



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTA' DI INGEGNERIA

Corso di Laurea triennale in Ingegneria Meccanica

**CARATTERIZZAZIONE DI SCAFFOLDS IN ACCIAIO 316L A GEOMETRIA VARIABILE
REALIZZATI TRAMITE ADDITIVE MANUFACTURING**

**CHARACTERIZATION OF SCAFFOLDS FABRICATED BY ADDITIVE MANUFACTURING
USING 316L STAINLESS STEEL**

Relatore: Chiar.ma

Prof.ssa Eleonora Santecchia

Tesi di Laurea di:

Matteo Capriotti

Correlatore: Chiar.mo

Prof. Paolo Mengucci

A.A. 2019 / 2020

A mia madre Rosella,

a mio padre Mauro

INTRODUZIONE.....	2
CAPITOLO 1 – TECNOLOGIE ADDITIVE.....	4
CAPITOLO 2 – ACCIAIO 316L.....	14
CAPITOLO 3 – TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE.....	22
CAPITOLO 4 – PROCEDURA SPERIMENTALE E RISULTATI.....	41
CONCLUSIONI.....	67
RINGRAZIAMENTI.....	68

INTRODUZIONE

Negli ultimi 50 anni la medicina rigenerativa ha compiuto notevoli passi in avanti nell'utilizzo di materiali e tecnologie innovative. In particolare, con l'avvento della stampa 3D, è cambiata completamente la mentalità produttiva, che rispetto ai tradizionali processi, non sottrae più materiale, ma lo aggiunge.

L'ingegneria tissutale è tra le pioniere in questo campo. Il termine "Ingegneria tissutale" nasce intorno agli anni Settanta per indicare la manipolazione di organi e tessuti; in seguito, la dicitura è stata adottata per indicare quel campo interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze della vita, per sviluppare dei sostituti di tessuti biologici o organi. Si tratta di una scienza multidisciplinare che, attraverso la semina di cellule staminali su appositi supporti (scaffold) e in presenza di specifici fattori di crescita (proteine segnale), è finalizzata alla costruzione di protesi biologiche o organi biologici per il trapianto nel paziente.

Diversi sono i materiali di supporto utilizzati dal titanio e le sue leghe fino agli acciai.

In questo studio è stata eseguita una caratterizzazione di due tipologie di scaffold graded lattice, realizzate con acciaio 316L. Dopo essere stati prodotti mediante Laser Powder Bed Fusion (LPBF), sono stati analizzati al microscopio elettronico (SEM) per osservarne la morfologia.

Le micrografie ottenute sono state elaborate mediante il software ImageJ.

Dall'analisi condotta si evince che le strutture porose sono particolarmente adatte per la semina delle cellule, al contrario ciò inficia le proprietà meccaniche del supporto.

Le strutture connesse invece, apportano benefici sia da un punto di vista biologico che meccanico, in quanto all'aumentare del numero di connessioni, lo spazio occupabile delle cellule e dai suoi nutrimenti, è maggiore. Inoltre, da uno sguardo ingegneristico, le interconnessioni rendono lo scaffold più resistente a compressione.

CAPITOLO 1

TECNOLOGIE ADDITIVE

Le tecnologie additive, in inglese “additive manufacturing”, sono una famiglia di tecnologie basata sul principio di funzionamento della stratificazione progressiva di materiale su livelli sovrapposti lungo “l’asse Z” (verso l’alto), al fine di ottenere un oggetto tridimensionale.

Il termine fu coniato per racchiudere i concetti di rapid prototyping, rapid tooling, rapid manufacturing, allo scopo di identificare le tre principali destinazioni di utilizzo di questa tecnologia. Il “rapid prototyping” indica l’insieme delle tecniche industriali volte alla realizzazione fisica del prototipo, in tempi relativamente brevi, a partire da una definizione matematica tridimensionale dell’oggetto (CAD) con l’obiettivo di ridurre sia i costi di realizzazione che i tempi di costruzione del prototipo stesso. Il “rapid tooling” è una tecnica che consente, in tempi più rapidi, di realizzare attrezzature per la creazione di prototipi come alternativa allo stampo metallico. Il “rapid manufacturing” consiste nella produzione rapida di prodotti personalizzati per il cliente eliminando l’utilizzo modelli.

Il processo di produzione additiva ha come input la realizzazione del modello 3D dell’oggetto. Questo può essere realizzato o mediante software di progettazione oppure tramite tecnica di “reverse engineering”, la quale permette di ricavare il modello CAD attraverso una scansione tridimensionale, ottenendo un grado di personalizzazione elevato. Pertanto, è usata nell’ambito biomedicale in cui si necessita di un prodotto proprio per ogni paziente. Il file CAD viene poi convertito in modello STL, che è elaborato dalla macchina per definire l’orientamento del pezzo, la direzione

di accrescimento e i supporti. Quest'ultimi sono necessari per evitare che la struttura collassi. Definito ciò si procede con lo "slicing": il modello virtuale viene sottoposto ad un taglio progressivo per determinare con precisione lo spessore degli strati, i parametri di processo, i tempi e i costi di produzione. Dopo aver definito queste operazioni la macchina può iniziare con la generazione del pezzo. Una volta estratto, vengono opportunamente rimossi i supporti, necessari per la buona riuscita della costruzione del pezzo, e si prosegue con la pulitura ed eventuali attività di post-produzione, per migliorarne le caratteristiche meccaniche ed estetiche.

Uno degli elementi peculiari di tutte le tecnologie "additive manufacturing" è la possibilità di realizzare in un unico processo di stampa, oggetti che tradizionalmente sono realizzabili in diversi componenti singoli, successivamente da assemblare oppure componenti non realizzabili con le tradizionali tecniche di lavorazione. La tecnologia additiva è destinata ad affiancare e/o sostituire le più comuni tecniche di fabbricazione industriale, tanto che si prevede un utilizzo sempre più pervasivo e conveniente, con tempi di processo sempre più bassi.

Si possono dividere le tecnologie additive in tre macroaree, in base alle caratteristiche di consistenza della materia prima:

- Nel caso di polveri troviamo le tecniche basate sulla:
 - sinterizzazione;
 - fusione delle polveri (attraverso laser o fascio di elettroni);
 - sulla deposizione di un legante chimico su un letto di polvere omogeneo.

- Nel caso di solidi le tecniche prevedono:
 - l'incollaggio stratificato di foglio;

- l'estrusione di materiale solido o semi solido.
- Infine, con i liquidi si utilizzano: processi di fotopolimerizzazione tramite lampade UV o di stampaggio a getto. Il materiale subisce una reazione chimica creando legami tra le molecole separate. Ovviamente l'impiego di una specifica tecnologia dipende da diversi parametri quali: il tipo di materiale, la resistenza meccanica del pezzo, la finitura superficiale desiderata del pezzo, la velocità di produzione, l'investimento necessario e il costo finale.

Nell'ambito dell'ingegneria industriali risultano di particolare interesse due categorie di materiali: i polimeri e i metalli. I primi garantiscono costi inferiori sia per l'acquisto del materiale stesso sia in termini di tecnologie di stampa, i secondi permettono prestazioni di livello più elevato ma richiedono tecnologie più costose e complesse. Tra i polimeri, solo i termoplastici possono essere utilizzati per l'additive manufacturing, e di questi i principali sono:

- Le PLA sono molto flessibili e adatte a diverse applicazioni, hanno buone caratteristiche meccaniche, sono stampabili anche a basse temperature, hanno una buona stabilità coniugata ad un ritiro ridotto, derivano dall'amido e per questo eco-friendly;
- Le ABS sono ottime per le proprietà meccaniche, presentano alta resistenza meccanica e al graffio, buona resistenza al calore, possono essere lucidate e verniciate facilmente, molto rigide;
- Il Nylon ha proprietà meccaniche molto buone, si salda bene su sé stesso rendendo meno visibili i layer, è stampabile senza necessità di un piano riscaldato, molto sensibile all'umidità e necessita di temperature di stampaggio superiori a 250°;

- L'HDPE è un materiale atossico particolarmente utilizzato nei settori alimentare, chimico ed elettrico, ha un basso assorbimento di acqua e grande resistenza agli agenti chimici;
- Il PVA è utilizzato come materiale di supporto solubile, è resistente agli idrocarburi, è complesso da estrarre per l'alta temperatura di stampa e va conservato in un luogo asciutto per evitarne il degrado.

Tra i materiali metallici più usati troviamo:

- L'alluminio che grazie alle sue doti di leggerezza, capacità termica, peso contenuto trova grande impiego nel settore dell'automotive e dell'aeronautica;
- Il Cobalto-Cromo impiegato in applicazioni ingegneristiche ad alta temperatura, come motori per gli aerei e ambito biomedico, presenta proprietà meccaniche che migliorano con l'aumentare della temperatura fino a 500-600 °C e ottima resistenza alla corrosione;
- Il Nichel ha ottima resistenza meccanica e all'ossidazione e per questo è utilizzato nel settore aerospaziale ed energetico, ad esempio per la realizzazione delle turbine;
- L'acciaio è una lega con ottimo rapporto costo/prestazioni, con notevole flessibilità applicativa, può anche essere inossidabile e sottoposto a tempra, come quelli derivanti da forgiatura;
- Il titanio è ottimo per le applicazioni biomediche perché presenta elevata biocompatibilità, resistenza alla corrosione, notevoli proprietà meccaniche ed è una lega dalla bassa densità [1.1].

Per ottenere le polveri metalliche si sottopongono le leghe ad un processo di atomizzazione. La lega fusa viene versata come un filo all'interno della camera di atomizzazione, impatta in un gas inerte che lo trasforma in goccioline. Queste raffreddandosi finiscono nel fondo della camera dove vengono raccolte sotto forma di polvere pre-legata. Il processo permette di mantenere la stessa composizione chimica della lega di partenza. Tuttavia, su più di 5500 leghe solo una parte ristretta può essere utilizzata per la “stampa 3D”, poiché le dinamiche di fusione e solidificazione sono molto rapide (velocità di circa 10^5 K/s). Di conseguenza si sviluppano microstrutture non tollerabili, come grossi grani e cricche periodiche, che rendono il prodotto di scarsa qualità.

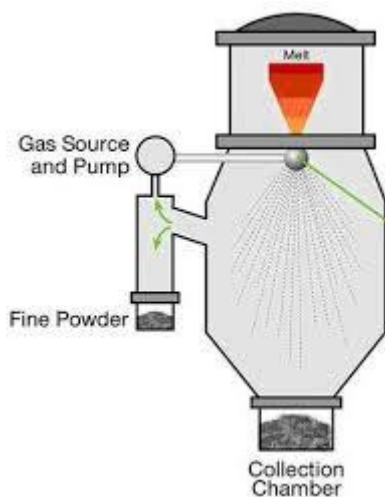


Figura 1.1: Atomizzatore (www.lpwtechnology.com)

Le tecniche di “stampa 3D” sono molteplici e variano a seconda della tipologia di prodotto da realizzare. Nel mio studio, per la realizzazione degli scaffolds, è stata utilizzata la “Laser Powder Bed Fusion” (LPBF) che rientra nella famiglia delle “Powder Bed Fusion” (PBF) ovvero, fusione a letto di polvere.

Questa si avvale dell'energia termica derivante da un fascio laser o di elettroni per fondere selettivamente regioni di un letto di polvere, strato su strato, seguendo un modello CAD. La polvere, contrariamente ad altri sistemi, non viene spruzzata bensì, come suggerisce il nome, si trova già presente sottoforma di uno strato, avente uno spessore pari alla dimensione dello slice definito dal file STL. Una volta fuso e solidificato il primo strato, viene ricoperto nuovamente di polvere fino alla creazione del pezzo.

Si possono distinguere due fusioni a letto di polvere: la “Electron Beam Melting” (EBM) e la “Laser Powder Bed Fusion” (LPBF). A sua volta la “Laser Powder Bed Fusion” può essere definita “Selective Laser Melting” (SLM) o “Direct Metal Laser Sintering” (SLS).

Durante il processo SLM il fascio laser, avente un diametro dell'ordine di 100 micron, interagisce localmente con lo strato di polvere appena depositato. La frazione di energia che riesce ad essere assorbita dalla polvere genera un volume di metallo fuso che solidifica rapidamente.

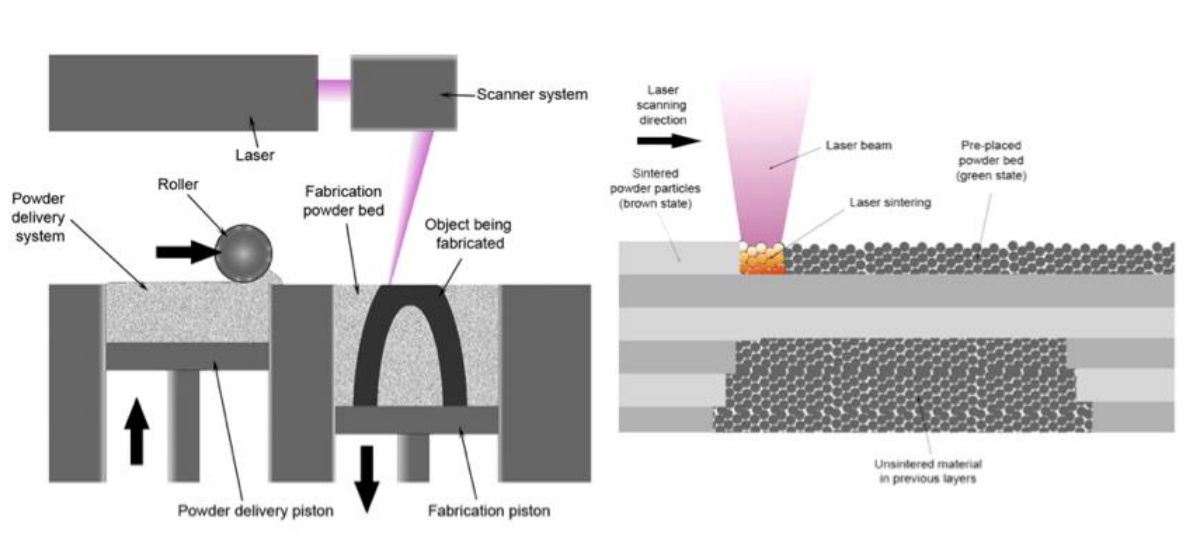


Figura 1.2: Laser Powder Bed Fusion (LPBF) (Fonte: EPMA – European Powder Metallurgy Association)

La creazione di un volume discreto di materiale consolidato comporta quindi, la definizione di una strategia di deposizione che possa efficacemente interessare via via tutte le sezioni della parte 3D da produrre.

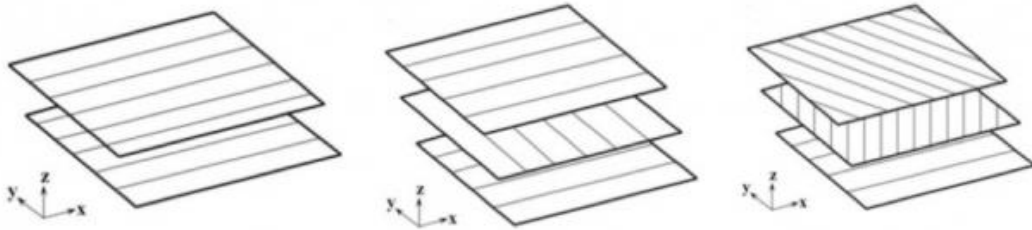


Figura 1.3: Esempi pattern

Il pattern prescelto, di solito definito selezionando tra alcune configurazioni di consolidato utilizzo, deve quindi assicurare un corretto controllo della microstruttura assunta con la solidificazione nel volume del pezzo. Allo stesso tempo deve ottimizzare le proprietà della sua superficie esterna attraverso specifiche passate lungo il profilo della sezione di ogni layer. Una volta terminate la passata di fusione, e dopo che la piastra di supporto viene retratta di una distanza corrispondente allo spessore di un nuovo strato di polvere (dell'ordine di 20-100 micron), viene depositato il successivo strato ed il processo viene ripetuto. L'interazione del fascio laser comporta quindi non solo la fusione del singolo strato, ma anche la parziale rifusione di quello sottostante per creare un volume solido [1.2].

L'Electron beam melting (EBM), come suggerisce il nome, usa un fascio di elettroni per fondere la polvere del metallo e creare, strato dopo strato, la parte desiderata. A oggi, l'unica compagnia a vendere macchine basate su questa tecnologia è la GE Additive che, nel 2016 ha acquisito la svedese Arcam. La tecnica permette di creare strutture complesse e altamente resistenti.

La differenza sostanziale con LPBF è la sorgente usata. Il cannone elettronico estrae da un filamento di tungsteno sottovuoto gli elettroni, che vengono accelerati ed infine proiettati sullo strato di polvere metallica da fondere. Ogni strato, spesso 50-100 μm , è preriscaldato fino al raggiungimento di una temperatura compresa tra i 600 e 800 $^{\circ}\text{C}$ usando fasci multipli ad una velocità di scansione maggiore di 10^4 mm/s con corrente elevata. Segue una scansione a velocità e corrente del fascio ridotte ($> 10^2$ mm/s; < 10 mA); la fusione localizzata procede fino al completamento della struttura, che può raggiungere le dimensioni di circa $0,2 \text{ m}^3$. Operando sottovuoto si riesce ad evitare che la polvere, una volta scaldata, possa ossidarsi a contatto con l'ambiente esterno.

