

POLITECNICO DI MILANO
FACOLTÀ DI INGEGNERIA DEI SISTEMI
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA
BIOMECCANICA E BIOMATERIALI



**CARATTERIZZAZIONE MECCANICA
DI TESSUTO OSSEO CORTICALE
MEDIANTE NANOINDENTAZIONE CICLICA A
CARICHI MULTIPLI**

Tesi di Laurea Magistrale
A.A. 2011-2012

Autori:

Giuseppe Cefalì 765488

Stefano Merlin 764297

Relatore:

Prof. Pasquale Vena

Tutor:

Ing. Mohamad Shahgholi

Ing. Riccardo Lucchini

Indice

<i>Ringraziamenti</i>	V
Sommario	VII
Summary	XVII
1. Introduzione.....	1
1.1 Il tessuto osseo	2
1.1.1 Struttura gerarchica del tessuto osseo	3
1.1.2 Architettura dell'osso corticale	7
1.1.3 Modelli di osso lamellare	10
1.1.4 Anisotropia e simmetria nell'osso corticale	17
1.1.5 Fattori rilevanti nella caratterizzazione delle proprietà meccaniche	25
1.1.6 Meccanismi deformativi a livello della nanoscala.....	32
1.1.7 Relazioni funzione-struttura nell'osso corticale.....	35
1.2 Stato dell'arte su nanoindentazione a carico singolo e a carichi multipli.....	37
2. Fondamenti teorici.....	49
2.1 Analisi teorica di prove di nanoindentazione.....	50
2.1.1 Fondamenti del meccanismo di contatto.....	51
2.1.2 La teoria di Oliver-Pharr	53
2.1.3 Fattori che influenzano una prova di nanoindentazione	56
3. Obiettivi.....	59
3.1 Campi di applicazione	60
3.2 Obiettivi specifici del lavoro.....	61
4. Materiali e Metodi	63
4.1 Preparazione dei campioni	64
4.1.1 Campioni per prove di compressione monoassiale macroscopica.....	65
4.1.2 Campioni per prove di nanoindentazione.....	66
4.2 Studio della morfologia superficiale	68
4.3 Protocollo di prova per test di compressione monoassiale macroscopica.....	71
4.4 Protocollo di prova per test di nanoindentazione a carichi multipli.....	74
4.5 Elaborazioni e analisi delle prove a carichi multipli in Matlab.....	79
4.5.1 Trattamento delle curve P-h.....	80
4.5.2 Analisi della morfologia superficiale.....	82

5. Risultati	85
5.1 Risultati delle prove macroscopiche	86
5.2 Risultati delle prove di nanoindentazione.....	88
5.2.1 Risultati medi in direzione longitudinale	89
5.2.2 Risultati medi in direzione trasversale	93
5.2.3 Risultati su lamelle chiare e scure.....	96
5.2.4 Risultati in funzione della distanza dal centro dell'osteone.....	98
5.2.5 Risultati relativi alla rugosità.....	103
5.3 Analisi dei risultati delle prove macroscopiche.....	106
5.4 Analisi dei risultati delle prove di nanoindentazione.....	108
5.4.1 Dipendenza dalla profondità di penetrazione	109
5.4.2 Dipendenza dalla direzione di prova	113
5.4.3 Dipendenza dal tempo di conservazione.....	117
5.4.4 Dipendenza dal tipo e dal numero di lamella	119
5.5 Confronto tra risultati macroscopici e alla nanoscala.....	120
6. Conclusioni e sviluppi futuri	123
Bibliografia	126
Appendice	139

Ringraziamenti

Durante questi mesi, abbiamo avuto il piacere di collaborare con diverse persone che hanno contribuito all'epilogo della nostra crescita universitaria tramite il loro supporto a questo lavoro di tesi.

Ringraziamo innanzitutto il Prof. Vena che ci ha sempre seguito con grandissima disponibilità, incoraggiandoci sempre di fronte alle difficoltà sperimentali e guidandoci con la sua competenza. Ringraziamo l'Ing. Riccardo Lucchini per il grande supporto e incoraggiamento che ha saputo fornirci costantemente durante il nostro lavoro, soprattutto nelle fasi iniziali in cui le certezze scarseggiavano. Un grazie va anche all'Ing. Mohamad Shahgholi che ha lavorato al nostro fianco in ogni fase, infondendo ottimismo in ogni momento e dando consigli di grande utilità, thank you very much Mohamad. Vogliamo poi ringraziare alcune persone che, anche se non citate ufficialmente, sono state determinanti per lo sviluppo della nostra campagna sperimentale. Un sentito ringraziamento innanzitutto all'Ing. Matteo Taffetani che ha svolto le prove sperimentali di nanoindentazione e ci ha supportato con grande disponibilità durante la fase di elaborazione dei test, chiarendo sempre ogni nostro dubbio. Un grazie spetta anche alla Dott.ssa Mariagiovanna Taccia e alla Prof.ssa Cristina Tedeschi per aver messo a nostra disposizione il Laboratorio Chimico del Dipartimento di Ingegneria Strutturale del Politecnico di Milano e le loro attrezzature; ringraziamo soprattutto Mariagiovanna per la pazienza che ha portato con noi dandoci pareri tecnici e consigli fondamentali per la riuscita del lavoro e per averci aperto le porte del suo laboratorio in qualunque momento ve ne fosse bisogno. Ringraziamo poi le due persone che forse più di tutti hanno saputo farci sorridere e metterci a nostro agio nei mesi passati al LaBS, i due Gigi. Vogliamo infatti ringraziare l'Ing. Luigi La Barbera che ci ha insegnato a utilizzare l'MTS 858 Bionix per i test macroscopici e che ci ha sempre dato la massima disponibilità sia per i macchinari, che per dubbi e spiegazioni, mentre un grazie va a Luigi Baglioni per aver tagliato e lavorato con pazienza infinita i vari campioni e per averci sempre dato il massimo supporto in ogni momento. Infine ringraziamo le nostre famiglie per averci sempre incitati e sostenuti, incoraggiandoci e consigliandoci quando ce n'era bisogno.

Io, Giuseppe, voglio ringraziare innanzitutto il mio amico Ste, che mi ha sopportato per tutto questo tempo, sostenuto con la sua solarità e forza e senza il quale non credo sarei giunto a questo punto. Probabilmente sarei ancora lì, a tagliare ossa oppure le dita della mia mano in caso contrario! Alla fine di questo cammino mi sento più uomo, mi sento forte. In questi cinque anni tutto è mutato così tante volte, che solo alcune persone, le più meritevoli, sono rimaste al mio fianco, ed è loro che voglio ringraziare per il sostegno che mi hanno sempre mostrato. Grazie a Micky, Fede, Bubu, Cippo, Matti, Fede, Cla, Ale e voi altri compagni di corso per tutte le risate e le partite a briscola che abbiamo fatto in questi anni tra una pausa e l'altra. Grazie speciale alle mie persone Simo, Luchino, Mony, Anna, Vivi, Teo, Vins, Lori e tutti gli altri amici che mi hanno sostenuto con il calore e la forza che hanno saputo darmi ogni giorno. Infine ringrazio la mia famiglia, per aver sempre creduto nelle mie capacità, e per aver reso tutto questo possibile.

Io, Stefano, voglio ringraziare innanzitutto la persona che mi ha fortemente voluto al suo fianco in questo lavoro di tesi, Beppe, per le lunghe giornate passate a pulire, tagliare, lucidare e schiacciare ossa di mucca, sempre ridendo e scherzando nonostante il suo pessimismo cronico.

Ringrazio tutti gli amici con cui ho condiviso il percorso universitario, tra cui Manu, Ste, Tia, Paul, Tova, i tre Marchi, la Fede, Cla e gli altri. Grazie ai miei amici milanesi della Zeronove SM2 con i quali ho condiviso feste, partite, pizze e trasferte che hanno reso indimenticabili i miei anni della magistrale: Luca, Fra, Ricky, Leo, Angy, Ste, Manu, Vale, Marco, Sara, Dani, Laura, Jack, Robi e Tartus. Grazie agli amici di una vita Emma, Chiara, Mirko, Marco, Ale e Paola. Grazie a quelli che sono amici di una vita e che in più mi hanno sopportato per più di 5 anni in appartamento a Milano, siete come dei fratelli per me, Luca, Bisi e Vince. Grazie ai miei zii Goti e Loretta e Jolly e Stefano per essermi stati sempre vicini nelle difficoltà. Ma il grazie più grande lo tengo per la mia famiglia: grazie a mia mamma che ha sempre creduto in me e mi ha sempre incoraggiato e grazie a Francesco, il mio fratellone con cui basta uno sguardo per capirsi. Infine vorrei dedicare l'ultimo pensiero ad una persona che non c'è più, ma che non dimenticherò mai, grazie papà.

A tutti, grazie di cuore.

Giuseppe e Stefano

Sommario

Introduzione

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo mineralizzato, altamente specializzato, con importanti funzioni strutturali e metaboliche ed è il principale costituente dello scheletro, l'impalcatura di sostegno dell'organismo. L'osso è un biomateriale composito eterogeneo e anisotropo a struttura gerarchica molto complessa, la quale rende interessante lo studio delle proprietà meccaniche di questo particolare materiale. Si compone di due fasi, una componente organica, costituita essenzialmente da collagene, organizzata in fibre in cui si trovano immerse componenti inorganiche, rappresentate da cristalli minerali di idrossiapatite. La presenza di minerali, come pure l'abbondanza e la particolare distribuzione delle componenti organiche della sostanza intercellulare, conferisce a questo tessuto spiccate proprietà meccaniche di durezza e di resistenza alla compressione e alla torsione.

L'osso mostra differenti strutture e disposizioni dei suoi costituenti a seconda della scala di grandezza presa in analisi. Tale considerazione è di primaria importanza nello studio dell'architettura ossea, in quanto la struttura del tessuto è gerarchica e complessa. Dunque, al fine di valutare le proprietà meccaniche dell'osso, è importante considerare sia le proprietà meccaniche dei suoi componenti, sia la relazione strutturale che intercorre tra essi a vari livelli gerarchici di organizzazione strutturale. Oltre alle differenze nell'organizzazione dell'osso a livello macroscopico, ci sono anche diversi tipi di struttura architettonica di osso corticale a livello microscopico. Si possono distinguere tre forme principali di tessuto osseo corticale, a seconda del diverso impaccamento delle fibre: lamellare (o osteonale), fibrolamellare e woven.

Le proprietà meccaniche dell'osso corticale dipendono dalle proprietà meccaniche dei suoi componenti, nonché dal contributo di ciascuno dei livelli gerarchici descritto precedentemente. Inoltre, le proprietà variano con l'orientamento, aspetto caratteristico del comportamento meccanico dell'osso corticale. Esso infatti risulta più resistente e più rigido quando viene caricato lungo la direzione longitudinale, che congiunge idealmente le diafisi di un osso lungo, rispetto alle direzioni circonferenziale e radiale, e presenta proprietà meccaniche maggiori a compressione rispetto alla trazione.

Le caratteristiche meccaniche del tessuto osseo sono state indagate a livello macroscopico da numerosi autori, tramite test di compressione a velocità di deformazione differenti. Questo parametro risulta influenzare le proprietà del materiale, infatti per alte velocità di deformazione si ritrovano moduli elastici più alti. L'esecuzione di test su campioni ossei deidratati fornisce risultati nettamente superiori a quelli idratati.

Da alcuni decenni, grazie all'introduzione di una metodica rivoluzionaria come la nanoindentazione, l'indagine delle proprietà meccaniche del tessuto osseo a livello della nanoscala è divenuta oggetto di interesse di un numero sempre crescente di studiosi. Si tratta infatti di una tematica di grande importanza sia nel campo prettamente ingegneristico dell'analisi delle strutture e della micromeccanica del danno, sia in ambito medico-scientifico, dove un'approfondita conoscenza di questi fenomeni può dare un grande apporto allo sviluppo dell'ingegneria tessutale. Fino ad oggi, il protocollo sperimentale più diffuso per

condurre questi test consiste nel metodo ampiamente analizzato da Oliver e Pharr (1992), in cui si esegue una singola indentazione, costituita da un unico affondamento nel campione di alcune centinaia di nm da parte di una punta in diamante dai parametri noti, seguito da uno scarico totale, rilevandone in tempo reale le penetrazioni h e i carichi P , generalmente di pochi mN. È possibile così risalire, con opportuni calcoli, a parametri meccanici di interesse, quali la durezza H , il modulo ridotto E^* o il modulo di indentazione M . La tecnica presenta la possibilità di indagare le proprietà meccaniche delle singole lamelle, di studiarne l'anisotropia, l'omogeneità delle proprietà meccaniche lungo le varie lamelle e la distinzione tra le caratteristiche di lamelle spesse e sottili. I parametri del protocollo di prova quali upload rate e strain rate imposti possono portare a risultati diversi: a strain rate maggiori, risulta un comportamento più fragile da parte del materiale. La rugosità è un altro parametro importante da considerare, poiché per bassi affondamenti, è opportuno che essa sia al massimo in rapporto 1:3 con la profondità massima da raggiungere.

Il tessuto osseo risulta quindi un materiale dalle proprietà meccaniche complesse e dimostra un'ampia variabilità dei risultati in quanto materiale biologico dipendente da numerosi variabili, quali età, direzione e tipologia di prova, sede anatomica, soggetti diversi e specie diverse, porosità e contenuto minerale, velocità di deformazione e rugosità della superficie.

Obiettivi

L'innovazione proposta in questo lavoro consiste nell'esecuzione di indentazioni cicliche a carichi multipli, ovvero di affondamenti ripetuti nello stesso sito di indentazione, con carichi e penetrazioni progressivamente maggiori. Questo innovativo protocollo di prova permette di analizzare il danneggiamento superficiale del materiale indotto dai test sperimentali osservando le variazioni di H e M a differenti affondamenti.

In primo luogo sono state svolte prove sperimentali di compressione macroscopica uniassiale a rottura. Lo scopo di tali test alla macroscale è duplice:

- permettere un primo raffronto generale tra le proprietà del tessuto osseo corticale analizzato in questo lavoro di tesi e i dati reperibili in letteratura, al fine di avere dei validi confronti con lo stato dell'arte;
- confrontare i risultati ottenuti alla nanoscala con i risultati dei test macroscopici, al fine di evidenziare similitudini o differenze tra le due procedure, cercando di capire e motivare le eventuali discrepanze.

Nei test svolti alla nanoscala si è voluto mettere in luce ed evidenziare differenti aspetti che possono influire sui risultati. Essendo una tipologia di prove assolutamente innovativa, infatti, alcuni fattori d'influenza possono essere non noti o avere effetti più o meno marcati rispetto ai test di indentazione singola. I principali aspetti studiati alla nanoscala sono:

- il decadimento delle proprietà meccaniche del tessuto all'aumentare della penetrazione massima raggiunta dalle prove cicliche a carichi multipli, con bassi carichi e penetrazioni in gioco;
- l'anisotropia del tessuto e le differenze di risultati al variare della direzione di prova;
- gli effetti del tempo di conservazione in soluzione salina in frigorifero sui risultati;

- le eventuali differenze tra risultati ottenuti da indentazioni su lamelle chiare e su lamelle scure, nel caso di provini lucidati;
- le eventuali differenze delle proprietà meccaniche rilevate tra lamelle progressivamente più lontane dal centro dell'osteone.

Sono stati inoltre valutati alcuni aspetti relativi al set-up di prova e alle procedure sperimentali di produzione dei campioni, che possono influire sui risultati dei test a carichi multipli, ad esempio la presenza di eventuali limiti di penetrazione massima oltre i quali si ottiene l'affidabilità delle misure e l'adeguatezza delle rugosità ottenute mediante la procedura di lucidatura. I risultati ottenuti permettono infine di evidenziare le differenze tra test alla macro e alla nanoscala in modo da riconoscere quali parametri possano contribuire a determinarle, tenendo conto dei meccanismi che agiscono sulle due scale di osservazione.

Materiali e metodi

Per discostarsi il meno possibile dalle condizioni fisiologiche, i campioni ottenuti sono stati immersi in soluzione salina e conservati in frigorifero prima di essere testati. I campioni per i test macroscopici sono stati testati pochi giorni dopo la loro produzione, mentre i provini per la nanoindentazione sono stati divisi in due gruppi: una serie è stata utilizzata entro 48 h dall'ottenimento, mentre un'altra è stata indentata dopo 5 mesi, al fine di osservare se in queste condizioni il tempo di conservazione potesse influire sui risultati. Tutti i campioni sono stati ottenuti da tessuto osso corticale, tra metafisi e diafisi tibiale, proveniente da bovino di 30 mesi. Per entrambi i test sono stati ottenuti campioni in direzione longitudinale e trasversale, considerato il tessuto trasversalmente isotropo (Figura 1).

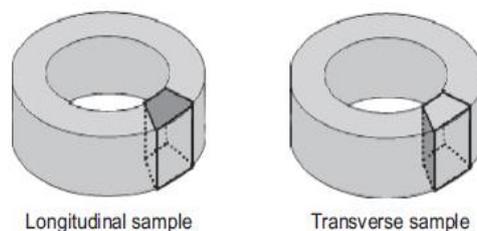


Figura 1: Posizione dei campioni longitudinali e trasversali nell'osso.

Per i test macroscopici sono stati quindi prodotti campioni cilindrici alti circa 1 cm con diametro di base di circa 0.5 cm in modo da ottenere un rapporto altezza:base di 2:1 per limitare gli effetti di bordo, mentre per le prove di nanoindentazione ciclica a carichi multipli sono stati ottenuti cubetti di circa 5 mm su cui sono state selezionate accuratamente alcune facce trasversali o longitudinali da sottoporre a cicli completi di lucidatura (Figura 2).

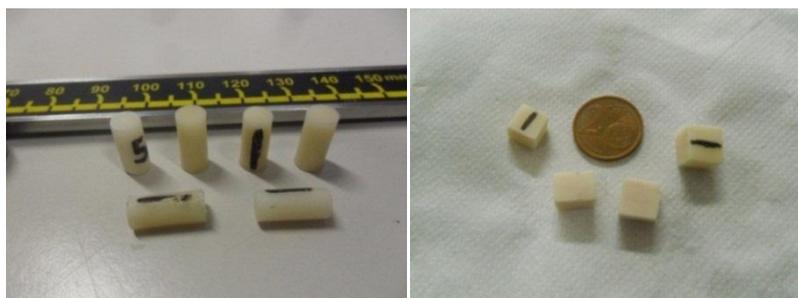


Figura 2: Campioni per test macroscopici (sinistra) e per test di nanoindentazione (destra).

Sui campioni destinati alle prove di nanoindentazione sono state attuate alcune procedure di imaging per lo studio della morfologia superficiale. Infatti sulla base delle immagini pre-indentazione e dei risultati dell'imaging, vengono decisi i siti di indentazione. In seguito vengono acquisite nuove immagini ottiche della superficie post-indentazione che permettono di valutare attentamente il numero di lamella in cui la prova è stata condotta. Questo fattore è molto importante per condurre una successiva analisi sulla dipendenza dei risultati ottenuti dalla distanza dal canale di Havers e dal tipo di lamella (chiare e scure). Infine dalla sovrapposizione tra le immagini ottiche e le immagini digitali ottenute dalla ricostruzione della superficie scansionata, si può immediatamente capire se qualche sito di indentazione sia stato posto in zone problematiche, non fornendo risultati affidabili (Figura 3).

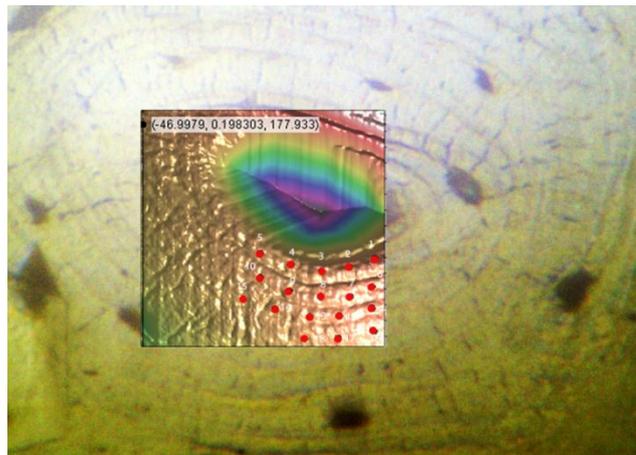


Figura 3: Esempio di sovrapposizione tra immagine ottica e immagine digitale.

Nei test macroscopici, una volta ottenuti i valori sperimentali di forza e spostamento ci si riconduce alle curve sforzo-deformazione (σ - ϵ), da cui è possibile ottenere mediante un'interpolazione lineare il modulo elastico E , definito dalla legge di Hooke come:

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon}. \quad (1)$$

Il modulo di Young è dato sperimentalmente dal coefficiente angolare della retta ottenuta tra il 40% e il 70% del limite elastico. L'altro parametro di interesse per un confronto con i valori di letteratura su scala macroscopica è costituito dallo sforzo di snervamento σ_y in corrispondenza del quale il materiale inizia a deformarsi plasticamente. Per l'ottenimento di tale valore è stata seguita una metodologia classica di elaborazione, tale per cui si trasla l'interpolante del tratto lineare della curva di 0.2%. L'intersezione di tale retta con la curva σ - ϵ restituisce il valore di σ_y .

Per quanto riguarda invece i test di nanoindentazione, sono state utilizzate delle punte Berkovich, mantenendo i campioni in soluzione salina dal momento del completamento della lavorazione fino a pochi minuti prima dell'esecuzione dei test. Le prove consistono nell'applicazione di carichi progressivamente crescenti nello stesso sito di indentazione per 8 differenti livelli di forza, rilevando la penetrazione conseguente in modo da valutare le proprietà meccaniche alla nanoscala all'aumento dell'affondamento o del carico applicato. Sia la velocità di carico che quella di scarico sono impostate a 0.5 mN/s. Il protocollo di prova è illustrato schematicamente in Figura 4.

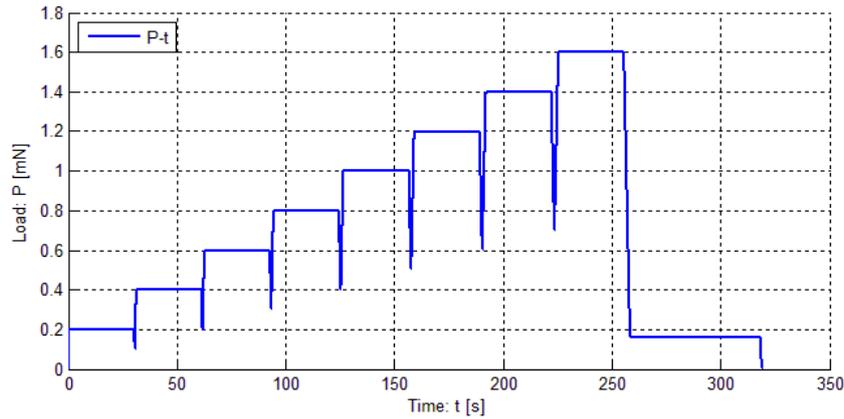


Figura 4: Curva P-t relativa al protocollo di prova.

Queste prove permettono di avere a disposizione su un singolo sito di indentazione otto curve di scarico, analizzabili attraverso la teoria di Oliver-Pharr, come illustrato in Figura 5.

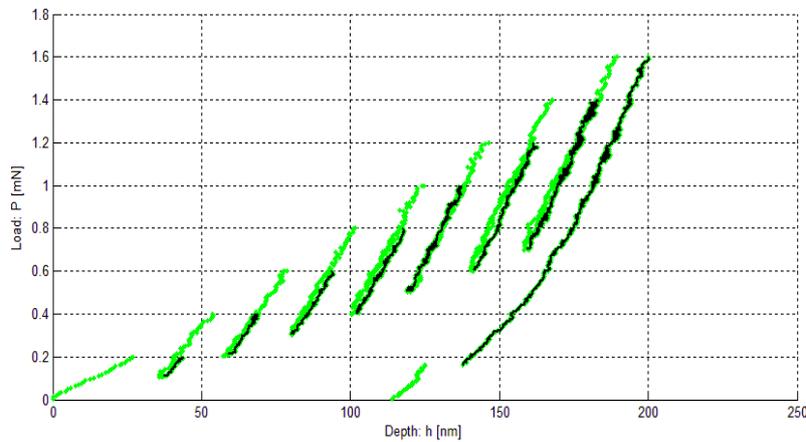


Figura 5: Curva P-h ottenuta nei test di nanoindentazione. Sono evidenziati in nero gli scarichi relativi.

Viene quindi ottenuta la durezza H :

$$H = \frac{P_{max}}{A} \quad (2)$$

dove P_{max} e A sono rispettivamente il carico massimo raggiunto prima dello scarico e l'area di contatto tra punta e campione al massimo affondamento. Si ottiene successivamente il modulo ridotto E^* :

$$E^* = \frac{S}{2\beta} \sqrt{\frac{\pi}{A}} \quad (3)$$

dove S è la rigidità iniziale di contatto opportunamente calcolata e $\beta=1.034$ per una punta di tipo Berkovich come quella utilizzata in questi test. Attraverso la relazione:

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1 - \nu_i^2}{E_i} + \frac{1 - \nu_s^2}{E_s} \quad (4)$$

dal modulo ridotto E^* si può risalire al secondo parametro d'interesse, il modulo di indentazione M :

$$M = \frac{E_s}{1 - \nu_s^2} \quad (5)$$

dove E_s e ν_s sono rispettivamente il modulo elastico e il coefficiente di Poisson del materiale in esame, ricordando che $\nu_i=0.07$ ed $E_i=1141$ GPa sono rispettivamente il coefficiente di Poisson e il modulo di Young dell'indenter.

Infine, allo scopo di automatizzare le procedure di analisi sono state implementate due funzioni Matlab. La prima, `function Nanotest` (riportata in appendice), permette di trattare i dati P-h rilevati dalla macchina durante le prove di nanoindentazione, in cui a causa dei meccanismi di contatto iniziale con carichi molto bassi si ha un plateau che introdurrebbe errori di calcolo (Figura 6). L'operazione rende i dati utilizzabili per l'analisi di Oliver-Pharr ed estrae in automatico i parametri di interesse per le varie prove a carichi multipli, tenendo conto della grande quantità di curve da correggere ed analizzare.

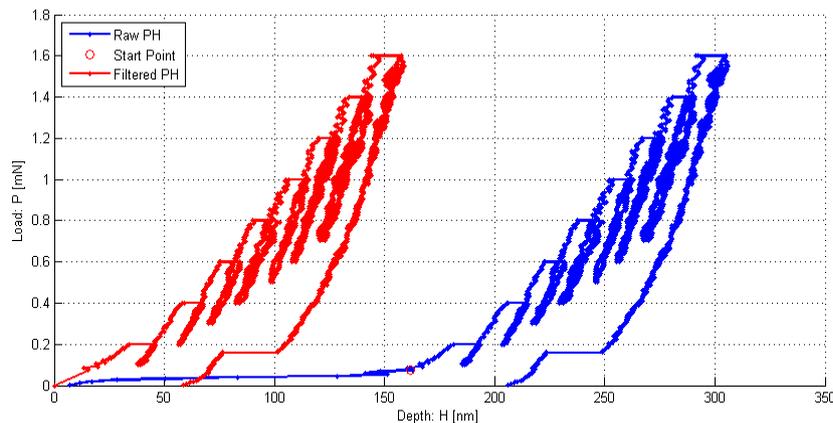


Figura 6: Correzione della curva originale tramite una interpolazione lineare dei dati.

La seconda, `function Roughness` (riportata in appendice), consente di ricostruire la morfologia 3D della superficie scansionata dalla macchina in fase di imaging al fine di studiare i siti di indentazione, in modo da capire se escludere o meno alcuni risultati, anche attraverso il calcolo della rugosità superficiale (Figura 7).

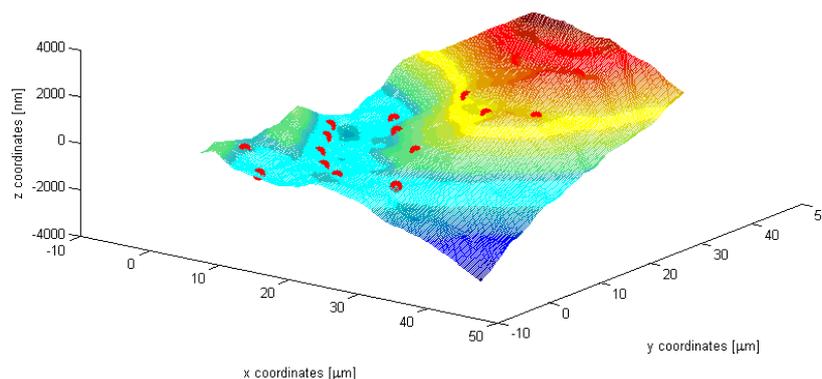


Figura 7: Rilevamento dei siti di indentazione sulla ricostruzione della superficie analizzata.

Risultati e analisi

Per quanto riguarda le prove di compressione monoassiale macroscopica sono stati testati 11 campioni in direzione assiale e 6 campioni in direzione trasversale. Hanno dato risultati analizzabili, giungendo a snervamento e quindi a rottura, 10 test in direzione longitudinale e 5 in direzione trasversale. I risultati finali sono riportati in Tabella 1.

Direzione Longitudinale	
E [GPa]	σ_y [MPa]
10.38 ± 0.62	160.26 ± 4.72

Direzione Trasversale	
E [GPa]	σ_y [MPa]
6.69 ± 0.90	125.69 ± 1.66

Tabella 1: Risultati medi e deviazioni standard dei moduli di elasticità e degli sforzi di snervamento in direzione longitudinale e trasversale.

Nei test di indentazione invece, il primo aspetto che emerge osservando i risultati riguarda l'andamento decrescente del modulo di indentazione M e della durezza H all'aumentare del carico massimo P_{max} imposto e della corrispondente penetrazione massima h_{max} ottenuta. Questo trend è riscontrabile sia nei test in direzione longitudinale, su campioni freschi e conservati per cinque mesi, sia nelle prove condotte in direzione trasversale (Figura 8 e Figura 9).

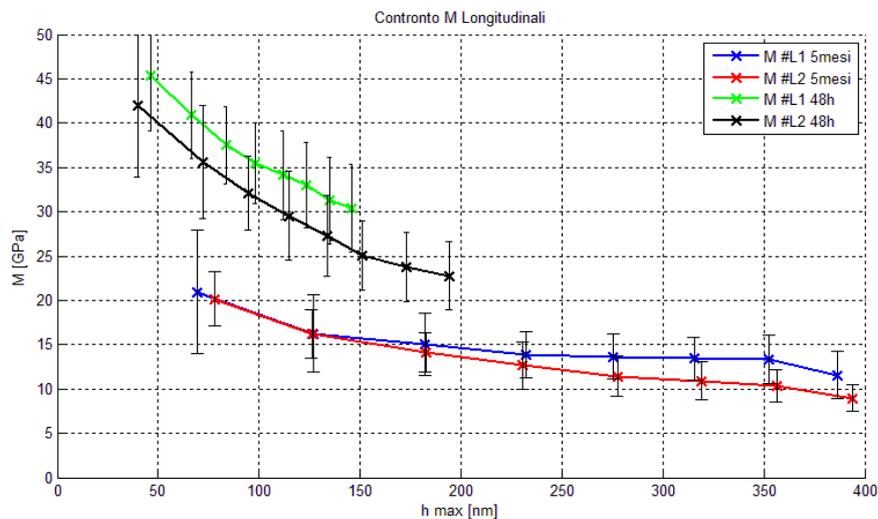


Figura 8: Modulo di indentazione M in funzione della penetrazione h_{max} per i campioni longitudinali.

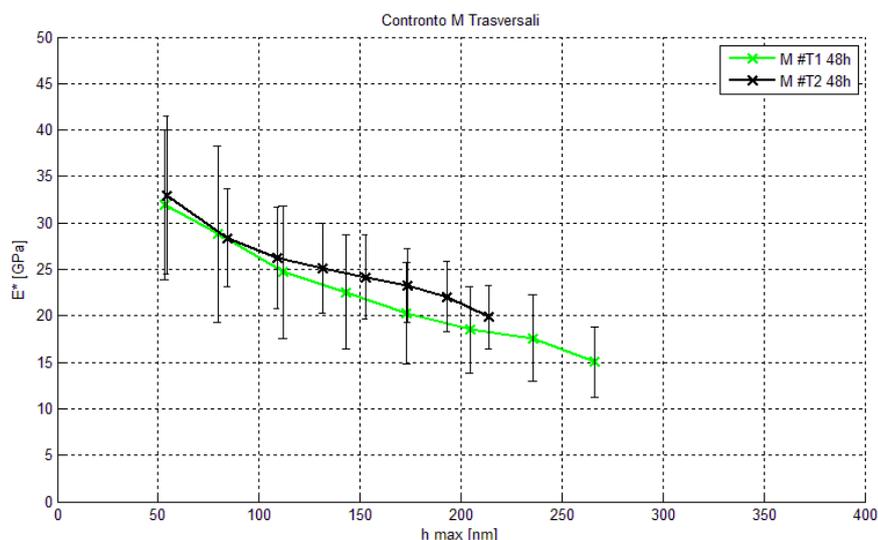


Figura 9: Modulo di indentazione M in funzione della penetrazione h_{max} per i campioni trasversali.

Per i campioni testati entro 48 h, ad esempio, in direzione longitudinale M decresce da valori compresi tra 42 e 45 GPa a circa 50 nm di affondamento fino a valori compresi tra circa 30 e 25 GPa per penetrazioni di circa 150 nm. In direzione trasversale, invece, i valori decrescono da circa 31-32 GPa a circa 50 nm fino a valori di circa 18-19 GPa intorno ai 200 nm. Considerando solo gli intervalli di penetrazione in comune, per i campioni longitudinali si rilevano dei decadimenti del 32.9% e del 40.4%, mentre in direzione trasversale si hanno decadimenti del 40.0% e del 39.8%. Questi risultati sono in accordo con quanto rilevato da altri autori e sono stati confermati mediante l'utilizzo di t-test per confrontare i primi livelli di scarico con quelli finali.

Inoltre come si può vedere dalla Figura 8 è stato rilevato che il tempo di conservazione in soluzione salina in frigorifero ha effetti notevoli sulle proprietà meccaniche del tessuto, che risultano quasi dimezzate dopo cinque mesi. Per quanto riguarda invece la dipendenza dal tipo o dal numero di lamella non sono state rilevate differenze statistiche significative, il che fa presupporre che per i campioni lucidati, indentare lamelle chiare o scure non influenzi i risultati e che allontanandosi dal centro dell'osteone le proprietà meccaniche non varino significativamente. Tutti gli aspetti appena analizzati trovano conferma in letteratura dagli studi di svariati autori.

Infine, dall'analisi dei risultati ottenuti su scala macroscopica e nanometrica, si rilevano delle differenze consistenti in entrambe le direzioni di prova (Figura 10 e Figura 11). Questo fatto è però spiegabile attraverso alcune considerazioni. Infatti, per esigenze sperimentali, a livello macroscopico è stata impostata una bassa velocità di deformazione corrispondente a strain rate di circa 0.003 s^{-1} , mentre a livello nanometrico, a causa dell'innovativo protocollo ancora da perfezionare, sono state svolte prove con carichi e scarichi ad una velocità di 0.5 mN/s, corrispondenti ad uno strain rate mediamente intorno a 0.1 s^{-1} . Tali differenze di ordine di grandezza tra gli strain rate spiegano parzialmente le differenze di risultati tra macro e nanoscala. Inoltre anche la porosità produce differenze, seppur limitate. Le misure attuate con la nanoindentazione, al contrario di quanto avviene a scala macroscopica, non risentono di questo effetto, poiché viene indentato esclusivamente tessuto corticale, evitando grazie all'imaging e alle dimensioni molto piccole della punta zone di vuoto. Infine tali differenze

trovano probabilmente spiegazione anche nell'organizzazione gerarchica del tessuto, che osservato a scale differenti possiede proprietà e caratteristiche notevolmente diverse.

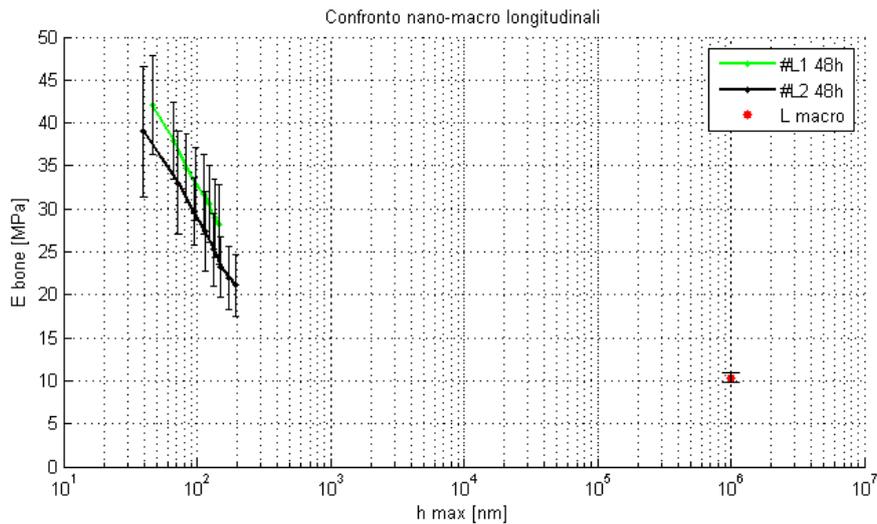


Figura 10: Confronto dei moduli elastici in direzione longitudinale tra macroscale e nanoscale.

