati delle prove di porosità.

5.6 Densità apparente e porosità

La densità apparente e la porosità percentuale sono state calcolate con le formule discusse nel capitolo 4.6. I campioni analizzati però non erano costituiti da un'unica fase quindi la densità calcolata è stata determinata come media pesata delle densità delle fasi costituenti i diversi cementi, a partire dalle densità tabulate dei vari minerali (Tabella E)

	densità tabulate (g/cm³)
Farringtonite	2,8
Struvite	1,711
Newberyite	2,1
Dittmerite	2,15
Bobierite	2,195

Tabella E: Valori di Densità tabulate delle fasi determinate nei campioni di cemento ²⁵

In tabella F sono riportati i valori della densità apparente, della densità calcolata e della porosità percentuale di tutti i cementi analizzati, mentre in figura 40 sono riportati gli andamenti dei valori di porosità per un confronto più diretto.

	densità apparente (p_a) (g/cm³)	densità calcolata (p_s) (g/cm³)	porosità % (Φ)
TMP_1535	1,818	2,070	12,21
TMP_1520	1,489	2,290	34,98
TMP_Struv_1535	1,500	2,262	33,67
TMP_Struv_1520	1,401	2,188	35,96
TMP_MLX_1535	1,615	2,085	22,55
TMP_Struv_MLX_1535	1,436	2,255	36,32
TMP_MLX_1520	1,447	2,199	34,21
TMP_Struv_MLX_1520	1,310	2,169	39,61
TMP_MLX_1535 (idr.)	1,673	2,192	23,68
TMP_Struv_MLX_1535 (idr.)	1,381	2,177	36,56
TMP_MLX_1520 (idr.)	1,416	2,220	36,21
TMP_Struv_MLX_1520 (idr.)	1,443	2,284	36,81

Tabella F: valori di densità apparente, densità calcolata e porosità percentuale dei vari cementi

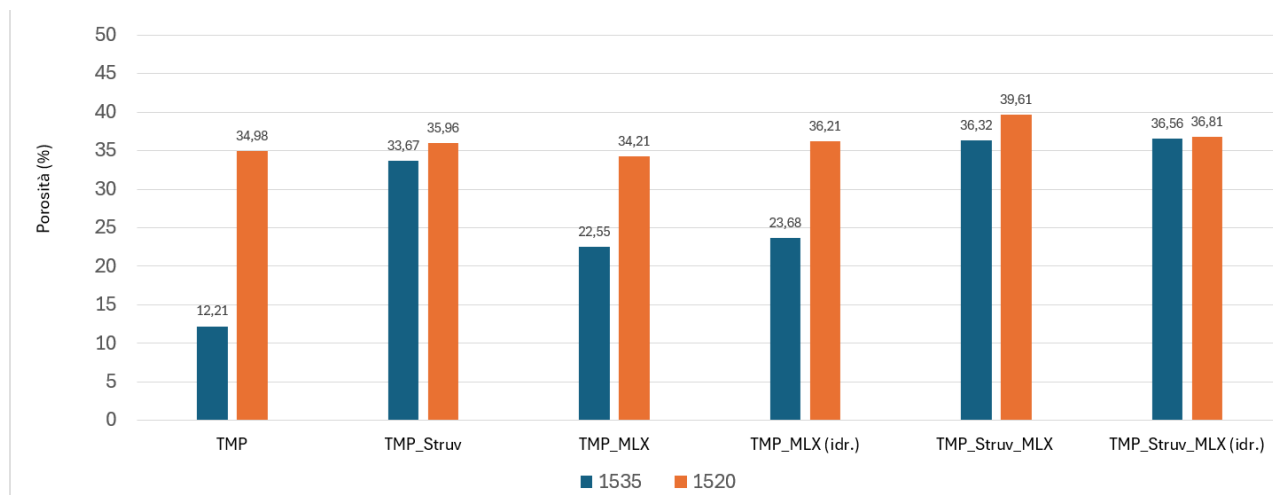


Figura 41: Andamento delle porosità delle varie formulazioni

Come atteso, le porosità più basse si registrano nei campioni in cui è stato utilizzato il fosfato 3.5 M e non è presente la struvite. L'aggiunta di struvite, sia nel campione senza che con farmaco e anche post idratazione, porta ad un aumento della porosità paragonabile a quello dei campioni con il fosfato 2.0 M. L'aggiunta del solo farmaco invece porta ad un aumento di porosità più contenuto, che si aggira attorno al 23%, contro il 36 % circa dei campioni con struvite.