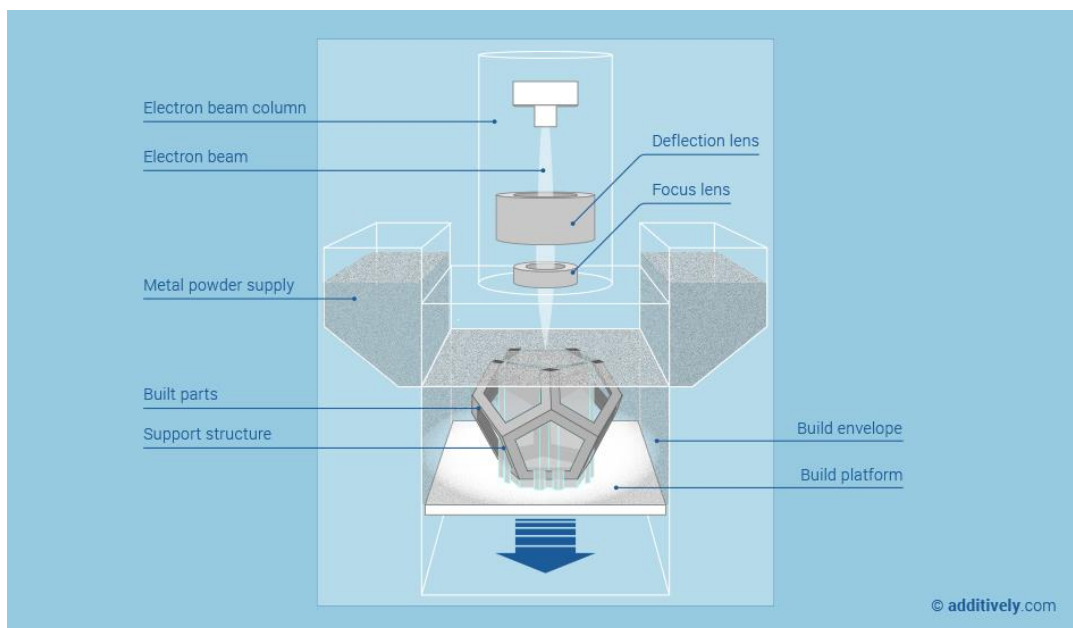


Figura 1.4: Electron Beam Melting (EBM) (additively.com)

Essendo il processo basato sul principio della carica elettrica, il materiale deve essere conduttivo, altrimenti non c'è interazione tra il fascio di elettroni e la polvere.

Ad oggi, poiché l'Arcam ha limitato la gamma di materiali compatibili, la realizzazione di manufatti avviene principalmente tramite leghe di titanio e cobalto-cromo, mentre i polimeri non possono essere utilizzati a causa della loro natura fisica.

La tecnologia EBM è utilizzata soprattutto per applicazioni aeronautiche e mediche, specialmente nella realizzazione di impianti di sostegno. Rispetto alla LSBP permette di creare parti più velocemente a discapito però della finitura, che, a causa della polvere più granulare, è meno accurata e di qualità inferiore [1.3] [1.4].

In base all'applicazione d'interesse, il progettista può scegliere una delle due tecnologie, entrambe valide, poiché presentano ambedue vantaggi e svantaggi.

BIBLIOGRAFIA

[1.1] Dispense del corso di tecnologia meccanica A.A 2019/2020 del prof. Archimede Forcellese

[1.2] <http://www.addmelab.polimi.it/stampare-in-metallo/la-tecnologia-slm/>

[1.3] <https://www.3dnatives.com/en/electron-beam-melting100420174/#!>

[1.4] Lawrence E. Murr, Sara M. Gaytan, Edwin Martinez, Frank Medina, Ryan B. Wicker, "Next Generation Orthopaedic Implants by Additive Manufacturing Using Electron Beam Melting", *International Journal of Biomaterials*, vol. 2012, Article ID 245727, 14 pages, 2012.
<https://doi.org/10.1155/2012/245727>

CAPITOLO 2

ACCIAIO 316L

L'acciaio è un materiale generalmente utilizzato come materiale strutturale, grazie ai numerosi vantaggi che mostra di avere rispetto ad altre tipologie di leghe metalliche. Infatti, riscontra una considerevole applicazione come materiale di progetto e/o costruzione in ambiti che spaziano dal settore aeronautico fino a quello biomedicale [2.1].

Gli acciai inossidabili sono una importante classe di materiali ingegneristici, ampiamente utilizzati in molteplici applicazioni, soprattutto grazie alle buone proprietà meccaniche e la resistenza alla corrosione. Tra questi il gruppo più grande è rappresentato dagli acciai inossidabili austenitici, che hanno qualità eccellenti quali: resistenza alla corrosione, duttilità, tenacità e capacità di essere saldati [2.2].

La prima considerazione da fare su una qualsiasi tipologia di metallo, in particolar modo per quelli ad uso chirurgico, è il grado di corrosione. La corrosione è un fenomeno multifattoriale complesso, che dipende da vari parametri quali: metallurgia del materiale, geometria, proprietà meccaniche e chimiche, e dall'ambiente in cui lavora il metallo.

Parlando di biomateriali, questi si possono definire come un qualsiasi materiale, naturale o sintetico, che si interfaccia con tessuti viventi e/o sistemi biologici. La scienza dei biomateriali si occupa dello studio fisico, biologico e della loro interazione con gli organismi viventi. Storicamente, il primo utilizzo di biomateriali risale al 1895, quando il ricercatore Lane introdusse la prima piastra per il fissaggio delle fratture ossee. Gli acciai inossidabili austenitici (316 e 316L), la lega di cobalto-cromo-molibdeno, il

titanio e le sue leghe, sono comunemente usati negli impianti ossei. Negli anni '20 furono introdotti 18-8 acciai inox che attirarono immediatamente l'interesse della comunità medica, grazie alle buone proprietà meccaniche e ad una resistenza alla corrosione elevata per quel periodo.

Nell'acciaio 316L (Tabella 2.1), l'elevata resistenza alla corrosione è garantita dal contenuto di cromo e molibdeno. Il primo, reagendo con l'ossigeno, consente la formazione di ossido di cromo (Cr_2O_3) sulla superficie del metallo; questo agisce come un film protettivo sulla zona esposta e funge da barriera dalla corrosione. L'acciaio 316L, inoltre, ha un modulo di elasticità di 206 GPa, una resistenza allo snervamento pari a 267,2 MPa ed una densità di 7,98 g/cm³. Il 316L grazie alle caratteristiche sopra citate è largamente utilizzato per impianti chirurgici (sia temporanei che permanenti) e strumentali, dispositivi medici ed equipaggiamenti. Gli acciai inox austenitici non risentono della corrosione intergranulare, che si forma in seguito alla precipitazione dei carburi di cromo (Cr_{23}C_6) e dall'esaurimento del cromo nei bordi di grano. Tuttavia, l'ossido di cromo è instabile e soggetto a corrosione localizzata in impianti di lunga durata, a causa dell'ambiente elettrolitico molto aggressivo del corpo umano [2.3].

Gli studi sugli impianti recuperati mostrano che più del 90% dei fallimenti di impianti con 316L è dovuto all'attacco di vaiolatura (pitting) e corrosione interstiziale, che sono anche le cause di fallimento nelle più comuni applicazioni industriali. Questi attacchi di corrosione localizzata portano anche alla lisciviazione di metalli, in particolare di ioni Nichel, che possono avere un effetto tossico sull'organismo. Per questi motivi il 316L necessita di un miglioramento della resistenza alla corrosione mediante lega fusa oppure di una modifica superficiale.

I materiali biomedicali che sono soggetti a carichi ciclici ed a sollecitazioni elevate, a causa dell'ambiente aggressivo in cui sono immersi, cedono per fatica. Si è riscontrato che il processo di fatica viene ulteriormente accelerato a causa della formazione di detriti da usura. Durante la fatica si verifica la rottura dello strato di ossido e l'incapacità del materiale di passivarsi immediatamente, espone alcune regioni del metallo all'ambiente salino portando alla corrosione. Durante la misurazione del potenziale corrosivo dell'acciaio inox 316L, lavorato a freddo, è stato osservato che la resistenza a fatica è diminuita drasticamente quando la passivazione è stata inibita, confermando così che la formazione dello strato di ossido gioca un ruolo fondamentale nella determinazione della vita a fatica dei materiali, esposti ad ambienti aggressivi e corrosivi. Inoltre, si è visto che lo sfregamento che nasce tra impianto ed osso accelera il processo di fatica poiché viene resa più difficile la passivazione [2.4].

CHEMICAL COMPOSITION	SS-316L
Component	Wt%
C	Max 0.08
Cr	18 - 20
Fe	66.345 - 74
Mn	Max 2
Ni	8 - 10.5
P	Max 0.045
S	Max 0.03
Si	Max 1
Cu	---
Cb/Ta	---
Ti	---
Other	---

Tabella 2.1: Composizione chimica acciaio 316L

Con il costante progresso nello sviluppo dei biomateriali e la disponibilità di nuove tecnologie, la medicina rigenerativa compie grandi passi avanti.

Tuttavia, ci sono ancora molti ostacoli che dovranno essere superati in futuro.

Tra le nuove tecnologie usate troviamo il design di scaffolds ed impianti ossei, che replicano le proprietà biomeccaniche dell'organismo ospitante.

Per le applicazioni ossee sono stati impiegati per molti anni i metalli sopracitati: acciaio inossidabile, leghe di cobalto e di titanio. Questi materiali sono biocompatibili, hanno buone proprietà meccaniche ed una buona resistenza alla corrosione. Tuttavia, tali caratteristiche non garantiscono un funzionamento impeccabile dell'impianto finale. Sebbene la resistenza meccanica dei materiali sopracitati sia sufficientemente elevata da supportare il carico fisiologico, una rigidità maggiore rispetto alle ossa naturali, è la principale causa di degradamento del tessuto osseo e dell'eventuale fallimento dell'impianto.

Questo è imputabile alla differenza dei moduli di elasticità dell'osso naturale del paziente e del materiale impiegato. Quando un osso è abbinato ad un impianto, ne condivide la sua capacità di carico e, di conseguenza, l'osso tenderà a ridurre lo stress a cui è sottoposto, mettendo in atto un meccanismo di protezione che porterà al riassorbimento del tessuto osseo.

Un metodo efficace per prevenire il rigetto dell'impianto consiste nel modificarne la densità relativa, rendendo il materiale poroso. Quando l'osso danneggiato deve essere riparato oppure sostituito, i metalli porosi sono dei candidati idonei, poiché la loro rigidità e porosità possono essere regolate ad personam. Nel caso in cui i pori aperti siano posizionati all'esterno della superficie dell'impianto, si consente al tessuto osseo di crescere e, quindi di accelerare il processo di osteointegrazione.

Oggi grazie alle moderne tecniche di “additive manufacturing” (AM) è possibile ottenere strutture complesse che, in passato, non erano ottenibili con i tradizionali processi manifatturieri. I metalli che soddisfano i requisiti di carico meccanico possono essere lavorati con diverse tecniche AM, tra cui Laser Powder Bed Fusion (LPBF) e la Electron Beam Melting (EBM) [2.5].

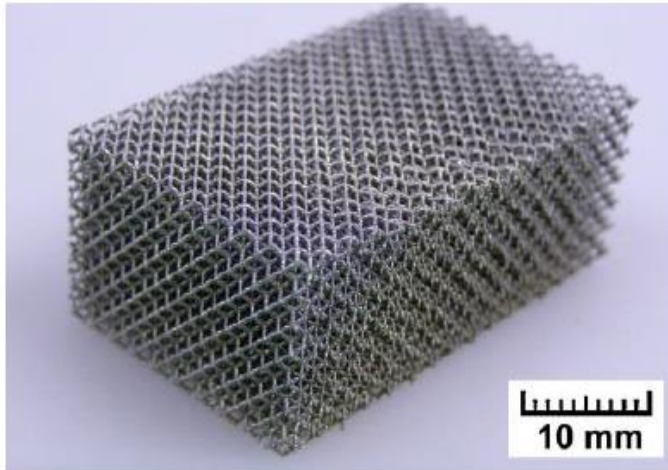


Figura 2.1: Esempio di uno scaffold di acciaio 316L realizzato mediante “stampa 3D”

Strutture porose come: nido d’ape, reticoli cristallini, schiuma Voronoi e reticoli gyroid, tutti prodotti mediante fusione a laser selettiva (SLM), hanno numerosi vantaggi quali: leggerezza, riducono l’utilizzo di materiale e consentono la regolazione delle proprietà meccaniche.

Cheng et al. [2.6] hanno confrontato la forza specifica di strutture in schiuma stocastica e strutture a rete, in determinate condizioni di uguale rigidità specifica, e ha scoperto che le strutture a maglie regolari (lattice) hanno una forza specifica più elevata. Inoltre, parametri di lavorazione come: velocità di scansione, spessore dello strato, distanza tra i pori e forma delle strutture porose influenzano le proprietà meccaniche delle parti.

La struttura gyroid è formata da una superficie periodica minima tripla (TPMS), che ha una curvatura pari a 0 e avendo superfici lisce può essere utilizzata in campo biomedico.

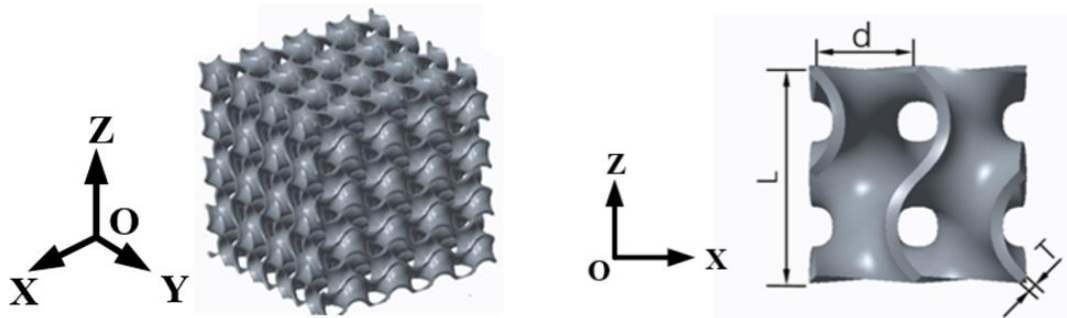


Figura 2.2: (sopra) Modello CAD struttura gyroid per un test di compressione; (sotto) Unità struttura gyroid

In termini di producibilità, si auto-supporta così da non richiedere strutture di sostegno ed è adatta per essere fabbricata mediante tecnologia SLM. Parlando di proprietà meccaniche Olivares et al. hanno dimostrato che questo tipo di struttura, avendo una migliore interconnessione e accessibilità da parte del fluido rispetto alle strutture esagonali, fornisce ottime capacità per la deposizione delle cellule e dei nutrienti. Infine, Jung et al. utilizzando schiume di grafene, ne hanno delineato il comportamento isotropo. Grazie all'elevato rapporto superficie/volume, la TPMS fornisce un'ampia superficie per l'adesione cellulare. Tuttavia, ciò non basta per rendere la struttura ottimale per l'insediamento delle cellule. Un altro fattore da tenere in considerazione è la permeabilità dello scaffold, e dalla letteratura si evince che una struttura reticolare rettangolare (lattice) ha migliori caratteristiche meccaniche e di permeabilità rispetto alla struttura gyroid.

In conclusione, dalla caratterizzazione di M. Fousova di uno scaffold in acciaio 316L, si è visto che ha proprietà meccaniche in compressione prossime all'osso umano e che la chimica della superficie non influenza negativamente la biocompatibilità del materiale, e per questo lo scaffold in

esame sembra essere uno strumento promettente per la riparazione dei difetti ossei [2.5].

BIBLIOGRAFIA

[2.1] Temperature Effects on Stainless Steel 316L Corrosion in the Environment of Sulphuric Acid (H₂SO₄), G. Ayu Arwati et al 2018 IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.343 012016

[2.2] A study on corrosion resistance of dissimilar welds between Monel 400 and 316L austenitic stainless steel, herish Mani et al 2018 IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.346 012025

[2.3] Biocompatibility, Bioactivity and CorrosionResistance of Stainless Steel 316L Nanocoatedwith TiO₂ and Al₂O₃ by Atomic Layer DepositionMethod, una Khethier Abbass et al 2018 J. Phys.: Conf. Ser.1032 012017

[2.4] <http://paduaresearch.cab.unipd.it/4486/1/BinderMarin.pdf>

[2.5] 3D printed porous stainless steel for potential use in medicine, M Fousová et al 2017 IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 179 012025

[2.6] Mechanical Behaviours and Mass Transport Properties of Bone-Mimicking Scaffolds Consisted of Gyroid Structures Manufactured Using Selective Laser Melting, Shuai Ma, Qian Tang, Qixiang Feng, Jun Song, Xiaoxiao Han, Fuyu Guo

CAPITOLO 3

TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE

Le tecniche sperimentali utilizzate per la caratterizzazione dei materiali d'impiego ingegneristico risultano in continua evoluzione, con l'obiettivo da un lato di rendere più agevoli ed ampie le caratterizzazioni chimico-fisiche e, dall'altro, di realizzare strumentazioni e software più versatili ed economici. In questo modo la caratterizzazione avanzata dei materiali, una volta propria dei soli laboratori di ricerca, è in grado di raggiungere anche le realtà industriali delle piccole e medie imprese. Caso emblematico è, ad esempio, lo sviluppo e la diffusione dei microscopi elettronici da banco nel mercato italiano, avvenuta grazie alle loro dimensioni e versatilità d'uso [3.1].