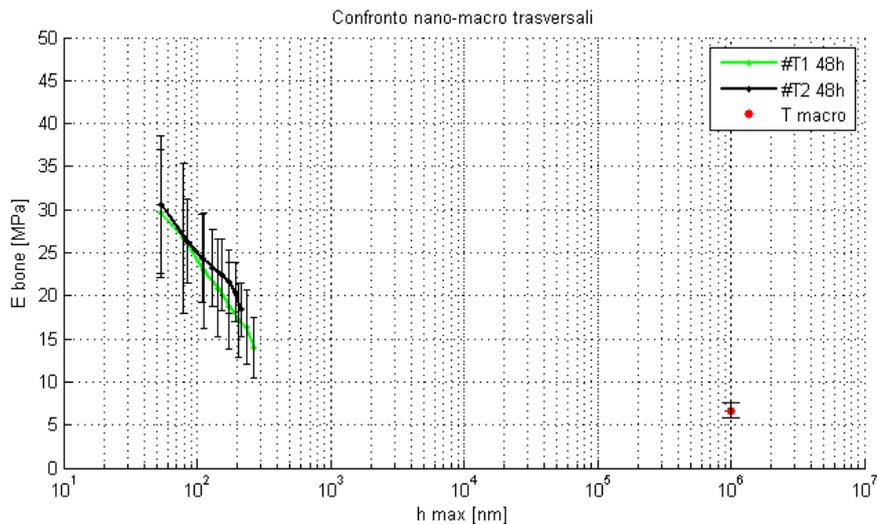


Figura 11: Confronto dei moduli elastici in direzione trasversale tra macroscale e nanoscale.

Conclusioni e sviluppi futuri

Per quanto riguarda la macroscale, i test di compressione hanno ottenuto risultati piuttosto consoni a quelli riportati in letteratura. I valori ottenuti confermano l'anisotropia del tessuto, evidenziando maggiori proprietà meccaniche in direzione longitudinale rispetto alla direzione trasversale. I test effettuati a bassi strain rate hanno riportato valori leggermente più bassi dei valori medi ritrovati in letteratura, mediamente eseguiti a strain rate maggiori.

A livello della nanoscale è stata constatata innanzitutto l'ipotesi del decadimento delle proprietà meccaniche, per quanto riguarda i parametri M e H . I risultati principali ottenuti mediante elaborazioni Matlab indicano che M e H diminuiscono in maniera evidente, fino al raggiungimento di un valore asintotico all'aumentare della penetrazione in tutti i test effettuati, con decadimenti del modulo di indentazione tra il secondo e l'ottavo livello di carico compresi tra il 32% e il 40%. Il decadimento delle proprietà meccaniche riscontrato è

probabilmente causato dal danneggiamento della superficie causato dall'affondamento stesso dell'indenter e dal progressivo decremento di strain rate con l'aumento della penetrazione. Inoltre si nota che anche a tale scala di osservazione emerge chiaramente l'aspetto di anisotropia del tessuto con proprietà meccaniche maggiori in direzione longitudinale rispetto alla direzione trasversale.

È stata successivamente valutata l'influenza o meno di parametri quali la distanza dell'indentazione dal centro dell'osteone, l'indentazione di lamelle chiare o scure ed il tempo di conservazione dei campioni. I primi due parametri non hanno presentato particolari effetti significativi sulle proprietà meccaniche dei campioni, mentre il tempo di conservazione (cinque mesi) ha portato un decadimento delle proprietà meccaniche pari circa al 50%.

Dal confronto tra macro e nanoscala emerge dunque un diverso comportamento meccanico da parte del tessuto alle diverse scale. È ipotizzabile quindi che a livello della nanoscala il modulo elastico risulti superiore per un apporto maggiore nella resistenza meccanica offerto dai cristalli minerali.

Per quanto riguarda invece le problematiche principali legate al set-up sperimentale o alle procedure di laboratorio della nanoindentazione ciclica, sono emerse in particolare le difficoltà di avere delle misure precise e affidabili per affondamenti al di sotto di 50-60 nm, così come si è evidenziata chiaramente l'importanza di avere una rugosità estremamente controllata nell'intorno dell'indentazione, soprattutto per i primi livelli di carico.

In conclusione, i risultati del lavoro rappresentano un primo riferimento per successive prove sperimentali, presentando l'analisi di possibili fattori di influenza dei test. Possibili sviluppi futuri sono ad esempio l'esecuzione delle medesime prove a livello della macro e della nanoscala a pari strain o load rate, valutando così l'effetto di questo parametro sulle prove, o la modifica delle procedure di polishing o l'utilizzo di un microtomo per identificare l'effetto della rugosità e distinguerlo dalle caratteristiche intrinseche del materiale, nonché infine una ricerca di nuove modalità di conservazione del campione. Al fine di una maggiore validazione dei possibili risultati, si suggerisce infine lo sviluppo di un modello agli elementi finiti al fine di confrontare i valori sperimentali ottenuti tramite nanoindentazione.

Parole chiave: anisotropia; meccanica del danno; nanoindentazione ciclica a carichi multipli; osso corticale bovino; rugosità; struttura gerarchica; velocità di deformazione.

Summary

Introduction

Bone tissue is a highly specialized mineralized connective tissue with important structural and metabolic functions and it is the main constituent of the skeleton, the supporting structure of the body. Bone is a composite heterogeneous and anisotropic biomaterial with a complex hierarchical structure, which makes the study of its mechanical properties interesting. The tissue is characterized by two phases, an organic component, consisting essentially of collagen, organized in fibers where the inorganic components, represented by mineral crystals of hydroxyapatite, are immersed. The presence of the minerals, as well as the abundance and the particular distribution of the organic components in the intercellular matrix, gives the tissue high mechanical properties of stiffness and resistance to compression and torsion. The bone shows different structures and arrangements of its constituents depending on the considered length scale. This consideration is of primary importance in the study of the architecture of the bone, as the tissue structure is hierarchical and complex. Therefore, in order to evaluate the mechanical properties of the bone, it is important to consider both the mechanical properties of its components and the structural relationship between them at various hierarchical levels of the structural organization. In addition to differences in the organization of the bone at the macroscopic level, there are also different types of architectural structure of the cortical bone at the microscopic level. We can distinguish three main forms of cortical bone tissue, depending on the different packing of the fibers: lamellar (or osteonal), fibrolamellar and woven.

The mechanical properties of the cortical bone depend on the mechanical properties of its components, as well as the contribution of each one of the hierarchical levels described previously. In addition, the properties vary with the orientation which is a characteristic mechanical behavior for the cortical bone. In fact, it is more resistant and stiffer when it is loaded along the longitudinal direction, which joins ideally the diaphysis of a long bone, compared to the circumferential and radial directions and it presents higher mechanical properties in compression than in traction.

The mechanical properties of the bone tissue have been investigated at a macroscopic level by numerous authors, with compression tests at different strain rates. This parameter influences the properties of the material, in fact for high strain rate higher elastic moduli are obtained. The test on dehydrated bone samples provides superior results to those hydrated.

In the recent decades, thanks to the introduction of a revolutionary method such as nanoindentation, the investigation of mechanical properties of bone tissue at the nanoscale level has become an object of interest for a growing number of researchers. In fact this is a very important issue both in the engineering field of structural analysis and micromechanics of damage and in medical science, where an in-depth knowledge of these phenomena could bring a great contribution to the development of tissue engineering. However, up until now, the most common experimental procedure that has been used to execute these tests consists in the extensively analyzed method by Oliver and Pharr (1992), where a single indentation is performed. It consists of a single penetration of the specimen, of some hundreds of nm by a diamond tip with known parameters, followed by a total unloading, detecting in real-time the

penetrations depth h and loads P , generally of a few mN. Thus, it is possible to obtain, with proper calculations, some mechanical parameters of interest, such as hardness H , reduced modulus E^* or indentation modulus M . This technique allows to investigate the mechanical properties of the individual lamellae, to study the anisotropy of the tissue, the homogeneity of mechanical properties along the various lamellae and the distinction between the characteristics of thick and thin lamellae. The parameters of the test, such as upload rate and strain rate imposed, may lead to different results: with higher strain rates, the material gives a more brittle response. Roughness is another important parameter to be considered, since for low sinkings, it is appropriate to have a 1:3 ratio between roughness and maximum penetration depth.

Bone is therefore a material with complex mechanical properties and it shows a wide variation of results as a biological material affected by many variables, such as age, direction and type of test, anatomical site, different subjects and different species, porosity and mineral content, strain rate and surface roughness.

Aim of the project

The innovation proposed in this paper consists in the execution of cyclic indentations at multiple loads, or rather in repeated penetrations at the same indentation zone, with progressively higher loads and penetrations. This innovative experimental procedure allows to analyze the surface damage of the material induced by experimental tests by observing the variations of H and M at different penetration depths. First of all macroscopic uniaxial compression to failure were performed. The purpose of these tests at the macroscale is twofold:

- to allow a first comparison between the general properties of cortical bone tissue analyzed in this work and the literature data, in order to have meaningful comparison with the state of art;
- to compare the results obtained at the nanoscale with the results of macroscopic tests, in order to highlight similarities and differences between the two procedures, trying to understand and motivate any discrepancy.

In the nanoindentation experiments we wanted to highlight different aspects that can affect the results. In fact, given that this is an absolutely innovative experimental procedure, some influencing factors could be unknown or have different effects compared to single indentation tests. The main aspects studied at the nanoscale are:

- the decay of mechanical properties of bone tissue when an increased penetration depth in multi-load nanoindentation tests at very low loads and penetration depths is present;
- the anisotropy tissue and the differences between results at different test directions;
- the storage effect in saline solution in the fridge on the results;
- any differences between the obtained results by nanoindentation of dark or light lamellae, in the case of polished samples;
- any differences in the mechanical properties detected at different distances from the centre of the osteon.

Certain aspects of the set-up test and experimental procedures of production of the samples were also evaluated. These may affect the results of multi-loads tests, such as the presence of any limit of maximum penetration beyond which the measurements and the adequacy of the roughness obtained by the polishing procedure are reliable. The obtained results allow then to highlight the differences between test at the macro and at the nanoscale in order to identify which experimental parameters may contribute to determine it, while taking account of different mechanisms that act on the two scales of observation.

Materials and methods

To depart as little as possible from the physiological conditions, the samples, once obtained, were immersed in saline and stored in a fridge before the tests. The samples for macroscopic compression were tested for a few days after their production, while the specimens for nanoindentation were divided into two groups: one series was tested within 48 h after their production, while another was indented after 5 months, in order to observe whether these storage conditions could affect the results. All samples were obtained from cortical bone tissue, between metaphysis and tibial diaphysis, from a bovine of 30 months. For both tests longitudinal and transversal samples were obtained, considering the tissue as transversely isotropic (Figure 1).

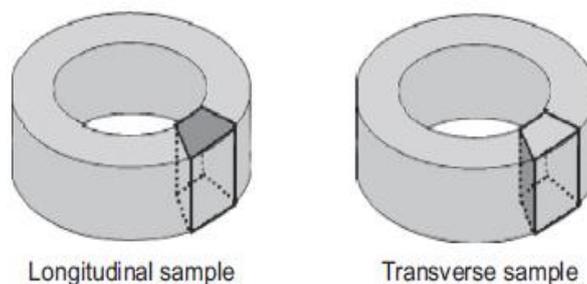


Figure 1: Position of longitudinal and transversal samples on the bone.

For macroscopic tests cylindrical samples about 1 cm high were produced, with a base diameter of about 0.5 cm in order to obtain a height:base ratio of 2:1 to limit the edge effects, while for the multi-load nanoindentation tests cubes of about 5 mm were obtained on which some transverse or longitudinal faces have been carefully selected to be subjected to full polishing procedure (Figure 2).

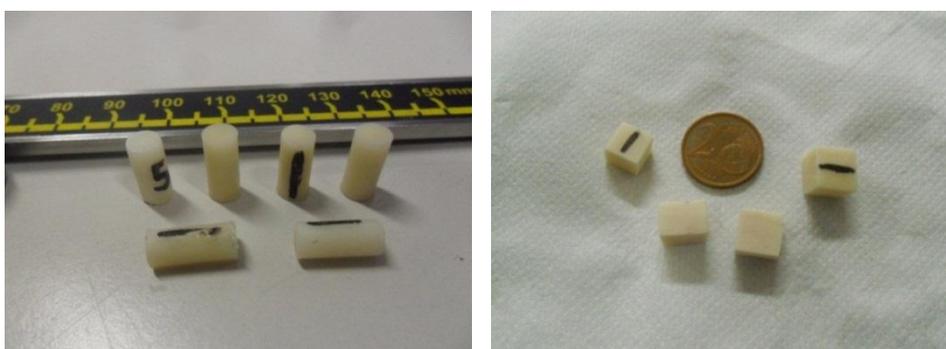


Figure 2: Specimens for macroscopic tests (left) and for nanoindentation tests (right).

Some imaging procedures for the study of surface morphology have been implemented on the sample intended for nanoindentation tests. In fact the indentation zone are selected based on the pre-indentation pictures and imaging results. Following the new optical images of the post-indentation surface are acquired and used to assess carefully the number of lamella where the test was conducted. This factor is very important in order to conduct a subsequent analysis on the dependence of the results by the distance from the Haversian channel and from the type of lamella (light and dark). Finally from the overlap between the optical and digital images, obtained from the reconstruction of the scanned surface, we can immediately see if any indentation site has been placed in difficult areas, providing unreliable results (Figure 3).

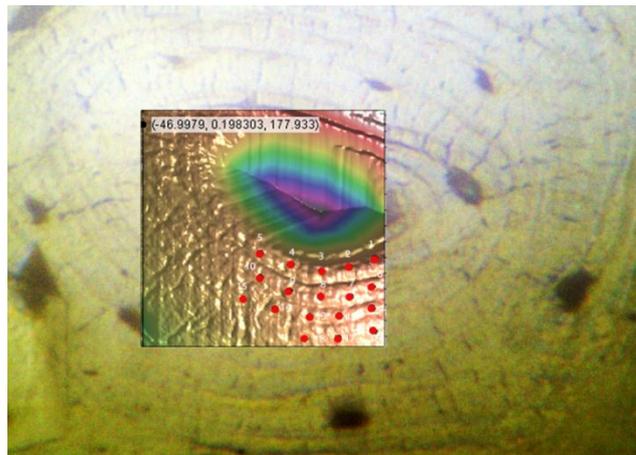


Figure 3: Example of overlapping of optical and digital images.

In the macroscopic tests, once the experimental values of force and displacement were obtained, it was possible to go back to the stress-strain curves (σ - ϵ), from which it is possible, using a linear interpolation, to obtain the elastic modulus E defined by Hooke's law as:

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon}. \quad (1)$$

The Young modulus is given experimentally by the slope of the straight line obtained between 40% and 70% of the elastic limit. The other parameter of interest for a comparison with the literature values on a macroscopic scale is the yield stress σ_y at which the material begins to deform plastically. To obtain this value a classic processing mode was followed, translating the interpolation of the linear stretch of the curve of 0.2%. The intersection of this straight line with the curve σ - ϵ returns the σ_y value.

Instead as regards the nanoindentation tests, some Berkovich tips have been used, maintaining the samples in saline solution from the end of production until a few minutes before the execution of the test. The tests consist in the application of progressively increasing loads on the same indentation site at 8 different load levels, obtaining the corresponding penetration in order to evaluate the mechanical properties at the nanoscale at increasing penetration depths or applied loads. Both the loading and unloading rate are set to 0.5 mN/s. The experimental procedure is schematically illustrated in Figure 4.

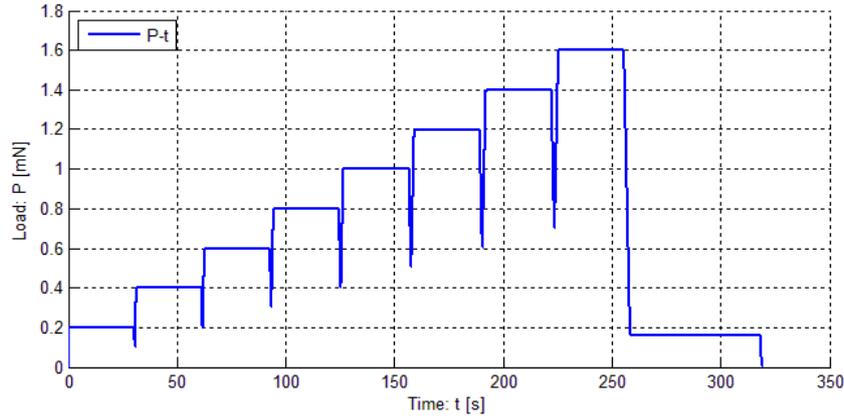


Figure 4: P-t curve of experimental procedure.

These tests allow to obtain eight unloading curves on a single indentation site, analyzed through the Oliver-Pharr theory, as shown in Figure 5.

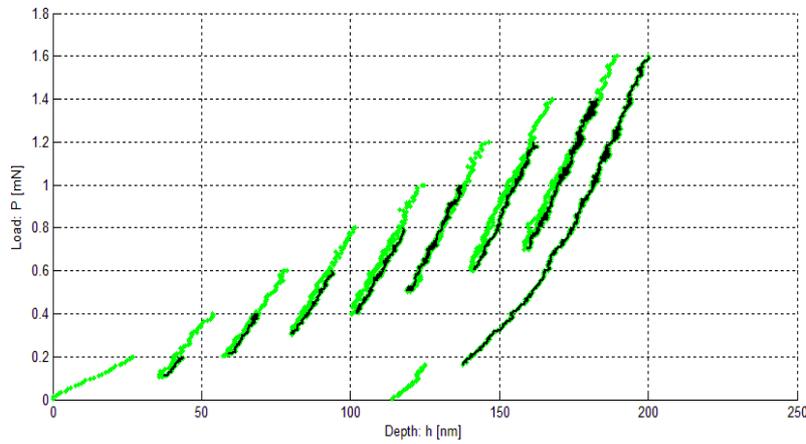


Figure 5: P-h curve of one nanoindentation test. The black curves are the unloading data.

Is then obtained hardness H :

$$H = \frac{P_{max}}{A} \quad (2)$$

where P_{max} and A are the maximum load reached before the unloading and the contact area between tip and sample at maximum penetration depth, respectively. Then is possible to get the reduced modulus E^* :

$$E^* = \frac{S}{2\beta} \sqrt{\frac{\pi}{A}} \quad (3)$$

where S is the initial contact stiffness, properly calculated, and $\beta=1.034$ for a Berkovich tip like that used for these tests. With the equation:

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1 - \nu_i^2}{E_i} + \frac{1 - \nu_s^2}{E_s} \quad (4)$$

it is possible to obtain from reduced modulus E^* the second parameter of interest, the indentation modulus M :

$$M = \frac{E_s}{1 - \nu_s^2} \quad (5)$$

where E_s and ν_s are the elastic modulus and Poisson ratio of material respectively, considering that $\nu_i=0.07$ and $E_i=1141$ GPa are the Poisson ratio and Young modulus of the indenter.

Finally, in order to automate the analysis procedures and two Matlab functions have been implemented. The first is `function Nanotest` (reported in appendix), that allows to process P-h data, detected by the machine during the tests of nanoindentation, in which it has a plateau due to the mechanisms of initial contact with very low loads that would introduce errors of calculation (Figure 6), to make them usable for the Oliver-Pharr analysis and to extract automatically the parameters of interest for the various multiple loads tests, taking into account the large amount of curves to correct and analyze.

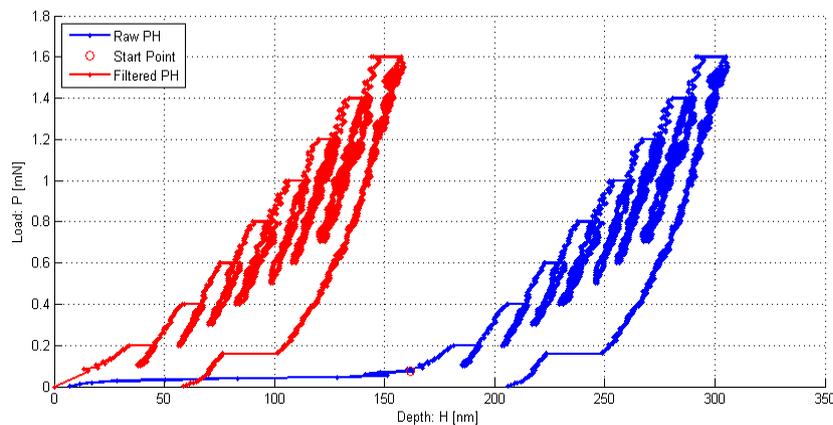


Figure 6: Correction of original curve tramite through a linear data interpolation.

The second is `function Roughness` (reported in appendix), that allows to reconstruct the 3D morphology of the surface scanned by the machine during imaging procedures in order to study indentation zone, in order to understand whether to exclude some results, also through the calculation of the surface roughness (Figure 7).

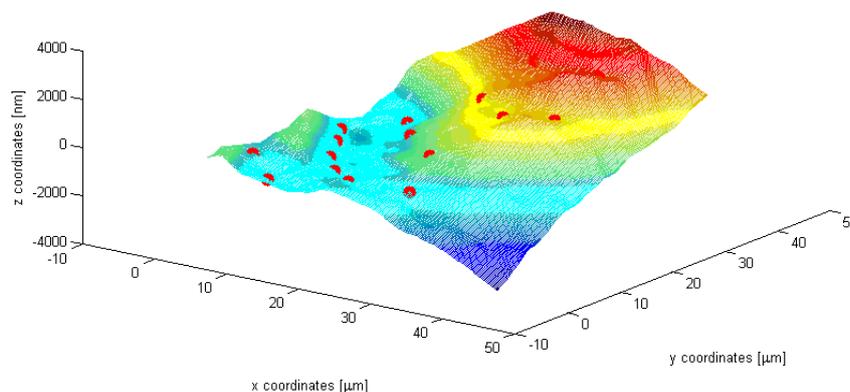


Figure 7: Detection of indentation sites on the reconstruction of the analyzed surface.

Results and analysis

With regard to the trials of macroscopic monoaxial compression 11 samples were tested in assial direction and 6 were tested in transversal direction. 10 longitudinal tests and 5 transversal tests have produced viable results, coming to yield and therefore rupture. The results are presented in Table 1.

Longitudinal Direction	
E [GPa]	σ_y [MPa]
10.38 ± 0.62	160.26 ± 4.72
Transversal Direction	
E [GPa]	σ_y [MPa]
6.69 ± 0.90	125.69 ± 1.66

Table 1: Mean results and standard deviation of elastic modulus and yield stresses in longitudinal and transversal direction.

On the other hand, in the indentation tests the first aspect that emerges when observing the results concerns the decreasing trend of the indentation module M and of the hardness H when the maximum imposed load P_{max} and the corresponding maximum penetration h_{max} obtained increase. This trend can be encountered both in the longitudinal-directed tests on fresh samples preserved for five months and in the trials conducted in transversal direction (Figure 8 and Figure 9).

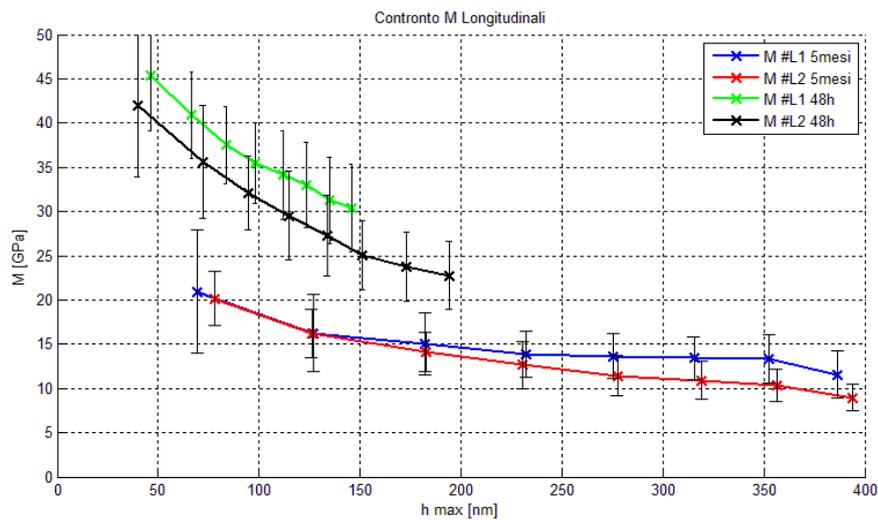


Figure 8: Indentation modulus M depending on penetration h_{max} for longitudinal samples.

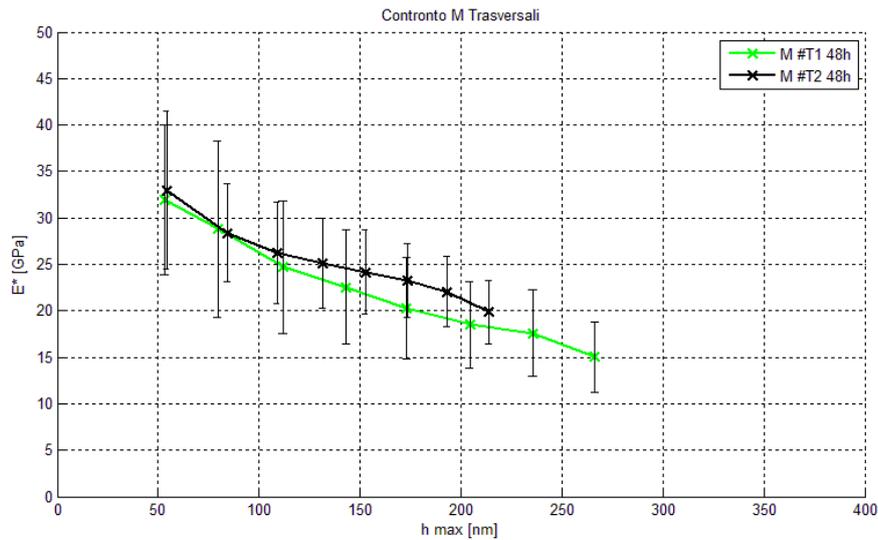


Figure 9: Indentation modulus M depending on penetration h_{\max} for transversal samples.

As far as the samples tested within 48 h are concerned, for example, in longitudinal direction it decreases from values ranging from 42 and 45 GPa at about 50 nm of penetration to values ranging between 30 and 25 GPa for penetrations of about 150 nm. On the other hand, in transversal direction values decrease from around 31-32 GPa at about 50 nm to values of around 18-19 GPa at around 200nm. Considering exclusively the common intervals of penetration for the longitudinal samples decreases of 32,9% and 40,4% can be noticed. Whereas in transversal direction we have detected decreases of 40% and 39.8%. These results are in accordance with the data detected by other authors and they have been confirmed using t-tests to compare the first and the final unloading level.

Furthermore, it has been detected that the storage time in the saline solution in the refrigerator has remarkable effects on the mechanical properties of the tissue (Figure 8), which are almost halved after five months. The dependence of the type or the number of lamella doesn't show any statistically significant differences. This suggests that for polished samples, indenting bright or dark lamellae does not influences the results and that moving away from the center of the osteon, mechanical properties do not differ significantly. All aspects previously analyzed are confirmed in the literature by the studies of several authors.

In the end, from the analysis of the results obtained on the macroscopic and nanometer scale, significant differences in both test directions were detected (Figure 10 and Figure 11). However, this is explained by some considerations. In fact, for experimental needs, at the macroscopic level, a low deformation rate, corresponding to strain rate of about 0003 s^{-1} , has been set, while at the nanometer level, due to of the innovative protocol, the test has been carried out with loads and discharges at a rate of 0.5 mN/s , corresponding to an average strain rate of 0.1 s^{-1} . These differences between the strain rates explain partially the differences between the macro- and nanoscale results. Also, the porosity produces differences, even if limited. Nanoindentation measurements do not suffer this effect, contrary to what occurs at the macroscopic scale, since exclusively cortical tissue is indented, avoiding vacuum zones thanks to the very small size of the tip and to the imaging procedure. Finally, these differences are probably also explained by the hierarchical organization of the tissue, which has different properties if observed at different scales.

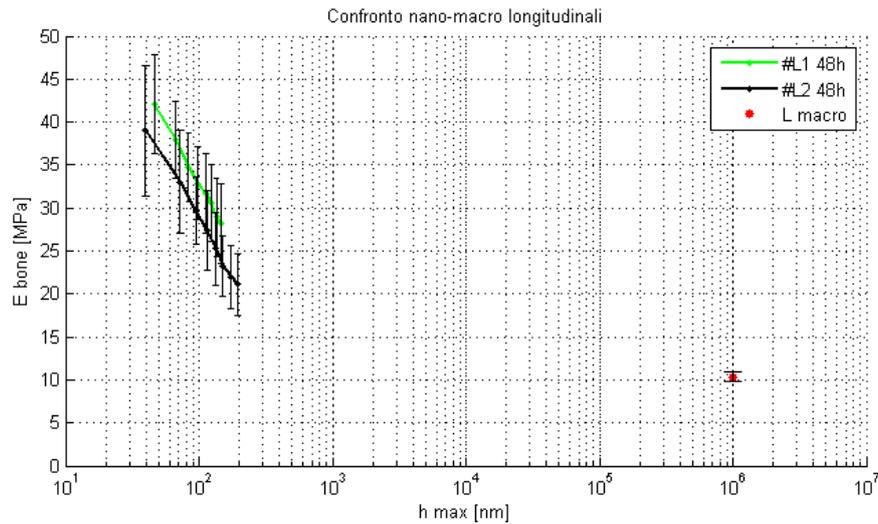


Figure 10: Comparison between the macroscale and the nanoscale of elastic modulus in the longitudinal direction.

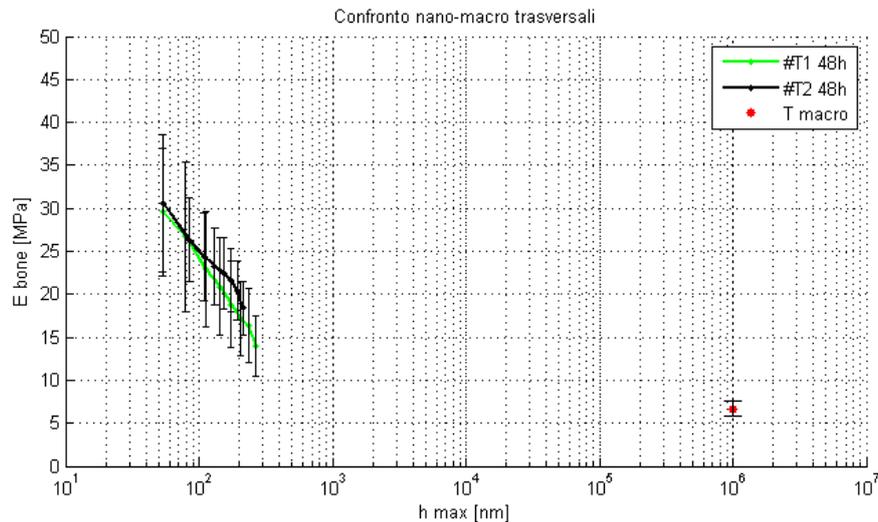


Figure 11: Comparison between the macroscale and the nanoscale of elastic modulus in the transverse direction.

Conclusions and future developments

With regard to the macroscale, compression tests have obtained consistent results compared to those reported in the literature. The values obtained confirm the anisotropy of the tissue, showing higher mechanical properties in the longitudinal direction compared with the transverse direction. The tests carried out at low strain rate reported slightly lower values than those found in the literature, which are performed at an average higher strain rate. At the nanoscale level, the hypothesis of the decay of the mechanical properties, as the M and H parameters, has been confirmed. The main results obtained through Matlab indicate the decreasing of M and H till they reach an asymptotic value with increasing penetration in all the tests carried out, with decays of indentation module between the second and the eighth level of load between 32% and 40%. The decay of the mechanical properties was probably caused by damage of the surface caused by the sinking of the indenter and by the progressive decrease of strain rate with the increasing of penetration. Furthermore, it is found that even at

this scale of observation, the anisotropy of the mechanical properties, higher in longitudinal direction compared to the transverse direction, emerges clearly.

Subsequently, it was observed the influence of parameters such as the distance from the center of the osteon, the bright or dark lamellae and the conservation time of the samples. The first two parameters have not presented special significant effects on the mechanical properties of the samples, while the conservation time (five months) has led to an decay of the mechanical properties of approximately 50%.

A comparison of macro- and nanoscale mechanical behavior shows different properties of the tissue at different scales. Therefore, it is possible that, at the nanoscale level, the elastic modulus is higher because of higher provision in the mechanical resistance offered by the mineral crystals.

Problems related to the experimental set-up or laboratory procedures of multi-load nanoindentation have emerged, in particular about having precise and reliable measures for penetrations under 50-60 nm. An extremely controlled roughness near the indentation spot, especially for the first load levels, is required.

In conclusion, the results of this work are a reference for subsequent experimental tests, presenting the analysis of possible influence factors on a mechanical test. Possible future developments are, for example, the execution of those tests on the macro and nanoscale with equal load or strain rate, to evaluate the effect of this parameter on the results, either modification of the procedure of polishing, or the use of a microtome, to identify and distinguish the effect of roughness from the intrinsic properties of the material, and finally a search for new ways of preserving the sample. Furthermore, it is suggested to develop a finite element model in order to compare experimental values obtained by nanoindentation.

Keywords: anisotropy; bovine cortical bone; damage mechanics; hierarchical structure; multi-load nanoindentation; roughness; strain rate.

Capitolo 1

Introduzione

La sezione 1.1 presenta il tessuto osseo e le sue principali caratteristiche, mettendo in rilievo, in particolar modo, gli aspetti trattati nel presente lavoro, quali la composizione, la struttura gerarchica e l'anisotropia del materiale su vari livelli. Sono presentati anche i principali modelli di strutture di osso lamellare, in particolare la struttura plywood assunta dalle fibrille mineralizzate di collagene, i fattori rilevanti in una prova meccanica su tessuto osseo, i meccanismi deformativi del tessuto a livello della nanoscala e le relazioni funzionali-strutturali che intercorrono tra gli elementi del tessuto.

Segue nella sezione 1.2 una panoramica sullo stato dell'arte della nanoindentazione a carico singolo e a carichi multipli su vari materiali, mettendo in evidenza risultati e parametri caratteristici in grado di influenzare una prova.

1.1 Il tessuto osseo

Il tessuto osseo fa parte, insieme alla cartilagine, dei tessuti connettivi specializzati ed è il principale costituente dello scheletro, l'impalcatura di sostegno dell'organismo. È un tessuto connettivo mineralizzato, altamente specializzato, con importanti funzioni strutturali e metaboliche.

Le funzioni strutturali consistono nel fornire rigidità, sostegno e resistenza a sopportare i carichi fisiologici e accidentali che agiscono sul corpo, nel sostenere i tessuti molli dell'organismo e nel proteggere importanti distretti del corpo, mentre le funzioni metaboliche nel fungere da principale deposito di ioni calcio e nel mantenere un corretto equilibrio omeostatico dei minerali all'interno del corpo, oltre allo svolgere un ruolo importante nel fenomeno dell'ematopoiesi (Cowin and Doty, 2007; Cowin, 1989).

L'osso è un biomateriale composito eterogeneo e anisotropo a struttura gerarchica. Nel tessuto osseo la matrice extracellulare, che costituisce circa il 90% del peso, è mineralizzata, mentre il restante 10% è rappresentato da acqua. La matrice è costituita per il 60% da componenti inorganici, soprattutto da fosfato di calcio sotto forma di microcristalli di idrossiapatite. La componente organica è essenzialmente costituita da collagene di tipo I, organizzato in fibre in cui si trovano immersi cristalli minerali di idrossiapatite. La presenza di minerali, come pure l'abbondanza e la particolare distribuzione delle componenti organiche della sostanza intercellulare, conferisce a questo tessuto spiccate proprietà meccaniche di durezza e di resistenza alla compressione e alla torsione (Bedini et al., 2009).

La matrice extracellulare mineralizzata viene organizzata dagli osteoblasti sotto forma di sottilissime lamine che poggiano le une sulle altre, ottenendo delle lamelle di spessore variabile (4–11 μm), al cui interno le fibrille mineralizzate di collagene sono disposte parallelamente tra loro, in maniera da sopportare al meglio le sollecitazioni da carico. Generalmente tali fibrille sono organizzate in fasci o gruppi allineati che possono essere disposti in modi diversi a seconda del tipo di tessuto osseo e sede anatomica. Si riconoscono infine due tipi di tessuto osseo: non lamellare e lamellare. Nell'organismo adulto quasi tutto il tessuto osseo presente è di tipo lamellare (Ambrosi et al., 2006).

La quantità dei principali componenti del tessuto osseo dipende da un gran numero di fattori, come la specie, la posizione da cui è tratto il campione, l'età, il sesso e il tipo di tessuto osseo. In Tabella 1.1 sono riportati alcuni dati di letteratura riguardanti la composizione dell'osso corticale umano e bovino.

Origine	Acqua H ₂ O [%]	Idrossiapatite Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH) [%]	Collagene [%]	Glicosamminoglicani GAG [%]
Umano	9.1	76.4	21.5	
Bovino	7.3	67.2	21.2	0.34

Tabella 1.1: Composizione volumetrica di tessuto osseo corticale umano e bovino (Herring, 1977; Pellegrino and Blitz, 1965; Vejlens, 1971).

1.1.1 Struttura gerarchica del tessuto osseo

L'osso mostra differenti strutture e disposizioni dei suoi costituenti a seconda della scala di grandezza presa in analisi. Tale considerazione è di primaria importanza nello studio dell'architettura ossea, in quanto la struttura del tessuto è gerarchica e complessa. Dunque, al fine di valutare le proprietà meccaniche dell'osso, è importante considerare sia le proprietà meccaniche dei suoi componenti, sia la relazione strutturale che intercorre tra essi a vari livelli gerarchici di organizzazione strutturale (Landis, 1995; Mehta, 1995; Weiner and Traub, 1992).

Come rappresentato in Figura 1.1, è possibile distinguere diversi livelli di organizzazione strutturale, a partire da una scala nanometrica fino ad una dimensione macroscopica.