Le porosità dei campioni 2.0 M sono tutte molto simili: in questo caso, l'aggiunta di struvite e farmaco non provoca una variazione della porosità percentuale.

Il rilascio di farmaco non sembra quindi far variare in modo significativo la porosità, probabilmente a causa della sua bassa quantità.

5.7 Rilascio di farmaco

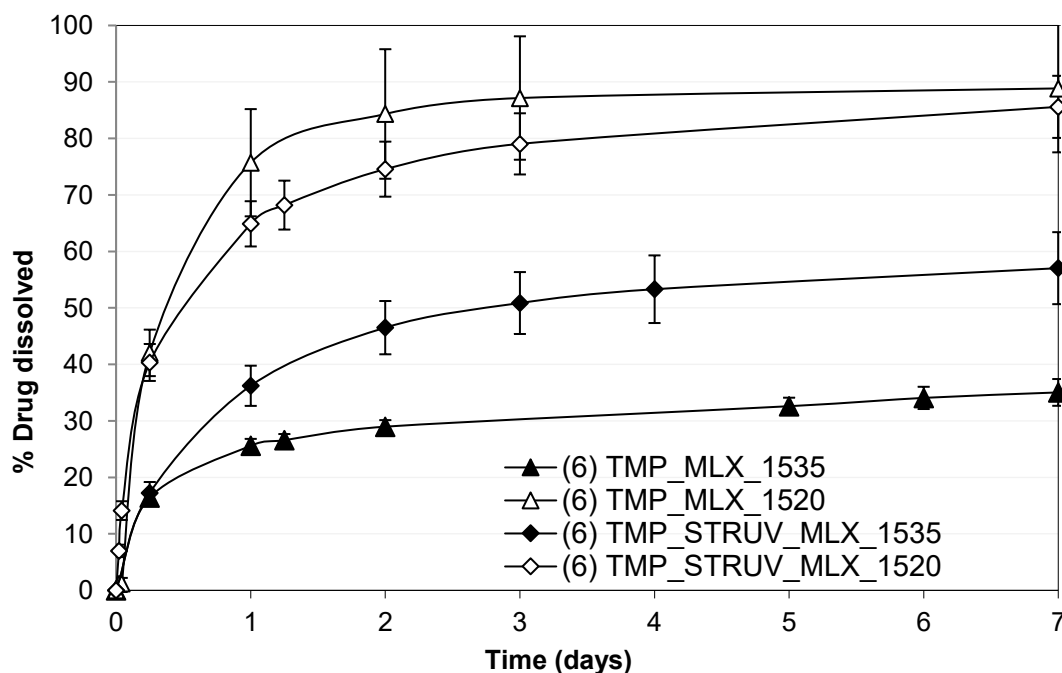


Figura 42: curve di rilascio di farmaco per i campioni indicati

Come evidente dalla figura 42, le curve di rilascio dei cementi sono abbastanza differenti, suggerendo una dipendenza delle cinetiche di rilascio dalla formulazione del cemento: questo a sua volta lascia presagire un buon grado di modulabilità dei sistemi TMPCs nei confronti del Meloxicam.

Tutti i campioni analizzati hanno una fase iniziale caratterizzata da un rapido rilascio del principio attivo (il cosiddetto burst), seguita da un progressivo rallentamento della velocità di rilascio. Questo comportamento può essere associato alla disponibilità immediata della frazione di farmaco più superficialmente esposta o debolmente trattenuta dalla matrice, mentre la successiva fase più lenta potrebbe dipendere dalla diffusione del principio attivo attraverso la matrice e dalla progressiva riduzione del gradiente di concentrazione tra campione e mezzo di rilascio. L'assenza di un incremento proporzionale nel tempo suggerisce il raggiungimento graduale di una condizione prossima all'equilibrio, con una quantità residua di farmaco probabilmente trattenuta più stabilmente all'interno della struttura del materiale.