Una caratterizzazione esaustiva delle proprietà di un materiale richiede la determinazione di una serie di parametri che variano a seconda dell'applicazione dello stesso e tra i quali vi sono: la forma, la distribuzione dimensionale, lo stato di aggregazione o di agglomerazione, la composizione chimica, la cristallinità, la solubilità, la presenza di eventuali impurezze, l'area superficiale, la morfologia, la porosità, la composizione superficiale, la carica superficiale, la reattività. Tali caratteristiche hanno un'influenza significativa sul comportamento macroscopico dello stesso. Pertanto, il ruolo della caratterizzazione è, principalmente, quello di definire una correlazione tra struttura, forma e composizione chimica dei materiali, e le loro proprietà funzionali. Gli aspetti importanti da tener presenti nella scelta dei metodi di caratterizzazione sono: il tipo di informazione che la tecnica può fornire e la risoluzione che essa è in grado di raggiungere.

Le tecniche di imaging forniscono informazioni sulla morfologia e sulla struttura dei materiali.

Tali tecniche richiedono l'utilizzo di un microscopio, che può essere:

- ottico, basato sull'osservazione nell'ambito dello spettro elettromagnetico della luce in senso lato;
- elettronico, basato sull'utilizzo di una sorgente di elettroni;
- a scansione di sonda, basato sull'esplorazione della superficie del campione con una sonda, o di altro tipo.

I microscopi ottici hanno una risoluzione molto inferiore rispetto alle altre due classi di microscopi menzionati. In campo biologico, per esempio, il microscopio ottico con focale consente di costruire un'immagine tridimensionale del campione analizzato senza dover effettuare il sezionamento dello stesso. Infatti, spostando il campione lungo l'asse verticale dopo ogni scansione, è possibile ottenere una serie di immagini successive corrispondenti a piani focali via via più profondi all'interno del medesimo campione. La sovrapposizione ordinata di queste sezioni ottiche, eseguita via software, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume scansionato, in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco. La possibilità, quindi, di ricostruire un volume in maniera non distruttiva, rende il microscopio ottico confocale uno strumento molto interessante. Il potere di risoluzione del microscopio ottico tradizionale è di 0,2 micron perché la luce visibile ha lunghezze d'onda dell'ordine della frazione dei nm, mentre le distanze interatomiche sono più piccole di almeno tre ordini di grandezza.

Per la caratterizzazione dei materiali a livello nanometrico è necessario invece, l'utilizzo del microscopio elettronico.

Gli elettroni consentono di generare immagini con una risoluzione superiore a quella ottenuta con i fotoni perché possono arrivare a lunghezze d'onda inferiori, come si deduce dall'equazione di De Broglie: $\lambda = 1,22 E^{-\frac{1}{2}}$, dove λ è la lunghezza d'onda di De Broglie e E il valore di energia di un fotone.

Inoltre, gli elettroni interagiscono con la materia in maniera più efficace, consentendo di generare altri tipi di segnali che forniscono informazioni anche diverse da quelle semplicemente morfologiche, come ad esempio, quelle di tipo composizionale. Diversamente dal microscopio ottico, la forte interazione con la materia richiede, naturalmente, che il microscopio elettronico lavori in condizioni di alto vuoto per ridurre l'effetto di scattering delle molecole dell'aria sugli elettroni. Il Microscopio Elettronico a Scansione (SEM), mostrato in figura 3.1, e il Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM) sono i principali strumenti utilizzati per la caratterizzazione dei materiali [3.2].

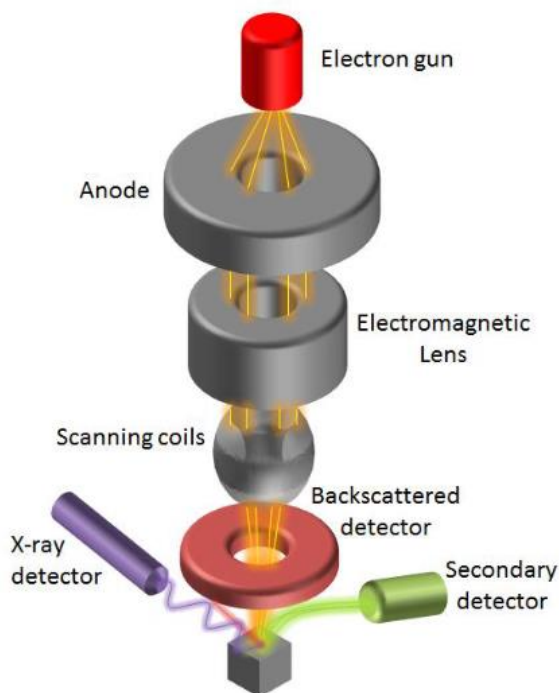


Figura 3.1: Schema Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)

Il primo (SEM) utilizza un fascio focalizzato di elettroni ad alta energia per generare sulla superficie dei campioni solidi una varietà di segnali. Tali, derivano dalle interazioni elettrone-campione (figura 3.2), rivelando informazioni sulla morfologia esterna, la composizione chimica, la struttura cristallina e l'orientamento dei materiali che compongono il campione. Nella maggior parte delle applicazioni, i dati vengono raccolti su una determinata area selezionata della superficie del campione e viene generata un'immagine bidimensionale che mostra le variazioni spaziali di queste proprietà. Le aree variano da 1 cm fino a 5 micron di larghezza e possono essere acquisite tramite le convenzionali tecniche di scansione SEM (ingrandimento da 20X a circa 300000X, risoluzione spaziale da 5 a 10 nm).

Il SEM è in grado di eseguire l'analisi di posizione di punti selezionati sul campione; questo approccio è particolarmente utile nella determinazione qualitativa o semi-quantitativa della composizione chimica (utilizzando la spettroscopia di diffrazione elettronica EDS, descritta in seguito), la struttura cristallina e gli orientamenti dei cristalli stessi (usando l'Electron Backscattered Diffraction, EBSD).

L'analisi SEM è considerata “non distruttiva”, cioè i raggi X generati dalle interazioni elettroniche non portano alla perdita di volume del campione, quindi è possibile analizzare gli stessi materiali ripetutamente.

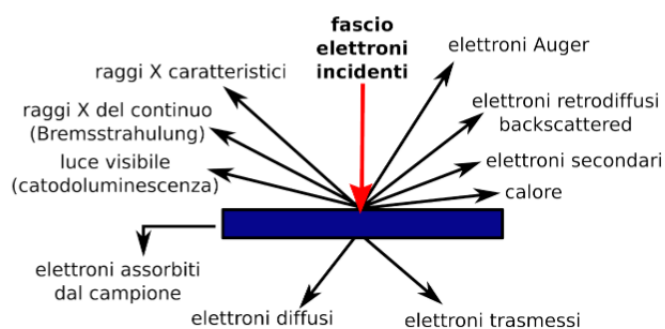


Figura 3.2: Principali segnali ottenuti dall'interazione dell'elettrone primario con la materia

Gli elettroni accelerati dal SEM trasportano quantità significative di energia cinetica, dissipata tramite una varietà di segnali prodotti dalle interazioni elettrone-campione nel momento in cui gli elettroni incidenti vengono decelerati nel campione solido.

Questi segnali includono:

- gli elettroni secondari producono immagini, nel SEM, della morfologia superficiale del campione;
- gli elettroni retrodiffusi (BSE) permettono di avere informazioni sulla morfologia e soprattutto sulle differenze in termini di composizione chimica presenti all'interno del campione;
- gli elettroni retrodiffusi rifratti (EBSD) che sono usati per determinare la struttura dei cristalli e l'orientamento dei minerali;
- i fotoni (raggi X caratteristici che sono usati per l'analisi elementare e raggi X continui);
- la luce visibile (catodoluminescenza);
- il calore.

Gli elettroni secondari e i retrodiffusi sono comunemente usati per i campioni di imaging: i primi mostrano la morfologia e la topografia dei campioni mentre i secondi evidenziano i contrasti nella composizione dei campioni multifase per una rapida distinzione.

La generazione di raggi X è prodotta da collisioni anelastiche tra gli elettroni incidenti e gli elettroni degli orbitali discreti (gusci) degli atomi nel campione. Quando gli elettroni eccitati tornano negli stati energetici inferiori, producono raggi X con una lunghezza d'onda fissa, correlata alla differenza di energia nei livelli degli elettroni nei diversi gusci per un dato

elemento. Pertanto, i raggi X sono prodotti per ogni elemento che viene “eccitato”.

Gli elettroni secondari sono a bassa energia (circa 50 eV) e si generano quando un elettrone del fascio primario scalza un elettrone da un atomo della superficie o sub-superficie del campione. Essi sono utilizzati per ottenere informazioni topografiche ad elevata risoluzione.

L’interpretazione delle immagini è resa semplice dal contrasto tra luci ed ombre, visibile nell’immagine SEM, ed è molto simile a quello che si otterrebbe se il campione fosse illuminato con la luce.

Gli elettroni retrodiffusi sono elettroni ad alta energia, prossima a quella del fascio primario. Generati dallo scattering elastico degli elettroni che rimbalzano indietro dal campione senza attraversarlo, essi vengono utilizzati quando si vogliono ricavare informazioni sulla densità atomica. La loro resa emissiva è sensibile al numero atomico medio dell’area che attraversano: maggiore è il numero atomico medio, più intenso è il segnale. Nell’immagine al microscopio elettronico, l’alta intensità del segnale si traduce in un’area di gradazione più chiara [3.2] [3.3].

La Figura 3.3 mostra una serie di immagini raccolte su una stessa superficie, in condizioni di lavoro diverse. La Figura 3.3(a) è ottenuta con elettroni secondari con accelerazione del fascio primario di 20 kV, in cui si notano molto chiaramente gli effetti del caricamento prodotti dall’utilizzo di elettroni primari ad alta energia (la nuvola bianca). La Figura 3.3(b) è stata fotografata utilizzando un voltaggio più basso per minimizzare tali effetti. Nella Figura 3.3(c) l’immagine è generata dagli elettroni retrodiffusi, in cui le diverse gradazioni di grigio corrispondono ad aree di diversa composizione chimica. È possibile, infatti, distinguere la matrice di Al, al

cui interno sono visibili la fase Mg (più chiara), e quella MgH₂ (più scura). Nelle prime due immagini il contrasto di colore, dovuto all'urto degli elettroni retrodiffusi con il rivelatore degli elettroni secondari, conferisce una risoluzione superiore alla terza figura. Riassumendo, con una velocità di scansione elevata posso visualizzare chiaramente il campione, in quanto il fascio di elettroni sosta limitatamente sulla zona di analisi, mentre con una bassa, posso acquisire immagini di elevata qualità.

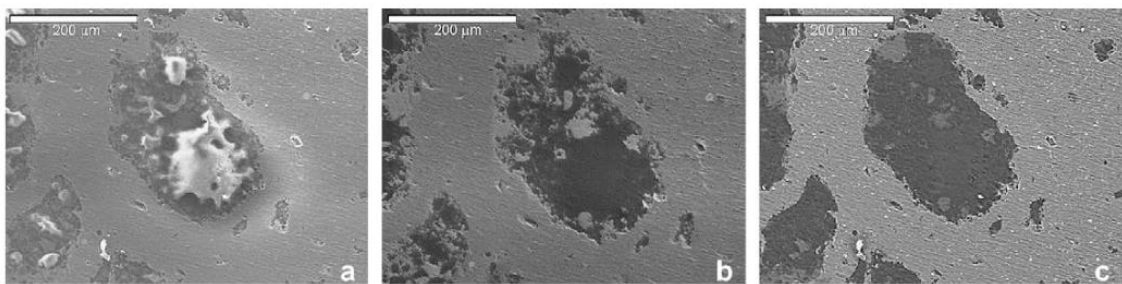


Figura 3.3: Immagini SEM di un agglomerato costituito da Mg e MgH₂ inglobato in una matrice Al

Precedentemente all'analisi, il campione deve essere preparato:

1. Selezione del campione: osservazione di una superficie di rottura oppure di una microstruttura interna;
2. Taglio: il campione deve essere delle dimensioni adatte per poter entrare nella camera del SEM, altrimenti rischierebbe di danneggiare i detector o la camera stessa;
3. Pulizia: il campione può essere pulito o tramite immersione in vaschetta ad ultrasuoni oppure utilizzando acetone. Un'ulteriore pulizia in alcol rimuove eventuali segni di solventi precedenti;
4. Inglobatura, assottigliamento ed attacco: per evidenziare la microstruttura dei metalli (Figura 3.4)



Figura 3.4: Esempio di provini inglobati

La tecnica dell'inglobatura può avvenire sia a caldo che a freddo e prevede di “inglobare” il provino, opportunamente tagliato, in resine per poter eseguire le successive fasi di preparazione più facilmente. Le resine sono di diverso tipo: trasparenti, opache e conduttive; queste ultime rappresentano una caratteristica fondamentale per l'analisi al SEM.

Mediante assottigliamento meccanico è possibile trattare il provino con carte abrasive al SiC di diverse granulometrie medie. Le carte sono classificate secondo una normativa internazionale, assegnando un numero che indica la densità media dei carburi di silicio per inch^2 (mesh). Minore è il numero riportato nella carta abrasiva minore è la densità di SiC, con conseguente aumento della grandezza media dei singoli carburi presenti. In sintesi, carte a bassa mesh producono solchi profondi e spessi, mentre carte con alta mesh graffiano la superficie del provino. È importante mantenere il campione sempre nella stessa direzione e ricordarsi di ruotarlo di 90° quando si cambia la carta, così da visualizzare sulla superficie i graffi e saperli collegare alla granulometria corretta.

Gli attacchi chimici ed elettrochimici risaltano i dettagli della microstruttura, attaccando selettivamente le discontinuità, con lo scopo di evidenziare alcuni siti preferenziali, come ad esempio i bordi di grano, creando un contrasto superficiale che permetta alla luce riflessa di sottolineare la morfologia dell'elemento. Permette di evidenziare bordi di grano, seconde fasi, strutture

allotropiche (martensite, ferrite, austenite), carburi, grafite, nel caso delle ghise, geminati, linee di flusso dovute al raffreddamento in fase di formatura del materiale, e soprattutto gli effetti di lavorazioni meccaniche, test di varia natura sulla microstruttura rispetto al materiale che non ha subito tali trattamenti. In generale gli attacchi chimici sono costituiti da un solvente (alcol metilico o etilico, acqua distillata etc.) e da uno o più acidi. Solitamente la durata dell'attacco chimico per un campione da analizzare al SEM è tipicamente inferiore, quindi più leggero, di quello necessario per l'osservazione al microscopio ottico.

Nella preparazione del campione bisogna tener conto anche del fenomeno dell'accumulo di carica che può compromettere il risultato dell'osservazione al SEM (Figura 3.5). Gli elettroni retrodiffusi, interagendo con il campione, perdono la loro energia e vengono assorbiti da quest'ultimo. Se un materiale è conduttivo, gli elettroni si disperdono in esso e poi nel porta-campioni. Nel caso invece di campione non conduttivo, gli elettroni si fermano nella zona d'interazione accumulandosi sulla superficie, che agisce come una trappola. Il fenomeno di accumulo viene definito "charging" (carica) che crea delle aree bianche sulla micrografia. Quando si verificano effetti di carica, la sonda elettronica che scansiona il campione subisce una deflessione, a causa della forza repulsiva, che crea nell'immagine una distorsione. Se la velocità di scansione è lenta, il fascio di elettroni rimane più a lungo nella zona di analisi e possono verificarsi effetti di scarica locale, tali per cui la sonda torna momentaneamente alla posizione iniziale.