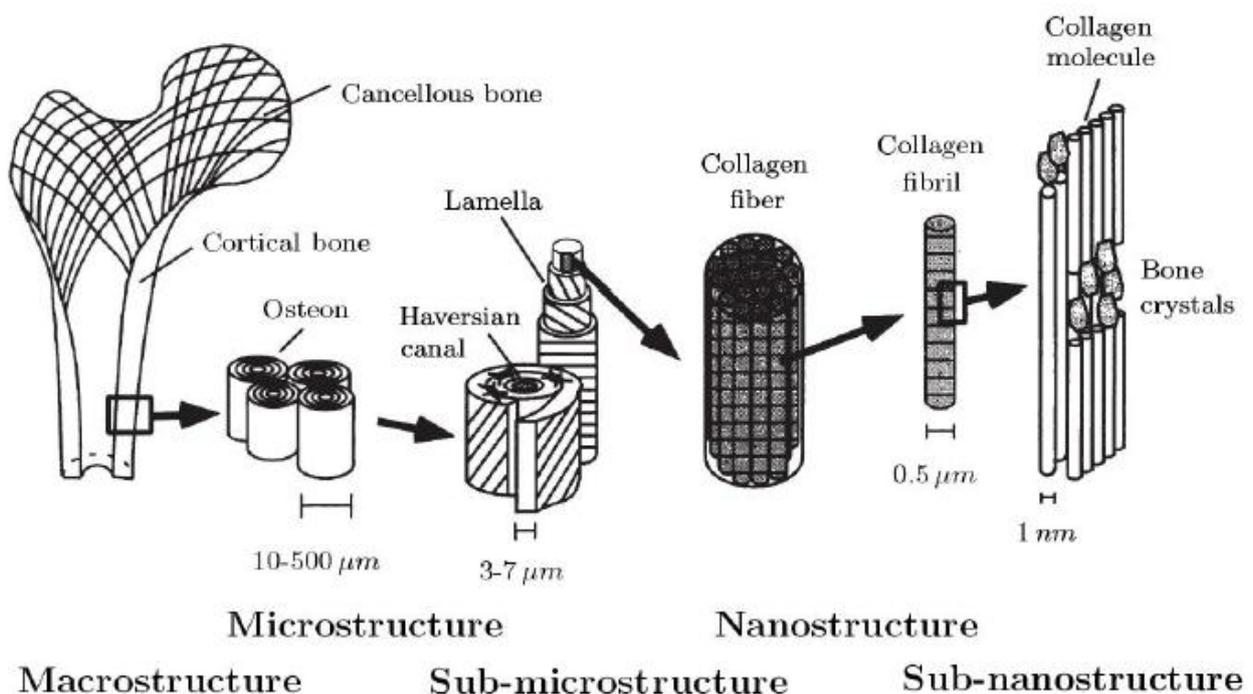


Figura 1.1: Struttura gerarchica dell'osso corticale (Rho et al., 1998).

Tali livelli e le strutture corrispondenti sono (Rho et al., 1998.):

1. la macrostruttura: osso spongioso e corticale;
2. la microstruttura (da 10 a 500 μm): sistemi di Havers (osteoni), osso lamellare, osso fibrolamellare, osso woven, singola trabecola ;
3. la sub-microstruttura (1-10 μm): lamelle;
4. la nanostruttura (da poche centinaia di nanometri a 1 μm): collagene fibrillare e minerali incorporati;
5. la sub-nanostruttura (sotto qualche centinaio di nanometri): struttura molecolare degli elementi costituenti, come i cristalli minerali, fibrille di collagene, e proteine organiche non collageniche.

La descrizione dettagliata dei cinque livelli strutturali individuati è presentata di seguito.

Livello macrostrutturale

A livello della macrostruttura, l'osso può essere classificato come corticale (o compatto) oppure spongioso (o trabecolare). In uno scheletro circa l'80% della massa scheletrica è rappresentata da tessuto compatto, il quale forma intorno a tutte le ossa un rivestimento solido ed è responsabile delle funzioni principali svolte dallo scheletro, quali funzione protettiva e di sostegno, mentre il rimanente 20% della massa dell'osso è data da tessuto spongioso (Bedini et al., 2009).

Entrambe i tipi possono essere facilmente distinti per il loro grado di porosità e di densità, sebbene una differenziazione più precisa si può ottenere dalla valutazione istologica della microstruttura dei tessuti. Il tessuto osseo compatto appare come una massa solida, densa, con la presenza esclusivamente di microscopici canali, priva di cavità macroscopicamente evidenti e con una bassa porosità (5-10%). Il tessuto osseo spongioso invece ha questo nome in quanto appare conformato come una spugna dalla porosità che varia tra 45-95%, dotato di travate ossee, dette trabecole, orientate in varie direzioni e intersecate tra loro, e delimitanti cavità, le cavità midollari, che in vivo sono ripiene di midollo osseo ematopoietico. L'osso spongioso è molto più attivo metabolicamente ed è sottoposto a processi di rimodellamento più frequenti, risultando così in media più giovane rispetto all'osso corticale (Bedini et al., 2009).

L'osso corticale è formato da diversi fasci di lamelle di collagene mineralizzate affiancate e allineate tra loro, mentre l'osso spongioso è formato da una rete di trabecole interconnesse tra loro a formare una struttura tridimensionale. Gli spazi delimitati da queste sono generalmente chiamati cavità midollari (Ambrosi et al., 2006).

Livello microstrutturale

L'osso corticale è costituito da fibre di collagene mineralizzato a loro volta organizzate in laminati chiamati lamelle, spesse dai 3 ai 7 μm . Queste possono formare osso lamellare (o osteonale) quando si organizzano in strati concentrici di circa 3-8 lamelle intorno ad un canale centrale in una struttura chiamata osteone, osso fibrolamellare quando sono organizzati in gruppi lineari di lamelle oppure osso woven quando sono meno ordinate e non si può distinguere alcuna configurazione caratteristica (Pani, 2011).

L'osteone è caratterizzato da una struttura cilindrica il cui diametro varia dai 100 ai 500 μm ed è attraversato assialmente per tutta la sua lunghezza dal canale di Havers, che permette il passaggio di vasi sanguigni e terminazioni nervose. La ripetizione di questa unità strutturale costituisce l'osso osteonale, descritto in sezione 1.1.2 (Ambrosi et al., 2006).

L'osso spongioso, invece, è costituito da una rete di trabecole variamente orientate ed intrecciate tra loro a delimitare numerose cavità intercomunicanti. L'orientamento delle trabecole all'interno del tessuto osseo spugnoso lamellare non è affatto casuale bensì esse si dispongono nello spazio secondo le linee di forza che vengono esercitate sul tessuto dalle sollecitazioni meccaniche alle quali esso è sottoposto. Una trabecola presenta un diametro di circa 5-30 μm (Rho et al., 1998).

Livello sub-microstrutturale

Le lamelle ossee sono spesse 3-7 μm , ma la disposizione e l'orientamento delle fibre di collagene mineralizzate negli strati che costituiscono una lamella sono ancora in discussione, in particolare nel caso di osso lamellare. L'idea più comune riguardo la disposizione delle fibre di collagene nell'osso lamellare è che esse si trovino in strati paralleli all'interno di ogni lamella, con una variazione di orientamento delle fibre da un livello all'altro (Gebhardt, 1906; Giraud-Guille, 1988; Weiner et al., 1997). Secondo questa rappresentazione, strati adiacenti all'interno di una singola lamella hanno diversi orientamenti, i più comuni dei quali sono quello longitudinale, con le fibre di collagene orientate lungo l'asse del piano lamellare, e quello trasversale, con le fibre di collagene perpendicolari all'asse lungo.

Livello nano strutturale

Le strutture più importanti che si possono osservare a questa scala (da centinaia di nanometri a 1 μm) sono le fibre di collagene. Le molecole di collagene si ritrovano circondate e allo stesso tempo compenstrate dai cristalli di idrossiapatite, formando così dei compositi che vengono comunemente chiamati fibre di collagene mineralizzato (Franzoso, 2008; Rho et al., 1998).

Le fibre sono rappresentate per la quasi totalità da molecole di collagene, principalmente di tipo I. Il collagene dell'osso possiede un elevato numero di legami crociati che tengono unite le singole molecole di tropocollagene. Le microfibrille di collagene si aggregano a formare fibre di collagene di spessore rilevante (Bedini et al., 2009).

Livello sub-nanostrutturale

A tale livello strutturale, in un range che va da pochi a un centinaio di nanometri, troviamo la struttura molecolare degli elementi costitutivi, ossia delle molecole di collagene e dei cristalli minerali di idrossiapatite (Figura 1.2).

I cristalli appiattiti di apatite sono presenti all'interno degli interspazi tra le fibrille di collagene, che limitano così un eventuale crescita eccessiva dei cristalli, costringendoli ad essere di dimensione contenuta e discontinui. Questi crescono con un orientamento specifico, in modo che l'asse principale dei cristalli sia il più possibile parallelo agli assi lunghi delle fibrille di collagene. Le dimensioni medie dei cristalli appiattiti sono 50x25 nm, mentre lo spessore è circa di 2-3 nm (Kuhn-Spearing et al., 1996; Landis, 1995; Ziv and Weiner, 1994).

La componente principale della matrice organica è il collagene di tipo I. Le molecole di collagene, secrete dagli osteoblasti, si aggregano in fibrille con una specifica struttura terziaria che presenta una periodicità di 67 nm e vuoti o lacune di 40 nm tra le estremità delle molecole. L'unità strutturale del collagene è rappresentata dal tropocollagene, proteina con una massa molecolare di circa 285 kDa formata da tre catene polipeptidiche con andamento sinistrorso che si associano a formare una tripla elica destrorsa. Le dimensioni di questa elica sono approssimativamente 1.5x300 nm. Proteine organiche non collageniche, tra cui fosfoproteine e osteocalcina, possono regolare orientazione, dimensioni e disposizione

cristallina dei depositi minerali. Esse possono anche fungere da riserva di ioni calcio e fosfato per la formazione di minerali (Rho et al., 1998).

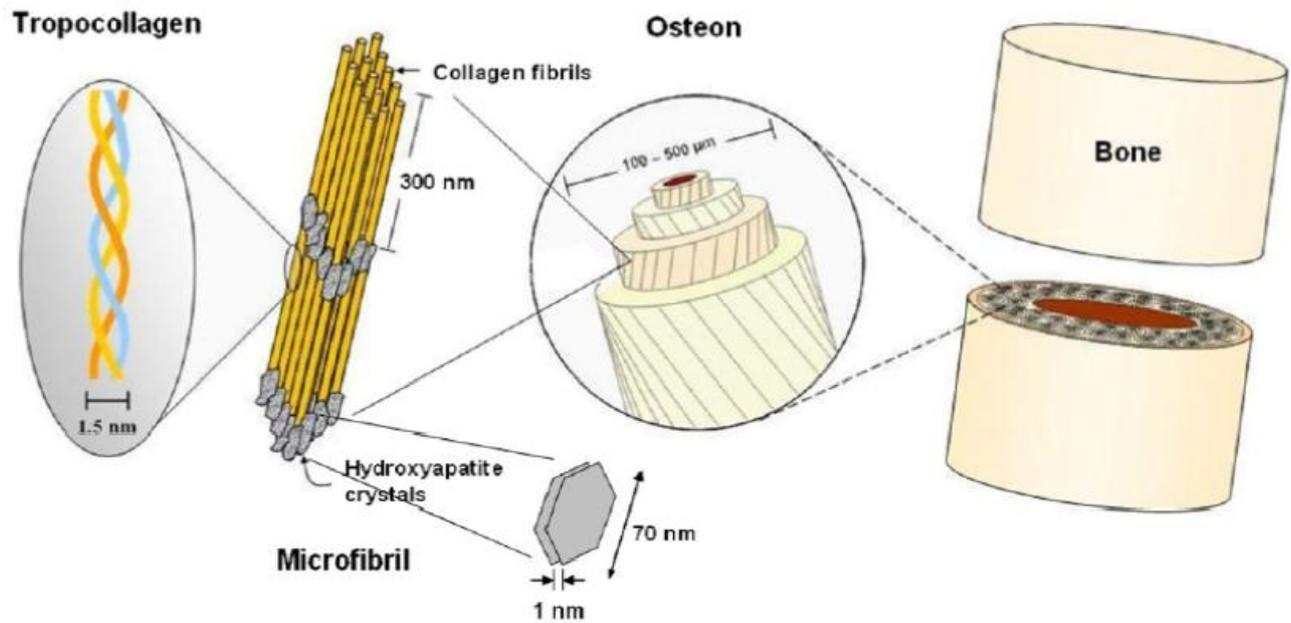


Figura 1.2: Componenti e organizzazione dell'osso alle diverse scale (Meyers et al., 2008).

1.1.2 Architettura dell'osso corticale

Oltre alle differenze nell'organizzazione dell'osso a livello macroscopico, ci sono anche diversi tipi di struttura architettonica di osso corticale a livello microscopico. Si possono distinguere tre forme principali di tessuto osseo corticale, a seconda del diverso impaccamento delle fibre: lamellare (o osteonale), fibrolamellare, e woven (Pani, 2011).

In Figura 1.3 sono rappresentate le prime due strutture precedentemente citate, mentre in Figura 1.4 è riportata la struttura woven.

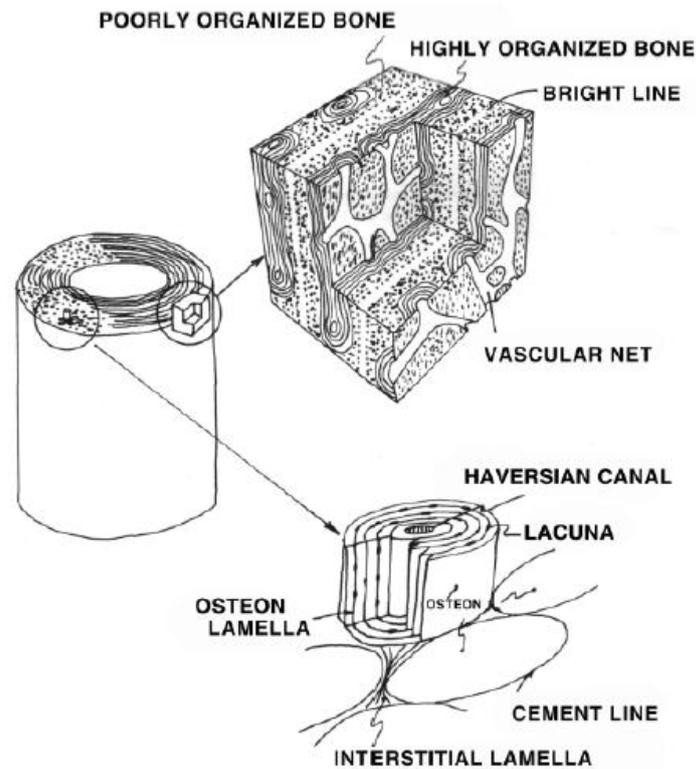


Figura 1.3: Struttura tipica dell'osso nella diafisi del femore. Sono rappresentati due tipi di osso corticale: fibrolamellare e osteonale (Cowan, 1989).

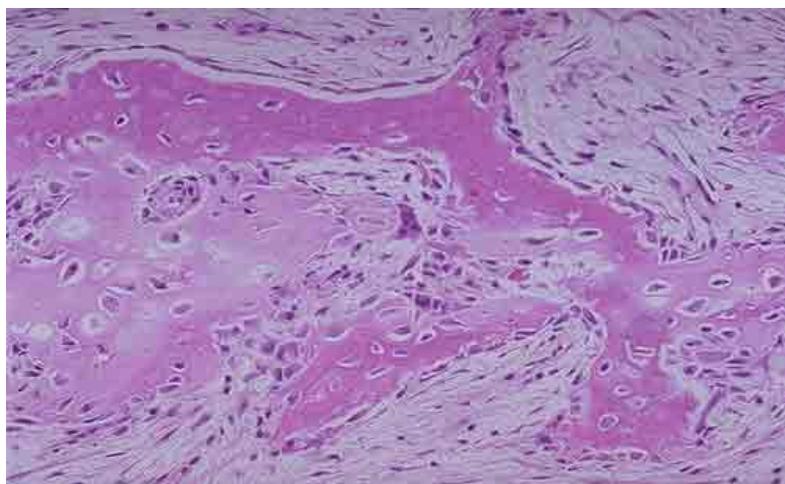


Figura 1.4: Struttura dell'osso woven (Pani, 2011).

Segue una descrizione più dettagliata dei tre tipi di osso corticale.

Osso lamellare

L'osso lamellare o osteonale consiste in una serie di fibre organizzate in lamine concentriche, dette lamelle, che costituiscono gli osteoni, elementi di base microstrutturali del tessuto osseo lamellare.

L'osteone, detto anche sistema di Havers, illustrato in Figura 1.5, è una struttura cilindrica di circa 200-250 μm di diametro, lunga circa 1-2 cm, costituita da strati concentrici di circa 3-8 lamelle intorno ad un canale centrale (canale di Havers). Gli osteoni si sviluppano parallelamente all'asse lungo dell'osso. Le cellule ossee (osteociti) si trovano in spazi vuoti, chiamati lacune, situati tra le lamelle. Tra lamelle adiacenti è presente inoltre una rete ramificata di vasi sanguigni, detti canalicoli, che si sviluppa radialmente dalle lacune al canale di Havers, il quale contiene a sua volta vasi sanguigni che scorrono parallelamente all'asse dell'osteone. A lamelle più sottili (circa 3 μm), ricche in microfibrille e relativamente povere in cristalli di apatite, si alternano lamelle più spesse (circa 7 μm), scarse in microfibrille e più mineralizzate. In queste ultime lamelle sono scavate le lacune ossee che accolgono i corpi degli osteociti (Bedini et al., 2009).

Si possono riconoscere due tipi di osteoni: primari e secondari. Gli osteoni primari sono strutture che si sviluppano intorno ai vasi sanguigni nella fase iniziale della crescita ossea, mentre quelli secondari si formano dopo il rimodellamento del tessuto. Le cellule dell'osso, durante questo processo, prima scavano un percorso tubolare attraverso il tessuto rigido, quindi depositano strato per strato i nuovi osteoni (Cowin, 1989; Cowin, 2001; Cowin and Doty, 2007).

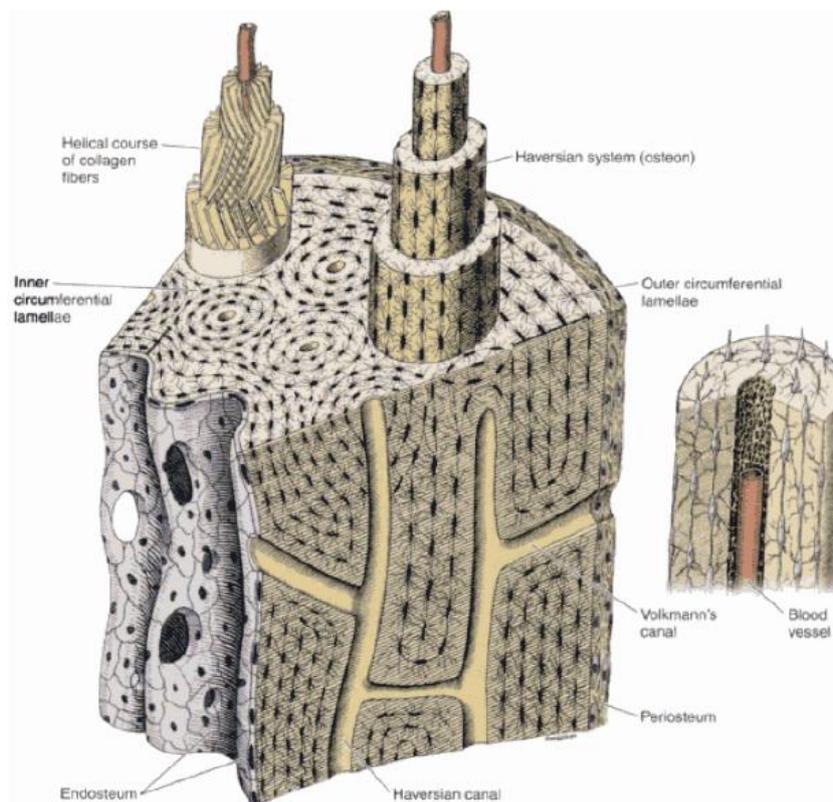


Figure 1.5: Struttura dell'osso lamellare (Junqueira and Carneiro, 1989).

Osso fibrolamellare

Questo tipo di tessuto si ha quando le lamelle sono nel complesso tangenti alla superficie esterna delle ossa, formando, insieme all'osso woven, una sovrapposizione di strati spessi circa 150-300 μm intorno alla circonferenza completa delle ossa (Figura 1.6). Tra ogni lamina vi è una rete di vasi sanguigni che è essenzialmente bidimensionale. Ogni lamella, come illustrato in figura Y, è suddivisa a sua volta in tre zone. La prima zona, che si estende dalla rete di vasi sanguigni fino a circa un terzo dello spessore totale, è composta da osso molto denso altamente organizzato. Nella seconda zona, che si estende per un ulteriore terzo dello spessore, ma a partire dalla superficie opposta della lamina, si trova un tessuto scarsamente organizzato. Tra le due esiste una fascia di tessuto osseo estremamente compatto detta bright line, che rappresenta il confine tra due reti di vasi sanguigni adiacenti e rispetto alla quale la lamina è simmetrica (Currey, 1960; Cowin, 1989).

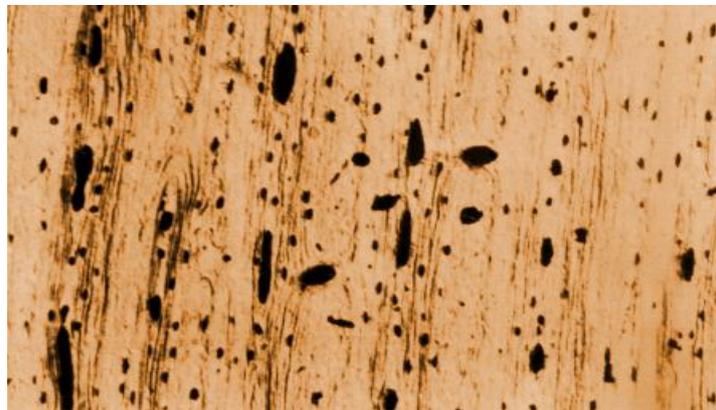


Figura 1.6: Struttura fibrolamellare dell'osso corticale (Cowin, 1989).

Osso woven

Tale tessuto è caratterizzato da una organizzazione casuale di fibre di collagene. L'osso woven (Figura 1.7) si trova di solito sia nel tessuto osseo corticale sia in quello trabecolare, nei giovani animali in crescita e negli adulti dopo una lesione ossea. Questo tipo di tessuto osseo è più debole rispetto ai precedenti tipi di osso corticale, ma si forma più rapidamente, e durante la normale maturazione viene gradualmente sostituito da osso fibrolamellare (Cowin and Doty, 2007; Pani, 2011).

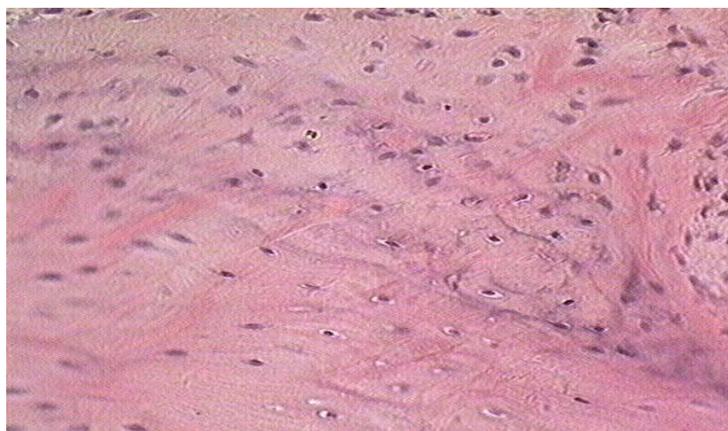


Figura 1.7: Tipica struttura dell'osso woven (Pani, 2011).

1.1.3 Modelli di osso lamellare

Le teorie sviluppate per spiegare la struttura lamellare degli osteoni secondari rientrano in due gruppi, entrambi focalizzati particolarmente sulla teoria dell'osteone alternato, costituito da strati alternati di due tipi di lamelle, scure e chiare.

Sono state presentate ipotesi diverse riguardanti le caratteristiche strutturali che differenziano un tipo di lamella dall'altro. Un gruppo di ricercatori attribuisce questa differenza all'orientamento dei principali componenti elementari del tessuto osseo: fibrille di collagene e cristalliti di idrossiapatite (Ascenzi and Benvenuti, 1986; Giraud-Guille, 1988; Weiner et al., 1997). Gebhardt (1906) è stato uno dei primi ricercatori a proporre un modello dettagliato in grado di spiegare le evidenze sperimentali. Egli ha suggerito che le differenze osservate in lamelle successive sulla base di esami con la luce polarizzata erano dovuti ad un cambiamento nell'orientamento dei fasci di fibrille. Sebbene la teoria di Gebhardt sia stata utilizzata a lungo come un modello per indagini in questo campo, non è universalmente accettata: un secondo gruppo di ricercatori (Marotti, 1993; Marotti, 1996; Marotti and Muglia, 1988) ha sviluppato una diversa teoria, attribuendo le differenze tra le lamelle alla diversa densità relativa delle componenti di base, asserendo cioè che la composizione di lamelle successive dovrebbe cambiare principalmente in termini quantitativi di collagene. Al momento, la prima ipotesi è di gran lunga la più accettata all'interno della comunità scientifica. Pertanto, la discussione riguarda soprattutto l'organizzazione di fibrille di collagene in strati successivi di una lamella.

Tuttavia, l'organizzazione delle fibrille di collagene all'interno di una lamella è solo un aspetto della sua struttura. Infatti, anche l'organizzazione e l'orientamento dei cristalli minerali di idrossiapatite all'interno e tra le fibrille è un importante oggetto di studio.

È possibile considerare le lamelle come un composito rinforzato con fibre (Currey, 1964, 1969; Giraud-Guille, 1988) o lamine (Wagner and Weiner, 1992; Weiner et al., 1999).

In questa sezione sono presentati modelli di struttura ossea lamellare con particolare attenzione alla struttura plywood assunta dalle fibrille di collagene mineralizzate e all'orientamento dei cristalli di idrossiapatite.

Struttura plywood

Materiali compositi fibrosi ordinati, noti anche come strutture plywood, sono spesso ritrovati in sistemi naturali, per lo più in tessuti extracellulari scheletrici o di protezione in cui si verifica spesso la deposizione di minerali (Neville, 1993). Questo modello è caratterizzato da insiemi di fibrille parallele e/o fasci di fibre presenti in strati distinti, con l'orientamento delle fibrille diverso in ogni strato.

La struttura plywood presenta una varietà affascinante di enigmi numerici, ciascuno dei quali ha una rilevante relazione struttura-funzione. Pertanto non sorprende che i ricercatori abbiano proposto diversi modelli per modellare la struttura delle lamelle.

Struttura plywood ortogonale

Gebhardt (1906) fu il primo a interpretare le differenze nei tipi lamellari in termini di orientamento dei componenti a percentuale più elevata. Usando la luce polarizzata, ha associato un aspetto scuro o chiaro alle lamelle, suggerendo che il diverso aspetto fosse dovuto a una differenza di orientamento delle fibrille. Più specificamente ha proposto quello che nella terminologia moderna è definito come un modello osteonale plywood ortogonale o quasi ortogonale, dove le fibrille di collagene cambiano orientamento da una lamella alla successiva.

Ascenzi e Bonucci (1967, 1968, 1970, 1976) hanno suggerito che le fibrille di collagene all'interno della stessa lamella fossero prevalentemente parallele e dotate di un orientamento preferenziale. L'orientamento delle fibre di collagene tra lamelle può cambiare fino a 90° rispetto alla lamella adiacente. Sulla base di questo, sono stati definiti tre tipi di osteoni contenenti tre differenti tipi di sottostrutture lamellari. Gli osteoni di tipo L (Figura 1.8 (a)) contengono lamelle le cui fibre di collagene sono orientate perpendicolarmente al piano della sezione, o parallelamente all'asse dell'osteone. Gli osteoni di tipo A (Figura 1.8 (b)) contengono orientamenti alternati dei fasci di fibre e quindi forniscono un pattern di fibre alternato chiaro e scuro sotto luce polarizzata. Gli osteoni di tipo T (Figura 1.8 (c)) contengono lamelle con fasci di fibre che sono orientate parallelamente al piano della sezione. Successivamente, Ascenzi e Benvenuti (1986) e Ascenzi et al. (1987), dopo un'indagine più accurata dell'organizzazione di tali strutture lamellari, hanno evidenziato che, nell'osso lamellare, lo spessore di tutti gli strati non fosse uguale: uno strato o una lamella sottili sono spesso seguiti da un elemento di maggior spessore, definendo così come unità di base ripetitiva una coppia di lamelle sottile e spessa. Inoltre, hanno scoperto l'esistenza di una evidente zona di transizione tra la lamella sottile e quella spessa, rendendo evidente che il materiale non fosse composto soltanto da una semplice struttura plywood ortogonale.

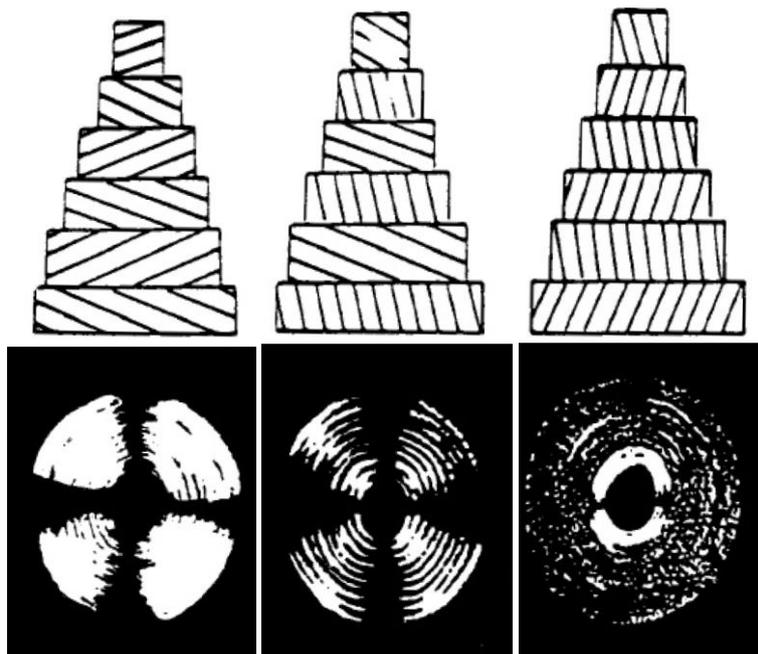


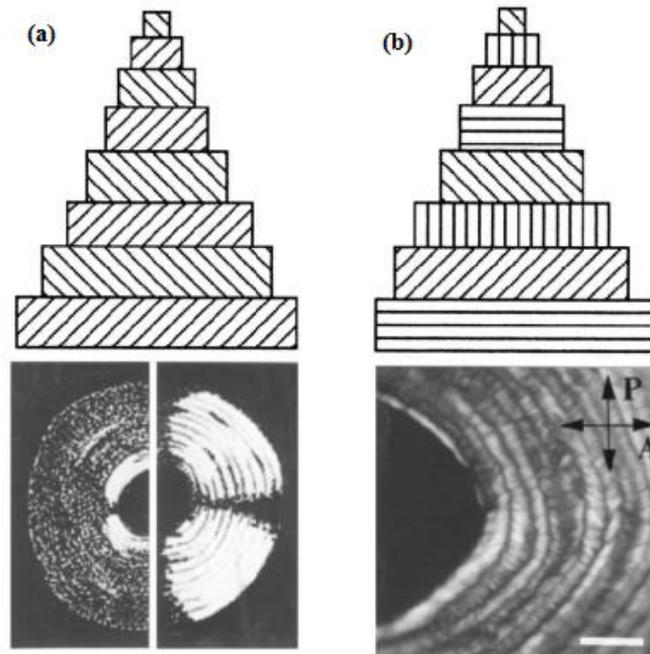
Figura 1.8: Modelli di osteoni come definiti da Ascenzi e Bonucci (1968). (a) Osteoni di tipo T. (b) Osteoni di tipo A. (c) Osteoni di tipo L (Martin and Burr, 1998).

Struttura plywood intrecciata

Il modello di Gebhardt è il più semplice modello di struttura plywood e consiste in fasci di fibrille parallele orientati ortogonalmente fra loro in strati alternati. Tuttavia, diversi ricercatori hanno evidenziato una maggior complessità della struttura. Giraud-Guille (1987, 1988) ha sviluppato il modello plywood intrecciato per l'architettura delle fibrille di collagene nella matrice dell'osso compatto.

Le osservazioni di Giraud-Guille per mezzo di microscopia a trasmissione elettronica (TEM) hanno rivelato una disposizione plywood ortogonale delle fibrille di collagene, ma anche una zona di cambiamento dell'orientamento delle fibrille di collagene. Per questo motivo due modelli osteonali principali coesistono nell'osso compatto. Il primo rientra nella descrizione classica degli osteoni sul modello plywood ortogonale, cioè con due orientamenti principali di fibrille (Figura 1.9a). Il secondo segue il modello plywood intrecciato, dove le fibrille di collagene subiscono piccole modifiche regolari nell'orientamento. In questo caso la struttura è continua ma al microscopio appare una certa stratificazione, cioè possiede un aspetto lamellare ad ogni 180° di rotazione delle direzioni fibrillari (Figura 1.9b).

La proposta di Giraud-Guille è che quasi tutte le fibrille di collagene mineralizzate siano allineate in piani paralleli nell'osso lamellare: tuttavia, questi fasci paralleli di fibrille hanno orientamenti diversi in diversi strati. La controversia sulla natura continua o discontinua degli orientamenti delle fibrille da una lamella alla successiva è stata risolta dall'osservazione delle due situazioni estreme tra cui variano le distribuzioni. Nella struttura plywood ortogonale l'angolo compreso tra strati consecutivi è di circa 90° , mentre nella struttura plywood intrecciata l'orientamento delle fibrille aumenta progressivamente da uno strato all'altro. In questo modo il modello plywood intrecciato affiancato alla teoria della rotazione continua delle fibre da uno strato al successivo rappresenta bene alcune proprietà ottiche degli osteoni.



**Figura 1.9: Due tipologie di osteoni reinterpretate dal modello di Ascenzi e Bonucci (1968).
(a) Osteoni di tipo chiaro o scuro in funzione del loro orientamento rispetto all'asse osteonale.
(b) Osteone di tipo intermedio con un orientamento degli strati di fibrille che cambia regolarmente
(Giraud-Guille et al., 2003).**

Struttura plywood ruotata

Weiner e altri autori hanno descritto in diversi lavori la struttura multistrato dell'osso lamellare (Weiner et al., 1991, 1997; Weiner and Wagner, 1998; Ziv et al, 1996a). Ponendo attenzione sull'orientamento delle fibrille di collagene in una unità lamellare (lamella sottile, lamella spessa e zona di transizione), hanno misurato gli angoli tra gli strati successivi di fibrille e proposto un modello riguardo l'organizzazione dei fasci di fibrille di collagene in una unità lamellare composta da cinque strati. Le loro osservazioni hanno rivelato discrete differenze angolari tra gli strati successivi di fibrille parallele di collagene. Le misure di questi angoli hanno mostrato che la maggior parte sono circa 30° , invece per un discreto numero di fibre più larghe intorno a 70° . Quindi, la struttura presenta quattro serie sequenziali di fasci di fibrille parallele che ruotano nel piano lamellare limite con incrementi di circa 30° . Inoltre, un ulteriore fascio di fibrille sottili delinea o un angolo grande (circa 70°) oppure un angolo piccolo (circa 30°) con uno dei suoi fasci di fibrille vicini. Questo pattern caratteristico può essere visto in (Figura 1.10a), in cui si presenta la struttura caratteristica ripetitiva composta da lamelle alternate approssimativamente nel piano della sezione e in quello perpendicolare ad esso. È inoltre possibile riconoscere anche le varie zone di transizione. Ogni lamella è costituita da fasci di fibrille di collagene, che sono più o meno parallele tra loro e chiaramente visibili con i loro assi ben allineati.

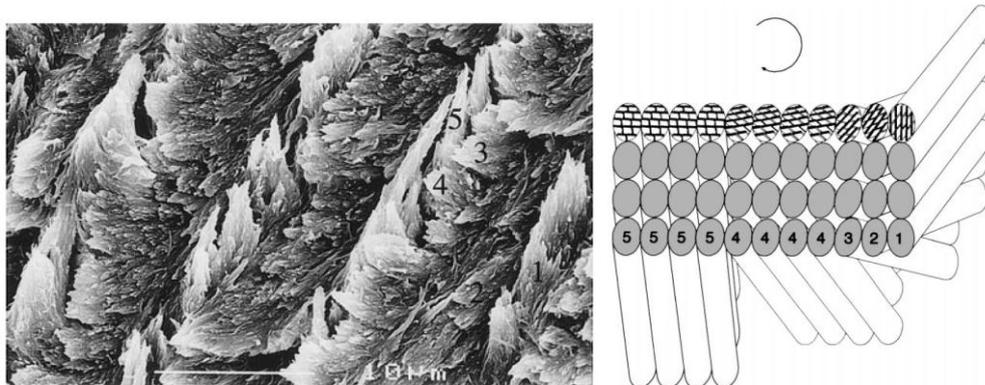


Figura 1.10: (a) Micrografia SEM della superficie di frattura di osso lamellare umano. Gli orientamenti dei cinque sotto-strati possono essere osservati in diverse porzioni della superficie. (b) Illustrazione schematica del modello di un'unità lamellare (Weiner et al., 1999).