Come si può notare dal grafico, le differenze composizionali tra i campioni si riflettono nei rispettivi profili di rilascio del farmaco, e soprattutto sulla quantità totale di farmaco rilasciato, che in nessun caso arriva al 100% (vedi tabella G)

	rilascio farmaco (%)
TMP_MEL_1535	35
TMP_MEL_1520	88
TMP_Struv_MEL_1535	57
TMP_Struv_MEL_1520	85

Tabella G: percentuali di rilascio del farmaco per i campioni indicati dopo 7 giorni in PBS

Il rilascio è maggiore nel caso della concentrazione 2 M della fase fosfato di ammonio.

Effetto della concentrazione di fosfato sul rilascio

La prima differenza importante che si riscontra riguarda l'effetto della concentrazione del fosfato: utilizzando un fosfato più concentrato (3.5 M), i rilasci finali sono nettamente inferiori rispetto a quelli che si ottengono usando un fosfato meno concentrato (2.0 M). Questo fenomeno potrebbe essere dovuto alla maggior densificazione della struttura (Figura 34) che si ottiene grazie ad una maggior formazione di struvite durante la fase di indurimento. In generale quindi, si potrebbe confermare che l'utilizzo della concentrazione 2.0 M porti ad una maggior efficacia del cemento come sistema di drug release a scapito delle sue proprietà meccaniche (capitolo 5.5).

Effetti della struvite aggiunta sul rilascio

La seconda grande differenza si può notare nella presenza o meno di struvite aggiunta, a parità di concentrazione di fosfato. Analizzando gli andamenti dei campioni TMP_MLX_1535 e TMP_Struv_MLX_1535, si può vedere che il rilascio del primo è di circa il 22% inferiore, suggerendo che la struvite aggiunta porti a una riduzione della densità del campione, come si può vedere dalle immagini SEM (Figura 34, immagine E). Tale risultato trova riscontro anche nell'aumento di porosità del TMP_Struv_MLX_1535 (36.32%) rispetto al TMP_MLX_1535 (22.55%) (Tabella F). Il minor rilascio del TMP_Struv_MLX_1535 rispetto ai campioni con fosfato 2.0 M, a parità di porosità, potrebbe essere spiegabile dalle immagini SEM, in cui si osserva, dal confronto dell'immagine E con le immagini I e M, una maggior omogeneità strutturale.

Quando si analizzano i campioni TMP_MLX_1520 e TMP_Struv_MLX_1520, si può notare che la struvite aggiunta non sembra avere lo stesso effetto. Infatti, il rilascio finale dei campioni con fosfato 2.0 M, non sembra variare in presenza di struvite, attestandosi a un valore di circa 85-88%. Il rilascio potrebbe non variare poiché il valore di porosità percentuale (circa 35%) è invariato. La differenza in

questo caso sta nella velocità di rilascio iniziale: nel campione TMP_MLX_1520, la mancanza di struvite sembrerebbe portare a una maggior velocità di rilascio nelle fasi iniziali.

Nel caso di campioni con fosfato 3.5 M, la struvite aggiunta diminuisce la densità del campione, mentre nei campioni con fosfato 2.0 M, le immagini SEM (Figura 35, immagine I e M) mostrano che la struvite aggiunta aumenta la densificazione della struttura, riducendo la dimensione dei pori e, di conseguenza, andando a mitigare il rilascio di farmaco rispetto al campione TMP_MLX_1520.

Sebbene le prove di rilascio siano state condotte per un periodo complessivo di soli sette giorni, i risultati ottenuti evidenziano un comportamento compatibile con quello di matrici cementizie a base di fosfati di calcio potenzialmente impiegabili per sistemi di drug delivery a rilascio prolungato.