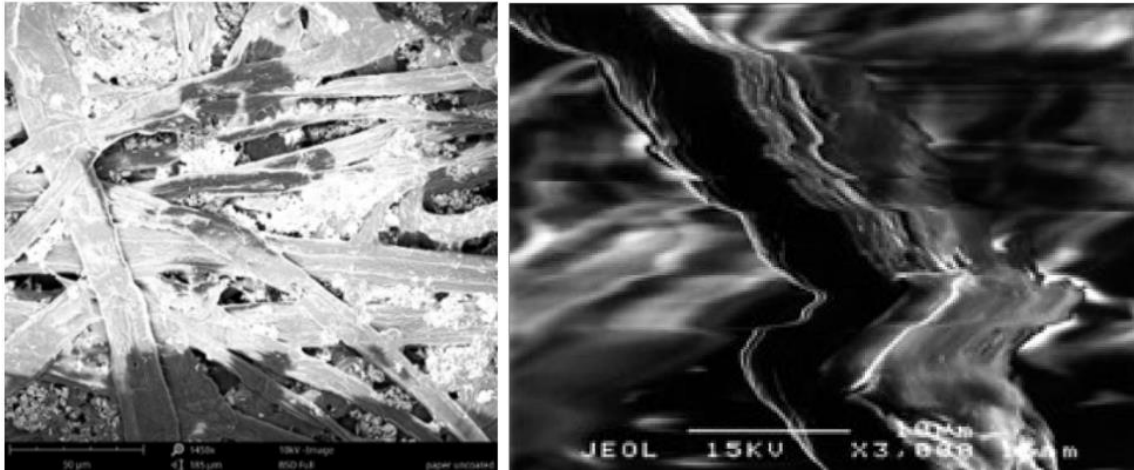


Figure 3.5: Esempi di problematiche relative all'accumulo di carica

Per risolvere il problema posso attuare diverse tecniche:

1. Metalizzazione (Figura 3.6): copertura del campione non conduttivo tramite deposizione di un sottile strato (10 nm al massimo) di materiale conduttivo come oro, carbonio, cromo etc. In una camera con basso vuoto viene immesso Ar. Gli ioni positivi di un metallo target vengono prodotti tramite scarica, ovvero riscaldando e vaporizzando il metallo e si depositano sul campione. L'alta tensione applicata tra il target (catodo) e la piattaforma del campione (anodo) forma un plasma gassoso. Gli ioni di Ar accelerano verso il target per colpirlo, il bombardamento erode il metallo ed estrae gli atomi che vengono diffusi dagli ioni Ar consentendo la loro deposizione omogenea sulla superficie del campione.
2. Bassa tensione di accelerazione: si riduce la quantità di elettroni che interagiscono con il campione.

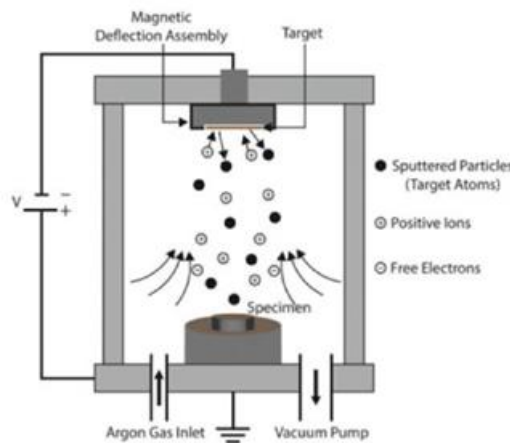


Figura 3.6: Metallizzazione

3. Montaggio appropriato (Figura 3.7): si utilizzano resine conduttive, come la bakelite, nella procedura di inglobamento dei campioni. Nel caso di campioni non omogenei, al posto dei dischetti adesivi di grafite, si possono utilizzare delle colle che permettono un miglior contatto campione-stub. Per ridurre ulteriormente il fenomeno dell'accumulo, è possibile realizzare con colle e nastri adesivi conduttivi, dei veri e propri "ponti conduttivi", ovvero delle tracce che vanno dalla superficie del campione allo stub.

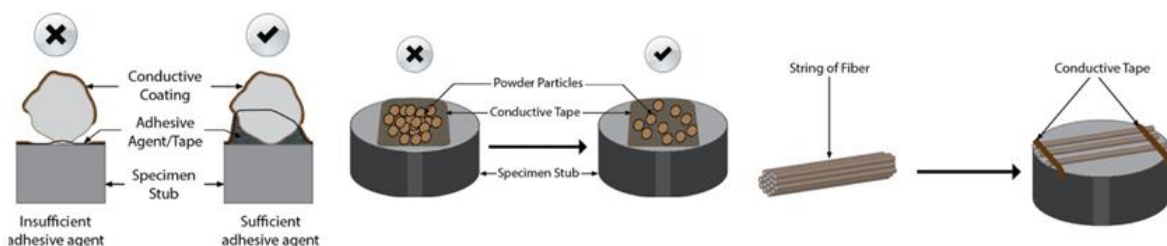


Figura 3.7: Esempi di montaggio appropriato per ridurre l'accumulo di carica

4. Aumentare la velocità di scansione: questa opzione, che in condizioni normali andrebbe evitata, potrebbe essere quella più indicata per catturare l'immagine nel caso di campioni non conduttivi perché la sonda elettronica sosta per minor tempo in ciascuna area.

5. Usare gli elettroni retrodiffusi (BSE): perché l'emissione degli elettroni retrodiffusi (BSE) non è fortemente disturbata dal cambiamento locale del potenziale sulla superficie del campione, a causa della elevata energia.

Nel microscopio elettronico a trasmissione (TEM, Figura 3.8) gli elettroni sono accelerati applicando un voltaggio molto alto, che ha un range da 100 kV a 3 MV. Questo perché l'immagine si forma raccogliendo gli elettroni trasmessi dal campione e quindi, devono avere energia a sufficienza per poterlo attraversare. Per consentire la "trasparenza elettronica" il campione deve avere spessori inferiori a 0,1 mm. Il fascio di elettroni è generato da una sorgente che si trova sulla testa della colonna. Una serie di lenti magnetiche consente di ridurre la sezione del fascio di elettroni, di focalizzarlo sul campione e, una volta attraversato, di indirizzarli su uno schermo fluorescente. In questo modo gli elettroni proiettano su di esso un'immagine reale e fortemente ingrandita della porzione di campione precedentemente attraversata. Per capire come si forma l'immagine al TEM è necessario richiamare il concetto di diffrazione. In un reticolo cristallino i fasci di elettroni vengono riflessi da ogni piano atomico.

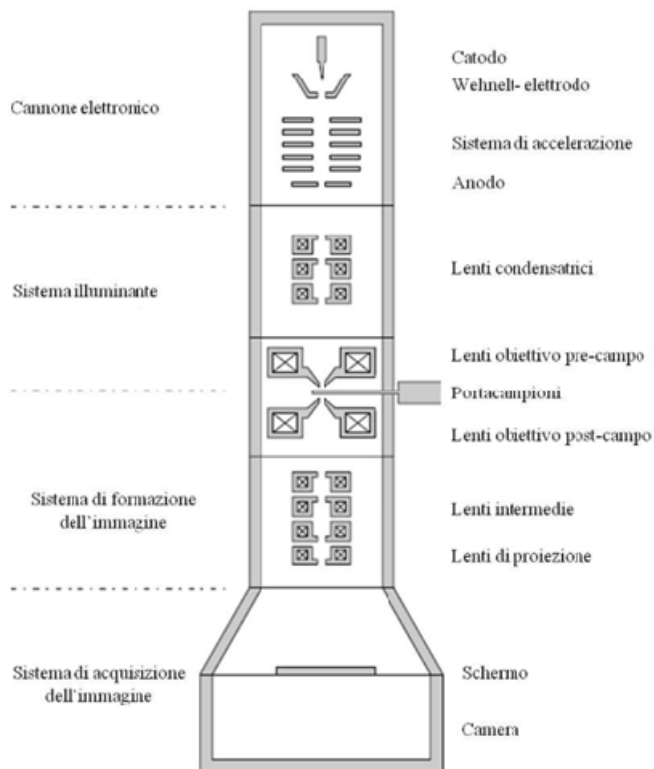


Figura 3.8: Schema colonna del TEM

I fasci a loro volta interferiscono costruttivamente soltanto se è verificata la legge di Bragg: $n\lambda = 2d\sin\theta$, in cui d è la distanza tra i piani atomici, θ è l'angolo di incidenza e di riflessione e λ è la lunghezza d'onda associata all'energia dell'elettrone incidente. L'angolo tra il raggio incidente e quello diffratto è denominato angolo di diffrazione e vale 2θ . Quando il fascio di elettroni incide sul campione, una parte procede senza subire diffrazione, l'altra viene invece diffratta. Il raggio trasmesso viene focalizzato dalle lenti obiettivo nel punto (a) e prosegue formando l'immagine sul piano I2. Il raggio diffratto è focalizzato dalle lenti obiettivo e forma uno spot di diffrazione b sul piano I1. Proseguendo, il fascio forma un'immagine sul piano I2 che si sovrappone a quella generata dal fascio diretto. Poiché in un cristallo i piani hanno diverse orientazioni, ognuno causerà la diffrazione del raggio di elettroni e darà luogo ad uno spot di diffrazione.

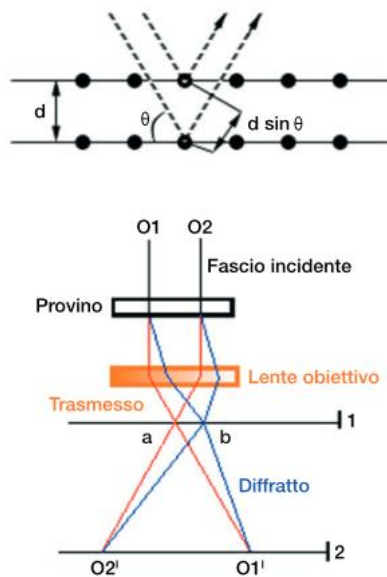


Figura 3.9: (in alto) Rappresentazione della legge di Bragg; (in basso) Schema di funzionamento del TEM

L'insieme degli spot di diffrazione origina un pattern di diffrazione. Questo, possedendo le stesse simmetrie del reticolo cristallino, permette di risalire alla struttura cristallina del campione e di calcolare le distanze interplanari.

Il sistema di lenti consente di visualizzare sullo schermo dello strumento sia il pattern di diffrazione che l'immagine del campione. Per formare l'immagine del campione si può scegliere di utilizzare il fascio trasmesso oppure il fascio diffratto da una famiglia di piani. L'immagine originata dal fascio trasmesso è detta "in campo chiaro", mentre quella da un fascio diffratto è detta "in campo scuro". Il diaframma sul piano I1 ha lo scopo di selezionare il fascio utilizzato per produrre l'immagine. La diffrazione di Bragg in sé non produce un'immagine, ma gioca un ruolo fondamentale nel contrasto dell'immagine stessa. Ciò significa che è in grado di determinare l'intensità locale, in quanto riduce l'intensità del fascio primario nelle zone che sono orientate in modo corretto per avere diffrazione. Questo tipo di contrasto è chiamato "contrasto di diffrazione". Poiché il contrasto dipende

dall'angolo con cui il fascio incide sul campione, il porta-campioni del TEM permette di ruotare il campione per selezionare le diffrazioni e, pertanto di evidenziare i particolari che interessano.

L'analisi di un materiale al TEM consente di verificare se un campione è a cristallo singolo, policristallino o amorfo.

L'altissima risoluzione e capacità di ingrandimento, che è possibile raggiungere, consentono di visualizzare i dettagli del reticolo e di studiarne le caratteristiche, quali la presenza di dislocazioni, precipitati, bordi grano, così come di distinguere diverse fasi [3.2].

Come nel caso del microscopio a scansione elettronica, anche per l'osservazione al TEM il campione dovrà essere preparato accuratamente. In questo caso il campione TEM è un disco da 3 mm di diametro o un pezzo più piccolo fissato su una griglia avente diametro di 3 mm per facilitarne l'uso; il disco spesso ai bordi (circa 70 micron per la manipolazione) e di solito ha un foro in prossimità del centro. Lo spessore non è omogeneo per evitare che in fase di incollaggio sul supporto possa rompersi. Per assottigliare il campione ci sono diverse tecniche: assottigliamento meccanico (tradizionale, per la maggior parte legato alle capacità dell'operatore), elettrochimico e con fascio ionico (si ottengono lamelle sottili che non necessitano del foro centrale).

Le tecniche analitiche sono fondamentali per la caratterizzazione dei materiali perché consentono di ottenere informazioni riguardo la composizione chimica e sulla natura dei legami chimici. Le più ampiamente utilizzate sono le spettroscopie elettroniche, perché spesso la strumentazione è incorporata all'interno dei microscopi elettronici.

Lo spettrometro a dispersione di energia (EDS) è generalmente integrato nel microscopio elettronico, sia esso TEM o SEM, perché offre l'enorme vantaggio di poter determinare la composizione locale dei materiali osservati al microscopio, attraverso un'analisi qualitativa e quantitativa puntuale. La microanalisi a raggi X fornisce informazioni specifiche circa la composizione degli elementi del campione, in termini di quantità e distribuzione. Il fascio elettronico che investe il campione durante un'osservazione al SEM promuove la ionizzazione degli elettroni che appartengono agli orbitali più interni dell'atomo. Dal rilassamento che ne consegue, vengono emessi dei raggi X che sono caratteristici dell'atomo da cui scaturiscono e, quindi, degli elementi che compongono il campione. Questi raggi X opportunamente registrati e discriminati sulla base della loro lunghezza d'onda o energia, consentono di determinare la composizione elementare del materiale analizzato, nella regione in cui è posizionata la sonda. Inoltre, l'intensità di queste radiazioni caratteristiche è proporzionale alla concentrazione dell'elemento nel campione, da cui è possibile ottenere anche un'analisi semi-quantitativa. Lo spettro si presenta come una serie di picchi la cui posizione e altezza relativa è caratteristica di un dato elemento. Materiali composti produrranno spettri EDS, i quali rappresentano la convoluzione delle righe caratteristiche degli elementi che li costituiscono. L'EDS (Figura 3.10) viene generalmente usato a supporto dell'osservazione dei campioni con elettroni retrodiffusi, per determinare la composizione chimica elementare delle aree che nell'immagine SEM-BSE mostrano un contrasto di colore in scala di grigio. Con speciali software è possibile realizzare le mappature per ogni singolo elemento che costituisce il campione. Al singolo pixel dell'immagine corrisponde un punto sulla superficie del campione dal quale è stato raccolto il segnale. La gradazione

di colore è indice del numero di conteggi dei fotoni provenienti da tale punto caratteristici dell'elemento selezionato [3.2].

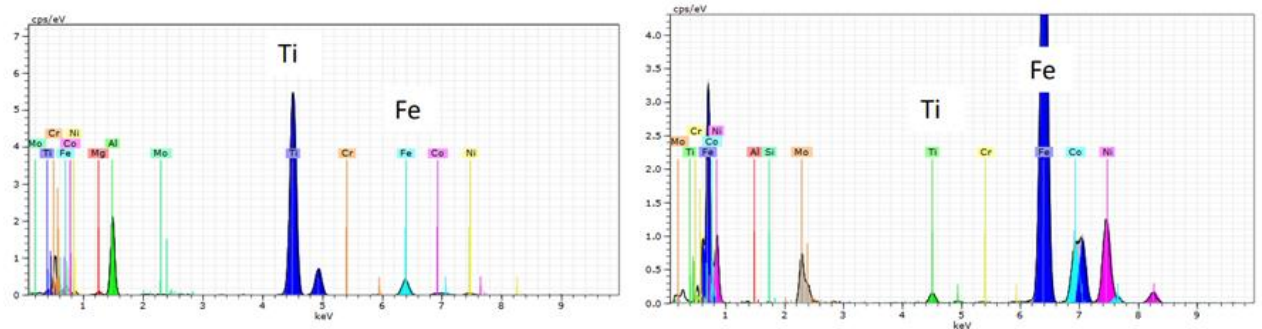


Figura 3.10: Esempi analisi qualitativa EDS di un Acciaio Maraging

La diffrazione di raggi X è generalmente impiegata per determinare la struttura cristallina dei materiali. Il fenomeno della diffrazione si verifica quando la radiazione elettromagnetica attraversa una serie di piani cristallini regolari, la cui distanza è dello stesso ordine di grandezza della lunghezza d'onda della radiazione incidente. I raggi X soddisfano tale condizione e così vengono diffratti dal reticolo cristallino secondo la Legge di Bragg. Identificando i picchi nello spettro che ne risulta, è possibile individuare le specie cristalline presenti e stabilire se nel materiale ci sono una o più fasi cristallografiche. La dimensione dei cristalli può essere determinata attraverso l'equazione di Scherrer: $L = \frac{C\lambda}{\beta \cos \theta}$, in cui C indica una costante prossima ad 1, λ la lunghezza d'onda della radiazione incidente, β l'allargamento del picco calcolato a metà altezza e θ l'angolo di Bragg. Lo spostamento dei picchi rispetto ai valori tabulati per una determinata fase fornisce una misura dello stress cristallino e, di conseguenza, della sua deformazione [3.2].