La sintesi di queste osservazioni ha permesso loro di proporre un modello semplice per l'organizzazione del collagene di una singola unità lamellare (Weiner et al., 1997). Questo è schematicamente illustrato in Figura 1.10b. La prima serie di fibrille adiacenti ad un lato del confine lamellare è allineata perpendicolarmente all'asse lungo dell'osso, come osservato da Weiner et al. (1991) e Ziv et al. (1996a), e a questa configurazione è arbitrariamente assegnato un angolo di 0° . Dopo quattro incrementi di 30° il fascio finale è orientato di 120° . Di conseguenza, questo modello può spiegare una significativa tendenza di orientamento di circa 30° e minore presenza di orientamenti a 70° . Quest'ultimo dovrebbe idealmente essere 60° , indicando che il modello non è affatto accurato a pochi gradi. Tale struttura è denominata modello plywood ruotato, poiché le fibrille mineralizzate strutturalmente ortotrope sono ruotate sia rispetto al bordo lamellare sia rispetto al proprio asse fibrillare.

In questo modello i due fasci principali di fibrille parallele di collagene in un'unità lamellare sono ortogonali tra loro. Proprio come il modello plywood ortogonale, anche la struttura ruotata è inclusa nel modello, poiché esso è coerente con il fatto che tra le cosiddette lamelle spesse e sottili vi sia una zona di transizione con fibrille in orientamenti intermedi differenti. Infatti, la lamella di spessore maggiore è orientata all'incirca ortogonalmente alla lamella sottile: se la zona di transizione tra i due è piccola, allora avrà l'aspetto di un plywood ortogonale, nel caso contrario un plywood ruotato. Pertanto, il modello plywood ruotato offre concettualmente una sintesi di tutti i modelli descritti riguardanti l'osso lamellare. Un'unità lamellare è composta da cinque sotto-strati, ognuno dei quali costituito da una serie di fibrille di collagene mineralizzate, allineate tra loro. Gli orientamenti di questi fasci differiscono in ciascun sottostrato rispetto sia gli assi delle fibrille di collagene sia ai cristalli stessi, tale per cui si forma una struttura plywood ruotata complessa. La variabile principale riguardo le fibrille di collagene è il diverso spessore dei sottostrati, piuttosto che l'angolo di orientamento da uno strato all'altro.

Recentemente l'impiego di un nuovo metodo che combina misurazioni tramite raggi X da sincrotrone con un fascio ampio $1\ \mu\text{m}$, in grado di scansionare una sezione sottile ($3\text{-}5\ \mu\text{m}$) di un osteone secondario nell'ordine di $1\ \mu\text{m}$, ha permesso di ottenere informazioni quantitative dettagliate sulla struttura osteonale (Fratzl and Gupta, 2007; Wagermaier et al., 2006, 2007). La Figura 1.11 mostra la variazione dell'orientamento delle fibrille attraverso e all'interno la lamella dell'osso, con risoluzione spaziale di $1\ \mu\text{m}$.

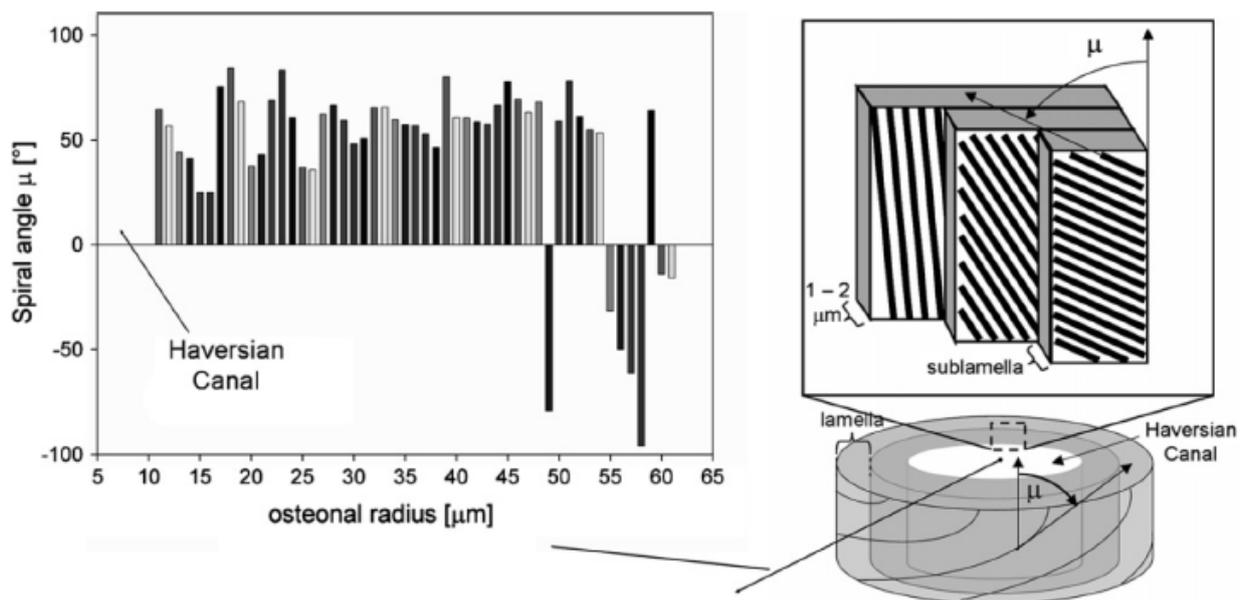


Figura 1.11: Modello di orientamento delle fibre all'interno della lamella di un osteone (Fratzl and Gupta, 2007).

Le fibre sono disposte secondo angoli differenti all'interno della singola lamella: l'orientamento dell'asse della fibra varia periodicamente con un periodo di circa $5\ \mu\text{m}$, corrispondente approssimativamente alla larghezza della singola lamella. Ciò implica che ogni lamella è costituita da una serie di fasci di fibrille orientati con angoli diversi rispetto all'asse dell'osteone (Figura 1.11, a sinistra). In media essi possiedono un angolo positivo a spirale,

tale per cui le fibre formano una spirale destrorsa attorno all'asse osteonale come una molla. Inoltre, vi è una variazione periodica dell'angolo lungo il diametro dell'osteone (Figura 1.11, a destra), con un periodo simile alla larghezza della lamella ($5\ \mu\text{m}$). È interessante notare che gli angoli sono sempre positivi, tranne per raggi più grandi di $40\ \mu\text{m}$, quando si ha un passaggio nell'osso interstiziale circostante. Ciò implica che, in media, ogni lamella ha un angolo a spirale non nullo rispetto all'asse lungo dell'osteone, con una ellitticità destrorsa.

Organizzazione dei cristalli

L'organizzazione di cristalli nel tessuto osseo è molto più difficile da indagare rispetto a quella del collagene, soprattutto a causa delle difficoltà nella preparazione di campioni sottili contenenti la componente minerale da analizzare.

Weiner et al. (1991) hanno dimostrato che i cristalli sono disposti in strati paralleli appiattiti che attraversano la fibrilla. I cristalli crescono all'interno della struttura di collagene e si ritrova un maggiore volume di componente minerale nelle regioni di gap piuttosto che in quelle di sovrapposizione. L'organizzazione dei cristalli si estende anche su alcune fibrille di collagene adiacenti. Dalle osservazioni precedenti è stato dedotto che la forma predominante dell'organizzazione dei cristalli in un singolo sottostrato di un'unità lamellare è un fascio di fibrille parallele con gli strati di cristallo in posizione allineata tra una fibrilla e la successiva. Le osservazioni precedenti sono state confermate da analisi tomografiche TEM (Landis et al., 1993) e tramite microscopia a forza atomica (AFM) (Erts et al., 1994).

Questa nanostruttura è sottoposta principalmente a carico monoassiale, come illustrato schematicamente in Figura 1.12a. Sotto tensione uniassiale, il percorso di trasferimento del carico nella nanostruttura segue una catena di tensione-taglio, con i cristalli minerali appiattiti sotto tensione e la matrice organica sotto sforzo di taglio (Figura 1.12b). A livello della nanoscala dunque, i cristalli minerali normalmente fragili diventano resistenti alla propagazione di fratture. Al di sotto della scala nanometrica, i cristalli minerali non risentono della propagazione di cricche preesistenti (Gao, 2006).

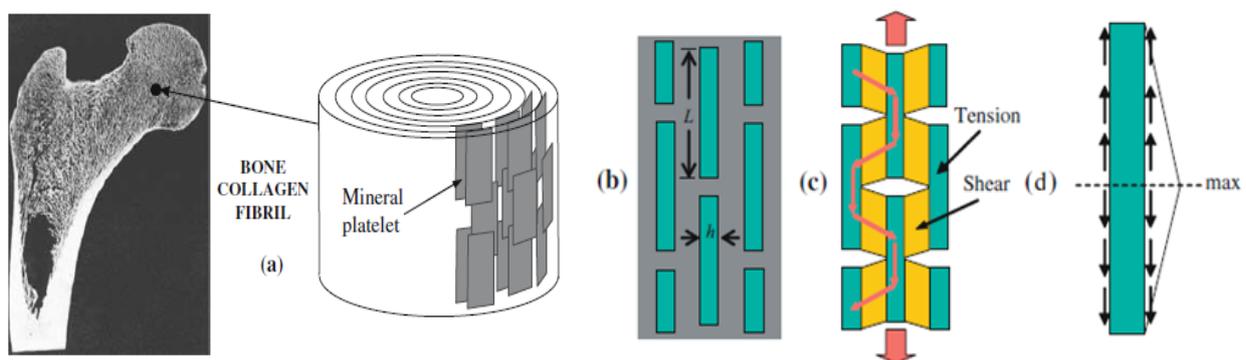


Figura 1.12: (a, b) Disposizione della componente minerale. (c, d) Trasferimento del carico tra componente organica e minerale (Gao, 2006).

È stato osservato qualitativamente un effetto di rotazione tramite micrografie della superficie di frattura attraverso SEM (Figura 1.13). L'orientamento dello strato minerale adiacente al bordo di unità lamellare sembra essere parallelo al piano del bordo, mentre in alcuni degli altri sottostrati appare ruotato: questo è chiaramente verificato nel quarto e quinto

sottostrato, orientati diversamente rispetto al primo. A giudicare dalla frequenza di particelle ossee esaminate al TEM, in cui gli strati di cristalli sono ruotati l'uno rispetto all'altro mentre gli assi principali risultano ancora allineati, gli autori hanno ipotizzato che la rotazione degli strati di minerale avviene anche entro il secondo e terzo sottostrato.

Gli autori hanno concluso da queste osservazioni che le fibrille di collagene in sottostrati adiacenti non sono solo orientate in direzioni diverse, dando luogo alla struttura plywood, ma sono anche ruotate intorno ai loro assi per cambiare l'orientamento degli strati di cristallo. Ciò è schematicamente illustrato in Figura 1.10b, dove gli strati di cristalli in sottostrati successivi ruotano in una certa direzione per formare la struttura plywood, descritta in dettaglio precedentemente.

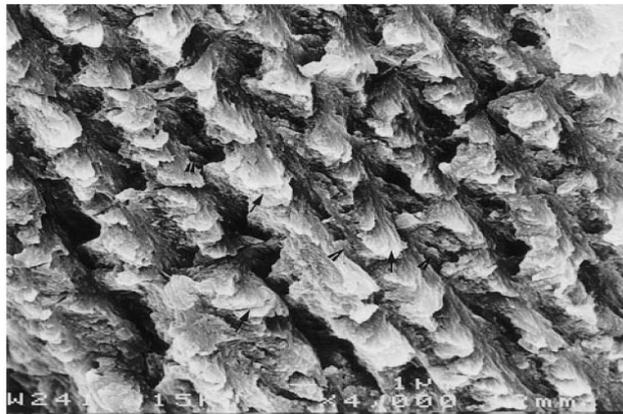


Figura 1.13: SEM di una superficie di frattura che mostra la struttura stratificata del quarto sottostrato e l'orientamento del quinto sottile sottostrato orientato in una direzione differente (Weiner et al., 1999.).

1.1.4 Anisotropia e simmetria nell'osso corticale

L'osso corticale può essere considerato un materiale anisotropo, eterogeneo e linearmente elastico, in cui è possibile trascurare la componente viscoelastica nel caso le deformazioni applicate durante un test di caratterizzazione siano applicate abbastanza lentamente in modo da trascurare gli effetti tempo-dipendenti (Katz and Bronzino, 2000).

Le proprietà meccaniche dell'osso corticale dipendono dalle proprietà meccaniche dei suoi componenti, nonché dal contributo di ciascuno dei livelli gerarchici descritto precedentemente. Inoltre, le proprietà variano con l'orientamento, aspetto caratteristico del comportamento meccanico dell'osso corticale. Esso infatti risulta più resistente e più rigido quando viene caricato lungo la direzione longitudinale, che congiunge idealmente le diafisi di un osso lungo, rispetto alle direzioni circonferenziale e radiale, come è possibile osservare in Figura 1.14b. Questa struttura resiste quindi in modo più efficiente agli sforzi uniassiali che si sviluppano lungo l'asse longitudinale durante le normali attività a cui è soggetto lo scheletro.

Il comportamento dell'osso a livello della macroscale è stato ampiamente documentato, ma si riconosce che le sue proprietà meccaniche cambiano a seconda della scala di osservazione, a causa delle diverse proprietà meccaniche delle sue componenti e delle relazioni strutturali che intercorrono tra essi ai vari livelli gerarchici.

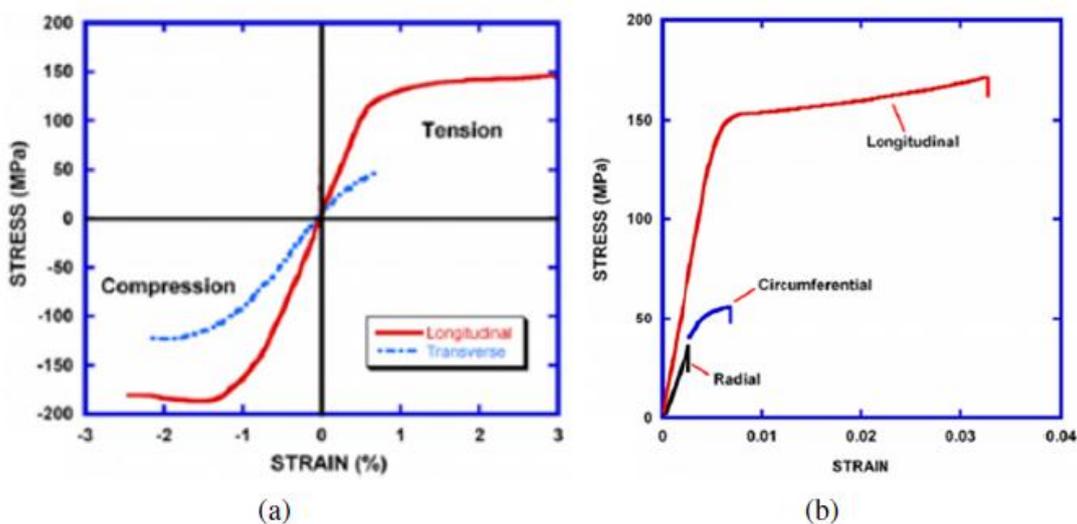


Figura 1.14: (a) Curve sforzo-deformazione, a trazione e compressione, di osso corticale nelle direzioni longitudinale e trasversale (Lucas et al., 1999). (b) Effetto dell'orientazione sulle curve sforzo-deformazione a trazione di osso lamellare bovino (Currey, 2006).

Osservando la figura 1.14a si può osservare che l'osso, sottoposto a una prova di trazione o compressione uniassiale a rottura, inizialmente assume un comportamento elastico lineare seguito da un netto punto di snervamento e una rottura a livelli di deformazione relativamente bassi (Turner et al., 1999; Meyers et al., 2008).

Si notano però differenze tra il comportamento a trazione e a compressione: lo sforzo a rottura è più elevato in compressione, mentre la deformazione a rottura è più elevata in caso di trazione, anche se è necessario sottolineare che l'entità di queste deformazioni diminuisce con l'invecchiamento dell'osso (Burstein et al., 1976). L'osso corticale è relativamente più fragile a trazione se caricato in direzione trasversale rispetto alla direzione longitudinale,

diversamente dal comportamento a compressione per cui esso risulta ugualmente fragile per carichi in entrambe le direzioni (Ascenzi and Bonucci, 1967; Burnstein et al., 1972; Currey, 1998; McElhaney et al., 1964; Reilly et al., 1974). Alcuni valori di modulo elastico, sforzo a rottura e snervamento dell'osso corticale umano, ricavati dalla letteratura (Martin and Burr, 1998; Reilly and Burstein, 1975), sono riportati in Tabella 1.2.

Proprietà	Direzione	Origine	Valore [MPa]
Snervamento a trazione	Longitudinale	Umano	115
Snervamento a trazione	Longitudinale	Bovino	141
Snervamento a compressione	Longitudinale	Umano	182
Snervamento a compressione	Longitudinale	Bovino	196
Snervamento a compressione	Trasversale	Umano	121
Snervamento a compressione	Trasversale	Bovino	150
Rottura a trazione	Longitudinale	Umano	133
Rottura a trazione	Longitudinale	Bovino	153
Rottura a trazione	Trasversale	Umano	51
Rottura a trazione	Trasversale	Bovino	50
Rottura a compressione	Longitudinale	Umano	195
Rottura a compressione	Longitudinale	Bovino	237
Rottura a compressione	Trasversale	Umano	133
Rottura a compressione	Trasversale	Bovino	178
Modulo elastico	Longitudinale	Umano	17400
Modulo elastico	Longitudinale	Bovino	20400
Modulo elastico	Trasversale	Umano	9600
Modulo elastico	Trasversale	Bovino	11700

Tabella 1.2: Caratteristiche meccaniche per osso corticale umano (Martin and Burr, 1998; Reilly and Burstein, 1975).

Diversi autori hanno ottenuto valori per i moduli elastici provenienti da bovino e sono state applicate diverse tecniche sperimentali per determinare le caratteristiche di rigidità e resistenza. Ad esempio, McElhaney et al. (1964) hanno ottenuto un modulo elastico in compressione di 20,5 GPa e sforzo massimo a rottura di 92 MPa. Reilly et al. (1974) hanno conseguito un modulo elastico e carico di rottura che variavano rispettivamente da 23,1 a 30,4 GPa e da 129 a 182 MPa. Lucksanasombol et al. (2003) hanno misurato un modulo elastico dell'osso corticale bovino pari a 16.7 ± 3.3 GPa, senza specificarne la direzione. Hengsberger et al. (2003) hanno correlato il modulo di indentazione ottenuto tramite nanoindentazione alle proprietà macroscopiche del tessuto, ottenendo valori fra 20,3 e 27,6 GPa.

Novitskaya et al. (2011) hanno investigato le proprietà meccaniche di osso corticale bovino tramite compressione in direzione longitudinale, radiale e trasversale (Figura 1.15). L'osso è

stato analizzato in vari stati: non trattato (UT), demineralizzato (DM) e deproteinizzato (DP). Il modulo di Young longitudinale per i campioni UT, DP e DM vale rispettivamente 22.6 ± 1.2 , 9.2 ± 2.8 e 0.232 ± 0.009 GPa. Questi risultati indicano che la maggior parte della rigidità proviene dal contributo della fase minerale, come previsto. Il modulo di Young trasversale per i campioni UT, DP e DM risulta rispettivamente 16.2 ± 1.4 , 2.2 ± 0.3 , 0.132 ± 0.015 GPa mentre per i radiali rispettivamente 12.4 ± 0.4 , 2.6 ± 0.5 , 0.06 ± 0.009 GPa. Le differenze nei valori del modulo di Young tra i casi UT e DP sono minime.

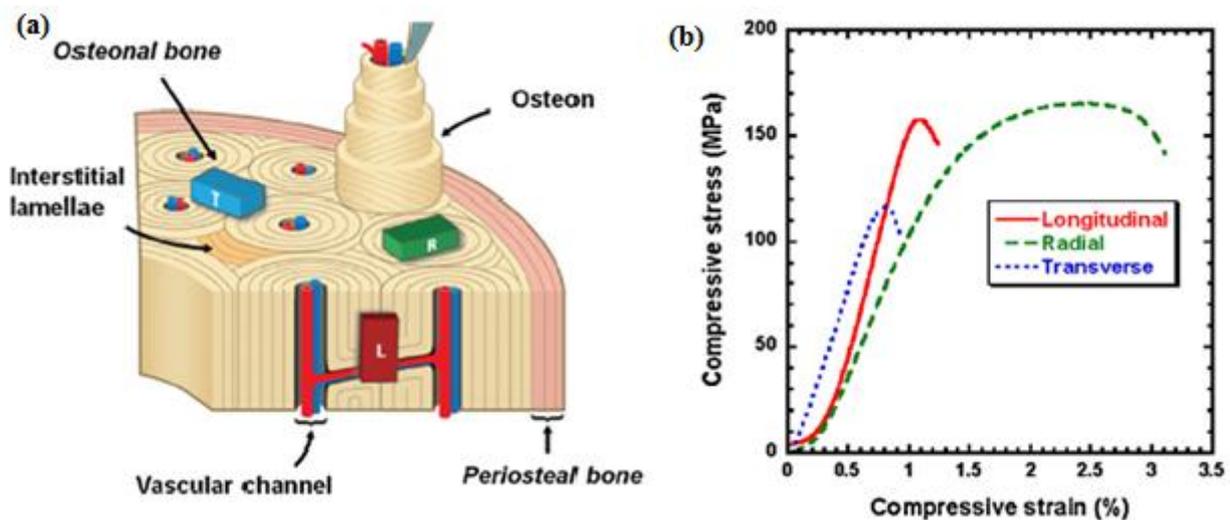


Figura 1.15: (a) Rappresentazione della microstruttura del tessuto osseo e orientazione anatomica dei campioni longitudinali L, radiali R e tangenziali T. (b) Curve stress-strain ottenute in direzione longitudinale, radiale e tangenziale (Noviyskaya et al., 2011).

Viguet-Carrin et al. (2008) hanno svolto test macroscopici di flessione su ossa di vitello, analizzando i parametri di campioni che avevano subito diversi trattamenti, ottenendo per l'osso non trattato un modulo elastico longitudinale di 6.299 ± 1.411 GPa (Tabella 1.3).

Modulo di Young [MPa]	Sforzo di snervamento [MPa]	Deformazione di snervamento []	Sforzo a rottura [MPa]	Deformazione a rottura []	Porosità [%]
6299 ± 1411	126 ± 24	0.023 ± 0.003	162 ± 25	0.048 ± 0.011	0.15 ± 0.67

Tabella 1.3: Parametri meccanici ottenuti (Viguet-Carrin et al., 2008).

Sono stati condotti ulteriori studi sull'anisotropia delle proprietà meccaniche dell'osso corticale da Reilly e Burstein (1975) e Cezayirlioglu et al. (1985). In questi lavori gli autori mostrano come queste cambino al variare dell'angolo compreso tra la direzione di applicazione del carico e l'asse longitudinale dell'osso (Figura 1.16). Nell'ipotesi di isotropia trasversa, tutte le direzioni che creano un angolo fisso con la direzione assiale sono tra loro equivalenti (Cowin and Doty, 2007). In particolare sono stati indagati gli sforzi a rottura a trazione e compressione in corrispondenza degli angoli di 0° , 30° , 60° e 90° , in cui gli angoli di 0° e 90° coincidono rispettivamente con la direzione assiale e con una qualsiasi direzione giacente nel piano di isotropia. I dati ottenuti sono presentati in Tabella 1.4.

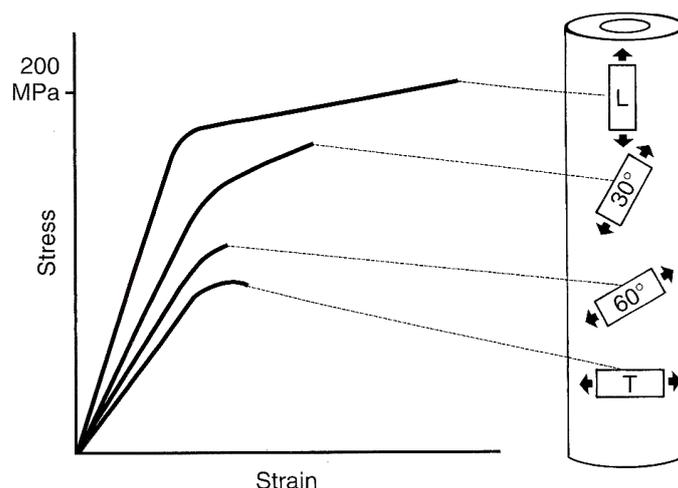


Figura 1.16: Dipendenza delle proprietà meccaniche dalla direzione (Cowin and Doty, 2007).

Origine	Direzione dello sforzo (angolo con l'asse longitudinale)	Sforzo di snervamento [MPa]	Sforzo a rottura [MPa]	Deformazione a rottura []
Umano	Trazione (0°)	115±11.2	133±14.1	0.0293±0.0094
	Compressione (0°)	182±14.4	195±19.6	0.0220±0.0057
	Trazione (30°)		100±11.4	0.0198±0.0083
	Compressione (30°)		173±13.8	0.0280±0.0052
	Trazione (60°)		61±12.2	0.0069±0.0022
	Compressione (60°)		133±15.0	0.0311±0.0010
	Trazione (90°)		51±11.1	0.0072±0.0016
	Compressione (90°)	121±9.2	133±16.7	0.0462±0.0260
Bovino	Trazione (0°)	141±17.1	156±23.5	0.0324±0.0161
	Compressione (0°)	196±18.5	237±38.6	0.0253±0.0096
	Trazione (30°)		109±9.0	0.0118±0.0025
	Compressione (30°)		190±12.6	0.0250±0.0038
	Trazione (60°)		60±9.8	0.0075±0.001
	Compressione (60°)		148±2.6	0.0320±0.0006
	Trazione (90°)		50±12.5	0.0067±0.0024
	Compressione (90°)	150±30.7	178±31.1	0.0517±0.0199

Tabella 1.4: Sforzo di snervamento, sforzo a rottura e deformazione a rottura per osso corticale umano e bovino (Cowin and Doty, 2007).

Al fine di comprendere in maniera opportuna il comportamento anisotropo di un materiale, è necessario indagarne il grado di anisotropia.

In un materiale ortotropo, il suo comportamento in ogni punto può essere descritto in relazione a tre assi principali mutuamente ortogonali tra loro. Se invece esiste una simmetria

rispetto a un asse principale del materiale allora si parla di isotropia trasversa. Nel caso in cui i tre assi possano essere scambiati tra loro senza che il materiale mostri alcuna direzione preferenziale si ricade nella particolare condizione di isotropia (Bartel et al., 2006). Per quanto riguarda il tessuto osseo corticale, la tipologia di struttura e il grado di anisotropia che lo caratterizzano presentano un'elevata variabilità a seconda del sito anatomico analizzato. Nel caso di osso lamellare, la struttura presenta un'anisotropia di tipo ortotropo, invece, nel caso di osso osteonale, gli osteoni mostrano una simmetria trasversalmente isotropa, come mostrato in Figura 1.17.

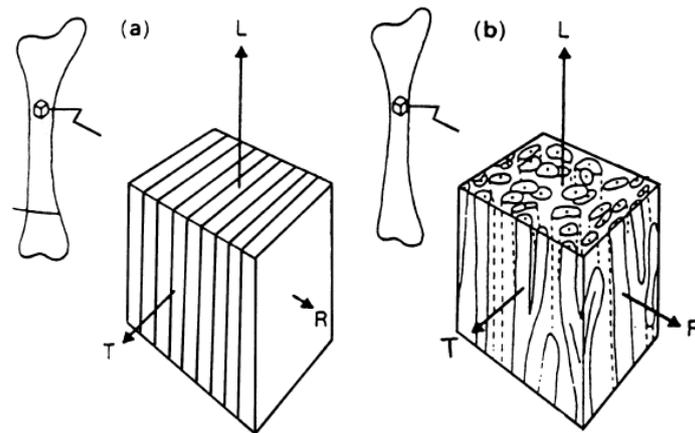


Figura 1.17: Disegno che mostra come l'osso lamellare (a) differisca maggiormente tra la direzione radiale e tangenziale (R e T) rispetto all'osso osteonale (b) (Wainwright et al., 1982).

Per identificazione un particolare tipo di simmetria per il tessuto osseo è necessario definire un sistema di riferimento coerente con le direzioni principali del materiale.

La direzione principale del sistema, indicata successivamente dal pedice 3, è quella parallela allo sviluppo delle fibre dell'osso. Questa direzione è considerata principale poiché lungo essa si riscontra la rigidità maggiore. Invece le altre due direzioni, indicate dai pedici 1 e 2, giacciono sul piano perpendicolare alla prima e, rispettivamente, in direzione tangenziale e normale alle lamine circolari dell'osso lamellare, come illustrato in figura 1.5. L'esistenza di questi tre piani di isotropia mostra che l'osso sviluppa naturalmente una simmetria ortotropo.

Un materiale ortotropo è descritto da nove costanti elastiche indipendenti: tre moduli di Young E_i , con $i = 1, 2, 3$, tre moduli tangenziali G_{12}, G_{23}, G_{31} e sei moduli di Poisson ν_{ij} , di cui tre indipendenti, con $i, j = 1, 2, 3$ e $i \neq j$. Nel caso di isotropia trasversa il numero di costanti elastiche viene ridotto a cinque dato che:

$$E_1 = E_2; \nu_{12} = \nu_{21}; \nu_{32} = \nu_{31} = \nu_{13} = \nu_{23}; G_{23} = G_{31}. \text{ Inoltre, } G_{12} = \frac{E_1}{2(1 + \nu_{12})} .$$

Infine, in caso di isotropia, le costanti elastiche si riducono ai due soli parametri E e ν .

La scelta del tipo di simmetria per un modello elastico dell'osso dipende innanzitutto dall'obiettivo previsto dallo studio. L'analisi dello stato di sforzo dell'osso all'interno di un femore umano, ad esempio, può essere descritta in maniera sufficientemente adeguata da un modello elastico trasversalmente isotropo (Cowin, 1989). Varie costanti elastiche ottenute in questo tipo di lavori sono riportate in Tabella 1.5.

	Reilly, Burstein, Frankel (1974)	Yoon, Katz (1976)	Knets, Mamesiters (1977)	Ashman, Cowin, Van Buskirk, Rice (1984)
Tipo di osso	Femore	Femore	Tibia	Femore
Simmetria ^a	TI	TI	ORTH	ORTH
Metodo ^b	M	U	M	U
E ₁ [GPa]	11.5	18.8	6.91	12.0
E ₂ [GPa]	11.5	18.8	8.51	13.4
E ₃ [GPa]	17.0	27.4	18.4	20.8
G ₁₂ [GPa]	3.6 ^c	7.17	2.41	4.53
G ₁₃ [GPa]	3.3	8.71	3.56	5.61
G ₂₃ [GPa]	3.3	8.71	4.91	6.23
ν ₁₂	0.58	0.312	0.49	0.376
ν ₁₃	0.31 ^c	0.193	0.12	0.222
ν ₂₃	0.31 ^c	0.193	0.14	0.235
ν ₂₁	0.58	0.312	0.62	0.422
ν ₃₁	0.46	0.281	0.32	0.371
ν ₃₂	0.46	0.281	0.31	0.350

^a Tipo di simmetria, ORTH ortotropa, TI trasversalmente isotropa

^b Metodo impiegato per ricavare la grandezza, U ultrasuoni, M prova meccanica

^c Quantità non misurata

Tabella 1.5: Costanti ingegneristiche per osso corticale umano (Cowin,1989).

I dati presentati in Tabella 1.5 indicano che le differenze che intercorrono tra le costanti elastiche ottenute sperimentalmente considerando un'anisotropia elastica ortotropa (ORTH) o trasversalmente isotropa (TI) sono ragionevolmente limitate. Quindi se l'uso desiderato delle costanti elastiche è quello di descrivere un modello dello stato di sforzo interno di un particolare osso, l'ipotesi di una simmetria trasversalmente isotropa è adeguatamente giustificata (Reilly and Burstein, 1974; Cowin, 1989). Al contrario, se la finalità dell'indagine è, ad esempio, il comportamento fisiologico del tessuto osseo in termini di perfusione sanguigna, le differenze nei due approcci possono portare a risultati differenti. La diversa rigidità nelle tre direzioni determina infatti un percorso preferenziale dei vasi sanguigni: essi partono dal canale haversiano e si estendono in direzione radiale piuttosto che in direzione circonferenziale, dove la rigidità è maggiore e quindi si ipotizza una permeabilità minore (Currey, 1960). In questo caso si rende necessaria una trattazione ortotropa dell'osso, per cogliere i comportamenti differenti della grandezza oggetto di studio nelle tre direzioni.

Diversi autori (Katz and Ukraincik, 1971; Lang, 1969; Yoon and Katz, 1976a, 1976b) assumono che l'osso sia trasversalmente isotropo, con l'asse osso longitudinale come unico asse di simmetria. Qualsiasi piccola differenza nelle proprietà elastiche tra le direzioni radiali

e circolari è considerata trascurabile e non altera la simmetria di base. Pertanto, in questo caso, sono indipendenti solo cinque costanti elastiche. Al contrario, altri autori (Ashman et al., 1984; Knetts and Malmeisters, 1977; Van Buskirk et al., 1981) hanno cercato le differenze nelle proprietà elastiche tra la direzione radiale e tangenziale, per valutare l'osso come un materiale ortotropo, richiedendo così nove costanti elastiche indipendenti.

Per quanto riguarda i singoli osteoni, Ascenzi e altri collaboratori ne hanno esaminato le proprietà meccaniche per mezzo di prove meccaniche tradizionali: trazione (Ascenzi and Bonucci, 1967), compressione (Ascenzi and Bonucci, 1968) e torsione (Ascenzi et al., 1994) (Tabella 1.6).

I termini longitudinale, trasversale e alternato si riferiscono all'orientamento dei fasci di fibre di collagene rispetto al piano della sezione dell'osteone: gli osteoni longitudinali (o trasversali) hanno un orientamento prevalente in direzione longitudinale (o trasversale), invece gli osteoni che hanno orientamenti formanti un angolo acuto tra loro sono chiamati osteoni alternati.

Tipo di osteone	Test meccanico	Modulo elastico [GPa]	Sforzo a rottura [MPa]
Longitudinale	Trazione	11.7	114
Alternato	Trazione	5.5	94
Longitudinale	Compressione	6.3	110
Trasversale	Compressione	9.3	164
Alternato	Compressione	7.4	134
Longitudinale	Taglio	3.3	46
Trasversale	Taglio	4.2	57
Alternato	Taglio	4.1	55

Tabella 1.6: Proprietà meccaniche di singoli osteoni (Ascenzi et al., 1967, 1968, 1994).

Per investigare l'anisotropia dell'osso corticale alla sub-microscala è necessario conoscere le proprietà meccaniche delle singole lamelle in orientamenti diversi. Tuttavia, sebbene molte informazioni strutturali a questo livello siano state ottenute usando microscopia ottica, diffrazione a raggi X e microscopia elettronica, misurazioni dirette delle proprietà meccaniche a questa scala diventano estremamente complicate, a causa dell'esistenza dell'architettura gerarchica intrinseca del tessuto, rendendo questo obiettivo molto impegnativo da raggiungere.

Svariati autori (Aoubiza et al., 1996; Biltz and Pellegrino, 1969) hanno sviluppato un modello computazionale di osteone, sviluppando valori per le costanti ingegneristiche espresse in GPa relative all'osso corticale (Tabella 1.7), determinando inoltre l'influenza sul modello di parametri come porosità, percentuale di collagene e componente minerale (Figura 1.18).

C₁₁	C₃₃	C₄₄	C₆₆	C₁₂	C₁₃
22.8 ± 0.10	34.5 ± 0.00	5.93 ± 0.40	5.31 ± 0.08	10.48 ± 0.20	9.5 ± 0.11

Tabella 1.7: Costanti ingegneristiche per osso corticale (Aoubiza et al., 1996).

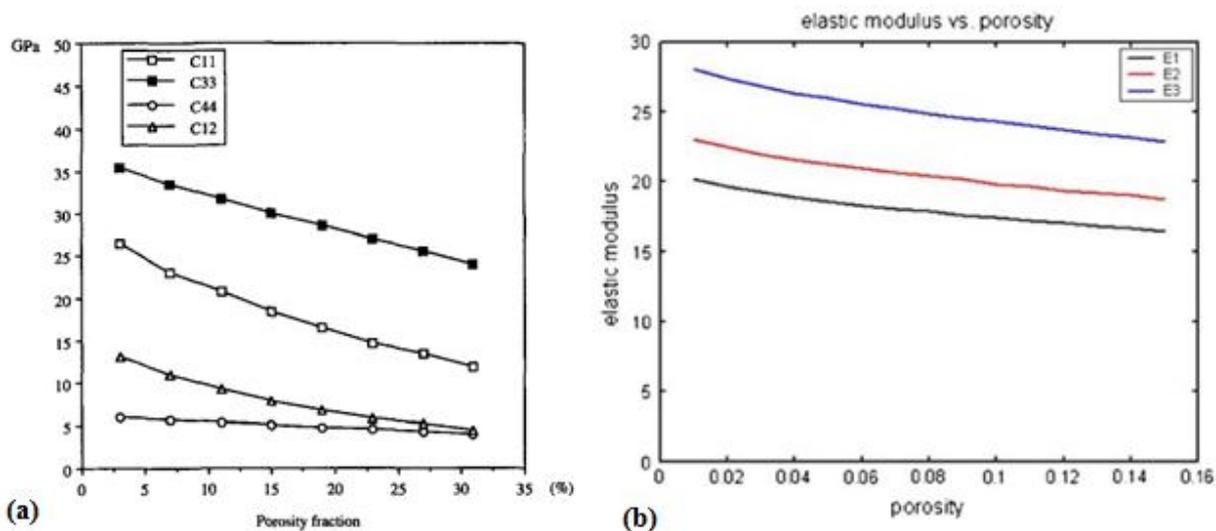


Figura 1.18: Andamento delle costanti ingegneristiche (a) (Aoubiza et al., 1996) e dei moduli elastici (b) (Biltz and Pellegrino, 1969) in funzione della porosità.