Il rilascio non completo del farmaco potrebbe rappresentare un problema nelle eventuali formulazioni. Probabilmente la porosità presente, benchè elevata (intorno al 30-40%) non è sufficiente a favorire la diffusione completa del farmaco, come invece accade nei cementi a base di fosfati di calcio.

5.8 Iniettabilità

A scopo esemplificativo è stata riportata la prova relativa al campione TMP_1535, i restanti cementi sono stati testati allo stesso modo.

In una siringa sono stati inseriti 3 grammi di TMP mentre con la seconda siringa sono stati prelevati 2 mL di fosfato 3.5 M. Le quantità sono state volutamente scalate per rendere più agevole il prelievo di fosfato con la siringa per limitare il rischio di errori procedurali.

Le due siringhe sono state connesse tramite il sistema Luer Lock e il mescolamento è stato protratto spingendo il fosfato nella siringa del TMP e successivamente spingendo la soluzione avanti indietro per 10 volte (come descritto dalle modalità operative). Il prodotto poi è stato iniettato a diversi tempi all'interno di un vetro ad orologio.

All'interno della siringa, il TMP_1535 ha iniziato la fase di presa. Valutando lo scorrimento sulle pareti della siringa, a circa 3 minuti e 34 secondi si è notato un aumento di viscosità.

A 6 minuti e 27 secondi, la miscela risultava ancora troppo liquida per permettere una stabilizzazione efficace a seguito dell'iniezione.

A 10 minuti e 30 secondi, la miscela risultava sufficientemente pastosa e, una volta iniettata, la miscela ha mantenuto la forma, consentendone addirittura il prelevamento con una spatola e il modellamento (figura 43).



Figura 43: campione di TMP_1535 iniettato con consistenza pastosa

Dopo 15 minuti, il campione si è solidificato dentro la siringa, assumendo una consistenza farinosa e friabile, non consentendone l'iniezione. Il cemento nel vetrino risultava anch'esso friabile e non più modellabile. Ne consegue che il tempo utile di lavorazione sia intorno ai 5 minuti dopo la fase di iniettabilità.

	inizio presa	iniezione utile	indurimento
TMP_1535	3' 34"	10' 30" - 15'	> 15'

Tabella H: tempi di lavorabilità del cemento TMP_1535

Ripetendo il test con il fosfato 2.0 M, si è potuto notare un aumento della lavorabilità. La soluzione ha iniziato la presa a circa 3 minuti dalla fine del mescolamento nella siringa. L'iniettabilità è stata stimata attorno alla decina di minuti. L'inizio dell'indurimento e la fine hanno raggiunto però tempi maggiori rispetto al TMP_1535, con un aumento del tempo utile di circa 10 minuti.

	inizio presa	iniezione utile	indurimento
TMP_1520	3' 45"	10' 32" - 25'	> 25'

Tabella I: tempi di lavorabilità del cemento TMP_1520

L'aggiunta di farmaco e struvite, o di entrambe, non ha portato a una modifica dei tempi di reazione o di indurimento. I campioni di TMP_MLX_1535 e TMP_MLX_1520 si sono comportati esattamente allo stesso modo di quelli senza farmaco. La struvite aggiunta, invece, non è entrata in soluzione durante il mescolamento nella siringa, rimanendo in sospensione e rendendo più difficoltosa l'iniezione del composto, ostruendo l'uscita della pasta cementizia e non modificando in alcun modo i tempi di reazione.

L'aggiunta di struvite quindi potrebbe essere più utile quando il sistema dovesse essere impiegato per la creazione di protesi all'interno di stampi più che non iniettato all'interno della zona sottoposta a intervento.

Conclusioni

Il presente lavoro di tesi ha dimostrato che i cementi ossei a base di trimagnesio fosfato rappresentano una piattaforma promettente per lo sviluppo di materiali multifunzionali, capaci di combinare supporto meccanico e rilascio locale controllato di farmaci. La sintesi allo stato solido si è rivelata la procedura più efficace per ottenere il TMP puro in forma cristallina e con rese elevate, mentre la sintesi della struvite ha permesso di ottenere una fase idrata utilizzabile come componente o additivo del sistema cementizio.