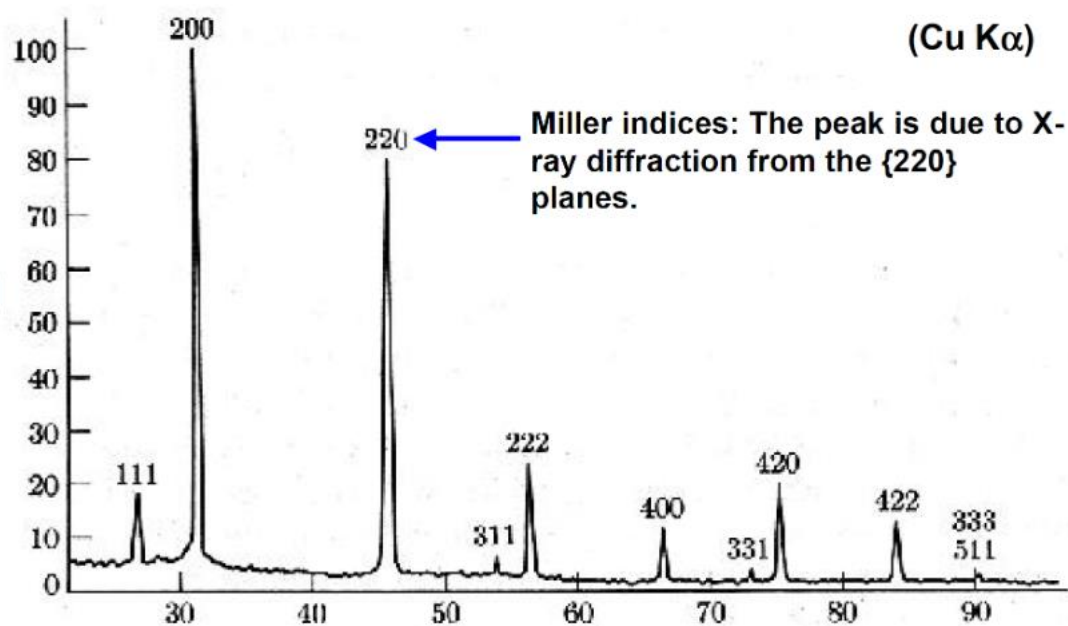


Figura 3.11: Pattern di diffrazione della polvere di NaCl (angolo di diffrazione di 2 θ)

Pertanto, si può affermare che la selezione delle tecniche di caratterizzazione più appropriate è strettamente correlata alla tipologia di materiale in esame e al tipo di informazioni che si intendono ricavare, quali i dettagli e le proprietà microscopiche [3.2].

BIBLIOGRAFIA

[3.1] <https://aec-analisiecalcolo.it/notizie/167-/>

[3.2] A. Montone, A. Aurora, G. Di Girolamo, Caratterizzazione dei nanomateriali, ENEA Unità Tecnologie dei Materiali (2015), pagine 93-104.
<https://www.enea.it/it/seguici/pubblicazioni/pdf-eai/1-2anno2015/22-caratterizzazione-dei-nanomateriali.pdf>

[3.3] <http://paduaresearch.cab.unipd.it/4486/1/BinderMarin.pdf>

CAPITOLO 4

PROCEDURA SPERIMENTALE E RISULTATI

▪ TIPOLOGIE DI CAMPIONI ANALIZZATI

Nel mio studio mi sono occupato di scaffold in graded lattice ovvero, scaffold costituiti da celle elementari che, ripetendosi nelle tre direzioni, cambiano di dimensione. Pertanto, è possibile customizzare maggiormente le proprietà meccaniche e biologiche dello scaffold, in base alle caratteristiche necessarie per la singola applicazione finale. Esistono, inoltre, scaffold in lattice, ovvero che sono formati da una cella elementare unitaria che si ripete per tutto il volume.

Per distinguere le due tipologie di scaffolds in esame, questi sono stati identificati come: DENS-IN (Figura 4.1) e DENS-OUT (Figura 4.2). Con DENS-IN indichiamo uno scaffold in cui la distribuzione di materiale è maggiore all'interno dello stesso, mentre proseguendo all'esterno la densità diminuisce. Al contrario nel DENS-OUT ho una distribuzione maggiore di materiale all'esterno dello scaffold rispetto allo spazio interno. Gli scaffolds, di dimensioni 10x10x10 mm, sono stati realizzati in acciaio 316L, hanno un'elevata biocompatibilità ed un basso costo.

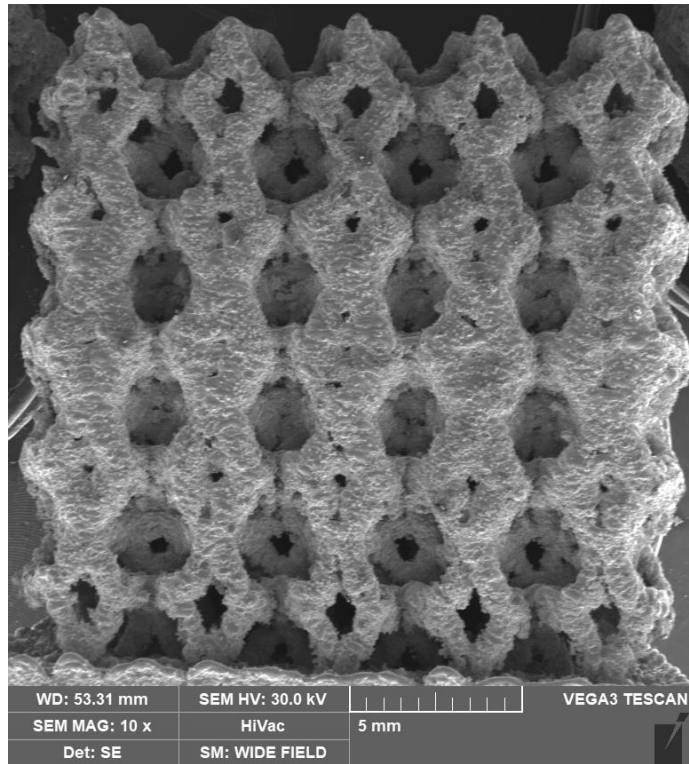


Figura 4.1: Scaffold DENS-IN

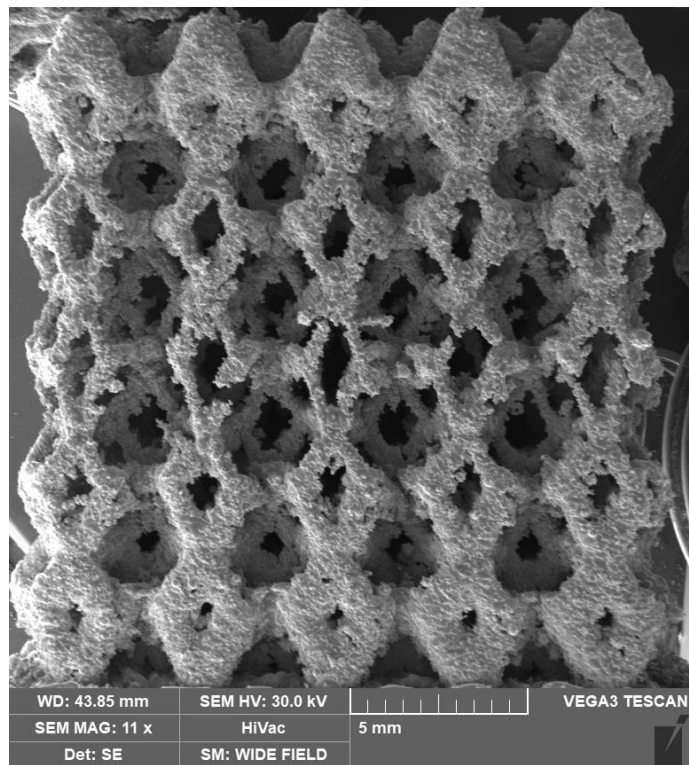


Figura 4.2: Scaffold DENS-OUT

Gli scaffold caratterizzati nel presente lavoro di tesi sono stati prodotti mediante Laser Powder Bed Fusion (LPBF) dall'azienda italiana 3D4MEC s.r.l. di Sasso Marconi (BO). La polvere è stata fornita dall'azienda britannica Carpenter Additive (UK).

In particolare, il presente studio si è focalizzato sul core dello scaffold, che è critico sia dal punto di vista biologico che meccanico. Nel primo caso, nel momento in cui le cellule colonizzano lo scaffold, sono soggette al fenomeno dello spreading, che consiste nell'allungamento del citoscheletro (il citoscheletro è un insieme di strutture cellulari che formano una rete tridimensionale di tubuli e filamenti); ciò permette alle cellule di aderire alla superficie.

Il fenomeno è influenzato dalla geometria dello scaffold in quanto, nel caso in cui il terreno di coltura non sia in grado di permeare al suo interno, all'aumentare delle cellule, diminuirà la superficie su cui queste possono crescere, conseguendone la necrosi del tessuto organico.

Per questo i pori devono essere abbastanza grandi da permettere ai nutrienti di raggiungere il centro del supporto; tuttavia, ad un'eccessiva grandezza del poro corrisponde una perdita delle proprietà meccaniche. Le proprietà meccaniche degli scaffold non sono in ogni caso oggetto del presente lavoro di tirocinio e tesi.

Lo scopo dell'elaborato è quello di comparare la dimensione degli struts (gli struts rappresentano lo spessore di materiale tra due porosità vicine) e dei pori delle strutture DENS-IN e DENS-OUT. Gli struts variano su piani paralleli ed hanno dimensioni di 0,25 mm; 0,50 mm; 0,75 mm (Figure 4.3 -

4.4). Sono simmetrici su piani paralleli, perpendicolari rispetto all'asse Z di costruzione, e progressivi; a seconda che si tratti di DENS-IN o DENS-OUT.

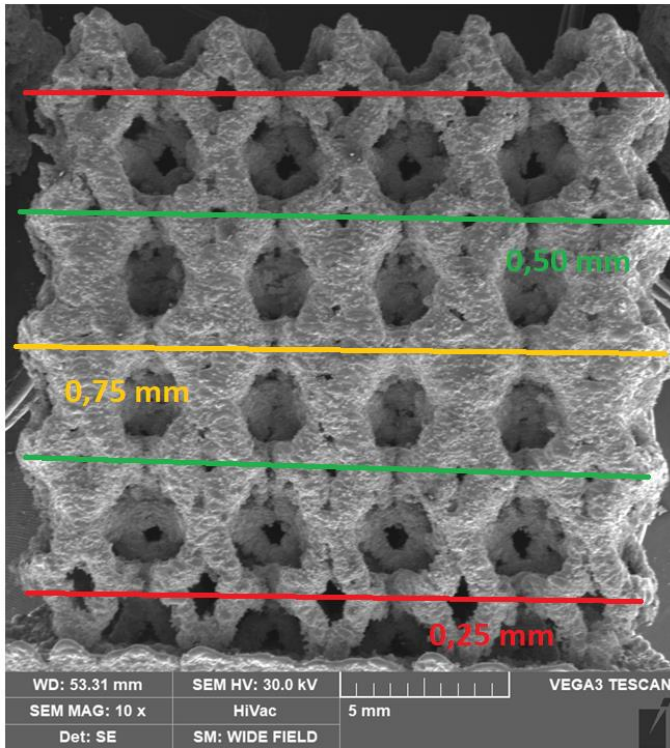


Figura 4.3: Struts DENS-IN

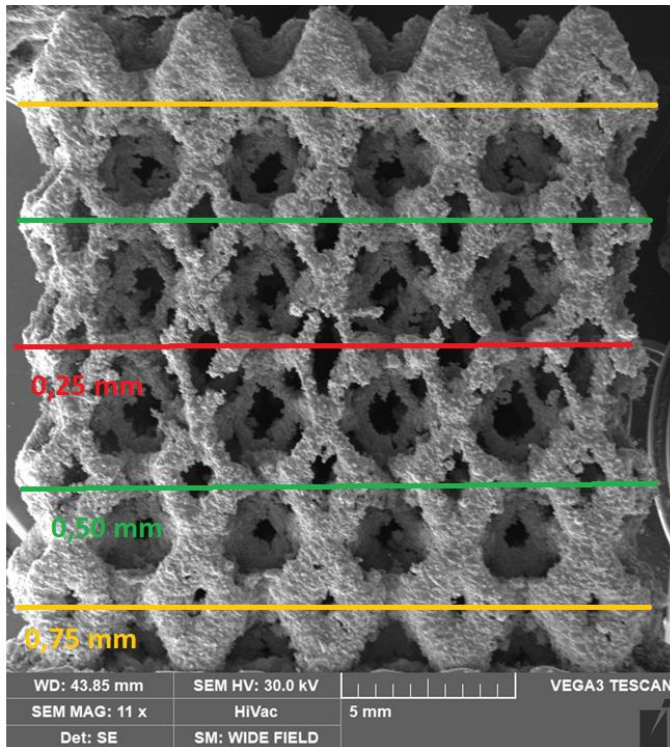


Figura 4.4: Struts DENS-OUT

▪ PROCEDURA DI PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Dopo essere stati realizzati, gli scaffolds hanno subito un trattamento di pulitura mediante immersione in un bagno di acetone ad ultrasuoni, per facilitare l'espulsione della polvere in eccesso. L'operazione è durata circa 1 ora e successivamente sono stati asciugati con la pistola ad aria compressa.

Il presente studio si è focalizzato sul core dello scaffold e per questo è stato necessario tagliarlo a metà (Figura 4.5), ad un'altezza di 5 mm, essendo il SEM una misura distruttiva. Contrariamente il tomografo esegue una misurazione di volume. La procedura, inoltre, è utile per verificare che la geometria ideata in fase di progettazione sia stata rispettata, per validare la geometria dello scaffold ed i parametri di stampa. Ciò ha anche un riscontro del punto di vista biologico, essendo la zona del core la più critica da far

colonizzare alle cellule. L'operazione del taglio è avvenuta posizionando lo scaffold in una morsetta di teflon, per mantenerla ben salda durante il processo, e posizionando dei pesi al di sopra della lama (Figura 4.6).

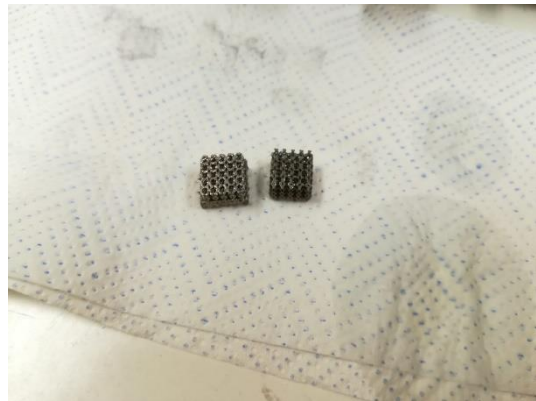


Figura 4.5: (a sinistra) Operazione di taglio scaffold; (a destra) Scaffold tagliato



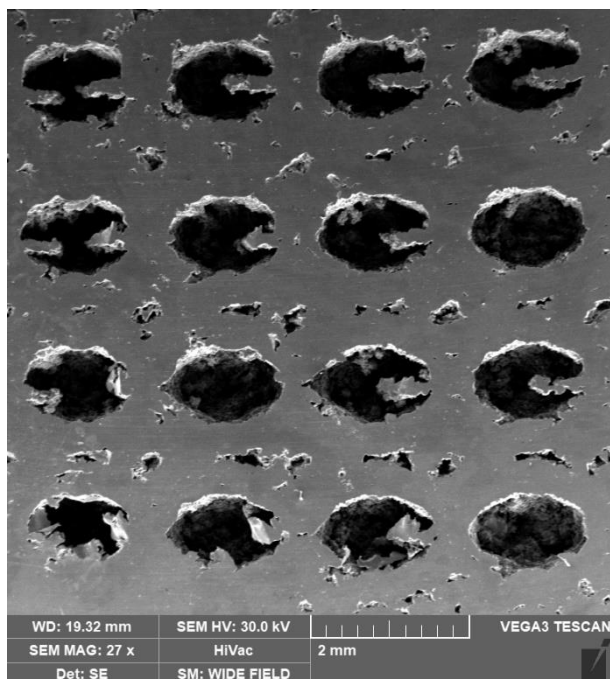
Figura 4.6: (a sinistra) Supporto in teflon; (a destra) Pesì per il taglio

Infine, gli scaffolds sono stati lappati con carta da 400 grit e 600 grit, in modo tale da evidenziare la morfologia, ripulendo la superficie da eventuali scarti di lavorazione.

Non hanno subito trattamento di metallizzazione e sono stati fissati allo stub mediante bi-adesivo in carbonio.

▪ RISULTATI

Con non poche difficoltà, grazie all'aiuto della Dott.ssa Maria Laura Gatto, abbiamo analizzato gli scaffold al SEM, ottenendo 6 micrografie; 3 per ogni tipologia di scaffold.