Seto et al. (2008) hanno valutato le proprietà del materiale delle singole unità fibrolamellari di un osso plessiforme a trazione e in condizioni di umidità controllata. Poiché struttura e orientamento delle fibrille possono variare significativamente su scale di lunghezza di 10-100 μm , sono stati eseguiti test di microtrazione su campioni di dimensioni micrometriche con fibrille di struttura omogenea al fine di determinare le proprietà meccaniche anisotrope della unità di base fibrillare nell'osso fibrolamellare. Le unità di osso fibrolamellare sono state sezionate ad angoli diversi rispetto all'asse principale delle fibre di collagene. Sono state eseguite misure a trazione meccanica: quando il carico è applicato ai campioni a 0, 10, 20, 30, 45, 60 e 90° rispetto all'asse principale della fibra di collagene, si nota che sia il modulo elastico che il carico di rottura decrescono notevolmente a mano a mano che l'inclinazione di orientamento del campione si allontana da quella dell'asse della fibra. L'entità di questa diminuzione indica il grado di anisotropia. Sono stati misurati dei rapporti di anisotropia, definita come il rapporto tra il coefficiente di rigidezza trasversale e quello in direzione longitudinale, pari a 1:20 per il modulo elastico e 1:15 per la resistenza a trazione in un campione idratato. Questi rapporti si riducono a 1:8 e 1:7, rispettivamente, in condizioni dry. Questi risultati dimostrano un alto grado di anisotropia meccanica nell'osso fibrolamellare.

A livello della scala nanometrica, alcuni studi che hanno utilizzato demineralizzazione selettiva e metodi acustici hanno dato spiegazioni sul ruolo complementare del collagene e della componente minerale (Hasegawa et al., 1994; Pidaparti et al., 1996; Turner and Burr, 1997; Turner et al., 1995). Sono stati misurati rapporti di anisotropia su tessuto osseo demineralizzato e decollagenizzato, ottenendo rapporti di anisotropia di circa 1.5 e 1.1 rispettivamente per l'osso decollagenizzato e demineralizzato. Ciò suggerisce che l'anisotropia meccanica nel tessuto osseo deriva principalmente dalla fase inorganica (componente minerale), poiché i rapporti di anisotropia misurati sono stati essenzialmente gli stessi nei casi di tessuto osseo intatto e di tessuto decollagenizzato. Di fatto, il collagene isolato è più o meno isotropo e solo la presenza di minerali fa aumentare il suo rapporto di anisotropia.

1.1.5 Fattori rilevanti nella caratterizzazione delle proprietà meccaniche

Le proprietà meccaniche dell'osso corticale dipendono da diversi parametri quali specie, età, sesso, presenza di patologie, e altri fattori. Inoltre, le sue proprietà variano tra individui differenti in ossa diverse dello stesso soggetto e anche in zone diverse dell'osso stesso (Goldstein, 1987; Rho et al., 1995).

Per vari tipi di ossa umane (compresi femore, tibia, omero, vertebre lombari, mandibola, rotula), sono stati studiati il modulo elastico, il modulo di taglio, il coefficiente di Poisson e la densità, determinando valori specifici del sito di analisi, utilizzando anche tecniche ad ultrasuoni (Rho, 1991; Rho et al., 1995). È stata notata di fatto una variazione delle proprietà meccaniche dell'osso corticale umano di tibia, femore e omero tra soggetti diversi e tra zone diverse dello stesso soggetto.

Altri fattori rilevanti nella caratterizzazione meccanica del tessuto osseo sono la porosità, l'organizzazione e la composizione delle fibrille mineralizzate (Hoc et al., 2006; Rho et al., 1997, 1999a; Roy et al., 1999; Zysset et al., 1999). La porosità influenza le proprietà meccaniche (Sevostianov and Kachanov, 2000) come la mineralizzazione, che è fortemente legata all'età. In generale, aumentando il contenuto minerale l'osso risulta essere più rigido e meno resistente.

In letteratura è possibile ritrovare numerose relazioni tra porosità e modulo elastico. A titolo d'esempio, Carter e Spengler (1978) hanno considerato l'osso come un materiale poroso, definendo una relazione tra modulo di Young E e porosità: $E = k * (1 - p)^3$, dove p rappresenta la porosità, $1-p$ una frazione volumetrica e k una costante.

Durante un test anche il grado di idratazione dell'osso è un fattore rilevante, poiché l'osso deidratato risulta più rigido, e vengono influenzati anche parametri come tenacità e durezza (Cowin, 2001; Rho and Pharr, 1999). Seto et al. (2008) hanno dimostrato inoltre un alto grado di influenza dell'idratazione sull'anisotropia meccanica dell'osso fibrolamellare.

Feng e Jasiuk (2010) hanno sviluppato un modello computazionale riguardante test a trazione macroscopici su provini di tessuto osseo umano dalle geometrie diverse, giungendo alla conclusione che anche la geometria del campione possa influire sui parametri della caratterizzazione meccanica.

Il tessuto osseo presenta anche un comportamento viscoelastico a causa della sua composizione, risultando in genere più rigido e più resistente a più alte velocità di deformazione (Cowin, 2001). Un altro importante parametro che influisce dunque sulle proprietà meccaniche del tessuto osseo è lo strain rate, ovvero la velocità di deformazione.

Si riporta di seguito un'analisi approfondita dell'effetto della velocità di deformazione, in quanto uno dei maggiori parametri che ha avuto effetto sui risultati ottenuti in questo lavoro.

Numerosi autori (Crowninshield and Pope, 1974; Currey, 1975; Evans et al., 1992; McElhaney, 1965, 1966; Pithioux et al., 2004; Robertson and Smith, 1978; Saha and Hayes, 1974, 1976; Wright and Hayes, 1976) hanno effettuato test a diversi strain rate, giungendo alla conclusione che anche la modalità di prova stessa influisce sui parametri meccanici come il modulo elastico, concludendo che a bassi strain rate, esso risulta notevolmente più basso rispetto ai valori canonici riportati in letteratura.

In generale, le proprietà meccaniche dell'osso vengono valutate con strain rate relativamente bassi, variabili tra 10^{-3} e 10 s^{-1} (Tabella 1.8).

Riferimento	Tipo di osso ³	Tipo di prova	Strain rate [s ⁻¹]	E	σ_Y	ϵ_Y	Sforzo a rottura	ϵ_f	U_F
Currey (1975)	BF	T	0.00013-0.16	↑	↑	↑	↑		
Evans et al. (1992)	EM	T	0.0001-1	↑			→	∩	∩
Pithioux et al. (2004)	BF	T	0.00014-17	→			↓	↓	
Saha and Hayes (1974, 1976)	B, H	T	0.0025; 133				↑		→
Crowninshield and Pope (1974)	BT	T	0.001-200	↑	↑	↑	↑	↓	∩
Wright and Hayes (1976)	BF	T	0.00053-237	↑			↑		↑
Robertson and Smith (1978)	PM, BF	C	0.00013-0.16				→		∩
McElhaney (1965, 1966)	H, BF	C	0.001-1500	↑			↑	↓	∩

³ B: tibia e femore bovini, BT: tibia bovina, BF: femore bovino, EM: metacarpo equino, H: umano, PM: mandibola porcina

↑: aumenta, ↓: diminuisce, →: piccolo cambiamento con lo strain rate, ∩: prima aumenta poi diminuisce
T: trazione, C: compressione

Tabella 1.8: Effetto dello strain rate su alcuni parametri meccanici.

McElhaney (1966) ha eseguito test di compressione su osso umano e bovino a vari strain rate, variabili tra 0.001 e 1500 s^{-1} , ottenendo una serie di curve riportate in Figura 1.19. Come si può osservare, da uno strain rate di 0.001 a 1 s^{-1} il modulo elastico passa da circa 14 a 23 GPa .

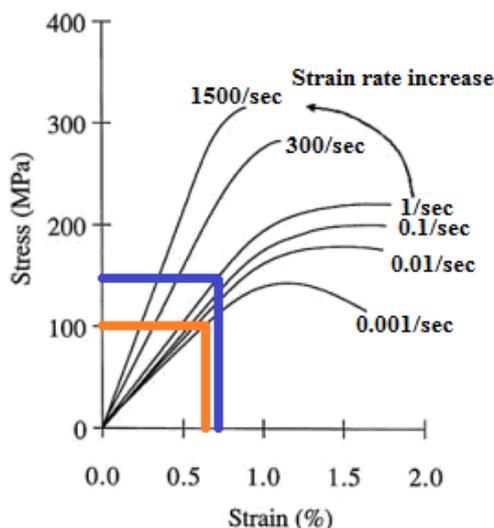


Figura 1.19: Effetto dello strain rate su curve stress-strain su osso umano e bovino (McElhaney, 1966).

Wright and Hayes (1976) hanno riportato in un grafico l'andamento del modulo elastico e dello sforzo a rottura a trazione in funzione dello strain rate dopo aver effettuato test a trazione su osso bovino corticale. Come risulta evidente dalla figura, esiste una certa proporzionalità diretta tra strain rate e modulo elastico, nonché resistenza a trazione (Figura 1.20).

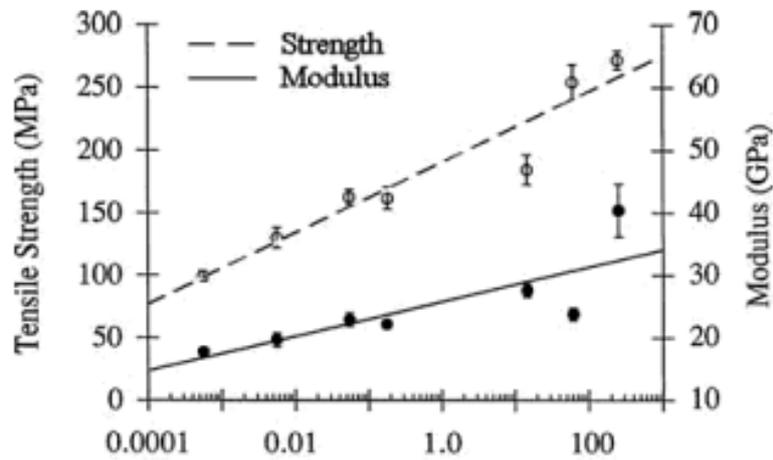


Figura 1.20: Andamento in funzione dello strain rate di modulo elastico e resistenza a trazione (Wright and Hayes, 1976).

Hansen et al. (2008) hanno testato osso corticale femorale umano in direzione longitudinale a strain rate compresi tra 0.14–29.1 s^{-1} in compressione e tra 0.08–17 s^{-1} in trazione. Il modulo di Young generalmente aumenta in funzione di strain rate maggiore, sia in compressione sia in trazione (Figura 1.21).

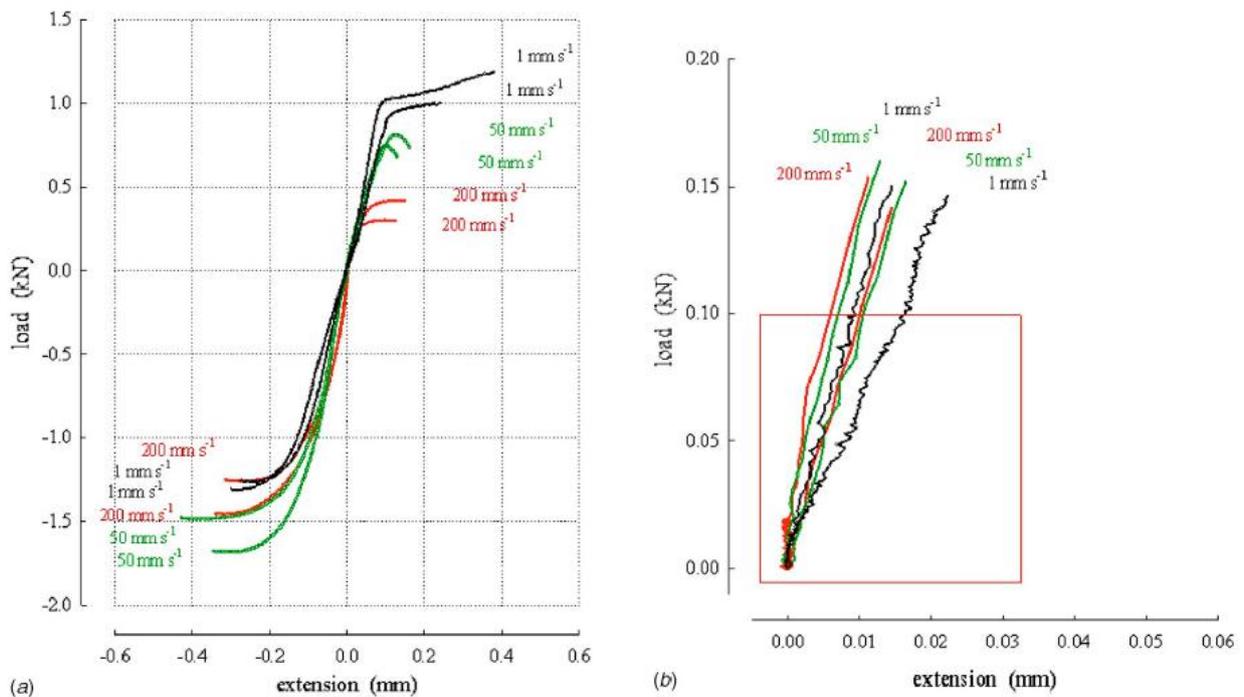


Figura 1.21: Curve forza-spostamento ottenute con diversi strain rate (Hansen et al., 2008).

Kulin et al. (2008, 2011) hanno effettuato test di flessione e compressione di femori equini a diversi strain rate. Anche in questo caso, a strain rate bassi (10^{-3} s^{-1}) il valore di modulo elastico risulta più basso rispetto a quelli noti in letteratura, sia in direzione longitudinale sia in direzione trasversale. Tra uno strain rate di 10^{-3} e 10^3 s^{-1} , il modulo elastico passa circa da 10 a 22 GPa in direzione longitudinale, e da 7 a 11 GPa in direzione trasversale.

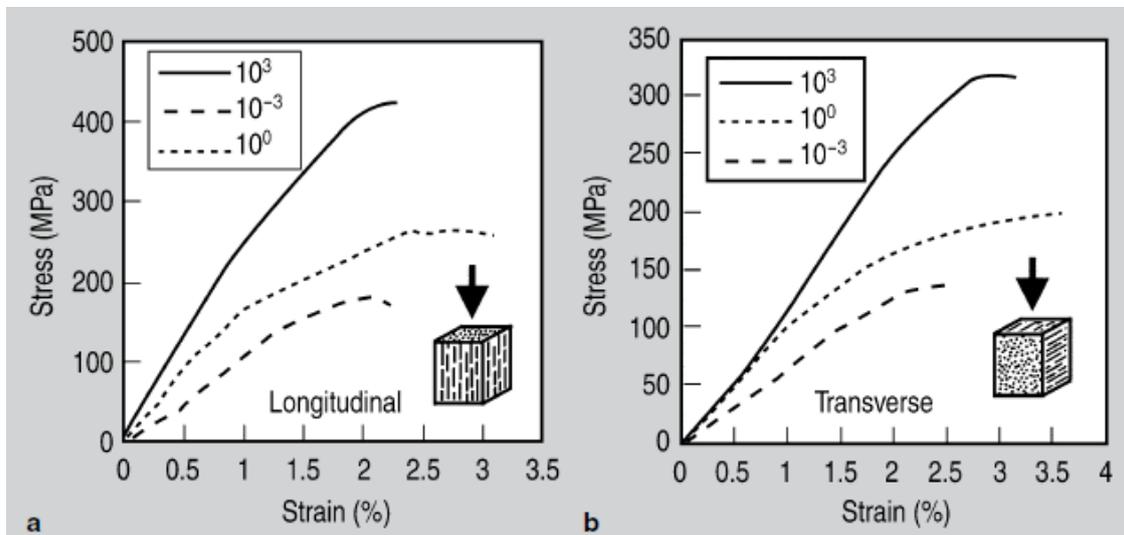


Figura 1.22: Effetto dello strain rate su curve stress-strain in direzione longitudinale e trasversale (Kulin et al., 2008).

Yu et al. (2011) hanno eseguito test di compressione assiale su osso bovino a diversi strain rate, variabili da 0.26 a 260 s^{-1} , con un rispettivo modulo elastico variabile da 13 a 17.5 GPa (Figura 1.23).

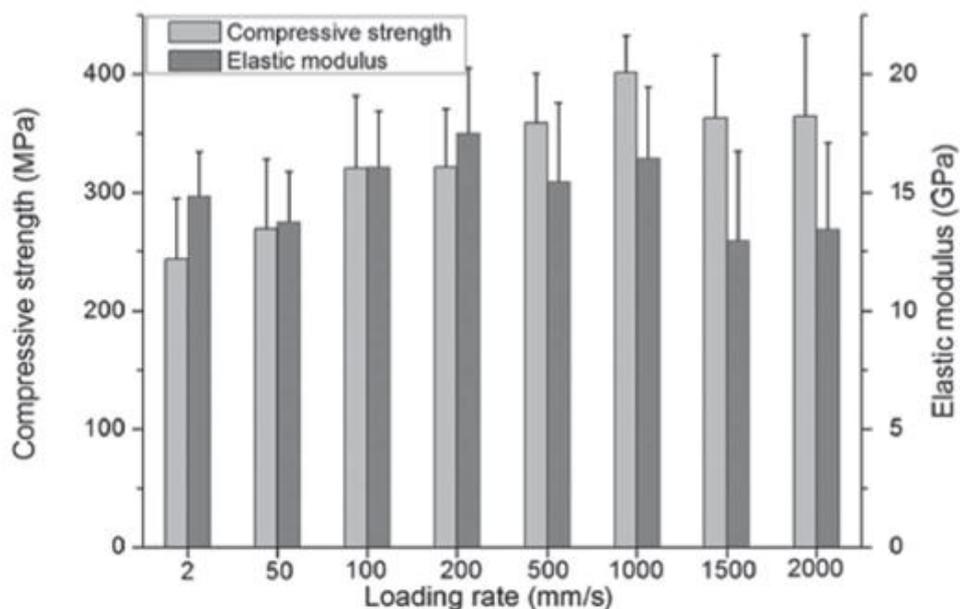


Figura 1.23: Resistenza a compressione e modulo elastico su osso bovino a diversi strain rate (Yu et al., 2011).

Crowninshield and Pope (1974) si sono occupati della risposta dell'osso corticale bovino in trazione a vari strain rate, variabili da 0.001 a 200 s⁻¹. L'andamento del modulo elastico in funzione dello strain rate è riportato nel seguente grafico (Figura 1.24). Come è possibile notare, il modulo elastico in trazione non varia molto in funzione dello strain rate, sia in direzione longitudinale (da circa 11 a 15 GPa rispettivamente a bassi ed alti strain rate), sia in direzione trasversale, il quale risulta praticamente costante.

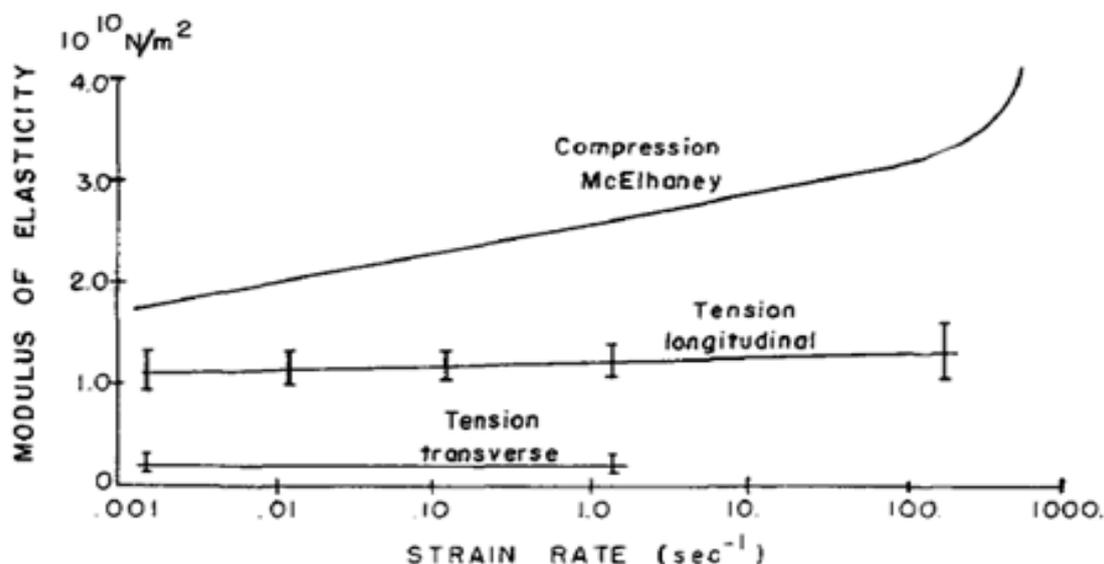


Figura 1.24: Andamento del modulo elastico in funzione dello strain rate in una prova di trazione su osso corticale bovino (Crowninshield and Pope, 1974).

Ferreira et al. (2006) hanno condotto test macroscopici quasi-statici di compressione su osso bovino femorale, ad alti strain rate, in direzione longitudinale e circonferenziale, ottenendo i valori riportati in Tabella 1.9.

Direzione	Sforzo a rottura [MPa]	Deformazione a rottura [mm/m]	Modulo elastico [GPa]
Longitudinale	281 ± 42.4	32.6 ± 7.2	9.9 ± 2.7
Circonferenziale	240 ± 66.4	37.3 ± 4.5	6.8 ± 2.1

Tabella 1.9: Parametri meccanici ottenuti tramite test di compressione su osso bovino (Ferreira et al., 2006).

Adharapurapu et al. (2006) hanno svolto test di compressione su osso bovino femorale in stato dry e wet, in direzione longitudinale e trasversale, a diversi strain rate, variabili da 10⁻³ a 10³ s⁻¹ (Figura 1.25). I campioni dry hanno dimostrato un modulo elastico maggiore e un maggiore sforzo a rottura e presentano valori più alti per strain rate più alti. In condizioni wet si ritrova per la direzione longitudinale un modulo di circa 8 GPa e uno sforzo di snervamento di circa 150 MPa con uno strain rate dell'ordine di 10⁻³ s⁻¹. Nel caso di strain rate pari a 10³ s⁻¹ tale modulo vale circa 21 GPa. Anche il valore dello sforzo di resistenza a compressione aumenta con l'aumentare dello strain rate.

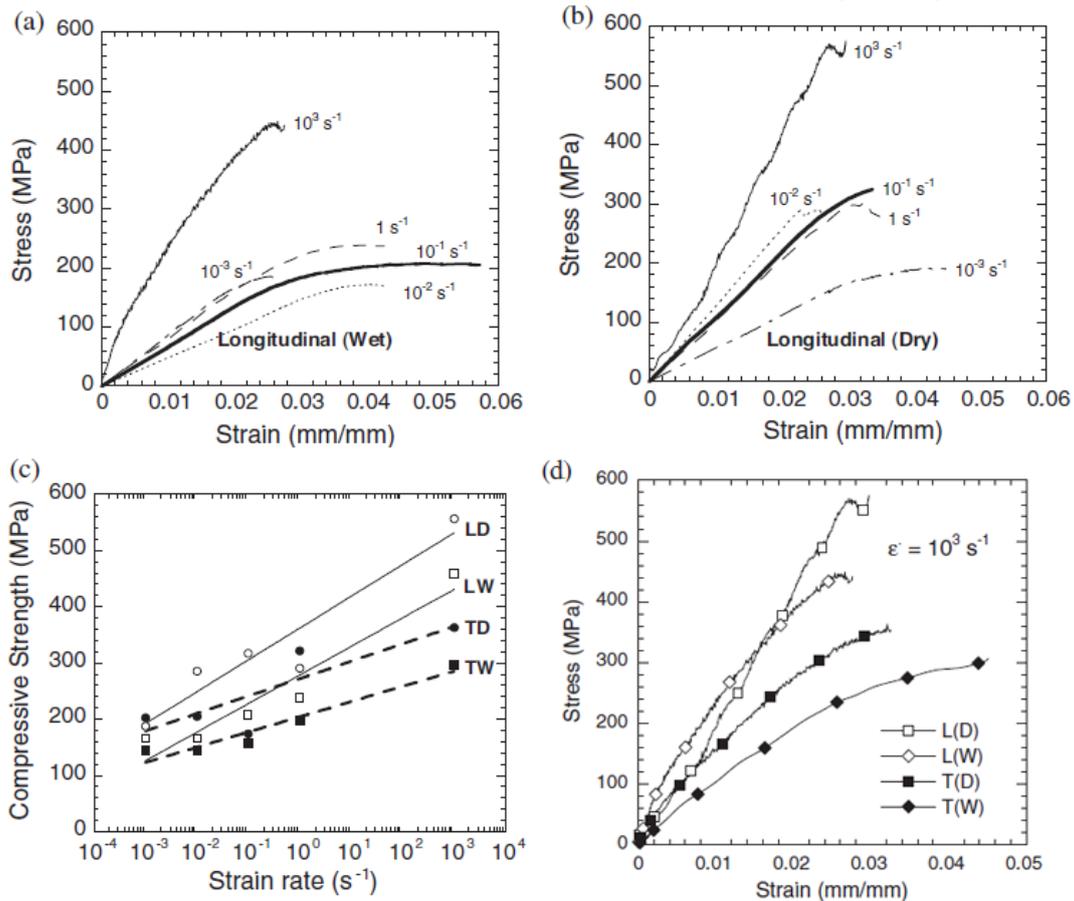


Figura 1.25: (a,b) Comportamento a compressione di osso bovino in stato wet e dry in direzione longitudinale a vari strain rate. (c) Andamento della resistenza a compressione in funzione dello strain rate. (d) Curve stress-strain ad uno strain rate di 10^3 s^{-1} (Adharapurapu et al., 2006).

Szabò et al. (2011) hanno eseguito test di flessione su una singola trabecola ossea di bovino a vari strain rate, tra 0.01 e 3.39 s^{-1} , ottenendo risultati per il modulo elastico longitudinale variabili da 1.13 a 16.46 GPa . Anche questo risultato evidenzia l'effetto dell'applicazione di un certo strain rate sulle caratteristiche meccaniche dell'osso.

Manilay et al. (2012) hanno valutato le proprietà meccaniche di osso femorale da bovino giovane e adulto mantenuti idratati tramite test di compressione a 10^{-3} s^{-1} . Il soggetto adulto ha presentato valori più alti di rigidità e porosità minore (5%), a differenza del soggetto giovane (8%). Sono riportati di seguito i risultati e le curve ottenute (Tabella 1.10 e Figura 1.26).

Età	Direzione	Resistenza a compressione [MPa]	Modulo elastico [GPa]	Rapporto di anisotropia [E_l/E_t]
Adulto	Longitudinale	184 ± 14.7	20.5 ± 2.3	1.58 ± 0.21
	Trasversale	156.5 ± 5.3	13.0 ± 2.3	
Giovane	Longitudinale	113.3 ± 39.4	6.6 ± 1.9	1.25 ± 0.29
	Trasversale	121.0 ± 3.2	5.3 ± 0.1	

Tabella 1.10: Proprietà meccaniche valutate ad uno strain rate di 10^{-3} s^{-1} su osso bovino giovane e adulto (Manilay et al., 2012).

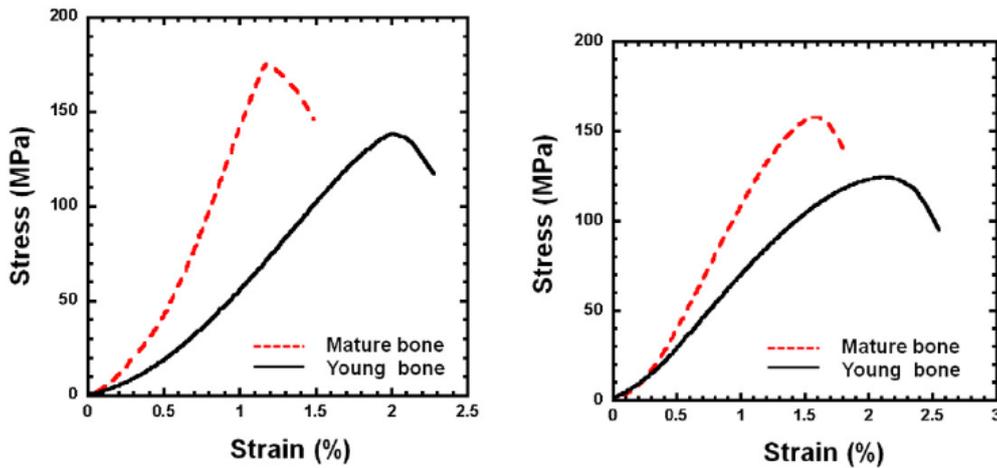


Figura 1.26: Curve stress-strain per osso bovino giovane e adulto (Manilay et al., 2012).

Linde et al. (1993) hanno testato provini cilindrici di osso trabecolare dell'epifisi prossimale tibiale in modo non distruttivo dopo un intervallo di tempo variabile tra 1.5 e 2.5 ore dall'asportazione dell'arto e nuovamente dopo 24 ore, conservando i provini in soluzione salina. I risultati hanno evidenziato una diminuzione del 10% nella rigidità e nell'energia rilasciata allo scarico (area sotto la curva forza-spostamento misurata in fase di scarico), e un incremento del 10% nel rapporto tra l'energia d'isteresi e quella di carico, quantificando con questo parametro la variazione della pendenza tra la curva di carico e quella di scarico.

Si conclude quindi che nell'esecuzione di prove meccaniche sul tessuto osseo ci siano molte incertezze, a causa di numerosi parametri coinvolti, dipendenti sia dal materiale, quali ad esempio densità, porosità, età, specie, posizione anatomica, geometria e difetti, sia dalla prova stessa, quali ad esempio velocità di deformazione, condizione di idratazione e modalità e tempo di conservazione. Ciò porta quindi ad un'ampia variabilità dei risultati meccanici ottenibili, risultato comunque atteso quando ci si occupa dello studio di un materiale biologico.

1.1.6 Meccanismi deformativi a livello della nanoscala

Quando si caratterizza un materiale biologico, come ad esempio l'osso corticale, si può osservare come le proprietà meccaniche del materiale dipendano decisamente dalle proprietà delle singole componenti e dalle interazioni che intercorrono tra queste alle varie scale di organizzazione gerarchica. È possibile indagare quindi i principali meccanismi che regolano la deformazione di queste strutture ai vari livelli di organizzazione e di come questi determinino il comportamento macroscopico del tessuto. Tuttavia, a causa della complessa struttura dell'osso, è difficile identificare e definire quantitativamente i meccanismi deformativi a livello delle fibre di collagene e quindi risalire al comportamento a rottura e di deformazione post-elastica macroscopica. Nel meccanismo di deformazione del materiale intercorrono le deformazioni delle fibrille di collagene mineralizzato, dei cristalli di idrossiapatite e della matrice di collagene in cui questi sono immersi (Hoo et al., 2011).

Gupta et al. (2005, 2006a) hanno studiato la deformazione a livello delle fibrille tramite tecnica SAXS (Small-angle X-Ray scattering), misurando gli spostamenti sia delle fibre sia del tessuto a seguito dell'applicazione di uno sforzo noto a priori.

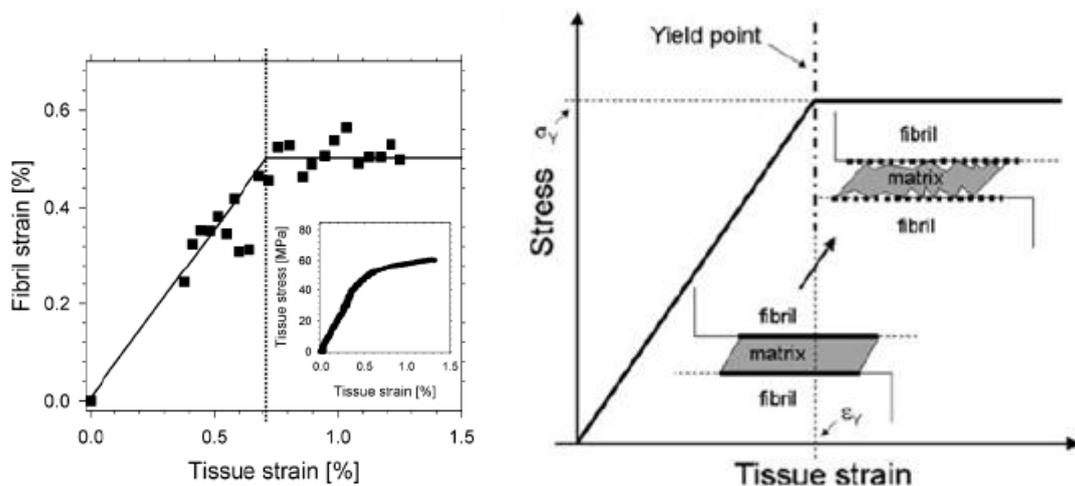


Figura 1.27: Stiramento delle fibrille in relazione alla deformazione del tessuto. La linea tratteggiata delinea la transizione elasto-plastica. Generazione di sforzi di taglio nella matrice (Gupta et al., 2005, 2006a).

In Figura 1.27 è possibile osservare la variazione di deformazione delle fibrille di collagene a fronte della deformazione dell'intero tessuto di un provino: per deformazioni del tessuto minori di circa 0,7%, le fibrille e il tessuto si deformano entrambi in maniera sostanzialmente lineare mentre per deformazioni del tessuto maggiori le fibrille si mantengono a un livello di deformazione pressoché costante, pari a circa 0,5%. Dal momento che questa saturazione avviene non appena si presenta lo snervamento del tessuto, gli autori ipotizzano che le fibrille non si allunghino ulteriormente e che mantengano una deformazione costante anche quando il tessuto viene stirato fino alla rottura, evento che avviene a una deformazione di circa 1,3%, dimostrando così un comportamento elastoplastico.

Hoo et al. (2011) hanno combinato la tecnica SAXS e la tecnica WAXD (Wide-angle X-ray diffraction) con prove di trazione in situ per indagare i meccanismi di deformazione e di

cedimento dell'osso corticale bovino a tre livelli gerarchici: (1) a livello atomico, corrispondente alla fase di cristalli minerali; (2) a livello dei nanometri, corrispondente alle fibrille di collagene; (3) a livello macroscopico. Si è constatato che la deformazione in una prova di trazione in direzione longitudinale è lineare a tutti i tre livelli fino a un valore di deformazione pari a 0,2%. A questo valore critico è stata osservata una diminuzione improvvisa del 50% nelle deformazioni delle fibrille e della componente minerale. Questo suggerisce la presenza di danno locale parziale che evidenzia una distribuzione disomogenea delle deformazioni all'interno della struttura analizzata (Figura 1.28).

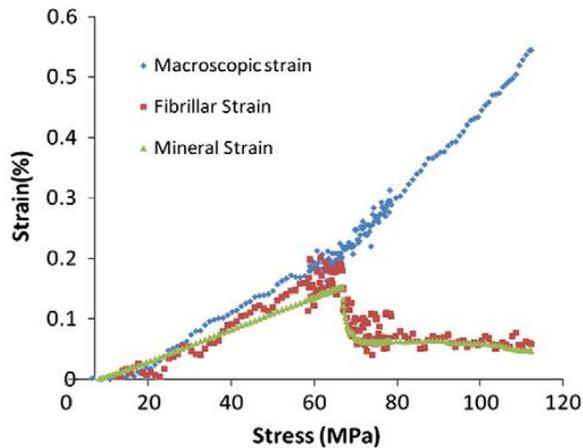


Figura 1.28: Comportamento a deformazione dei componenti della fibrilla mineralizzata e dei suoi componenti (Hoo et al., 2011).

Gupta et al. (2006b) hanno eseguito test di trazione carico-scarico sul tessuto osseo e hanno notato che a fine della fase di scarico, quando il provino di osso viene riportato in situazione di riposo, ovvero di sforzo nullo, dopo essere stato deformato oltre il punto di snervamento, si registra una deformazione irreversibile a carico del tessuto intero e non a livello delle singole fibrille di collagene mineralizzato. Queste, infatti, quando sono riportate in condizione di riposo, mostrano una deformazione negativa rispetto alla configurazione iniziale, come si osserva in Figura 1.29. Si suppone che questo fenomeno sia dovuto a un danneggiamento delle fibrille mineralizzate, in cui venga a mancare una parte della coesione tra i minerali di idrossiapatite e le fibre di collagene.

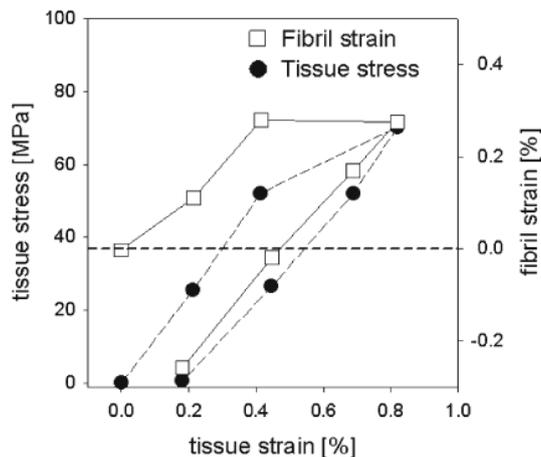


Figura 1.29: Relazione tra sforzo nel tessuto e deformazione delle fibrille con la deformazione del tessuto (Gupta et al., 2006b).

Per quanto riguarda lo sviluppo di modelli del tessuto osseo, quello sviluppato da Ji and Gao (2004) prevede che le fibrille di collagene mineralizzato trasferiscano gli sforzi alle fibrille adiacenti mediante la matrice di collagene interposta tra di esse, generando degli sforzi di taglio. Quando l'osso viene deformato oltre il punto di snervamento e viene superata una sollecitazione di taglio critica, la matrice di collagene perde coesione e scorre contro le fibrille causando dei fenomeni di attrito. In questo modo, tra le fibrille mineralizzate viene trasferito uno sforzo tangenziale costante che causa una loro deformazione fissa.