Le analisi strutturali hanno evidenziato che l'indurimento dei TMPCs porta alla formazione di una matrice costituita principalmente da farringtonite residua, struvite e newberyite. La concentrazione del fosfato ha influenzato in modo significativo l'evoluzione delle fasi e le proprietà finali del cemento: la formulazione con fosfato 3.5 M ha favorito una maggiore formazione di struvite e una struttura più compatta, mentre quella a 2.0 M ha prodotto cementi più porosi e caratterizzati da una minor quantità di struvite. Durante la maturazione e l'immersione in ambiente fisiologico, i TMPCs hanno mostrato evidente trasformazione di fase, con la formazione di fasi quali dittmarite e bobierite.

L'aggiunta di meloxicam non ha impedito la formazione dei cementi e ne ha confermato la compatibilità con la matrice inorganica. Tuttavia, il farmaco ha influenzato l'evoluzione del sistema, favorendo in alcuni casi una maggiore stabilizzazione della struvite e modificando la microstruttura del cemento. L'aggiunta di struvite preformata non ha invece determinato un aumento della formazione della fase struvite, come ipotizzato, ma ha prodotto effetti dipendenti dalla concentrazione del fosfato, modificando principalmente la morfologia, la porosità e portando alla formazione di fasi disidratate, senza particolari benefici sulle proprietà meccaniche, ma risultando utile per modulare il rilascio di farmaco.

Le proprietà meccaniche e il comportamento di rilascio hanno confermato la stretta relazione tra compattezza della matrice e prestazioni del materiale. I campioni preparati con fosfato 3.5 M hanno mostrato la maggiore resistenza e il rilascio più lento del meloxicam, mentre le formulazioni 2.0 M, caratterizzate da una porosità più elevata, hanno consentito un rilascio nettamente maggiore del farmaco.

Nel complesso, i TMPCs studiati sono risultati idonei all'incorporazione e al rilascio locale di meloxicam, mostrando un comportamento dipendente dalla formulazione. La formulazione con fosfato 3.5 M sembra essere maggiormente indicata quando sono richieste migliori proprietà meccaniche e un rilascio prolungato, mentre quella a 2.0 M risulta più favorevole quando si desidera massimizzare la quantità di farmaco rilasciata.

Le prospettive future riguardano l'ottimizzazione del rapporto tra resistenza meccanica, porosità e cinetica di rilascio, attraverso la variazione della concentrazione del fosfato, del rapporto liquido/polvere e della quantità di meloxicam o struvite aggiunta, nonché la valutazione delle proprietà meccaniche nel tempo. Sarà inoltre necessario migliorare la riproducibilità della preparazione dei provini, approfondire l'evoluzione delle fasi durante la permanenza in ambiente fisiologico e verificare la citocompatibilità e l'effettiva efficacia biologica dei cementi mediante ulteriori prove in vitro.