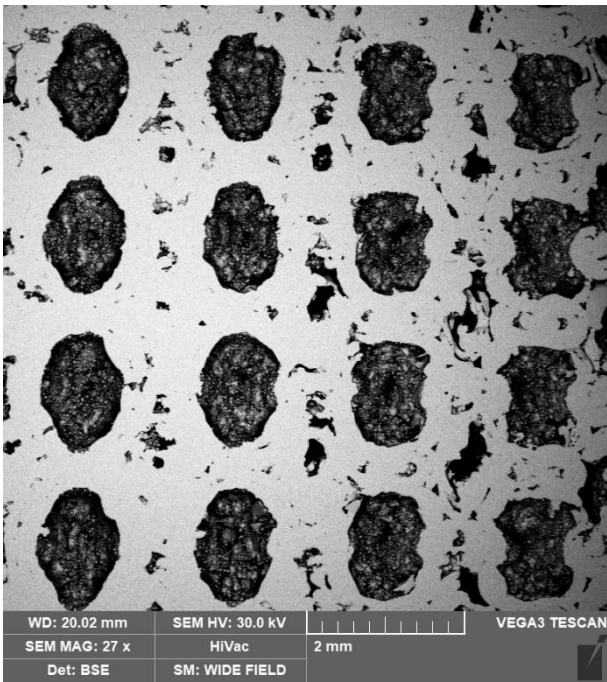
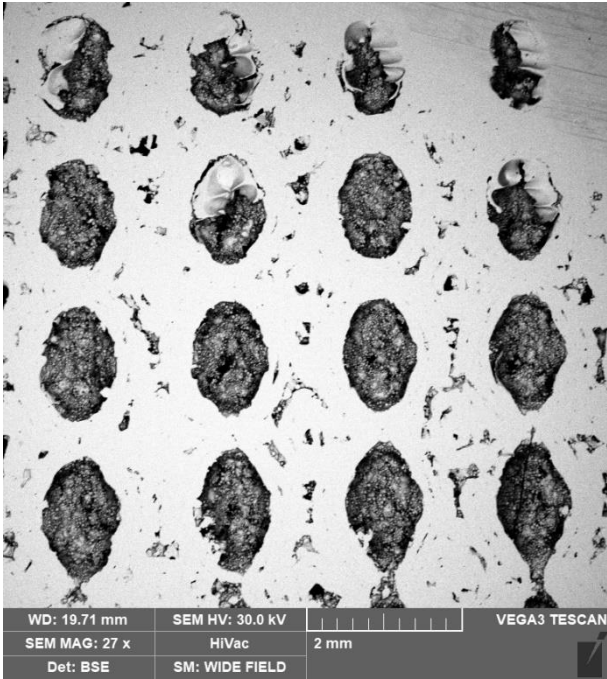


Figura 4.7: (in ordine) Micrografie DENS-IN 1;2;3

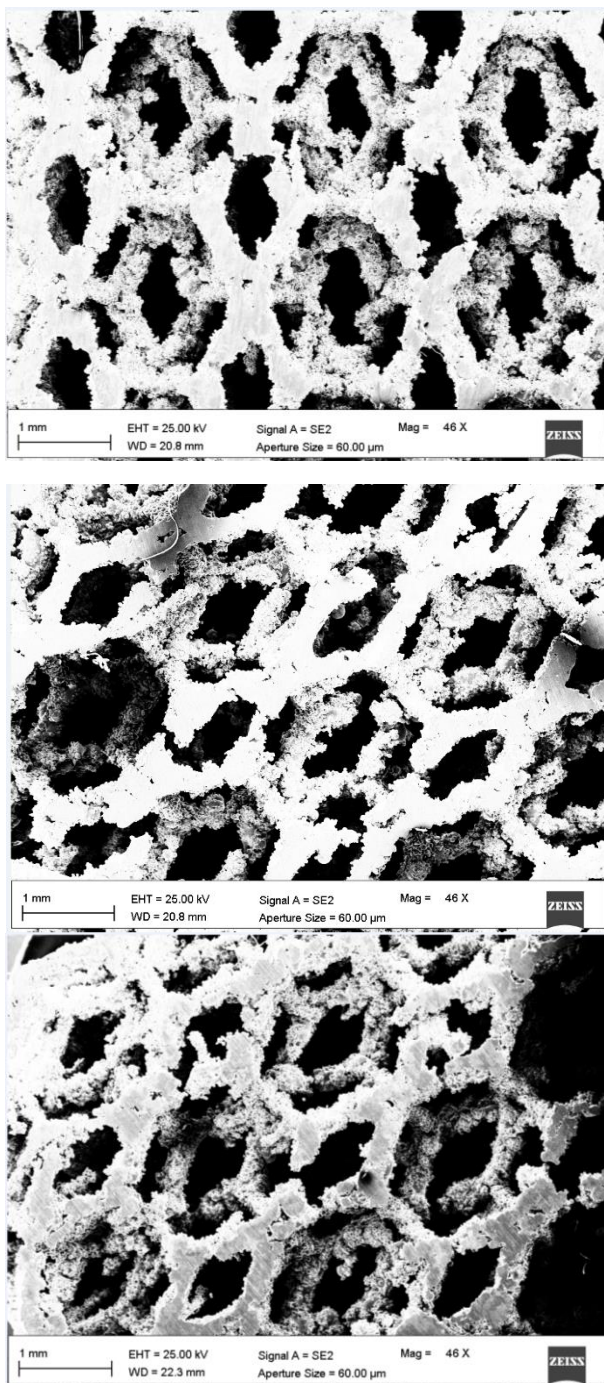


Figura 4.8: (in ordine) Micrografie DENS-OUT 1;2;3

Osservando le micrografie, sono ben visibili le particelle di polvere parzialmente fuse, che influenzano la rugosità dello scaffold. Questo problema è dovuto da un'impresione che la macchina ha avuto nel processo di stampa, a causa di un errore software. Nel momento in cui la piattaforma

era in movimento, il laser continuava, in parte, a fondere la polvere (ritardo di switch off).

Una volta ottenute le micrografie, queste sono state analizzate con il software Imagej che è programma di elaborazione digitale delle immagini, rilasciato nel pubblico dominio, basato su Sun-Java, e sviluppato dal National Institutes of Health degli Stati Uniti. Imagej è stato progettato con un'open architecture che prevede la possibilità di avere delle estensioni tramite piccoli sottoprogrammi "plugin Java" e molte macro-registrabili.

Ho quindi binarizzato le micrografie, e tramite il comando "Analyze Particles" ho trovato il numero di pori e calcolato la dimensione.

Infine, i risultati sono stati rielaborati mediante il software excel.

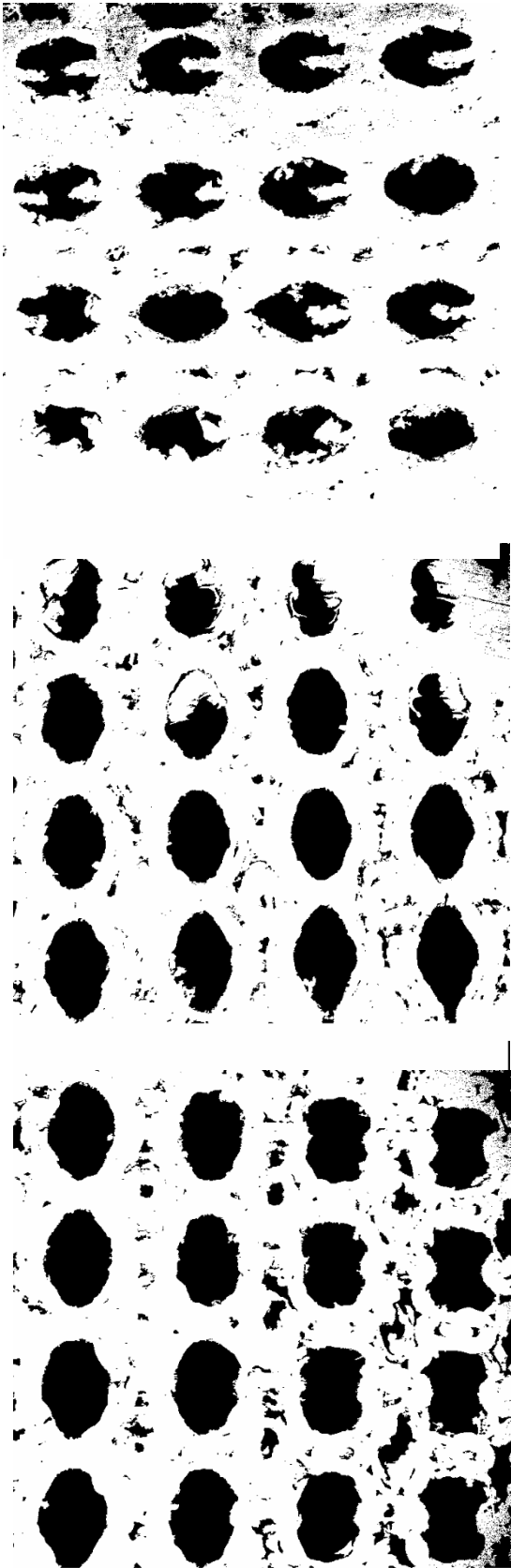


Figura 4.9: Micrografie binarizzate DENS-IN

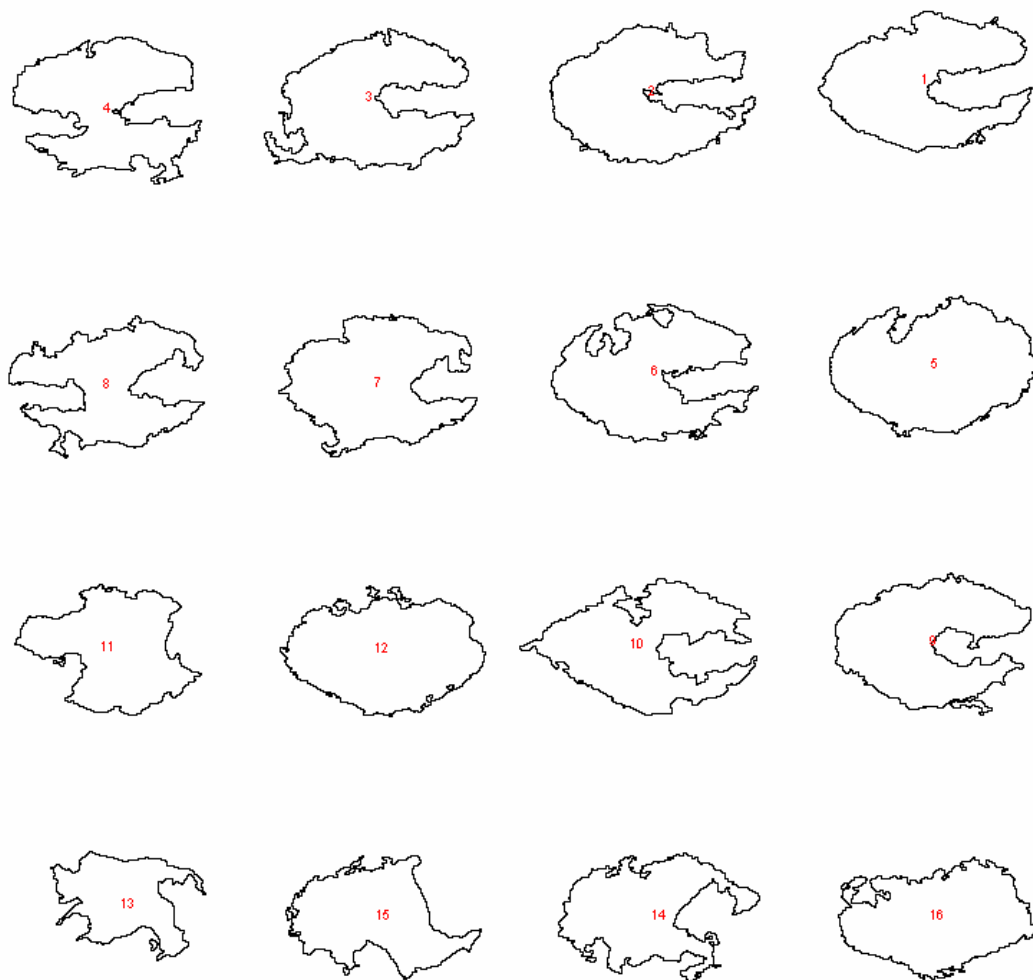


Figura 4.10: Risultato analisi micrografie DENS-IN 1

In figura 4.10 è ben evidente il risultato dell'analisi. Il programma è riuscito perfettamente a delineare i pori ed a conteggiarli.

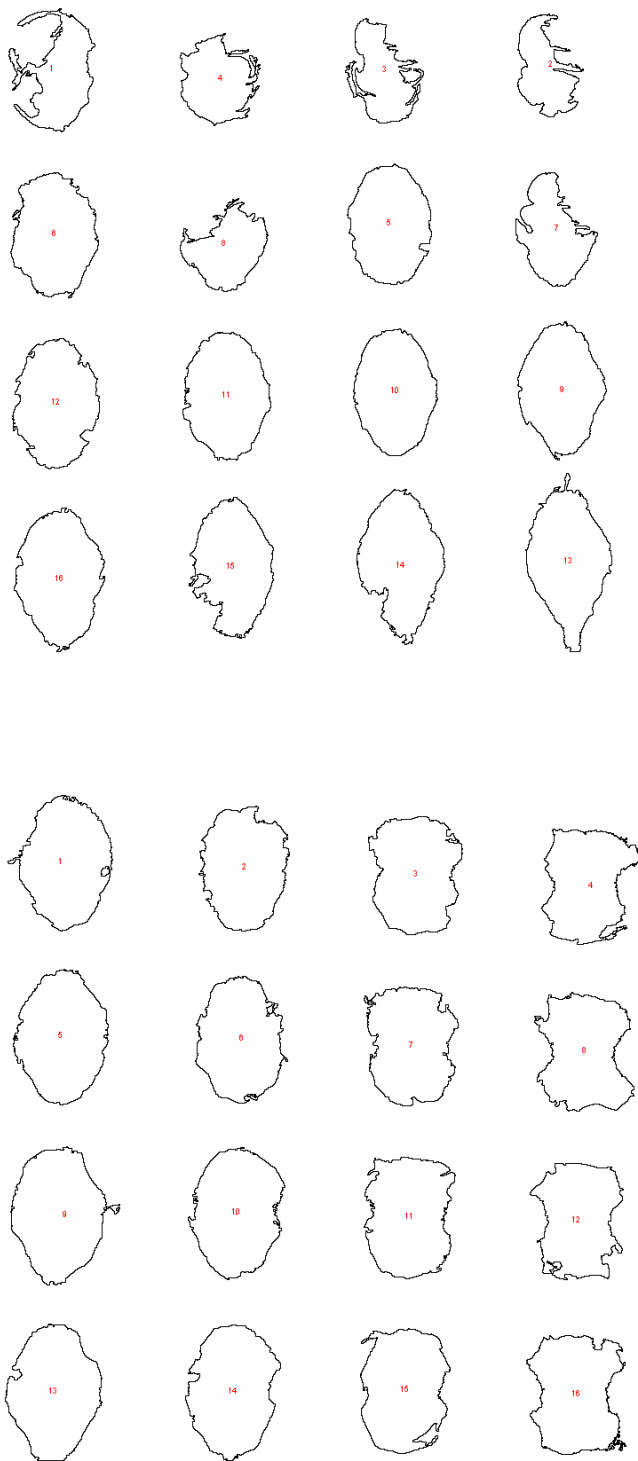


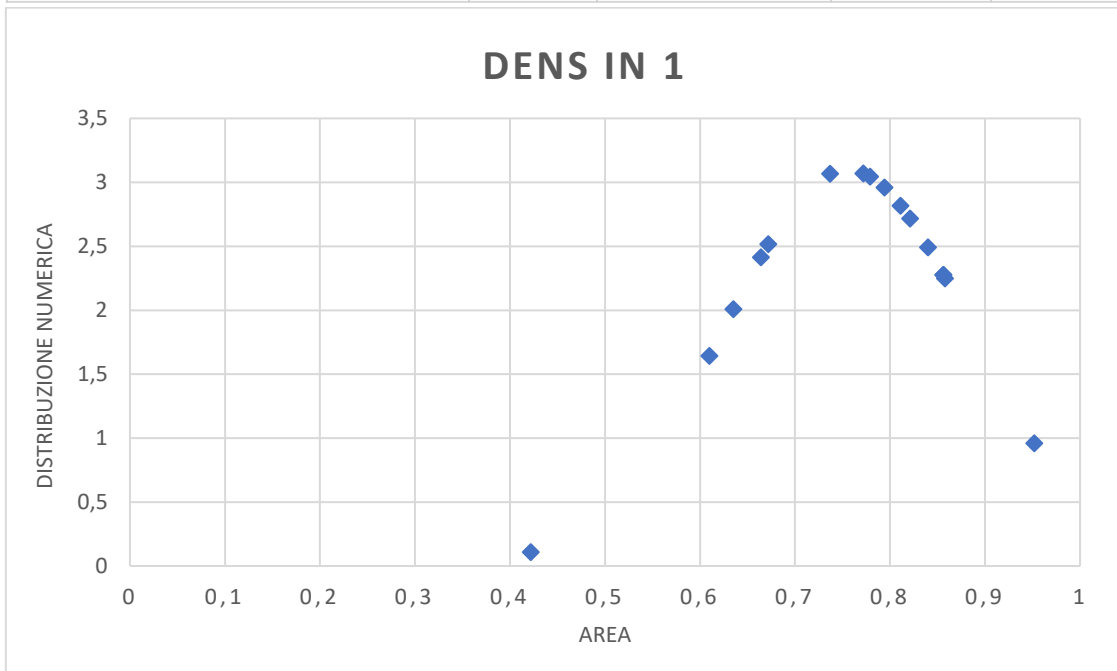
Figura 4.11: (sopra) Risultato micrografia DENS-IN 2; (sotto) Risultato micrografia DENS-IN 3

I risultati che ho ottenuto sono:

- DENS-IN 1:

Fori	Area (mm ²)
1	0,856
2	0,856
3	0,858
4	0,779
5	0,952
6	0,794
7	0,821
8	0,672
9	0,811
10	0,772
11	0,664
12	0,84
13	0,422
14	0,635
15	0,61
16	0,737
	Area media fori (mm ²)
Area totale (mm ²)	12,079
	0,755

Slice	Count	Total Area (mm ²)	Average Size	%Area
dense-in valutazione pori e struts 1.tif	16	12,077	0,755	18,191