Gupta et al. (2005, 2006a) hanno sviluppato un modello il cui principio è quello di unire, alle diverse scale, elementi sempre più rigidi circondati da una matrice soffice per formare il livello successivo (Figura 1.30). In questo modo si ottiene un materiale composito che sopporta deformazioni considerevoli malgrado sia costituito in buona parte da particelle sostanzialmente indeformabili, e capace di sostenere un carico a rottura più elevato di quello dell'idrossiapatite pura. Inoltre, la deformazione della matrice mineralizzata non si verifica solo a livello gerarchico delle fibrille mineralizzate/matrice extrafibrillare, ma può verificarsi anche al livello gerarchico superiore (Fratzl and Weinkamer, 2007).

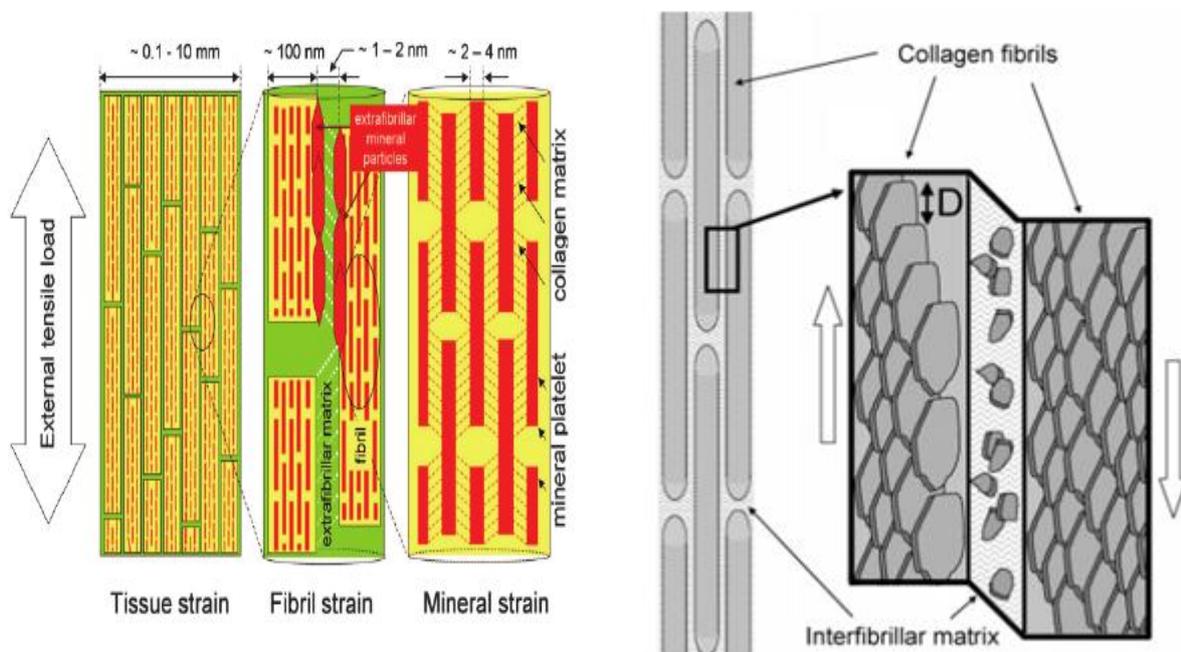


Figura 1.30: Modello schematico per tre differenti livelli nella struttura gerarchica con deformazione dell'osso dovuta a un carico esterno a trazione (Gupta et al., 2006a). Le frecce bianche in direzione opposta indicano uno sforzo di taglio agente sulla matrice (Gupta et al., 2005).

1.1.7 Relazioni funzione-struttura nell'osso corticale

È noto che, nei materiali biologici strutturali, le anisotropie strutturali e meccaniche sono più alte a livello della scala molecolare, e si riducono progressivamente all'aumentare della scala: questo si verifica, in generale, quando numerosi fasci di fibre o lamelle sono disposti in strutture stratificate o laminate orientate su varie angolazioni. Questo è un aspetto tipico di struttura che si ritrova in natura, questo perché le strutture macroscopiche di solito non sono strutturate unicamente per un solo tipo di sforzo, ma piuttosto contro sollecitazioni di vario tipo applicate in direzioni diverse, comportando così una complessità strutturale inevitabile (Weiner et al., 2000).

Come descritto precedentemente, la fibrilla mineralizzata di collagene è la componente principale della struttura ossea, ma le sue due componenti principali, collagene e cristalli di apatite, hanno proprietà completamente differenti. La visione globale di questa unità mostra una struttura fibrosa a livello delle singole molecole a tripla elica, fibrille, e assemblaggi di fibrille che formano fibre. Al contrario, in una fibrilla, la struttura è cristallina con simmetria ortotropa a causa delle cristalli appiattiti di apatite che sono all'interno della fibrilla e la circondano (Weiner and Traub, 1992).

Tuttavia, sebbene l'organizzazione strutturale interna di ogni fibrilla abbia una simmetria ortotropa, resta ancora da capire se le fibrille vicine siano allineate in tutte e tre le dimensioni, formando una struttura cristallina estesa, oppure solo rispetto al loro asse fibrillare. La differenza tra queste due configurazioni è importante in termini di simmetria: una sarebbe ortotropa e l'altra trasversalmente isotropa (Figura 1.31). Inoltre, la modalità in cui i fasci di fibrille sono impacchettati in modo da formare grandi strutture ordinate determina le proprietà meccaniche a livelli gerarchici superiori (Weiner and Wagner, 1998).

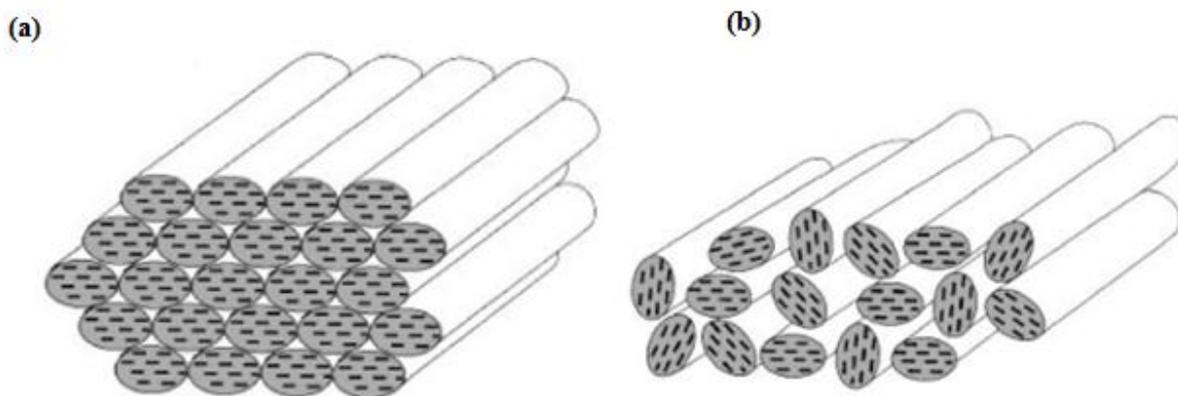


Figure 1.31: Illustrazione schematica (non in scala) dell'organizzazione delle fibrille di collagene (Weiner and Wagner, 1998). (a) Disposizione parallela delle fibrille mineralizzate rispetto ai cristalli e ai propri assi, definendo una simmetria ortotropa. (b) Disposizione parallela delle fibrille mineralizzate solo rispetto ai propri assi, definendo una simmetria trasversalmente isotropa.

In realtà, poiché le fibre di collagene mineralizzate sono quasi sempre presenti in fasci allineati lungo la loro lunghezza, ci si aspetta che un fascio di queste fibrille, in cui gli strati di minerale sono allineati tra fibrille vicine, possa essere altamente anisotropo.

L'osso lamellare presenta una struttura in cui le fibrille mineralizzate sono tutte allineate e si raggiunge il massimo grado di anisotropia in un singolo sottolivello della struttura lamellare. La struttura di una lamella determina una riduzione dell'anisotropia a livello microstrutturale (Weiner and Addadi, 1997; Weiner et al., 2000) in due modi: in primo luogo, disponendo i suoi sottostrati in direzioni diverse in modo da formare una struttura plywood, in secondo luogo, con l'introduzione di una rotazione progressiva dei fasci di fibrille mineralizzate di collagene intorno ai propri assi all'interno dei sottostrati che costituiscono un'unità lamellare. Pertanto, la struttura lamellare, considerando l'impaccamento in direzioni diverse e le rotazioni delle proprie unità strutturali anisotrope, determina proprietà meccaniche molto diverse rispetto a quelle dell'osso fibrolamellare.

Weiner et al. (2000) hanno sviluppato l'ipotesi che la struttura organizzativa dell'osso lamellare abbia come obiettivo quello di formare una struttura mineralizzata che tende all'isotropia, anche se l'unità strutturale su cui si sviluppa sia altamente anisotropa, diminuendo così il grado generale di anisotropia a livelli gerarchici superiori quali sub-micro e microscala.

La struttura altamente anisotropa dei fasci paralleli di fibrille possiede il vantaggio che essi possano essere allineati in direzioni specifiche per adattarsi alle loro funzioni meccaniche, massimizzando le proprietà elastiche in una data direzione, mentre un materiale che è più isotropo delle sue unità strutturali presenta una struttura plywood ruotata (Weiner et al., 2000). Questo può riflettere la necessità dell'osso lamellare di resistere a forze di compressione in varie direzioni, a differenza delle ossa fibrolamellare. Pertanto, sembra che l'osso lamellare non possa essere associato ad una specifica funzione meccanica, ma sembra essere progettato per soddisfare una serie di differenti funzioni meccaniche (Weiner et al., 1999).

Le lamelle del tessuto osteonale sono costituite da elicoidi tridimensionali concentrici intorno al vaso sanguigno centrale, fungendo anche supporto biomeccanico protettivo. Inoltre, tale struttura elicoidale ha ulteriori vantaggi biomeccanici: l'angolo a spirale medio non nullo indica che l'osteone è una struttura estensibile (e comprimibile) come una molla lungo il suo asse. Per esempio, la sua estensibilità elastica è utile ad assorbire energia durante un carico meccanico, contribuendo così a proteggere i vasi sanguigni interni più sensibili (Fratzl and Weinkamer, 2007).

1.2 Stato dell'arte su nanoindentazione a carico singolo e a carichi multipli

Negli ultimi anni la tecnica della nanoindentazione è stata ampiamente utilizzata per lo studio e la caratterizzazione di molti aspetti delle proprietà meccaniche dell'osso alla nano e alla microscala (Fan et al., 2002; Feng and Jasiuk, 2011; Hengsberger et al., 2003; Hoffler et al., 2005; Oliver and Pharr, 1992; Oyen, 2006; Rho et al., 1997, 1999a, 1999b, 2001a, 2001b; Swadener et al., 2001; Tai et al., 2005; Tang et al., 2007; Ulm et al., 2007; Zebaze et al., 2011; Zysset et al., 1999).

Questa tecnica è stata utilizzata per studiare le differenze tra osso corticale e trabecolare, osservando le proprietà microstrutturali degli osteoni e delle lamelle interstiziali in tessuto osseo umano proveniente da tibia (Rho et al., 1997), femore (Hengsberger et al., 2001; Turner et al., 1999; Zysset et al., 1999), vertebre (Roy et al., 1999) e addirittura singole trabecole di vertebre toraciche (Rho et al., 1999a), anche proveniente da differenti posizioni (Hoffler et al., 2000). In generale, i vari studi condotti si concentrano comunque prevalentemente sulle proprietà elastiche del materiale e raramente riportano valori della durezza H .

L'anisotropia del tessuto è stata studiata mediante nanoindentazione introducendo test sperimentali in direzione longitudinale e trasversale, sia per osso spongioso che corticale (Rho et al., 1999b; Roy et al., 1999). In particolare sono state condotte prove su tibia umana (Fan et al., 2002; Swadener and Pharr, 2001) e radio equino (Rho et al., 2001a) a livello lamellare, studiando il modulo ridotto E^* e la durezza H degli osteoni secondari e dell'osso interstiziale in funzione dell'angolo formato con la sezione trasversale dell'osso. L'alta risoluzione spaziale della nanoindentazione permette infatti la caratterizzazione meccanica dell'osso ad un livello inferiore al micrometro, il che ha reso possibile investigare le proprietà di una singola lamella di tessuto osseo corticale e trabecolare proveniente da femore umano (Hengsberger et al., 2002b; Xu et al., 2003).

L'articolo di Franzoso e Zysset (2009) è uno degli articoli più recenti in cui si fa uso di test di nanoindentazione per caratterizzare l'anisotropia elastica del tessuto osseo corticale. In questo lavoro è presentato un metodo per ottenere le costanti elastiche ortotrope da prove sperimentali condotte lungo due direzioni perpendicolari. Per i test è stato utilizzato osso lamellare umano con una profondità di penetrazione massima di 800 nm, in cui ogni indentazione coinvolge circa due o tre lamelle. È stata inoltre utilizzata la relazione analitica tra il modulo d'indentazione lungo una data direzione e la costante elastica di anisotropia (Swadener and Pharr, 2001) con lo scopo di quantificare l'anisotropia elastica a livello lamellare.

Turner et al. (1999) hanno comparato risultati ottenuti mediante nanoindentazione ad una profondità massima di 1 μm a 0.75 mN/s in fase di carico e 0.375 mN/s in fase di scarico, con misure ottenute tramite microscopio a scansione acustica, sia su osso umano trabecolare sia su osso corticale femorale, ottenendo dei rapporti medi di anisotropia ($E_{\text{trasversale}}/E_{\text{longitudinale}}$) simili tra loro (Tabella 1.11).

Campioni	Modulo di Young (metodo acustico)	Modulo di Young (nanoindentazione)
Osso trabecolare	17.50 ± 1.12 (n=3)	18.14 ± 1.7 (n=30)
Osso corticale (trasversale)	14.91 ± 0.52 (n=3)	16.58 ± 0.32 (n=60)
Osso corticale (longitudinale)	20.55 ± 0.21 (n=3)	23.45 ± 0.21 (n=60)
Osso corticale (media)	17.73 ± 0.22 (n=3)	20.02 ± 0.27 (n=60)

Tabella 1.11: Confronto tra moduli elastici ottenuti con due differenti tecniche di analisi (Turner et al., 1999).

Rho et al. (1999a) hanno riportato, a partire da indentazioni di osteoni provenienti da tessuto osseo umano tibiale, un modulo elastico di 22.4 ± 1.2 GPa e una durezza di 617 ± 39 MPa in direzione assiale, mentre in direzione trasversale un modulo elastico di 16.6 ± 1.1 GPa e una durezza di 654 ± 34 MPa. Rho et al. (1997) hanno inoltre eseguito prove su osteoni tibiali in direzione longitudinale ottenendo un modulo elastico di 22.5 ± 1.3 GPa e una durezza H di 614 ± 42 MPa. Successivamente Rho et al. (2002) hanno riportato un modulo elastico di 21 ± 1.7 GPa e una durezza di 590 ± 60 MPa da prove ad un carico massimo di 8 mN con un load rate di 0.4 mN/s su osteoni provenienti da endostio femorale umano. In questi ultimi due lavori gli autori non riportano alcun valore delle proprietà meccaniche in direzione trasversale.

Al fine di aumentare la precisione nel posizionamento della punta dell'indenter, Hengsberger et al. (2001) hanno utilizzato un microscopio a forza atomica su campioni di tessuto osseo femorale umano al fine di acquisire immagini delle regioni indentate, prima e dopo le prove. Studi nanomeccanici della rigidità e della durezza locali sull'osteone hanno rivelato una modulazione delle proprietà micromeccaniche a livello lamellare (Gupta et al., 2006a). Più precisamente, il modulo di indentazione all'interno di una singola lamella varia tra circa 24 e 27 GPa, con strati sottili di rigidità minore alternati a strati più spessi con rigidità maggiore (Figura 1.32). Sono state realizzate immagini dalla rilevazione di elettroni back-scattered per determinare il contenuto minerale locale nelle posizioni in cui sono state seguite le nanoindentazioni. Una minor rigidità assiale rilevata è in parte dovuta alla minor rigidità di una fibra in direzione normale al suo asse rispetto alla rigidità lungo il suo asse. In ogni caso i risultati mostrano che le regioni che presentano rigidità minore corrispondono a zone con contenuto minerale minore (Figura 1.32).

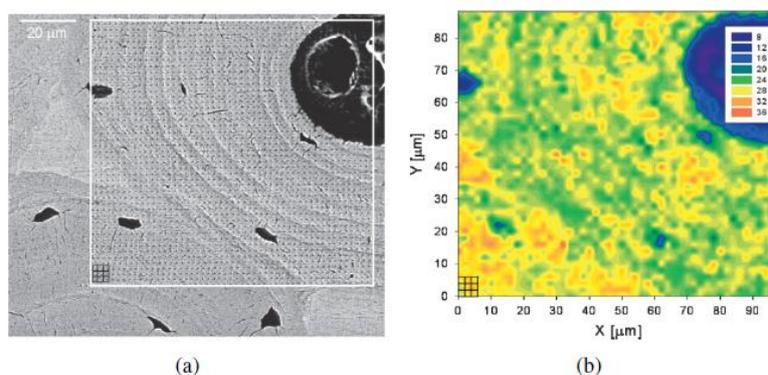


Figura 1.32: Scansione 2D dell'area soggetta a indentazione intorno all'osteone (Gupta et al., 2006a). (a) Immagine SEM ella regione di interesse. (b) Rappresentazione grafica del valore del modulo ridotto sull'area analizzata.

Attraverso una combinazione di spettroscopia di Raman, microscopia acustica e nanoindentazione, Hofmann et al. (2006) hanno investigato struttura, composizione chimica e anisotropia elastica di una singola lamella in osteoni secondari provenienti da osso femorale. L'impedenza acustica è stata correlata con il modulo d'indentazione ed entrambi i parametri si sono dimostrati sensibili all'anisotropia del tessuto. I valori minori sono stati ottenuti in direzione perpendicolare all'asse longitudinale femorale. Le immagini acustiche presentano un pattern bimodale lamellare con un'alternanza di valori di impedenza alti e bassi. Inoltre è stata osservata una distribuzione omogenea delle bande di intensità di fosfato negli osteoni, il che suggerisce una deposizione di minerale omogenea negli strati lamellari spessi e sottili adiacenti tra loro. La bassa correlazione riscontrata tra impedenza e intensità delle bande di fosfato supporta proprio l'ipotesi per cui il grado di mineralizzazione non possa essere il fattore dominante per la variazione del modulo elastico osservata in differenti lamelle: questa modulazione è stata quindi attribuita a variazioni dell'orientamento lamellare che deriva dalla struttura plywood, composta a sua volta da fibre intrinsecamente anisotrope.

Un'altra applicazione della nanoindentazione consiste nell'esaminare la variazione delle proprietà meccaniche in differenti lamelle all'interno dell'osteone in funzione della distanza dal canale di Havers (Rho et al., 1999b). Sono state trovate proprietà meccaniche delle lamelle maggiori in prossimità del centro dell'osteone, rispetto alle lamelle più esterne. Tuttavia, altri autori (Burket et al., 2011; Faingold et al., 2012), studiando tessuto osseo corticale di babuino e di cavallo, hanno rilevato che all'aumentare della distanza dall'osteone non vi sono variazioni significative nei valori di modulo d'indentazione e modulo elastico rispettivamente, anche se comunque il valore del modulo ridotto risulta più alto nelle lamelle vicine al centro rispetto a quelle più esterne (Figura 1.33 e Figura 1.34).

Si può notare che Burket et al. (2011) hanno trovato valori del modulo d'indentazione più alti nella prima lamella solo in direzione longitudinale, tuttavia con un'analisi più approfondita hanno osservato che in realtà solo in due campioni su nove tale valore era significativamente differente dai valori nelle successive lamelle.

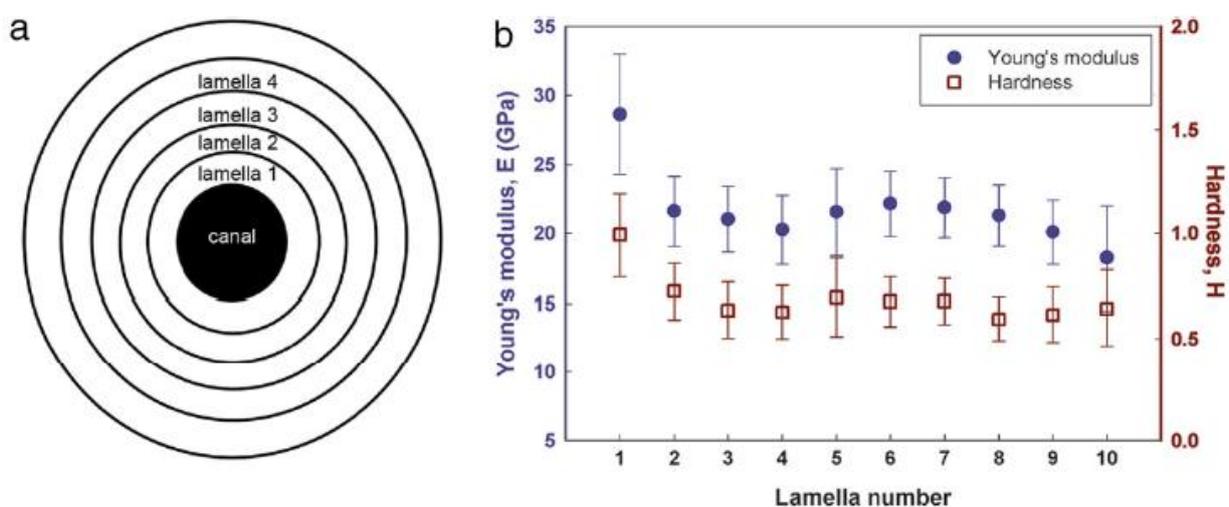


Figura 1.33: (a) Illustrazione schematica dell'ordine delle lamelle (non in scala) e (b) valori di E e H in funzione del numero di lamella (Faingold et al., 2012).

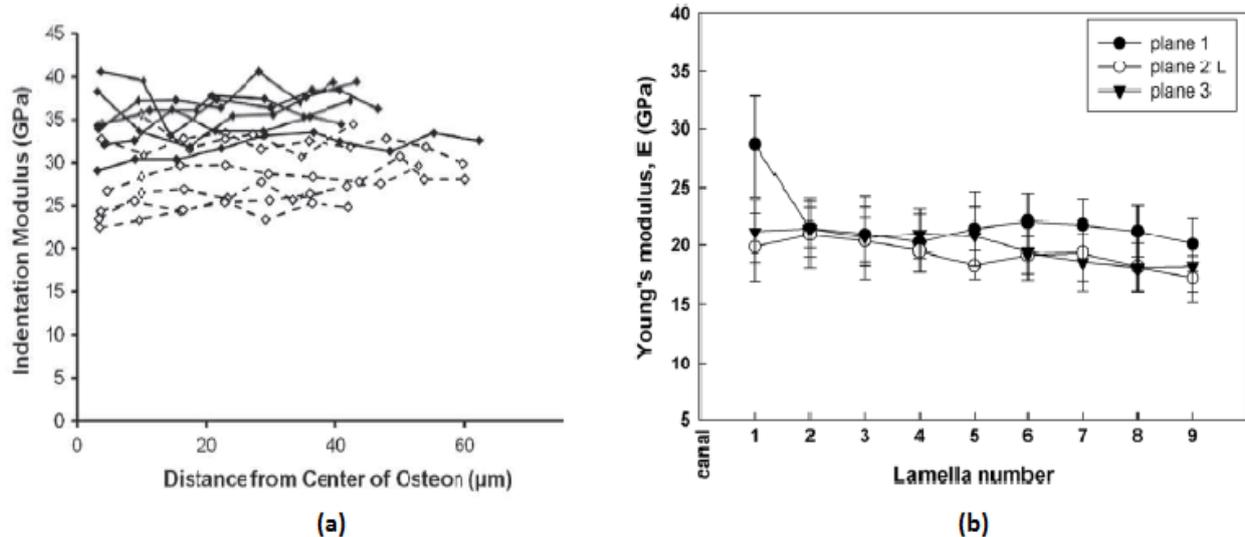


Figura 1.34: Andamento (a) del modulo di indentazione e (b) del modulo elastico del tessuto in funzione della distanza dal centro dell'osteone (Burket et al., 2011; Faingold et al., 2012).

Faingold et al. (2012) hanno riportato in un grafico l'andamento del modulo E in funzione della profondità di penetrazione. Come si può notare, il grafico considerato nella regione di interesse presenta un andamento di tipo asintotico a 20 GPa (Figura 1.35).

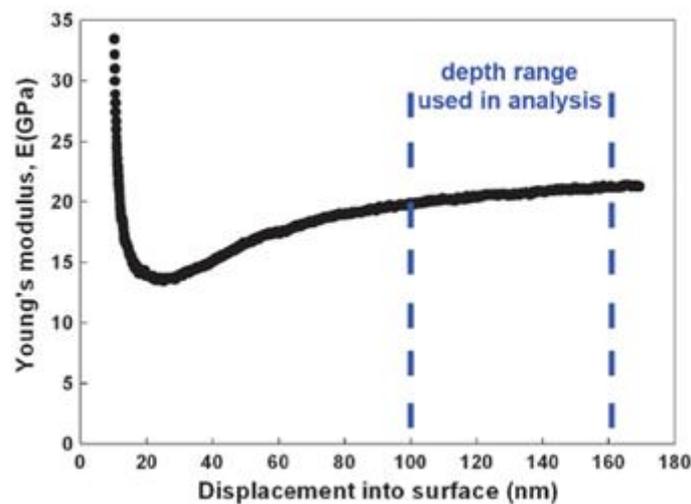


Figura 1.35: Andamento del modulo elastico del tessuto in funzione della profondità di penetrazione (Faingold et al., 2012).

Rho et al. (2001b), studiando lische di pesce, hanno usato la nanoindentazione per provare che i cristalli di idrossiapatite influenzassero fortemente le proprietà elastiche delle fibrille di collagene mineralizzate. Nelle lische di pesce le fibrille di collagene mineralizzate hanno una singola orientazione con una variazione di mineralizzazione lungo la lunghezza: nella regione distale il tessuto è alle prime fasi di calcificazione, mentre nelle zone prossimali è completamente mineralizzato. I risultati mostrano che sia il modulo d'indentazione sia il rapporto d'anisotropia dei moduli sono influenzati dalla mineralizzazione: in particolare il rapporto di anisotropia tra direzione longitudinale e perpendicolare nella regione completamente mineralizzata è circa 2.1, mentre nelle zone ai primi stadi di calcificazione il

rapporto decade a circa 1.1. Di conseguenza si può dedurre che la presenza di cristalli minerali è la principale causa per le differenze tra le proprietà elastiche in differenti direzioni, mentre le fibrille di collagene si comportano come un materiale isotropo quando si ha un basso contenuto minerale.

La nanoindentazione è stata inoltre utilizzata per descrivere gli effetti di molti altri parametri, come la mineralizzazione (Tai et al., 2005) e il suo ruolo durante la formazione di tessuto osseo lamellare (Busa et al., 2005), l'età dei soggetti (Hengsberger et al., 2002a; Rho et al., 2002) o la presenza di patologie come l'osteogenesi imperfetta (Fan et al., 2006). Altri autori (Fan and Rho, 2002; Tang et al., 2007) hanno studiato gli effetti della viscoelasticità sul modulo di Young misurato mediante nanoindentazione e hanno osservato come essi siano simili a quelli che si hanno nei test macroscopici.

Sono state comparate due differenti tecniche di preparazione dei campioni (Xu et al., 2003): l'utilizzo del microtomo e la procedura di lucidatura. I campioni ottenuti con il microtomo presentano una maggior rigidità sulle lamelle spesse rispetto a quelle sottili, mentre nei campioni lucidati non sono state trovate differenze significative.

Poiché le condizioni dry inducono un aumento di rigidità dell'osso (Rho and Pharr, 1999; Feng et al., 2012), per simulare le condizioni fisiologiche, sono stati condotti test su provini immersi in una cella riempita di liquido (Hoc et al., 2006; Hoffler et al., 2000, 2005; Zysset et al., 1999). In particolare, Hengsberger et al. (2002b) hanno cercato di quantificare il modulo di indentazione e la durezza di lamelle spesse e sottili selezionate da osso trabecolare e osso compatto umano. Il modulo d'indentazione e la durezza dell'ECM dell'osso sono stati investigati in funzione del tipo di lamella e della profondità d'indentazione in condizioni dry e wet. Per basse profondità di penetrazione le lamelle spesse hanno mostrato un modulo d'indentazione maggiore delle lamelle sottili. Con l'aumento della profondità le lamelle spesse hanno presentato un netto calo del modulo d'indentazione e della durezza, mentre per le lamelle sottili questo effetto è risultato meno evidente. Il processo di essiccazione del campione influenza i valori di modulo d'indentazione e durezza nell'osso umano, ma non ci sono effetti sui trend in funzione della profondità d'indentazione e del tipo di lamella, che rimangono simili in condizioni dry e fisiologiche.

Numerosi studi sono stati condotti in particolare sull'osso bovino (Carnelli et al., 2011; Hengsberger et al., 2003; Hoc et al., 2006; Isaksson et al., 2010; Lucchini et al., 2011; Rho and Pharr, 1999; Tai and Ortiz, 2006; Tai et al., 2005; Wang et al., 2006; Ziv et al., 1996b).

Ziv et al. (1996b) hanno misurato la durezza dell'osso fibrolamellare da femore bovino. Nell'osso fibrolamellare i valori di durezza nelle tre direzioni ortogonali principali differiscono abbastanza. Sul piano parallelo alla superficie più esterna dell'osso (periostio, indicato con P in Figura 1.36) i valori di durezza sono 0.480 ± 0.060 GPa, mentre sulla faccia parallela all'asse longitudinale dell'osso (L in Figura 1.36) e trasversale ad esso (T in Figura 1.36) i valori sono rispettivamente 0.600 ± 0.060 GPa e 0.705 ± 0.090 GPa. Il grado di anisotropia è grande, probabilmente perché la struttura non è perfettamente regolare alle dimensioni della microscala.

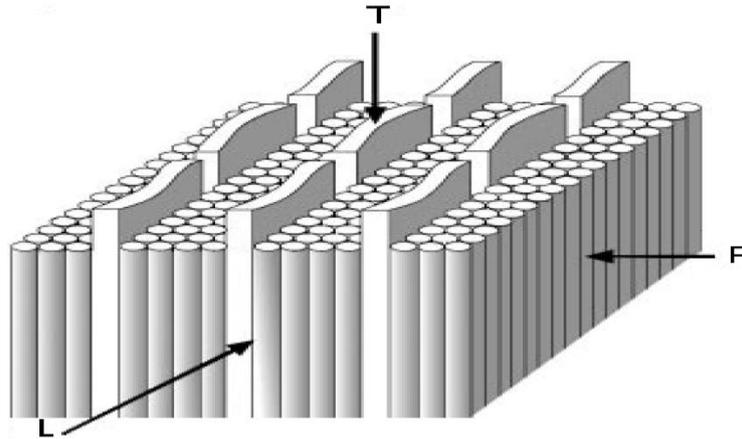


Figura 1.36: Illustrazione schematica della struttura alla nanoscala delle fibrille mineralizzate di collagene, con relative direzioni principali (Ziv et al., 1996b).

Hengsberger et al. (2003) hanno studiato tramite nanoindentazione le proprietà meccaniche della diafisi femorale di osso bovino, ottenendo i risultati riportati in Tabella 1.12. Il test a carico singolo arriva ad una profondità massima di 900 nm con un carico massimo di 10 mN ad uno strain rate di 0.066 s^{-1} , cui segue un periodo di holding di 5 s.

Campioni	M_1 [GPa]	M_3 [GPa]	M_3/M_1	Porosità [%]	M_3^{app} (nano) [GPa]
a	18.6 ± 1.5	22.1 ± 3.6	1.19	3.4 ± 1.4	19.9 ± 3.3
b	20.7 ± 1.2	27.9 ± 3.1	1.35	3.1 ± 1.0	26.8 ± 3.0
c	23.7 ± 3.0	31.6 ± 3.3	1.26	3.1 ± 1.0	30.0 ± 3.2

Tabella 1.12: Proprietà meccaniche di osso bovino a 900 nm di profondità (Hengsberger et al., 2003).

Lau et al. (2010) hanno condotto nanoindentazione su campioni di osso corticale bovino provenienti da costole con successiva deidratazione. Il carico massimo applicato è di 30 mN con un load/unload rate di 2 mN/s. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 1.13, presupposto un $\nu_b=0.27$.

Direzione	n° indentazioni	E_b [GPa]	M [GPa]	H [GPa]
Longitudinale	75	16.23	17.51	0.505
Trasversale	120	10.26	11.07	0.387

Tabella 1.13: Proprietà meccaniche di osso bovino a 30 mN di carico (Lau et al., 2010).

Rho and Pharr (1999) hanno riportato valori in condizioni dry in direzione longitudinale di 24.4 GPa e 0.68 GPa rispettivamente per modulo elastico e durezza.

Tai et al. (2005) hanno svolto nanoindentazione in direzione trasversale su osso corticale bovino proveniente da diafisi e metafisi tibiale, con un rate di scarico di $9 \pm 0.4 \mu\text{N/s}$, un carico massimo di 1 mN e una profondità massima di penetrazione di circa 500 nm, ottenendo un valore di modulo elastico di 12.86 ± 2.9 GPa. Successivamente Tai e Ortiz (2006), applicando allo stesso tipo di campione un carico massimo di 0.01 mN con una profondità massima inferiore a 50 nm, hanno ottenuto un valore di durezza in direzione longitudinale pari a 8.3 ± 3.4 GPa.

Donnelly et al. (2006) hanno studiato tramite test di nanoindentazione classica e a carichi multipli gli effetti di rugosità e carico massimo applicato sulle proprietà nanomeccaniche del tessuto lamellare e interlamellare, analizzando campioni di osso spongioso di coniglio dopo deidratazione utilizzando carichi massimi che vanno da 0.25 a 3 mN, con un load rate di 0.05 mN/s. Per mantenere l'integrità superficiale e produrre una rugosità quadratica media nell'intorno dei 10 nm su un campione di $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ è stato sviluppato un protocollo di deidratazione per il campione da esaminare. Quando il rapporto tra la profondità di penetrazione e la rugosità superficiale scende al di sotto di 3:1, la variabilità nella proprietà del materiale aumenta notevolmente, comportando imprecisioni rilevanti nei risultati. Si può notare in Figura 1.37 come si ottengano risultati più alti a bassi carichi massimi e con rugosità ridotta.

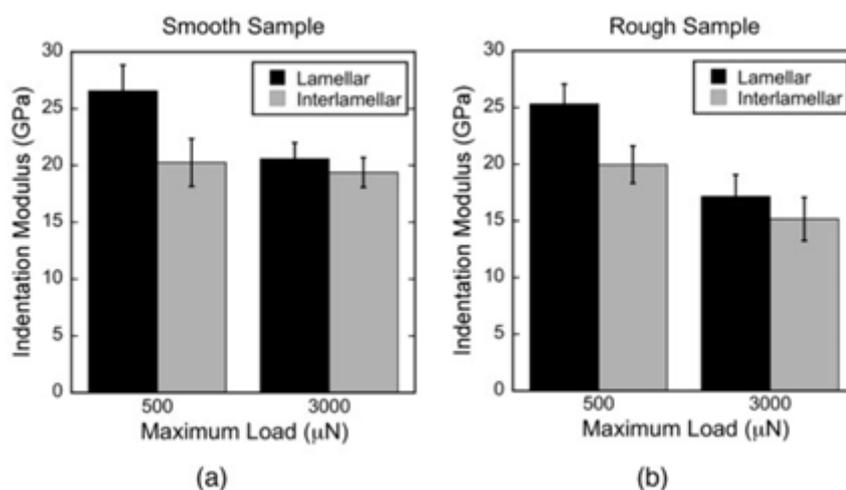


Figura 1.37: Confronto dei parametri meccanici tra campione lucidato (a) e non lucidato (b) (Donnelly et al., 2006).

Il metodo di preparazione della superficie può influenzare quindi le proprietà meccaniche perché la rugosità superficiale può avere un impatto significativo sulla misurazione del modulo tramite nanoindentazione (Klapperich et al., 2001; Gerberich et al., 1998; Donnelly et al., 2006). Per ridurre al minimo gli errori derivanti da rugosità, i tessuti mineralizzati sono spesso sezionati al microtomo in sezioni sottili o lucidati prima dell'indentazione (Roy et al., 1999; Ho et al., 2004; Xu et al., 2003). Si suggerisce in un test di nanoindentazione che la rugosità della superficie debba essere inferiore al 10% della profondità massima da raggiungere (Ebenstein and Pruitt, 2006). Tramite l'utilizzo del microtomo si ottengono rugosità più basse rispetto alla procedura di polishing (Ho et al., 2004; Xu et al., 2003).

Hoffler et al. (2005) hanno eseguito nano indentazioni a carichi multipli con l'obiettivo di determinare gli effetti dei parametri del test sperimentale sulle misure delle proprietà meccaniche di osso corticale umano, in particolare delle modalità di preparazione del campione, della profondità di penetrazione, dei carichi multipli, del tempo di prova e dello strain rate. Sono stati ritrovati moduli ridotti significativi a partire da una profondità massima di 500 nm, al di sotto della quale le misure sono state influenzate negativamente dai possibili artefatti dovuti al polishing e da irregolarità geometrica dell'indenter. I risultati indicano anche che i moduli e le durezze dei campioni mantenuti dry sono significativamente maggiori

(22,6% e 56,9%, rispettivamente) rispetto a quelli dei campioni wet. I moduli elastici ottenuti a 5 nm/s risultano significativamente inferiori a quelli ottenuti a 10 e 20 nm/s, valori per cui invece non sono state riscontrate differenze significative tra i moduli relativi (strain rate relativi, rispettivamente di 0.01, 0.02 e 0.04 s⁻¹). Le misure di durezza hanno mostrato anch'esse un comportamento diverso a seconda della velocità di deformazione (Figura 1.38). Si osserva che il tessuto osseo interstiziale ha significativamente modulo e durezza maggiori del tessuto osseo osteonale. L'applicazione di carichi multipli e tempi di prova diversi non porta differenze significative sui parametri meccanici. È stata infine osservata una correlazione lineare significativa tra durezza e modulo elastico.