Bibliografia

- [1] Mori A, Ohtsuki C, Miyazaki T, Sugino A, Tanihara M, Kuramoto K, Osaka A. Synthesis of bioactive PMMA bone cement via modification with methacryloxypropyltrimethoxysilane and calcium acetate. *J Mater Sci Mater Med*. 2005;16(8):713-718.
- [2] Sabatini C. *Sintesi e caratterizzazione di cementi ossei a base di fosfati di magnesio* [Tesi di Laurea Magistrale]. Politecnico di Torino; 2017.
- [3] Ostrowski N, Roy A, Kumta PN. Magnesium phosphate cement systems for hard tissue applications: A review. *ACS Biomater Sci Eng*. 2016;2(7):1067-1083.
- [4] Liu J, Hou W, Wei W, Peng J, Wu X, Lian C, Zhao Y, Tu R, Goto T, Dai H. Design and fabrication of high-performance injectable self-setting trimagnesium phosphate. *Bioact Mater*. 2023; 28:348-357.
- [5] Tian Y, Sun R, Li Y, Liu P, Fan B, Xue Y. Research progress on the application of magnesium phosphate bone cement in bone defect repair: A review. *Bio-Med Mater Eng*. 2024;35(3):265-278. doi:10.3233/BME-230081
- [6] Kanter B, Vikman A, Brückner T, Schamel M, Gbureck U, Ignatius A. Bone regeneration capacity of magnesium phosphate cements in a large animal model. *Acta Biomater*. 2018; 69:352-361.
- [7] Ginebra MP, Canal C, Espanol M, Pastorino D, Montufar EB. Calcium phosphate cements as drug delivery materials. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(12):1090-1110.
- [8] Haque MA, Chen B. Research progresses on magnesium phosphate cement: A review. *Constr Build Mater*. 2019; 211:885-898.
- [9] Yang Y, Ying X, Huang H, Cui Y. Tri-magnesium phosphate as a candidate biocompatible retarder for magnesium potassium phosphate cement: Setting behavior, mechanical properties, and microstructure. *Materials (Basel)*. 2026;19(7):1354.
- [10] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 24842, Trimagnesium phosphate.
- [11] Abdel-Gawwad HA, Abo-El-Enein SA, Heikal M. Synthesis, characterization and application of magnesium phosphate cements: A comprehensive review. *Radiat Eff Defects Solids*. 2024;179(9-10)
- [12] Ostrowski N, Lee B, Hong D, Enick PN, Roy A, Kumta PN. Synthesis, osteoblast, and osteoclast viability of amorphous and crystalline tri-magnesium phosphate. *ACS Biomater Sci Eng*. 2015;1(1):52-63.
- [13] Ostrowski N, Roy A, Kumta PN. Magnesium phosphate cement systems for hard tissue applications: A review. *ACS Biomater Sci Eng*. 2016;2(7):1067-1083.
- [14] Tas AC. Preparation of porous, biomimetic, and antibacterial calcium phosphate coatings on Ti6Al4V alloy. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(1):223-232.
- [15] Böhner M, Brunner TJ, Stark WJ. Controlling the reactivity of a magnesium phosphate cement: A study of the reaction between β -tricalcium phosphate and monocalcium phosphate monohydrate. *J Mater Chem*. 2005;15(29):2930-2935.

- [16] Sidorczuk D, Kozanecki M, Civalleri B, Pernal K, Prywer J. Structural and optical properties of struvite: Elucidating structure of infrared spectrum in high frequency range. *J Phys Chem A*. 2020;124(42):8668-8678.
- [17] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 62639, Struvite.
- [18] Kurtuluş G, Taş AC. Transformations of neat and heated struvite ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). *Mater Lett*. 2011;65(19-20):2883-2886.
- [19] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 54677470, Meloxicam.
- [20] A comparative approach of MIR, NIR and Raman based chemometric strategies for quantification of Form I of Meloxicam in commercial bulk drug. *Microchem J*. 2022; 180:107575.
- [21] Abbona F, Madsen HEL, Boistelle R. Crystallization of two magnesium phosphates, struvite and newberyite: Effect of pH and concentration. *J Cryst Growth*. 1982;57(1):6-14.
- [22] Baby B, Thambi T. Formation and microanalysis of struvite urinary calculi. *Int J ChemTech Res*. 2014;6(7):3720-3726.
- [23] Lai Z, Qian J, Lu Z, Li Q, Zou Q. Rapid synthesis of dittmarite by microwave-assisted hydrothermal method. *Adv Mater Sci Eng*. 2012; 2012:968396.
- [24] Chiovetta C. *Cementi brushitici drogati con zinco e magnesio: sintesi, caratterizzazione e applicazione come sistema di drug delivery di Meloxicam* [Tesi di Laurea Magistrale]. Università degli Studi di Pavia; 2023.
- [25] Anthony JW, Bideaux RA, Bladh KW, Nichols MC, eds. *Handbook of Mineralogy*. Mineralogical Society of America; 1990–2003.