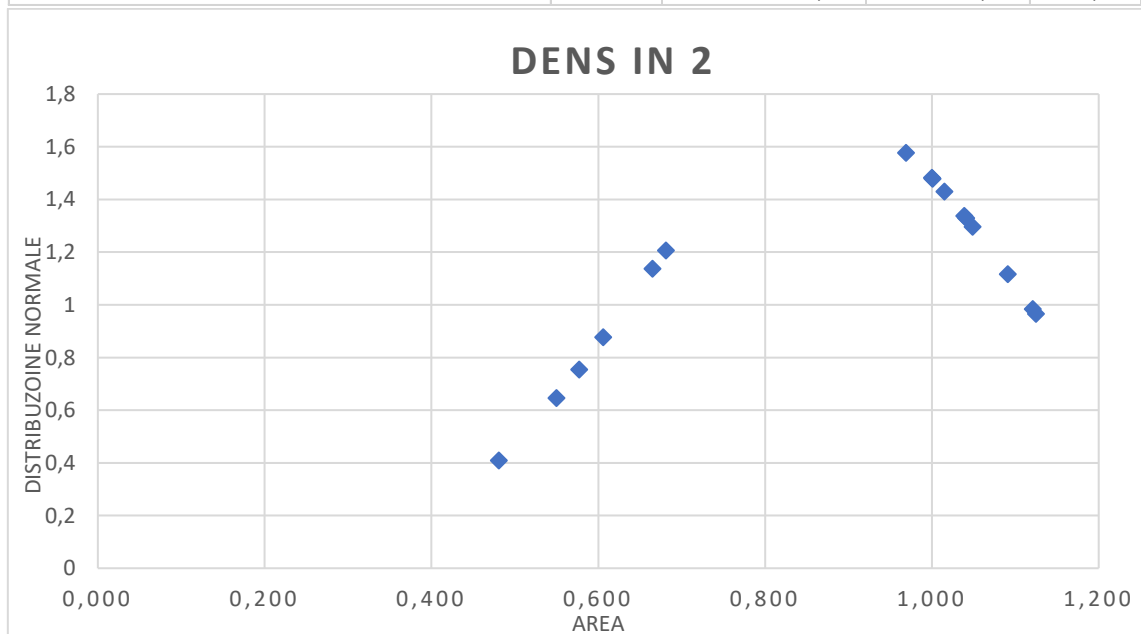


- DENS-IN 2:

Foro	Area (mm ²)
1	0,681
2	0,481
3	0,550
4	0,606
5	0,969
6	1,015
7	0,665
8	0,577
9	1,039
10	1,000
11	1,049
12	1,041
13	1,121
14	1,091
15	1,001
16	1,125

		Area media foro (mm ²)
Area totale fori (mm ²)	14,011	0,876

Slice	Count	Total Area (mm ²)	Average Size	%Area
DENSE IN 2	16	14,011	0,876	20,945

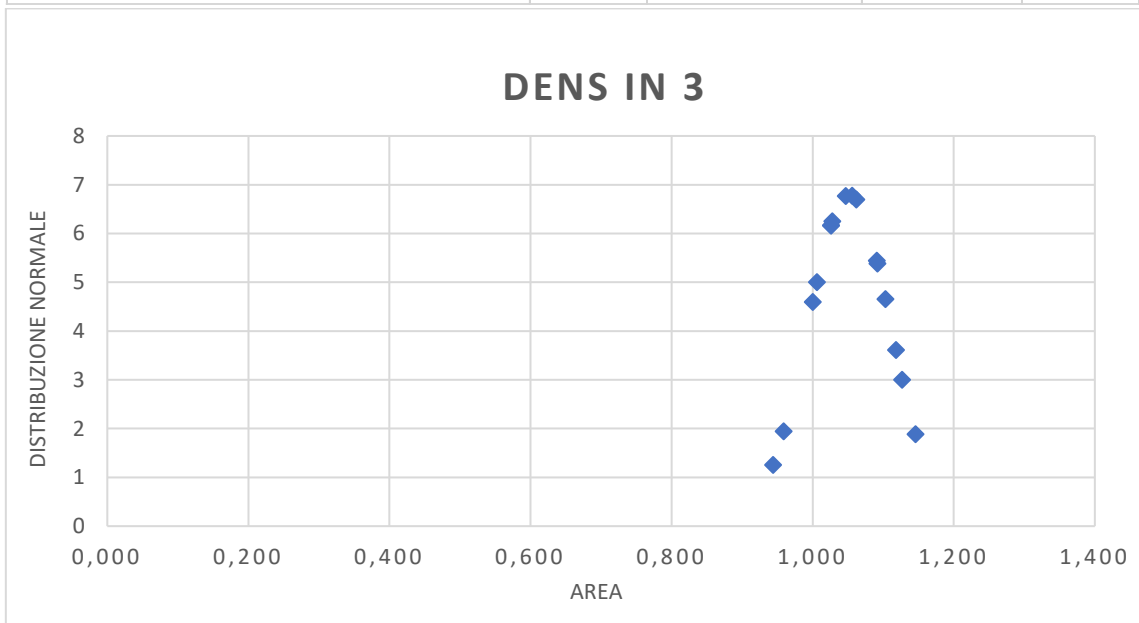


- DENS-IN 3:

Fori	Area (mm ²)
1	1,092
2	1,000
3	1,028
4	0,959
5	1,118
6	1,006
7	1,026
8	1,026
9	1,146
10	1,091
11	1,062
12	0,944
13	1,127
14	1,103
15	1,047
16	1,056

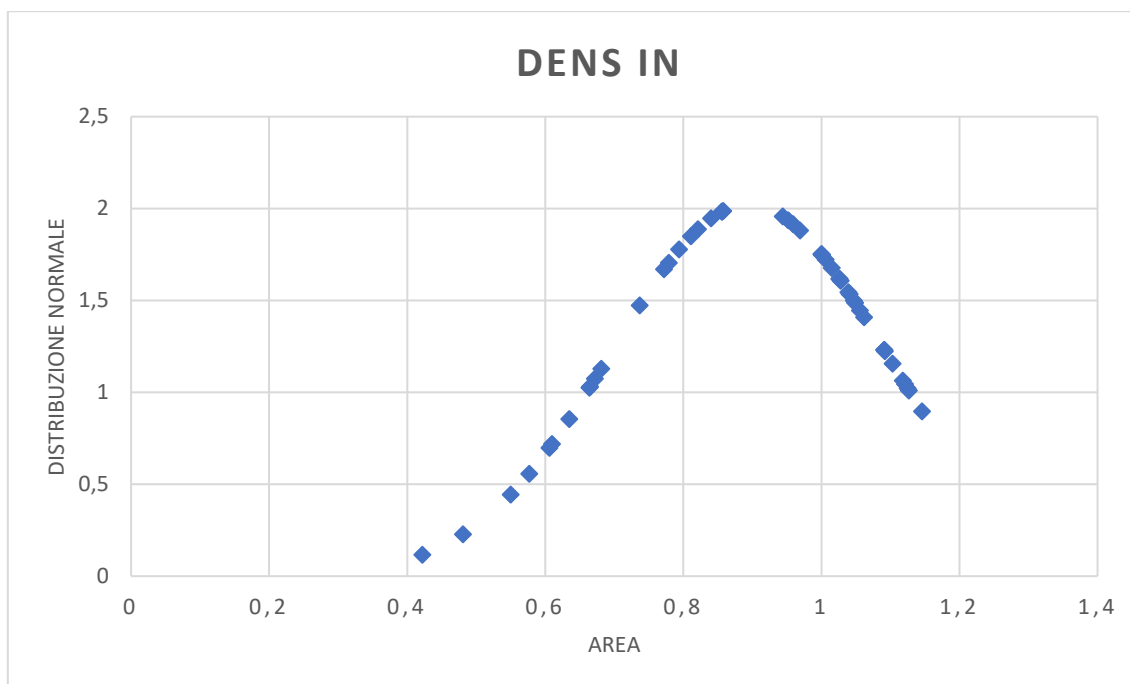
	Area media foro (mm ²)
Area totale fori (mm ²)	16,831
	1,052

Slice	Count	Total Area (mm ²)	Average Size	%Area
DENSE IN 3.tif	16	16,830	1,052	26,443



Conoscendo le aree dei pori dei tre scaffold, ho calcolato l'area media e ne ho ricavato la distribuzione normale:

area media (mm ²)
0,8941875



Ho ripetuto lo stesso procedimento per le micrografie DENS-OUT, ottenendo:

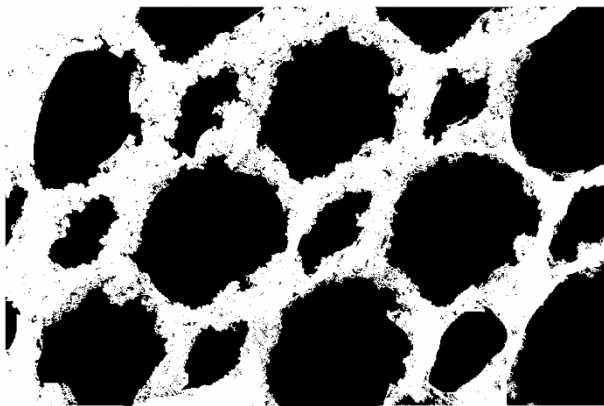
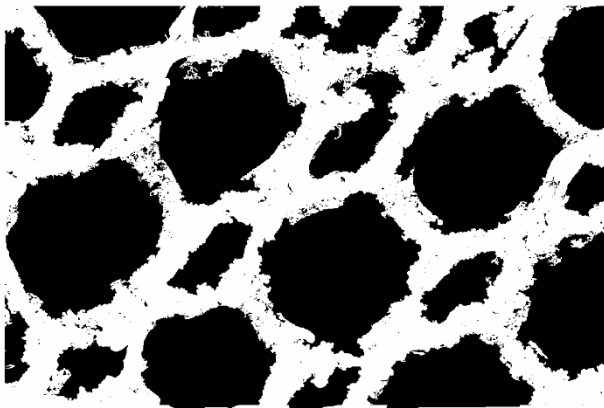
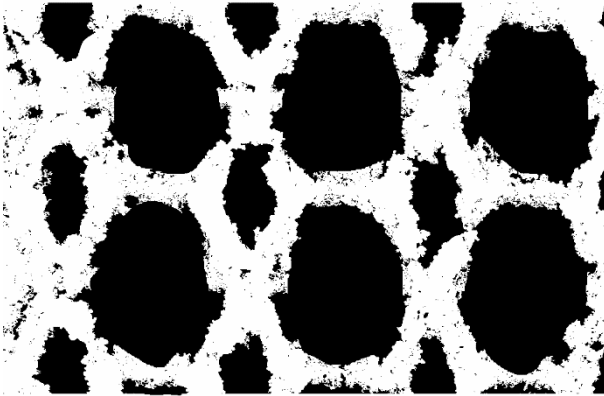
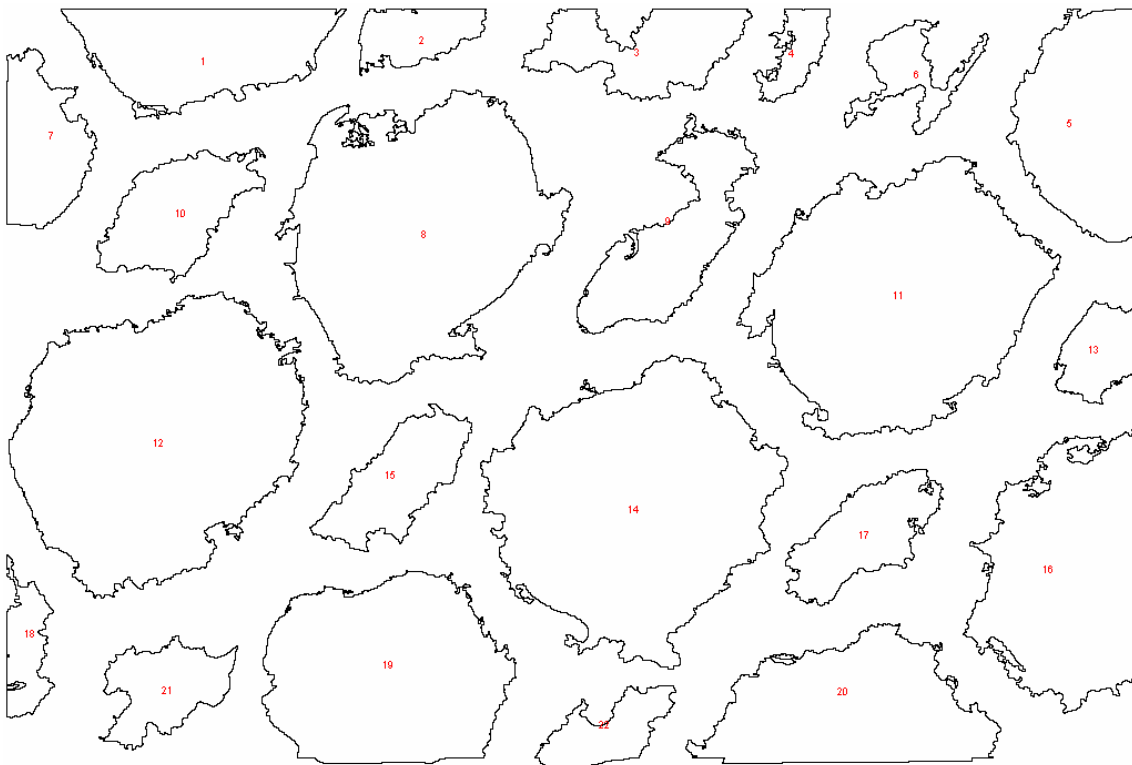
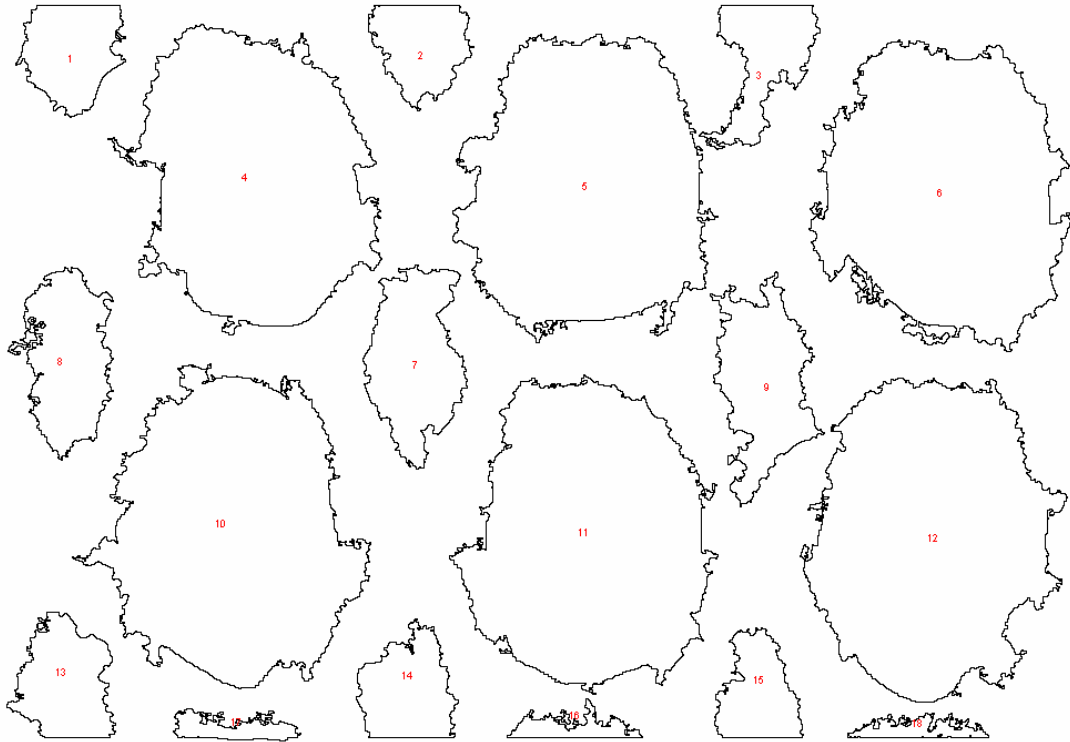