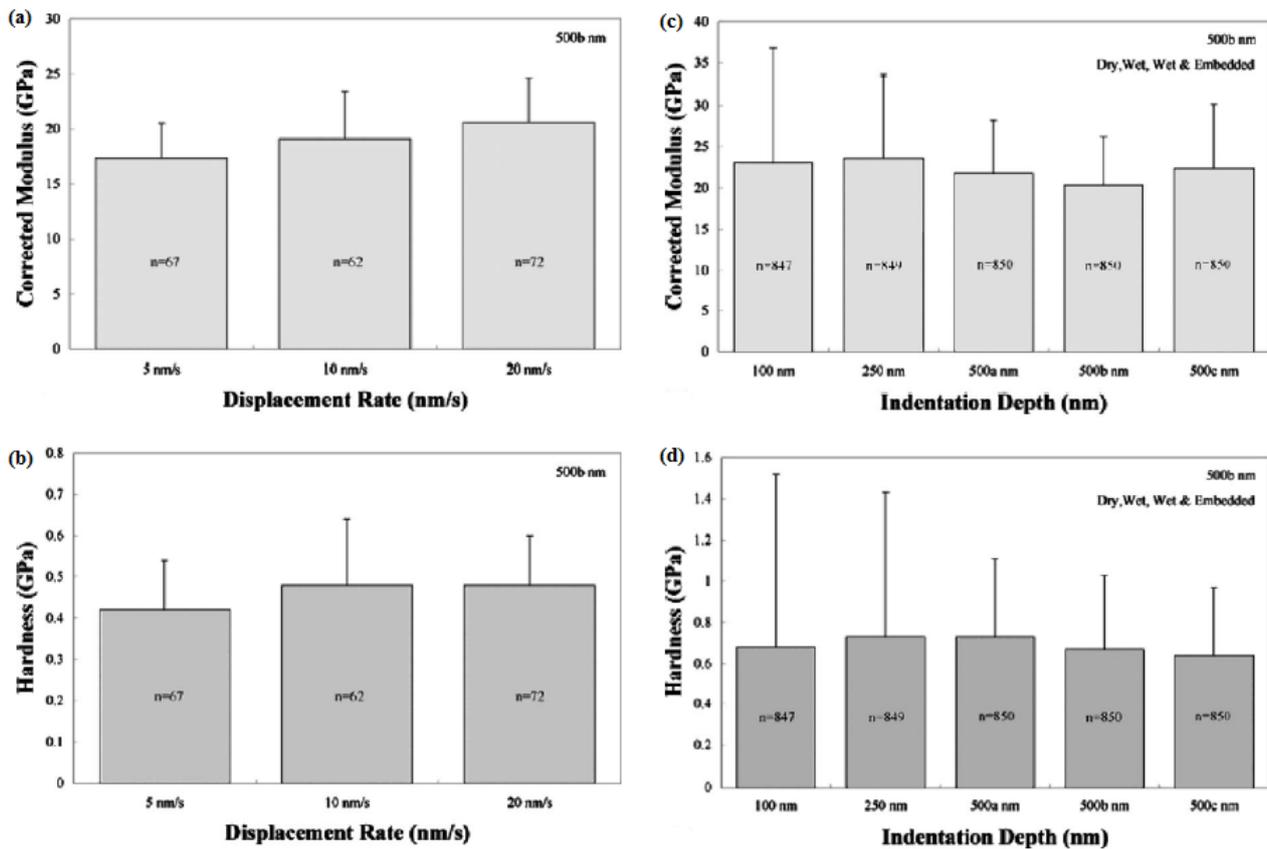


Figura 1.38: Andamenti di modulo elastico e durezza in funzione di (a,b) velocità e (c,d) profondità di penetrazione (Hoffler et al., 2005).

Anche Jakes et al. (2010) hanno svolto nanoindentazioni a carichi multipli a diversi strain rate, variabili tra 10⁻³ e 10 s⁻¹, su HDPE (polietilene ad alta densità), e hanno riscontrato a bassi strain rate un valore di H tra i 60 e 90 MPa, mentre ad altri strain rate un valore di 200 MPa, per un differenza superiore al 50%.

Wang et al. (2006) hanno svolto test di nanoindentazione a carico singolo, in direzione longitudinale e trasversale, su lamelle osteonali e interstiziali di campioni deidratati di tibia e vertebra bovina. Il carico massimo raggiunto è di 20 mN, con un load/unload rate di 1 mN/s, raggiungendo così una profondità massima tra 900 e 1000 nm (Figura 1.39). I risultati sono riportati nella Tabella 1.14. È stato trovato un rapporto tra durezza trasversale ed assiale H_T/H_A=0.76 (H_A = 811 MPa; H_T = 647 MPa). Il modulo E_b è stato correlato al modulo ridotto del campione, con ν=0.27.

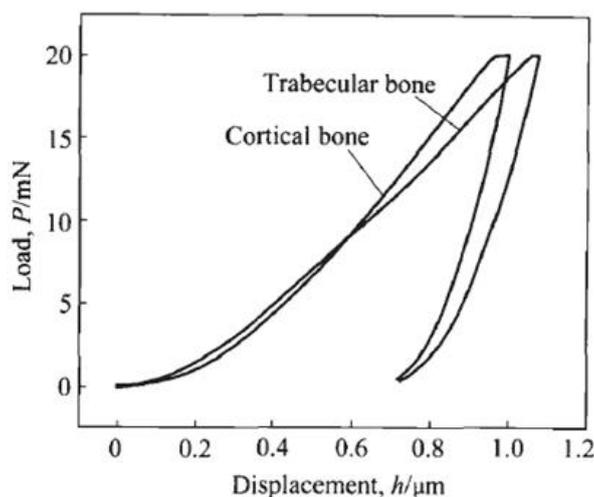


Figura 1.39: Curva P-h ottenuta per nanoindentazione di osso osteonale e trabecolare (Wang et al., 2006).

Tipo di osso	Direzione di prova		n° prove	E _b [GPa]	M [GPa]	H [GPa]
Osso corticale	Longitudinale	Osteoni	28	24.7±2.5	26.64±2.7	0.811±0.155
		Lamelle interstiziali	37	30.1±2.4	32.47±2.6	0.892±0.113
	Trasversale		62	19.8±1.6	21.36±1.7	0.647±0.060
Osso trabecolare	Longitudinale		49	20±2.0	21.57±2.1	0.528±0.095
	Trasversale		44	14.7±1.9	15.86±2.0	0.410±0.063

Tabella 1.14: Parametri meccanici di osso bovino osteonale e trabecolare (Wang et al., 2006).

Isaksson et al. (2010) hanno determinato durezza e modulo ridotto di osso bovino femorale deidratato, sia corticale sia trabecolare, in una prova di nanoindentazione con un carico massimo di 0.1 mN, con un load rate di 0.01, 0.02, 0.05 e 0.1 mN/s nello scarico (Figura 1.40). Successivamente il modulo ridotto E* è stato correlato al modulo elastico del campione, con $\nu=0.27$.

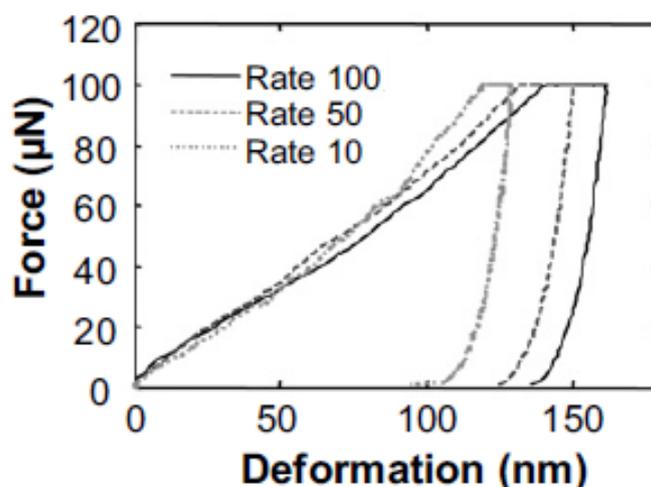


Figura 1.40: Effetto delle strain sulle curve P-h (Isaksson et al., 2010).

Con un rate di scarico di 0.02 mN/s il modulo ridotto risulta 18.9 ± 4.2 GPa e 21.9 ± 3.8 GPa rispettivamente per osso trabecolare e corticale, mentre la durezza rispettivamente 0.72 ± 0.22 GPa e 0.79 ± 0.19 GPa. Entrambi i parametri risultano dipendenti dalla profondità massima di penetrazione (Figura 1.41), raggiungendo una profondità massima di circa 170 nm.

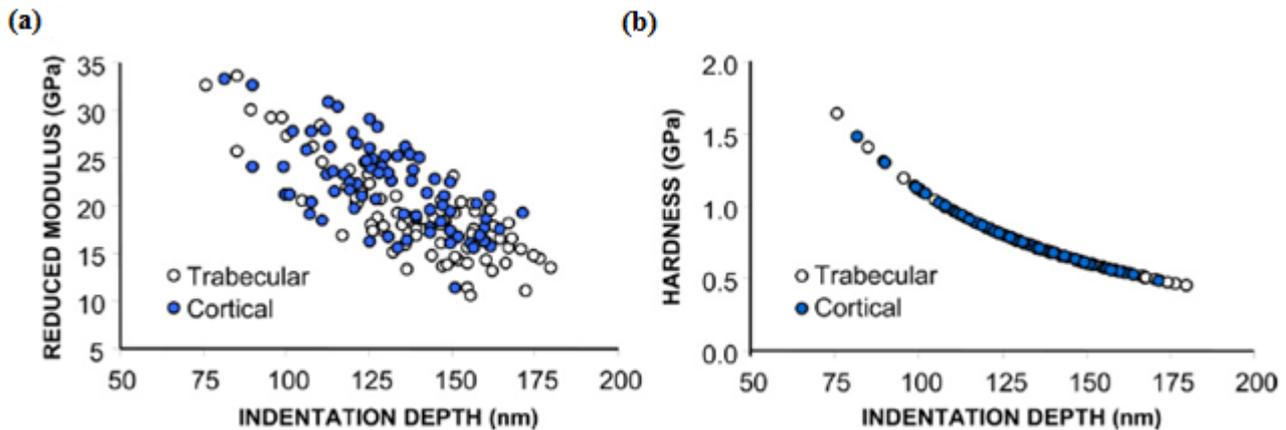


Figura 1.41: Andamento del modulo ridotto (a) e della durezza (b) in funzione della profondità di penetrazione (Isaksson et al., 2010).

È stata dimostrata una certa proporzionalità lineare tra modulo elastico e strain rate, espressi in scala logaritmica, con una pendenza dell'approssimante lineare pari a 0.06 (Carter and Hayes, 1977). Precedentemente Fan e Rho (2002) hanno ottenuto un valore di 0.10. Isaksson et al. (2010) hanno ottenuto un valore di 0.03 per l'osso corticale e 0.1 per l'osso trabecolare bovino (Figura 1.42).

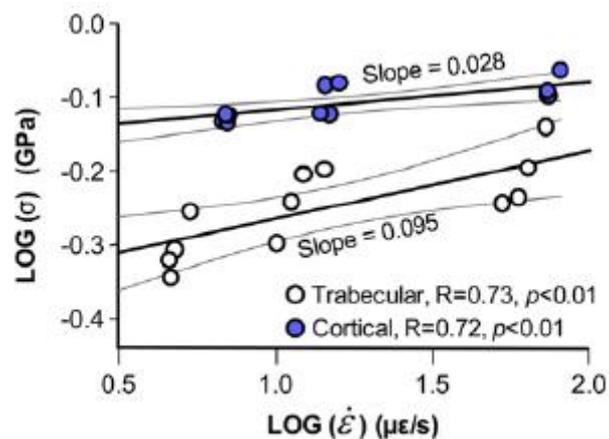


Figura 1.42: Dipendenza lineare tra strain rate e modulo elastico in scala logaritmica (Isaksson et al., 2010).

Wu et al. (2011) hanno valutato l'effetto di holding sulle misure nanoindentazione, poiché la viscoelasticità può influenzare sia le caratteristiche elastiche che quelle a rottura del materiale. È necessario un tempo di holding di almeno 15 s al fine di esaurire la risposta viscoelastica del sistema.

Lucchini et al. (2011), Carnelli (2010) e Carnelli et al. (2011) hanno affrontato sia da un punto di vista sperimentale sia computazionale una nanoindentazione classica utilizzando osso bovino proveniente da metafisi e diafisi tibiale.

Carnelli et al. (2010, 2011) riportano valori ad una profondità massima di 300 nm e una velocità di penetrazione di 100 nm/s. Tali valori sono ripresi da Lucchini et al. (2011), con una nuova profondità massima di 450 nm, ottenendo così una serie di valori per le seguenti profondità: 50, 100, 200, 300 e 450 nm. Essi hanno osservato un decadimento delle proprietà meccaniche con l'aumento della profondità di penetrazione e la perdita di rigidità di contatto durante la fase di scarico del test, evidenziando così il possibile danneggiamento del materiale. Sono state effettuate prove di nanoindentazione a carico singolo lungo direzione assiale e trasversale tra 50 a 450 nm e successivamente è stato sviluppato un modello computazionale con cui confrontare i dati sperimentali. I valori medi e le deviazioni standard dei moduli di indentazione M in direzione assiale e trasversale sono riportati in Figura 1.43 e Tabella 1.15.

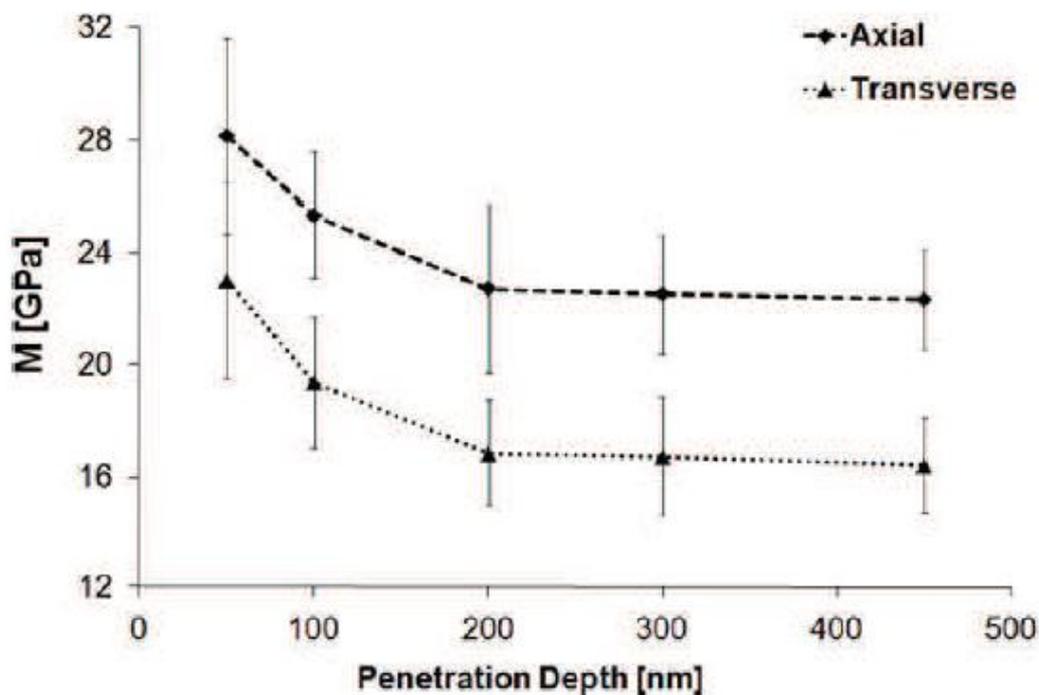


Figura 1.43: Andamento del modulo di indentazione in funzione della profondità di penetrazione (Lucchini et al., 2011).

Direzione	h_{max} [nm]	M [GPa]	H [GPa]
Longitudinale	50	28,15±3,47	1.02±0.22
	100	25,34±2,27	
	200	22,71±3,05	
	300	22,51±2,12	0.74±0.07
	450	22,3±1,78	0.73±0.04
Tangenziale	50	23,02±3,48	0.92±0.18
	100	19,29±2,27	
	200	16,83±1,92	
	300	16,73±2,17	0.64±0.11
	450	16,41±1,71	0.61±0.09

Tabella 1.15: Parametri meccanici a varie profondità di penetrazione (Lucchini et al., 2011).

I valori riportati dipendono sia dalla direzione dell'indentazione che dalla profondità massima di penetrazione. Infatti, le prove sperimentali hanno evidenziato il cosiddetto size effect, cioè una progressiva diminuzione delle proprietà meccaniche del tessuto all'aumentare dello spostamento dell'indenter al suo interno. In particolare, tra i 50 e i 450 nm è stato osservato un decadimento del modulo M , valutato come $100 * (M_{50nm} - M_{450nm}) / M_{50nm}$, più marcato in direzione trasversale (da 23.02 ± 3.48 GPa a 16.41 ± 1.71 GPa, con un decadimento di $\sim 29\%$) che in direzione assiale (da 28.15 ± 3.47 GPa a 22.30 ± 1.78 GPa, con un decadimento di $\sim 21\%$). Un comportamento simile è stato ritrovato in termini di durezza H del tessuto varia da 1.02 ± 0.22 GPa a 0.73 ± 0.04 GPa in direzione assiale e da 0.92 ± 0.18 GPa a 0.61 ± 0.09 GPa in direzione trasversale. I valori medi e le deviazioni standard dei carichi massimi rilevati a 50, 100, 200, 300 e 450 nm sono rispettivamente 0.17 ± 0.03 mN, 0.41 ± 0.05 mN, 1.10 ± 0.14 mN, 2.18 ± 0.20 mN e 4.49 ± 0.44 mN, in direzione assiale, e 0.15 ± 0.03 mN, 0.34 ± 0.04 mN, 0.92 ± 0.12 mN, 1.83 ± 0.29 mN e 3.82 ± 0.42 mN, in direzione trasversale. Inoltre la rugosità superficiale quadratica media ottenuta dopo la procedura di polishing effettuata risulta pari a 5.97 ± 0.66 nm (calcolata su un'area di $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ nelle varie posizioni delle nanoindentazioni), valore ottimale per ottenere misure precise superiori a 50 nm.

In conclusione, a causa della natura eterogenea del tessuto osseo, anche il protocollo di prova della nanoindentazione può influenzare le misure ottenute in termini di modulo di indentazione e durezza, comportando un'ampia variabilità dei dati (Isaksson et al., 2010; Zhang et al., 2008).

Capitolo 2

Fondamenti teorici

In questo capitolo sono sviluppati gli aspetti teorici e le metodologie necessarie all'analisi del comportamento meccanico di un materiale mediante la tecnica della nanoindentazione.

La sezione 2.1 presenta modelli analitici legati alla teoria della nanoindentazione: la teoria di Oliver-Pharr e possibili fattori di interesse in una prova di nanoindentazione quali rugosità superficiale, il fenomeno del pile-up e le modalità di conservazione.

2.1 Analisi teorica di prove di nanoindentazione

Un test di indentazione consiste nell'applicare una pressione mediante un indentatore (indenter) sulla superficie di interesse. La punta dello strumento è fatta di un materiale duro, solitamente diamante, e può avere forme differenti. Durante il test, il carico P e lo spostamento h sono misurati in continuo durante un ciclo di carico e scarico al fine di costruire la curva carico-spostamento, di solito indicata come curva $P - h$, la cui analisi consente il calcolo della durezza H e del modulo di indentazione M , in relazione alle proprietà elastiche del materiale. In Figura 2.1 è mostrata una tipica curva carico-spostamento durante un ciclo: la curva di carico è ottenuta mentre l'indenter penetra la superficie causando deformazioni sia elastiche che plastiche, durante la ritrazione viene invece acquisita la curva di scarico, che dipende solo dalle proprietà elastiche. Dopo la completa rimozione della punta rimane una deformazione plastica residua.

Questa sezione presenta una breve introduzione alla teoria dell'indentazione. In primo luogo si descrivono la teoria del contatto hertziano tra una sfera rigida e una superficie piana e la sua estensione agli indenter conici. Successivamente si illustra il metodo Oliver-Pharr (Oliver and Pharr, 1992) per l'analisi delle misure di indentazione con particolare riferimento ad una punta conica.

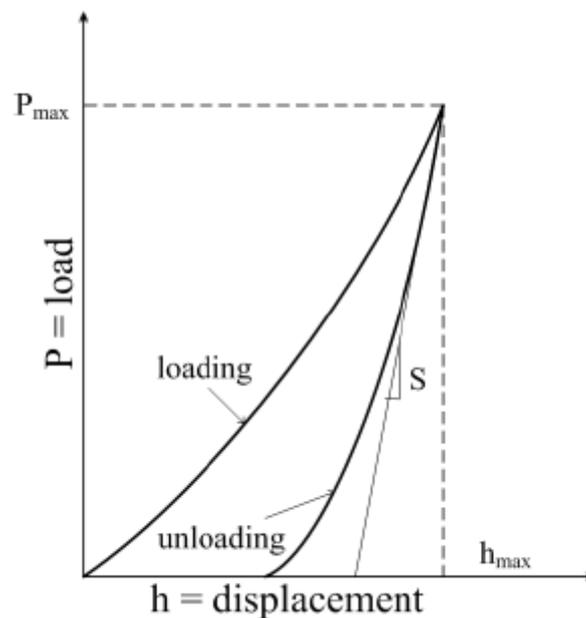


Figura 2.1: Tipica curva di nanoindentazione (Oliver and Pharr, 1992).

2.1.1 Fondamenti del meccanismo di contatto

Il parametro fondamentale nell'analisi dell'indentazione è il modulo di indentazione M . Generalmente M dipende dalle proprietà elastiche del materiale e dalla forma dell'indentatore e quindi dalla forma dell'area di contatto. Con l'assunzione di indentatori assialsimmetrici e di materiali omogenei, elastici ed isotropi, M può essere calcolato con la semplice relazione:

$$M = \frac{E}{1 - \nu^2} \quad (2.1)$$

dove E e ν sono rispettivamente il modulo di Young e il modulo di Poisson del materiale.

Il primo passo dell'analisi teorica dell'indentazione è descrivere il contatto tra i due corpi (Figura 2.2). Hertz (1882) ha studiato il contatto di una punta sferica rigida su un piano isotropo semi-infinito in assenza di attrito (Figura 2.2) e ha definito il raggio a dell'area di contatto circolare come:

$$a^3 = \frac{3PR}{4E^*} \quad (2.2)$$

dove P è il carico, R è il raggio dell'indentatore ed E^* , chiamato modulo ridotto, è una combinazione dei moduli di indentazione M dell'indentatore e del campione, rispettivamente indicati dai pedici i ed s :

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1 - \nu_i^2}{E_i} + \frac{1 - \nu_s^2}{E_s}. \quad (2.3)$$

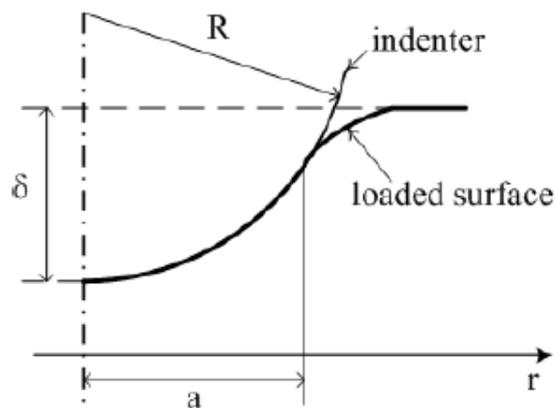


Figura 2.2: Contatto tra indenter e superficie (Hertz, 1882).

Solitamente la punta dell'indentatore è fatta di diamante con $E=1141$ GPa e $\nu=0.07$. Lo spostamento della superficie del campione dipende dalla distanza r dall'asse di simmetria e può essere descritto dalla relazione (valida per $r \leq a$):

$$h = \frac{1}{E^*} \frac{3P}{24a} \left(2 - \frac{r^2}{a^2} \right). \quad (2.4)$$

Combinando le equazioni (2.2) e (2.4), la profondità di penetrazione δ sull'asse ($r = 0$) risulta:

$$\delta^3 = \left(\frac{3}{4E^*}\right)^2 \frac{P^2}{R}. \quad (2.5)$$

Il carico P in funzione della profondità h può essere espresso come:

$$P = \frac{4}{3} E^* R^{\frac{1}{2}} h^{\frac{3}{2}}. \quad (2.6)$$

La pressione di contatto media può essere ottenuta da:

$$p_m = \frac{P}{\pi a^2} = \left(\frac{4E^*}{3\pi}\right) \frac{a}{R}. \quad (2.7)$$

Le relazioni sopra descritte per il caso di indentazione senza attrito di un semispazio isotropo con una sfera rigida sono state estese al caso di una punta conica da Sneddon (1965) che ha ottenuto l'espressione del carico totale P :

$$P = \frac{\pi a}{2} E^* a \cot \alpha \quad (2.8)$$

dove α è metà dell'angolo del cono e a è il raggio di contatto. Lo spostamento della superficie è dato da (valido per $r \leq a$):

$$h = \left(\frac{\pi}{2} - \frac{r}{a}\right) a \cot \alpha. \quad (2.9)$$

Lo spostamento sull'asse ($r = 0$) è:

$$h_{max} = \frac{\pi}{2} a \cot \alpha \quad (2.10)$$

ed il carico corrispondente può essere scritto come:

$$P = \frac{2}{\pi} E^* h_{max}^2 \tan \alpha. \quad (2.11)$$

L'iniziale rigidezza di scarico S è definita come:

$$S = \frac{dP}{dh} \Big|_{h=h_{max}}. \quad (2.12)$$

Pertanto, usando le equazioni (2.11) e (2.12) e considerando l'area di contatto proiettata $A = \pi a^2$, il modulo ridotto risulta:

$$E^* = \frac{S}{2} \sqrt{\frac{\pi}{A}}. \quad (2.13)$$

Vale la pena notare che le relazioni presentate da Sneddon sono esattamente soddisfatte solo da un cono ideale con una punta perfettamente acuminata che, nella pratica, è impossibile da realizzare. Così, dal momento che tutti gli indentatori reali hanno una punta arrotondata, tipicamente con raggi di 10-100 nm, la fase iniziale di contatto è più simile a quella sferica.

2.1.2 La teoria di Oliver-Pharr

Nel presente lavoro di tesi il modulo ridotto E^* e la durezza H sono state ottenute utilizzando il metodo proposto da Oliver e Pharr (1992) che sfrutta l'equazione (2.13), ricavata per un indentatore conico, adattandola alle differenti punte tramite un fattore correttivo β dipendente dalla geometria dell'indentatore. Ad esempio per una punta Berkovich come quella utilizzata in questo lavoro, si assegna a β un valore di 1.034. E^* si calcola quindi nel seguente modo:

$$E^* = \frac{S}{2\beta} \sqrt{\frac{\pi}{A}}. \quad (2.14)$$

La durezza H può essere calcolata dal rapporto tra il carico massimo P_{max} e l'area di contatto A :

$$H = \frac{P_{max}}{A}. \quad (2.15)$$

Quando la geometria dell'indentatore è nota questi parametri possono essere ottenuti dai dati di carico-spostamento.

Il procedimento di Oliver-Pharr inizia fittando una curva di scarico con una legge di potenza:

$$P = k(h - h_f)^n \quad (2.16)$$

dove k , n ed h_f sono parametri da individuare. Si può quindi ricavare la rigidità di contatto alla massima penetrazione che risulta essere:

$$S = nk(h_{max} - h_f)^{n-1}. \quad (2.17)$$

L'area di contatto dipende quindi dalla forma dell'indentatore. Si considera adesso una punta Berkovich, poiché è quella utilizzata nel presente lavoro. La forma è quella di una piramide con base a tre lati, con angolo caratteristico $\theta = 65.27^\circ$ tra le facce e la normale alla base, come illustrato in Figura 2.3.

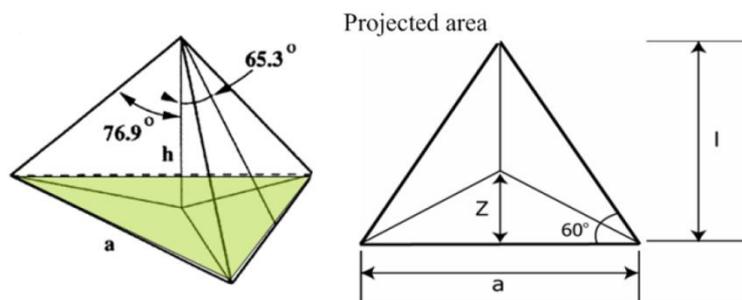


Figura 2.3: Punta Berkovich.

L'area di contatto risulta essere:

$$A = 3\sqrt{3}h_c^2 \tan^2 \theta = 24.56h_c^2 \quad (2.18)$$

dove h_c è la profondità di contatto, illustrata in Figura 2.4.

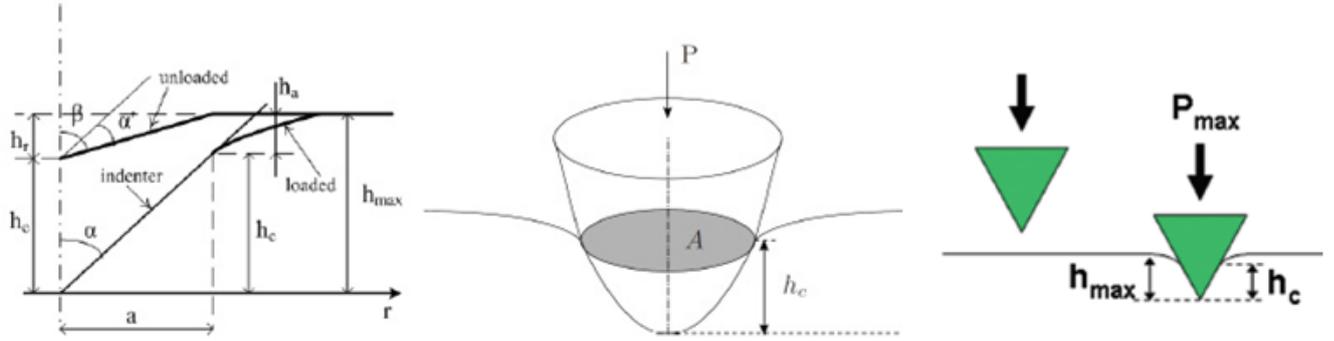


Figura 2.4: Profondità massima e profondità di contatto.

Generalmente nell'analisi della nanoindentazione si approssima l'indentatore piramidale con una punta conica che presenti lo stesso rapporto tra area e profondità di affondamento. Poiché si può scrivere l'area di affondamento per una punta conica come:

$$A = \pi h_c^2 \tan^2 \alpha \quad (2.19)$$

considerando le equazioni (2.18) e (2.19), si ottiene un angolo α per la punta conica equivalente di 70.3° . Per il calcolo di h_c si utilizzano le curve di scarico. Osservando la Figura 2.4 si può notare che i parametri h_e ed h_a si possono calcolare dalla (2.9) ponendo $r = 0$ ed $r = a$:

$$h_e = h(r = 0) = \frac{\pi}{2} a \cot \alpha' \quad (2.20)$$

$$h_a = h(r = a) = \left(\frac{\pi}{2} - 1\right) a \cot \alpha'. \quad (2.21)$$

I due valori possono essere legati come segue:

$$h_a = \left(\frac{\pi - 2}{\pi}\right) h_e. \quad (2.22)$$

Poiché $h_{max} = h_c + h_a$ si ha che:

$$h_{max} = h_c + \left(\frac{\pi - 2}{\pi}\right) h_e \quad (2.23)$$

dove h_e è ricavato adattando le equazioni (2.11) e (2.12) ad α' :

$$h_e = \frac{2P}{S}. \quad (2.24)$$

In conclusione il valore di h_c necessario per il calcolo dell'area di contatto risulta essere:

$$h_c = h_{max} - \frac{2(\pi - 2)}{\pi} \frac{P_{max}}{S} \quad (2.25)$$

dove h_{max} , P_{max} ed S sono valori ottenibili sperimentalmente. La costante $\varepsilon = 2(\pi - 2)/\pi$, pari a 0.72 per un indentatore conico, può essere adattata ad altre punte moltiplicandola per il fattore di correzione geometrica β già descritto in precedenza per la correzione del modulo ridotto E^* .

2.1.3 Fattori che influenzano una prova di nanoindentazione

Tra i fattori che possono influenzare i risultati di una prova di nanoindentazione rivestono particolare importanza il fenomeno del pile-up e la rugosità superficiale.

Pile-up e sinking-in

Si ha il fenomeno del pile-up quando il profilo della superficie deformata sovrasta il livello della superficie indeformata. Si parla invece di sinking-in quando avviene il fenomeno opposto come illustrato in Figura 2.5.

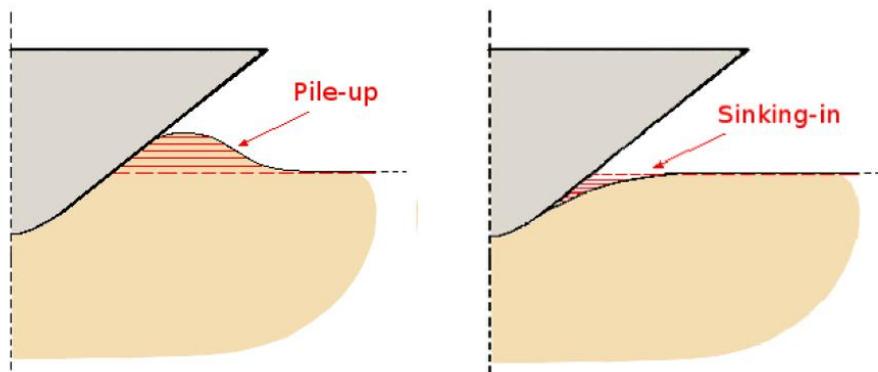


Figura 2.5: Fenomeno di pile-up e di sinking-in.

Questi effetti influenzano i risultati delle prove sperimentali, introducendo errori nella predizione dell'area di contatto nel metodo di Oliver-Pharr.

Quando si crea pile-up, l'area di contatto effettiva è maggiore di quella predetta dal metodo e sia la durezza sia il modulo di indentazione possono essere sovrastimati fino al 50% (Oliver and Pharr, 2004). L'inadeguatezza del metodo di Oliver-Pharr nel trattare il pile-up è conseguenza diretta dell'utilizzo di un modello di contatto elastico per determinare l'altezza di contatto h_c .

Oliver e Pharr (2004) e Ni et al. (2004) hanno mostrato che il pile-up è influenzato principalmente dall'incrudimento del materiale e dal rapporto E^*/σ_y tra il modulo ridotto E^* illustrato in precedenza e lo sforzo di snervamento σ_y del materiale.

Infatti in assenza di incrudimento si ha un pile-up marcato in materiali con E^*/σ_y grandi, mentre rapporti $E^*/\sigma_y \leq 30$ danno luogo a sinking-in (Oliver and Pharr, 2004).

L'introduzione dell'incrudimento invece riduce in modo considerevole il fenomeno di pile-up anche con E^*/σ_y elevati.

Bolshakov e Pharr (1998) hanno evidenziato come esista un altro parametro, misurabile sperimentalmente dalla curva di scarico di una prova di indentazione, che può essere usato per identificare il livello di pile-up o sinking-in in un materiale. Tale parametro è il rapporto h_f/h_{max} tra l'altezza finale di indentazione h_f e la profondità di penetrazione massima h_{max} , compreso tra 0 (comportamento puramente elastico) e 1 (comportamento rigido-plastico). Poiché in indentazioni coniche o piramidali la geometria è autosimilare il rapporto h_f/h_{max} è indipendente dalla profondità massima di indentazione, si può affermare che il fenomeno di

pile-up e sinking-in per tali tipi di punte è indipendente dall'affondamento a cui viene eseguita la prova. Il pile-up aumenta quando $h_f/h_{max} \rightarrow 1$ mentre è ridotto o assente per $h_f/h_{max} \leq 0.7$ (Bolshakov e Pharr, 1998).

La rugosità superficiale

Le proprietà meccaniche dei materiali misurate alla micro e nanoscala presentano spesso una significativa dipendenza dalla scala d'indentazione. Tali dipendenze possono essere attribuite a proprietà superficiali del materiale quali la rugosità. L'effetto dato da questo parametro diventa trascurabile nel momento in cui l'altezza caratteristica della rugosità e l'affondamento della prova di indentazione sono di alcuni ordini di grandezza differenti. Per piccoli affondamenti è quindi importante considerare, durante una prova di nanoindentazione, gli effetti della rugosità sui parametri misurati, cioè su modulo elastico e durezza (Jiang et al., 2008).

Per entrambi i parametri si osserva come i loro valori, misurati utilizzando punte autosimilari come quella Berkovich, aumentino con il diminuire della profondità d'indentazione. Tale effetto è comunemente chiamato Indentation Size Effect (ISE) (Kim et al., 2007). L'ISE viene spiegato da differenti autori, tramite misure sperimentali o modelli numerici, attraverso l'introduzione della rugosità superficiale. Pochi di questi hanno però studiato l'effetto della rugosità sia su H che su E (Bobji et al., 1999; Qasmi and Delobelle, 2006). Il maggior numero di lavori è concentrato sull'effetto che causa sulla durezza. Bobji et al. (Bobji and Biswas, 1998; Bobji et al., 1999) hanno dimostrato tramite prove computazionali che la rugosità superficiale ha un effetto significativo sulla variazione della durezza alle diverse scale, comportando errori anche del 15% sui risultati corretti. Alcune delle ragioni di questo scarto possono essere attribuite a variazioni nella composizione o nell'organizzazione del materiale, dalla presenza di irregolarità geometriche o asperità presenti sulla superficie della regione analizzata. Tali parametri possono essere migliorati tramite una procedura di polishing. Zhang e Xu (2002) e Kim et al. (2007) hanno considerato l'effetto della rugosità sulla prova di nanoindentazione trattandola come parte della dissipazione energetica superficiale, ovvero come il lavoro svolto per appiattire la rugosità tramite la punta.