Figura 4.12: (in ordine) Micrografie binarizzate DENS-OUT 1;2;3



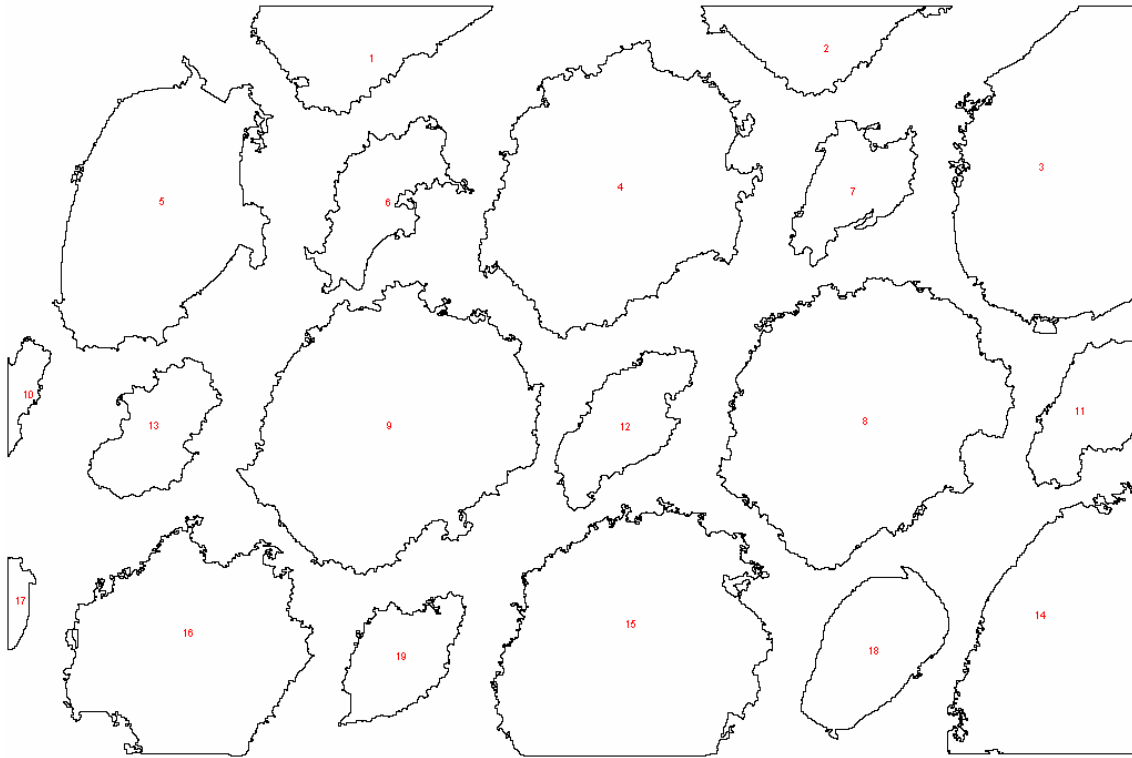


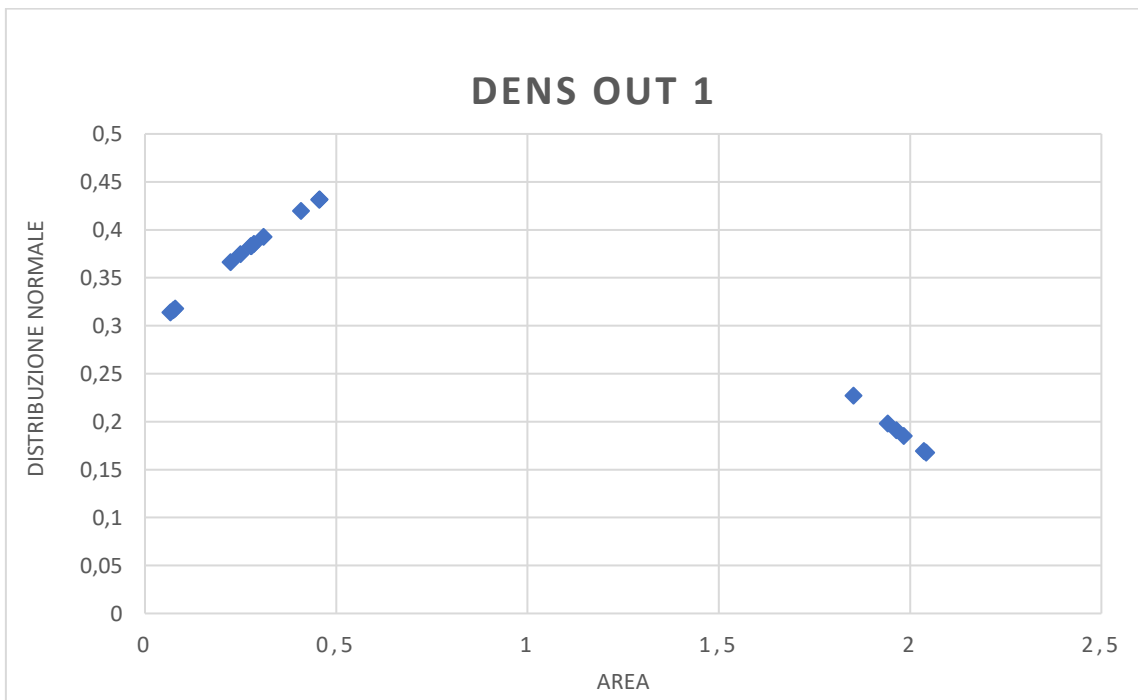
Figura 4.13: (in ordine) Risultato micrografie DENS-OUT 1;2;3

I risultati che ho ottenuto sono:

- DENS-OUT 1:

Foro	Area (mm ²)
1	0,285
2	0,25
3	0,278
4	1,852
5	1,964
6	1,942
7	0,456
8	0,408
9	0,457
10	2,036
11	1,984
12	2,042
13	0,31
14	0,277
15	0,224
16	0,074
17	0,079
18	0,067
	Area media foro (mm ²)
Area totale fori (mm ²)	14,985
	0,8325

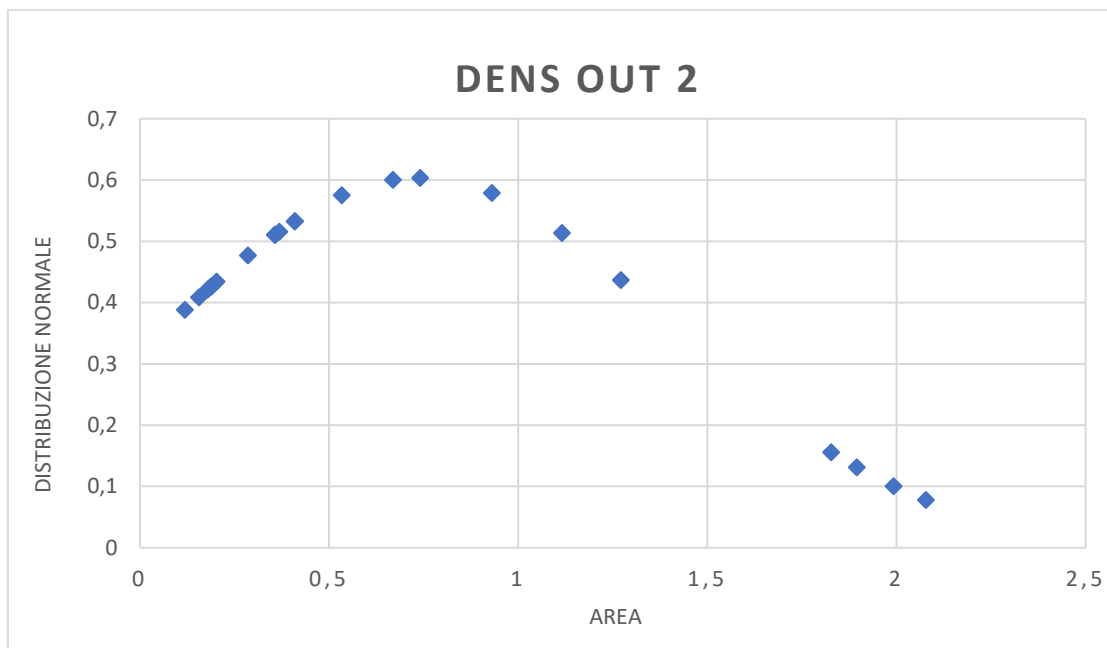
Slice	Count	Total Area (mm ²)	Average Size	%Area
DENSE OUT_ 01.tif	18	15	0,832	45,09



- DENS-OUT 2:

Fori	Area (mm ²)
1	0,669
2	0,191
3	0,409
4	0,119
5	0,741
6	0,18
7	0,369
8	1,828
9	0,534
10	0,41
11	1,895
12	2,078
13	0,187
14	1,993
15	0,357
16	1,116
17	0,358
18	0,156
19	1,272
20	0,931
21	0,286
22	0,203
	Area media foro (mm ²)
Area totale fori (mm ²)	16,282
	0,740

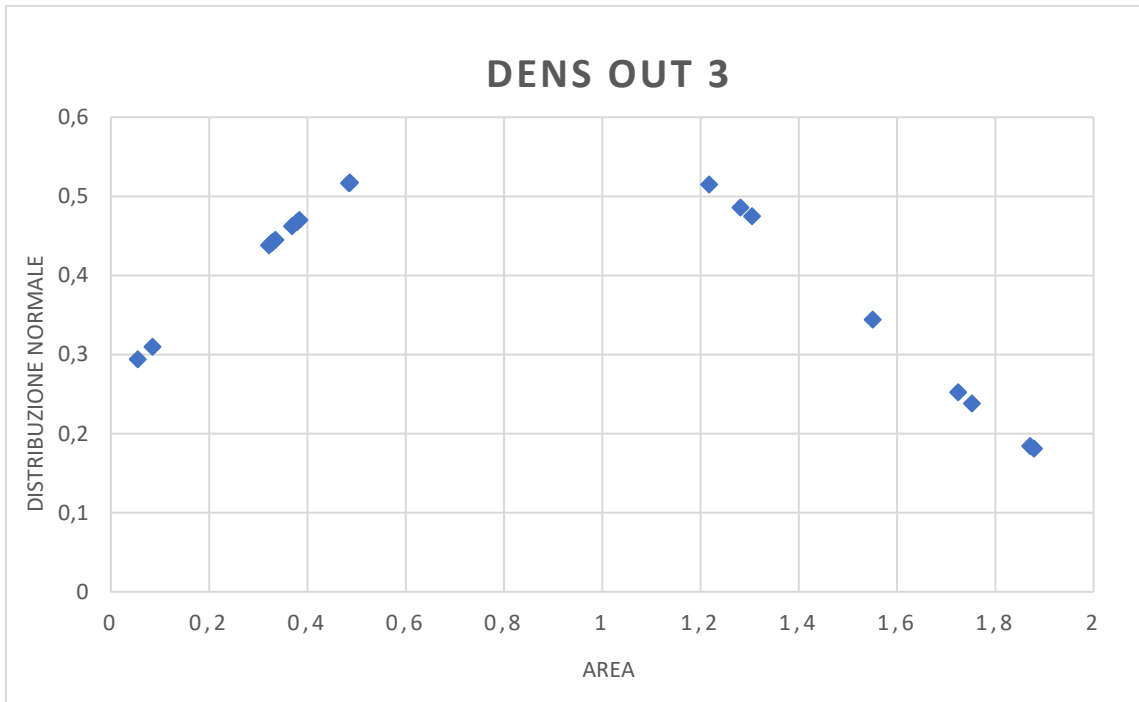
Slice	Count	Total Area (mm ²)	Average Size	%Area
DENSE OUT_ 02.tif	22	16,281	0,74	50,058



- DENS-OUT 3:

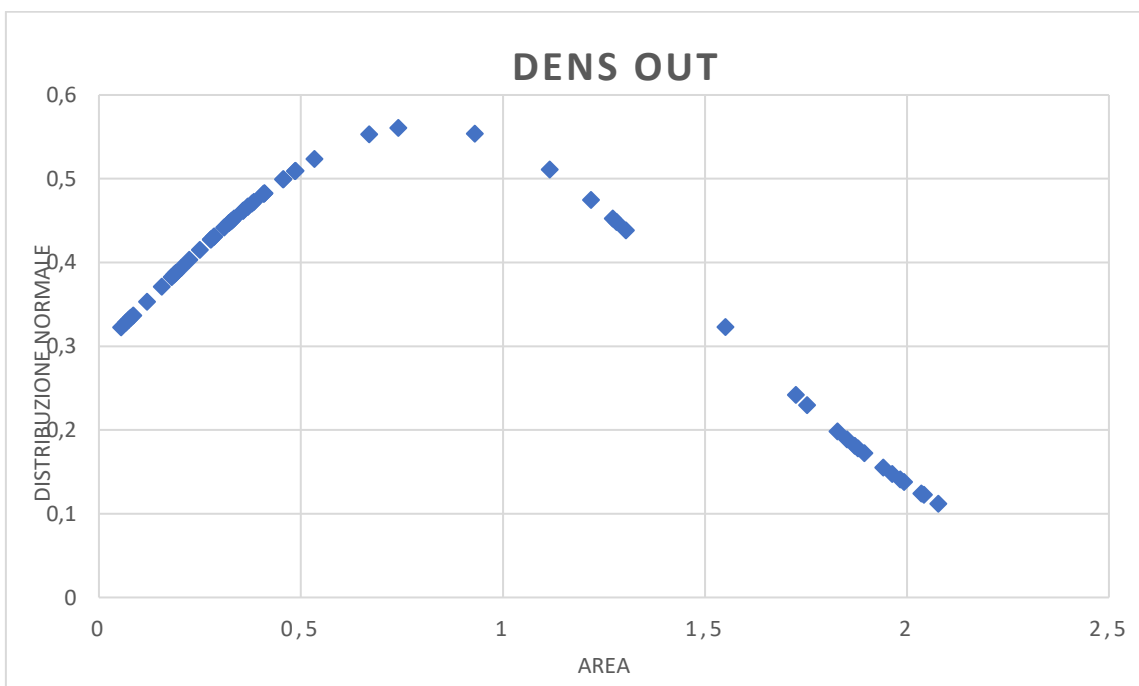
Fori	Area (mm ²)
1	0,487
2	0,379
3	1,551
4	1,725
5	1,305
6	0,384
7	0,322
8	1,871
9	1,879
10	0,085
11	0,33
12	0,369
13	0,335
14	1,218
15	1,753
16	1,282
17	0,055
18	0,485
19	0,327
	Area media foro (mm ²)
Area totale fori (mm ²)	16,142
	0,850

Slice	Count	Total Area (mm ²)	Average Size	%Area
DENSE OUT_ 03.tif	19	16,144	0,85	50,387



Conoscendo le aree dei pori dei tre scaffold, ho calcolato l'area media e ne ho ricavato la distribuzione normale:

area media (mm ²)
0,803542373



Dai risultati ottenuti è possibile dire, che nel caso delle strutture DENS-IN, la percentuale di superficie ricoperta dai pori è inferiore al 30%, con una grandezza media compresa tra $0,8 \text{ mm}^2$ e 1 mm^2 .

Nel caso delle strutture DENS-OUT, i pori coprono quasi il 50% della superficie dello scaffold, con conseguente diminuzione della dimensione degli struts, rispetto alla configurazione DENS-IN. Dal grafico della distribuzione normale, è ben evidente che i pori presenti in numero maggiore, hanno un'area compresa tra 0 e $0,5 \text{ mm}^2$, e nell'intorno di 2 mm^2 . Pertanto, lo scaffold DENS-OUT mostra una porosità maggiore.

Dalla letteratura sappiamo che la porosità è definita, in percentuale, come il rapporto tra i pori presenti ed il volume totale. La connettività, invece, è un indice, e quindi adimensionale, che mi descrive quanto la struttura sia connessa. Ovvero, rappresenta il numero di branch (rami) di cui è composta, e il punto in cui si interconnettono è definito nodo.

Da questo è facile dedurre che la porosità e la connettività controllano le prestazioni bio-meccaniche. A livello ingegneristico una maggiore connettività migliora le proprietà meccaniche dello scaffold, mentre per quanto riguarda il campo biologico, la maggiore connettività favorisce l'adesione cellulare, in quanto le cellule hanno a disposizione una superficie maggiore alla quale aderire.

CONCLUSIONE

Il presente elaborato si compone di una parte iniziale, in cui viene esposta la teoria sugli argomenti trattati e di una seconda parte in cui è riportata l'esperienza al laboratorio e la rielaborazione dei dati ottenuti.

Lo studio si è focalizzato sulla caratterizzazione di due tipologie di scaffolds di acciaio 316L, aventi distinte conformazioni, e realizzate mediante tecnica di Laser Powder Bed Fusion (LPBF). Per entrambe le tipologie sono stati caratterizzati tre campioni, opportunamente trattati per l'analisi al SEM.

In seguito, mediante l'utilizzo del software Imagej, è stato possibile ricavare ulteriori informazioni sulla grandezza dei pori e sulla distanza tra gli struts.

Dall'analisi si evince che la struttura con una maggiore porosità è favorevole per l'insediamento delle cellule e dei nutrienti; al contrario è caratterizzata da una pessima resistenza a compressione ed usura, poiché l'acciaio non è stato trattato con un film di rivestimento che lo possa proteggere dall'ambiente elettrolitico dell'organismo.

La connettività influenza positivamente la resa del prodotto, in quanto, un'elevata interconnessione permette alle cellule di avere spazio a sufficienza per l'insediamento. Tale proprietà conferisce alla struttura una resistenza a compressione maggiore.

RINGRAZIAMENTI

A conclusione del mio percorso di studi, vorrei ringraziare tutti coloro che mi hanno sostenuto con suggerimenti, critiche ed osservazioni.

In primis ringrazio la relatrice Prof.ssa Eleonora Santecchia, il co-relatore Prof. Paolo Mengucci, e la Dott.ssa Maria Laura Gatto per la loro costante disponibilità nell'aiutarmi a risolvere ogni dubbio presentatosi durante l'attività di tirocinio e stesura dell'elaborato.

In secondo luogo, la mia famiglia, ed in particolare mia sorella Martina e mia nonna Maria per il supporto emotivo fornitomi durante questo intenso percorso, non privo di difficoltà.

Per ultimi, ma non per importanza, i miei amici e compagni di corso con cui ho condiviso questo splendido cammino, che sono stati per me come una seconda famiglia.