Sono stati proposti differenti tipi di modellazione per questo effetto, ad esempio Chang et al. (1987) hanno descritto un modello in cui la deformazione delle asperità è in parte soggetta a deformazione elastica e in parte a deformazione plastica. Gao e Fan (2002), seguendo il modello formulato da Chang et al. (1987), hanno collegato il termine dell'energia di superficie dissipata con l'energia plastica dissipata durante l'indentazione di una superficie rugosa. Differentemente da Chang et al. (1987), Gao e Fan (2002) hanno condotto un'analisi in cui viene ipotizzato che durante la prova di indentazione le asperità che caratterizzano la rugosità di superficie vengano tutte deformate plasticamente.

Durante la determinazione sperimentale del modulo di Young utilizzando la tecnica di nanoindentazione, la precisione dei risultati dipende fortemente dalla qualità superficiale dei materiali che può essere caratterizzata dalla sua rugosità R_{ms} (Bobji and Biswas, 1998, 1999; Bobji et al., 1999; Mencik and Swain, 1995).

Qasmi e Delobelle (2006) hanno studiato l'effetto della rugosità su materiali metallici e ceramici in una prova di nanoindentazione con l'utilizzo di una punta Berkovich a diverse

profondità di affondamento h . È stata stimata una legge che lega valore medio e deviazione standard di E (indicati rispettivamente con E_{mean} e σ_E), β , la rugosità media e h : $\sigma_E/E_{\text{mean}} = \beta \cdot (R_{\text{ms}}/h)^n$ con $n=0.67$. Il valore di questo esponente è funzione della rugosità. Per quanto riguarda la durezza H , è stata stimata la seguente legge dalla struttura simile alla precedente: $\sigma_H/H_{\text{mean}} = \delta \cdot \sigma_E/E_{\text{mean}}$ con $1.2 \leq \delta \leq 2$ in base al materiale.

Numerosi altri studi relativi all'effetto della rugosità sono analizzati in dettaglio nella sezione 1.2, sezione in cui è presentata una serie consistente di valori numerici per l'effetto della rugosità sui parametri meccanici.

Capitolo 3

Obiettivi

Nella sezione 3.1 si illustra brevemente l'inquadramento generale di questo lavoro in ambito ingegneristico e biomedicale, identificando alcune possibili applicazioni a cui questi risultati potranno condurre in futuro.

In sezione 3.2 segue invece una dettagliata analisi degli obiettivi principali perseguiti dalla campagna sperimentale condotta, mettendo in luce i differenti aspetti e fattori d'influenza osservati nei test di indentazione ciclica a carichi multipli.

3.1 Campi di applicazione

Il presente lavoro di tesi si sviluppa nell'ambito della caratterizzazione dei tessuti biologici, in particolare del tessuto osseo corticale, con risvolti che possono avere utilità sia in un campo puramente ingegneristico come quello dell'analisi delle strutture e della meccanica del danno su scala microscopica, sia in campo medico-scientifico. Infatti, al fine di una progettazione sempre più avanzata di protesi che si interfacciano con il tessuto osseo o di scaffold per la medicina rigenerativa, può risultare utile comprendere il comportamento ed i meccanismi di danneggiamento di tale materiale a scale differenti.

In particolare la nanoindentazione, una tecnica innovativa che ha riscosso ampio successo e suscitato grandi interessi negli ultimi anni, ha permesso di indagare in maniera approfondita le proprietà meccaniche del tessuto a scale molto piccole, comparabili alla dimensione osteonale, consentendo di eseguire indentazioni limitate ad una singola lamella.

Fino ad oggi tuttavia, il metodo maggiormente utilizzato per condurre tali prove sperimentali consiste nell'applicazione di una singola indentazione, ovvero di una singola penetrazione a determinati carichi o affondamenti massimi impostati. Un'applicazione assolutamente innovativa consiste invece nell'esecuzione di indentazioni cicliche a carichi multipli. Tale protocollo sperimentale prevede affondamenti ripetuti nello stesso sito di indentazione, con carichi applicati e conseguenti penetrazioni rilevate progressivamente crescenti. Questa procedura non solo permette di effettuare un numero maggiore di indentazioni su un singolo campione, ma consente anche di valutare gli effetti del danno superficiale indotto dall'affondamento ripetuto della punta, sulle proprietà meccaniche del materiale alla scala nanometrica.

Per tali motivi in questo lavoro, presso il LaBS del Politecnico di Milano è stata svolta una campagna sperimentale di indentazioni cicliche a carichi ripetuti su tessuto osseo corticale bovino, con l'obiettivo di valutarne l'utilità, gli eventuali punti critici ed alcuni sviluppi futuri che consentano di affinare tale tecnica, data la scarsità di letteratura disponibile in proposito.

3.2 Obiettivi specifici del lavoro

Dopo aver studiato lo stato dell'arte di questo lavoro di tesi, sono stati definiti gli obiettivi specifici che sono stati perseguiti e gli aspetti principali su cui si è voluta focalizzare l'attenzione al fine di testare le proprietà meccaniche del tessuto a vari livelli di scala.

In primo luogo sono state svolte prove sperimentali di compressione macroscopica uniassiale in direzione trasversale e longitudinale, considerando il tessuto osseo come un materiale trasversalmente isotropo, con la direzione assiale assunta come direzione preferenziale. Lo scopo di tali test alla macroscale è duplice:

- permettere un primo raffronto generale tra le proprietà del tessuto osseo corticale analizzato in questo lavoro di tesi, proveniente da diafisi tibiali di bovino di 30 mesi e i dati reperibili in letteratura, al fine di avere dei validi confronti con lo stato dell'arte;
- confrontare i risultati ottenuti alla nanoscala con i risultati dei test macroscopici, al fine di evidenziare similitudini o differenze tra le due procedure, cercando di capire e motivare le eventuali discrepanze.

Nei test svolti alla nanoscala si è voluto mettere in luce ed evidenziare differenti aspetti che possono influire sui risultati. Essendo una tipologia di prove assolutamente innovativa, infatti, alcuni fattori d'influenza possono essere non noti o avere effetti più o meno marcati rispetto ai test di indentazione singola. I principali aspetti studiati alla nanoscala sono:

- il decadimento delle proprietà meccaniche del tessuto all'aumentare della penetrazione massima raggiunta dalle prove cicliche a carichi multipli, con bassi carichi e penetrazioni in gioco;
- l'anisotropia del tessuto e le differenze di risultati al variare della direzione di prova, considerando il tessuto trasversalmente isotropo;
- gli effetti sui risultati dei test a carichi multipli, da parte del tempo di conservazione in soluzione salina in frigorifero;
- le eventuali differenze tra risultati ottenuti da indentazioni su lamelle chiare e su lamelle scure, nel caso di provini lucidati;
- le eventuali differenze delle proprietà meccaniche rilevate tra lamelle progressivamente più lontane dal centro dell'osteone.

Inoltre si è voluto valutare alcuni aspetti relativi al set-up di prova e alle procedure sperimentali di produzione dei campioni, che possono influire sui risultati dei test a carichi multipli, tra cui i due principali sono:

- l'accuratezza delle misurazioni e la determinazione qualitativa di eventuali limiti di penetrazione massima oltre i quali si ottiene l'affidabilità delle misure;
- l'adeguatezza delle rugosità ottenute sull'intera superficie analizzata e nelle immediate vicinanze di una singola indentazione, mediante la procedura di lucidatura.

Tutti questi aspetti sono stati analizzati per porre delle basi utili per eseguire nuovi test in futuro che consentano di affinare ulteriormente i vari parametri di prova da impostare, in

modo tale da aumentare l'affidabilità delle misure. Inoltre i risultati ottenuti permettono di evidenziare le differenze tra test alla macro e alla nanoscala in modo da riconoscere quali parametri sperimentali possono contribuire a determinarle, pur tenendo conto dei differenti meccanismi che agiscono sulle due scale di osservazione.

Capitolo 4

Materiali e Metodi

La sezione 4.1 illustra i vari processi e le differenti lavorazioni effettuate, dal taglio della tibia bovina al polishing superficiale, le quali permettono di ottenere i campioni di tessuto osseo per i test di compressione su scala macroscopica e i test di nanoindentazione a carichi multipli.

Nella sezione 4.2 sono invece presentate le varie procedure riguardanti l'imaging del campione e lo studio della sua morfologia superficiale. Sono illustrate le procedure di acquisizione di varie immagini pre e post-indentazione mediante microscopia e le fasi di rilevamento dei dati riguardanti la profilometria. Si tratta di un aspetto molto importante per la successiva selezione e analisi dei risultati, nonché per la valutazione della rugosità.

Le sezioni 4.3 e 4.4 presentano rispettivamente i protocolli sperimentali per le prove di compressione monoassiale macroscopica e per i test di nanoindentazione. Si illustrano in dettaglio lo svolgimento delle prove in laboratorio ed il protocollo di analisi dei dati utilizzato per ottenere i risultati.

Infine nella sezione 4.5 sono introdotte le funzioni Matlab, appositamente scritte per questo lavoro di tesi, che permettono di automatizzare la procedura di analisi dei dati sperimentali ottenuti dai test di nanoindentazione a carichi multipli e di studiare la morfologia della superficie testata, in modo da osservare quali test siano affetti da errori dovuti ad asperità eccessive.

4.1 Preparazione dei campioni

Per discostarsi il meno possibile dalle condizioni fisiologiche, i campioni non sono stati deidratati in alcool, fissati chimicamente o congelati, ma una volta ottenuti sono stati immersi in soluzione salina e conservati in frigorifero prima di essere testati. Si precisa che i campioni per i test macroscopici sono stati testati pochi giorni dopo la loro produzione, mentre i provini per la nanoindentazione sono stati divisi in due gruppi: una serie è stata utilizzata entro 48 h dall'ottenimento, mentre un'altra è stata indentata dopo 5 mesi, al fine di osservare se in queste condizioni il tempo di conservazione potesse influire sui risultati.

Tutti i campioni testati nel presente lavoro di tesi sono stati ottenuti da tessuto osso corticale, tra metafisi e diafisi tibiale, proveniente da bovino di 30 mesi. Gli animali in esame non presentavano alcuna problematica di salute.

Si illustrano nel seguente paragrafo i metodi di ottenimento dei campioni per le prove macroscopiche e alla nanoscala. Per entrambi i test si ottengono campioni in direzione longitudinale e trasversale, in modo da poter valutare le proprietà meccaniche anisotrope del tessuto, considerato trasversalmente isotropo (Figura 4.1).

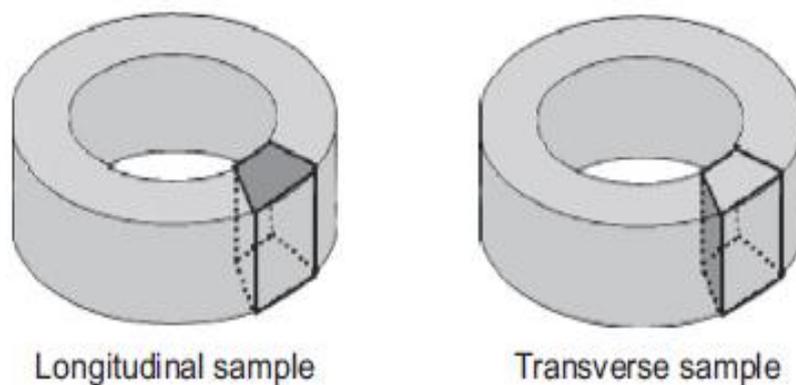


Figura 4.1: Posizione dei campioni longitudinali e trasversali nell'osso.

4.1.1 Campioni per prove di compressione monoassiale macroscopica

I campioni sono stati ottenuti per carotaggio, spruzzando costantemente acqua sul tessuto durante la lavorazione, dopo aver pulito la tibia da carne e altre parti organiche e aver svuotato il canale midollare (Figura 4.2).



Figura 4.2: Carotaggio dell'osso.

Sono stati quindi prodotti campioni cilindrici alti circa 1 cm con diametro di base di circa 0.5 cm in modo da ottenere un rapporto altezza:base di 2:1 per limitare gli effetti di bordo (Figura 4.3).



Figura 4.3: Provini per test macroscopici.

I campioni non hanno ricevuto nessun particolare trattamento superficiale. Infine tutti i campioni sono stati sottoposti a 7-8 cicli di 5 minuti ciascuno di sonicazione, con un bagno a ultrasuoni SONICA®, al fine di eliminare ogni impurità prima della conservazione in frigorifero in attesa delle prove.

4.1.2 Campioni per prove di nanoindentazione

Sono stati ottenuti cubetti di circa 5 mm per lato mediante l'utilizzo di sega e fresa con irrigazione costante di acqua sul campione (Figura 4.4). I campioni sono stati tagliati in modo da avere due facce perpendicolari all'asse longitudinale (sezioni assiali) o all'asse trasversale (sezioni trasversali) della tibia.



Figura 4.4: Preparazione dei campioni per la nanoindentazione.

Sui vari campioni sono state selezionate alcune facce assiali e trasversali da sottoporre ad operazioni di lucidatura (polishing), condotte con una lappatrice a velocità variabile BUEHLER EcoMet®3 (Figura 4.5), dotata di testa semi-automatica AutoMet®2, presso il Laboratorio Chimico del dipartimento di Ingegneria Strutturale (reparto diagnostica, monitoraggio e indagini sui materiali per il costruito e i beni culturali) del Politecnico di Milano. Tale procedura è necessaria per ridurre la rugosità superficiale prima di effettuare le procedure di imaging e di nanoindentazione. Prima di attuare la lucidatura, i campioni sono stati sottoposti a ulteriori cicli di sonicazione.



Figura 4.5: Lappatrice utilizzata per la procedura di polishing.

La procedura di polishing prevede:

- 30 s a 100 rpm con carta abrasiva di granulometria 2500 al carburo di silicio (SiC);
- 8-9 minuti a 150 rpm con carta abrasiva di granulometria 4000 al Sic;
- 6 minuti a 70 rpm con panno Alulap per lucidatura preliminare mediante particelle di allumina (Al_2O_3) da 1 μm ;
- 3 minuti a 50 rpm con panno Polilap per lucidatura finale metallografica con particelle di Al_2O_3 da 0.05 μm .

Durante tutta la procedura di taglio e lucidatura i campioni sono stati mantenuti immersi in soluzione salina quando non coinvolti nelle varie operazioni di preparazione. Una volta ultimate le procedure di ottenimento i campioni sono stati sottoposti ancora a 7-8 cicli di sonicazione da 5 minuti ciascuno. In Figura 4.6 sono mostrati alcuni provini prodotti alla fine dell'intero ciclo.

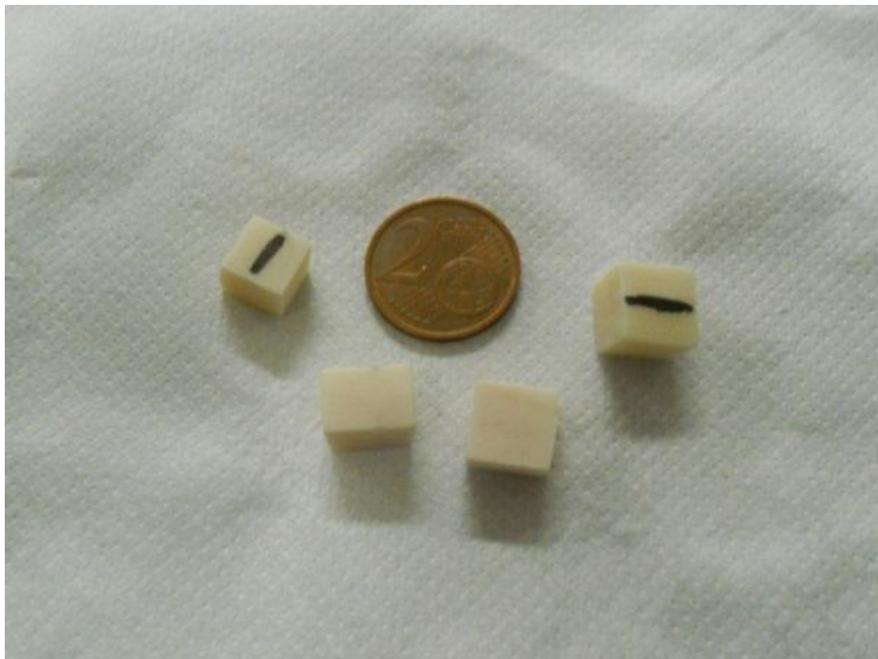


Figura 4.6: Campioni per i test di nanoindentazione.

4.2 Studio della morfologia superficiale

Il primo passo per l'analisi della morfologia dei campioni per le prove di nanoindentazione consiste nell'osservazione al microscopio ottico con ingrandimento 10x (Figura 4.7). In questa fase si osservano i diversi osteoni e le loro lamelle, al fine di scegliere le zone migliori in cui impostare i test.

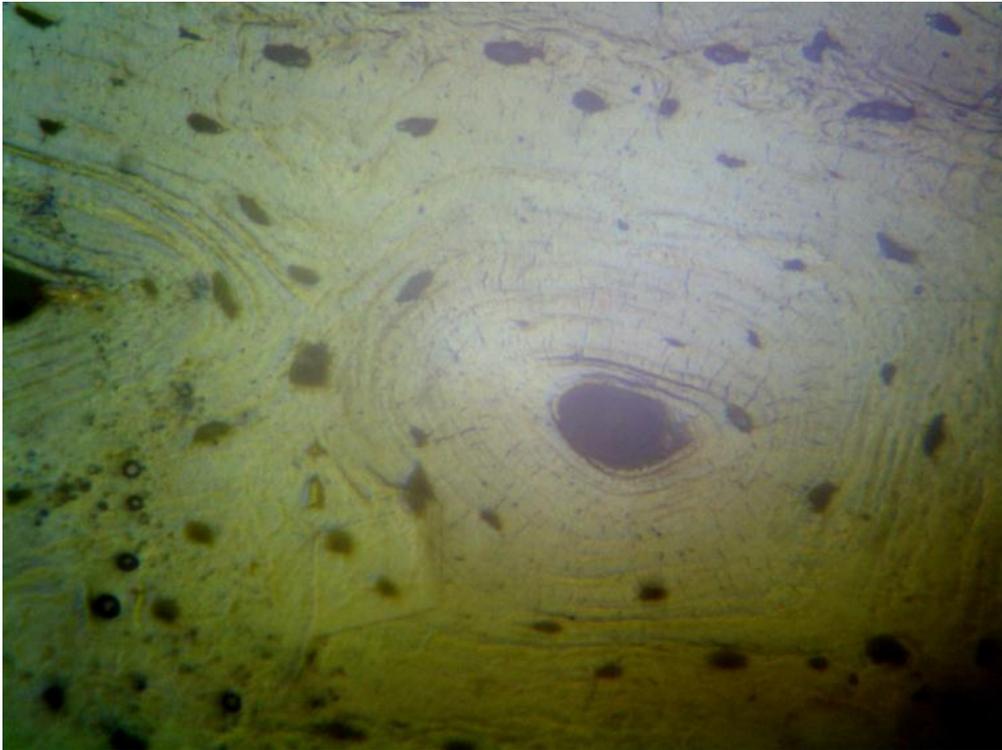


Figura 4.7: Osservazione al microscopio ottico dell'osso corticale.

Una volta che la zona di interesse è stata selezionata si procede con l'imaging, attuato con il tastatore di cui è dotato il macchinario, impostando una forza di contatto pari a 0.08 mN. Lo strumento scansiona una zona di 40-50 μm per lato lungo le coordinate x e y, rilevando dati circa ogni 150 nm, attuando un contatto col campione con forze molto basse in modo da evitare il danneggiamento della superficie del campione. Gli spostamenti del tastatore sull'asse z dovuti alla presenza di picchi e valli sulla superficie permettono di osservare la qualità del polishing e di eseguire in un secondo momento le analisi successive, illustrate nei paragrafi seguenti.

Sulle basi delle immagini pre-indentazione e dei risultati dell'imaging, vengono decisi i siti di indentazione e possono quindi essere eseguiti i test sperimentali. In seguito vengono acquisite nuove immagini ottiche della superficie. Ad esempio in Figura 4.8 è possibile chiaramente notare le impronte triangolari lasciate dalla punta piramidale Berkovich.

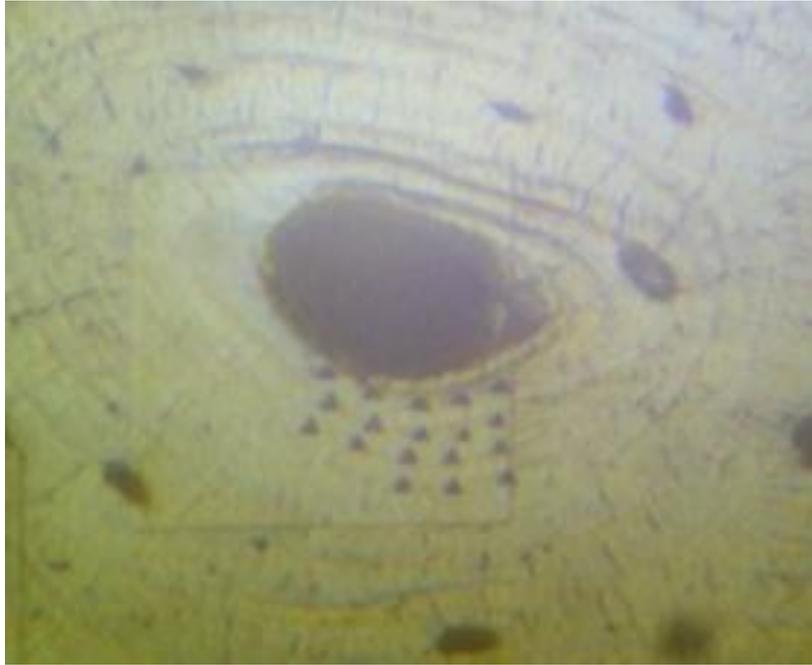


Figura 4.8: Solchi nella superficie causati dalla procedura di imaging.

Lo studio e l'elaborazione delle immagini post-indentazione, descritto accuratamente nei paragrafi successivi, permette di valutare attentamente il numero di lamella in cui la prova è stata condotta. Questo fattore è molto importante per condurre una successiva analisi sulla dipendenza dei risultati ottenuti dalla distanza dal canale di Havers. Inoltre, la risoluzione adeguata permette la distinzione tra lamelle chiare e scure, in modo da valutare anche l'influenza di questo fattore sui risultati dei test di nanoindentazione.

In Figura 4.9 è riportata un'immagine ottica post-indentazione su un campione assiale che permette di analizzare i due aspetti precedentemente indicati.

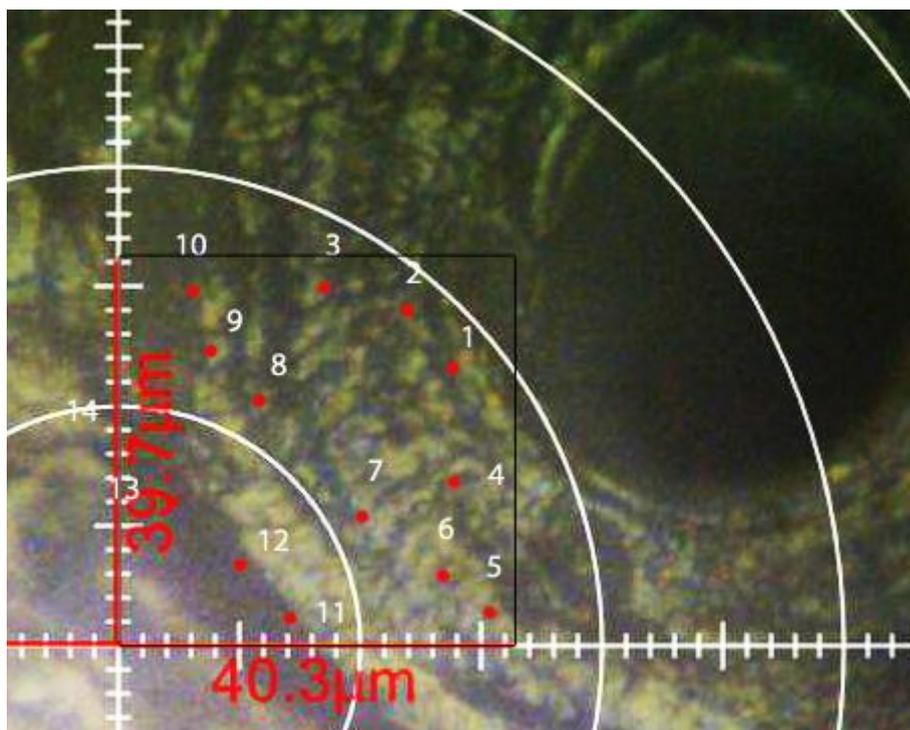
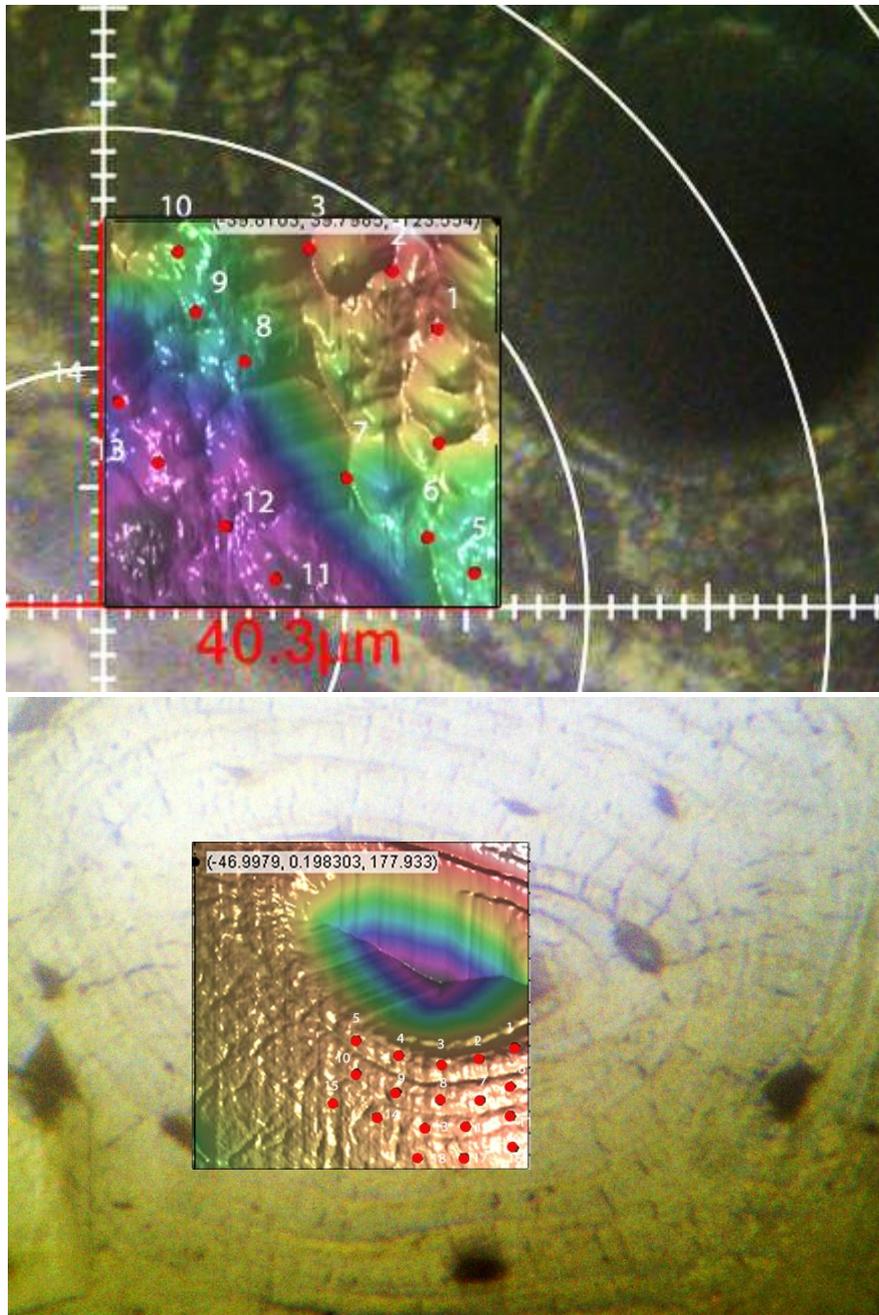


Figura 4.9: Rilevazioni degli spot di indentazione sulle lamelle.

Infine, come illustrato in Figura 4.10, dalla sovrapposizione tra le immagini ottiche e le immagini digitali ottenute dalla ricostruzione della superficie scansionata, è possibile immediatamente capire se qualche sito di indentazione sia stato posto in zone problematiche, quali picchi, regioni poco planari, oppure troppo vicine al canale di Havers o al confine stesso dell'osteone.



4.10: Esempi di sovrapposizione delle immagini digitali della topografia all'immagine ottica.

4.3 Protocollo di prova per test di compressione monoassiale macroscopica

A livello macroscopico sono state condotte prove di compressione monoassiale, allo scopo di determinare i valori del modulo di elasticità e dello sforzo di snervamento del materiale per un confronto preliminare con i dati di letteratura.

I test sono stati svolti al Laboratorio di Strutture Biologiche (LaBS) del Politecnico di Milano su una macchina di prova oleodinamica MTS 858 Bionix (S/N 1015457, MTS, Minneapolis, MN). Il macchinario (Figura 4.11) è equipaggiato di un attuatore idraulico assiale con capacità di carico di 25 kN ed un trasduttore di spostamento LVDT con range di funzionamento di ± 100 mm. La forza applicata è stata misurata con una cella di carico MTS (modello 622.20D-05 S/N 1007099, carico assiale massimo ± 25 kN), mentre la macchina è stata gestita attraverso il software di controllo Test Star II.



Figura 4.11: Macchinario utilizzato per le prove di compressione macroscopica.

Sia i campioni assiali, sia quelli trasversali, sono stati testati ad una velocità di deformazione di 2 mm/min, pari a circa 0.033 mm/s, con prove condotte fino a rottura. La frequenza di acquisizione dati è stata impostata a 10 Hz. Per ridurre i possibili effetti introdotti dall'attrito e dal contatto tra le piastre del macchinario e le superfici dei provini è stata utilizzata un'apposita pasta lubrificante, posta sulle facce di ogni campione prima del test.

Il software di controllo restituisce i dati dello spostamento della traversa della macchina di prova e la relativa forza rilevata, come illustrato in Figura 4.12.

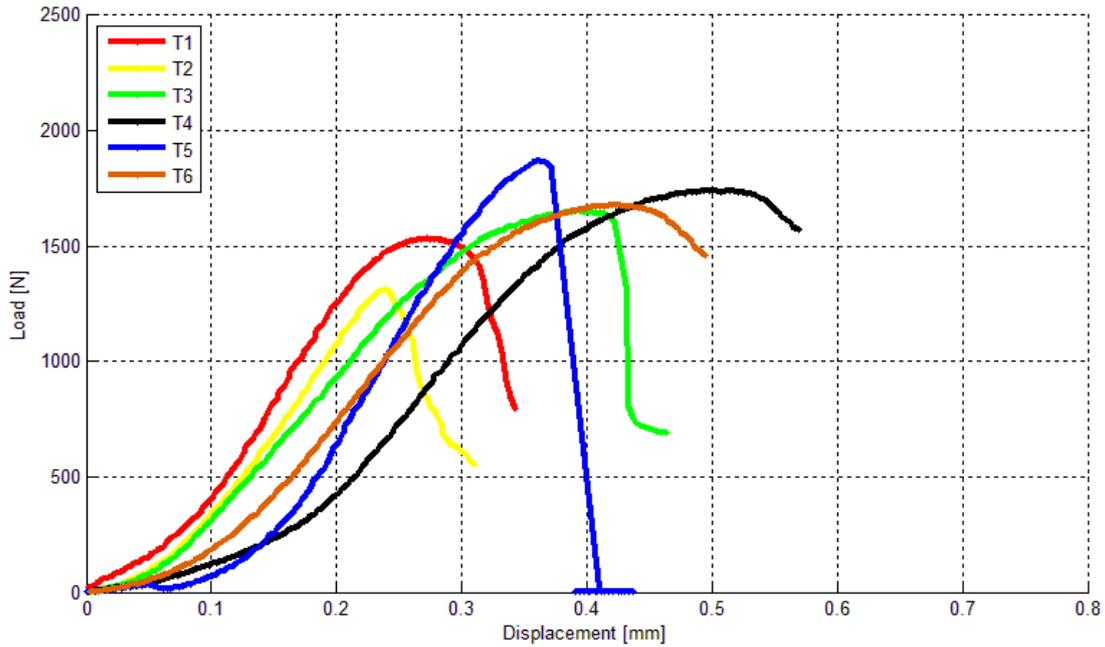


Figura 4.12: Curve forza-spostamento delle prove macroscopiche.

Ottenuti i valori sperimentali, si procede all'elaborazione secondo il seguente metodo di analisi. A partire dai dati forza-spostamento ($F-\Delta x$) si riconducono nuove curve sforzo-deformazione ($\sigma-\varepsilon$). Lo sforzo σ in una generica sezione è calcolato secondo la relazione:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (4.1)$$

dove F è la forza di compressione esercitata e rilevata dalla macchina, mentre A è la sezione resistente misurata prima della prova. La deformazione ottenuta è invece calcolata come:

$$\varepsilon = \frac{l - l_0}{l_0} = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (4.2)$$

dove l_0 è l'altezza iniziale del campione, misurata prima del test, nella direzione di prova, mentre l è l'altezza del provino a seguito della sollecitazione, rilevata durante l'esperimento e pari alla distanza tra le due ganasce del macchinario di prova.

Dalle curve $\sigma-\varepsilon$ ottenute in questo modo è possibile ottenere mediante un'interpolazione lineare il modulo elastico E , definito dalla legge di Hooke come:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}. \quad (4.3)$$

Il modulo di Young è dato dal coefficiente angolare della retta ottenuta tra il 40% e il 70% del limite elastico.

L'altro parametro di interesse per un confronto con i valori di letteratura su scala macroscopica è costituito dallo sforzo di snervamento, altrimenti detto yield stress, cioè lo sforzo σ_y in corrispondenza del quale il materiale inizia a deformarsi plasticamente.

Per l'ottenimento di tale valore è stata seguita una metodologia classica di elaborazione, tale per cui si trasla l'interpolante del tratto lineare della curva di 0.2%. L'intersezione di tale retta con la curva σ - ϵ restituisce il valore di σ_y . In Figura 4.13 sono illustrati gli ottenimenti del modulo di Young e dello sforzo di snervamento per una tipica curva σ - ϵ .

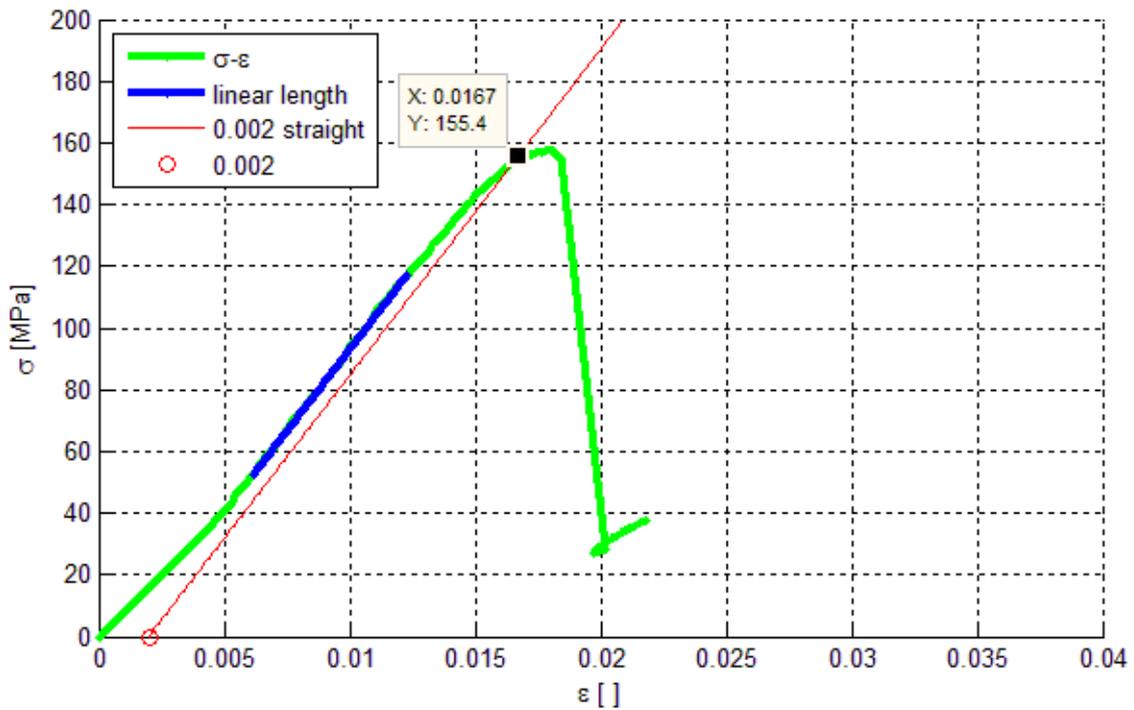


Figura 4.13: Retta passante per il 2‰ di deformazione parallela al tratto lineare della curva.

4.4 Protocollo di prova per test di nanoindentazione a carichi multipli

A seguito delle prove su scala macroscopica, condotte allo scopo di ottenere un raffronto preliminare tra il tessuto osseo utilizzato in questo lavoro e alcuni risultati già noti dalla letteratura, sono stati eseguiti vari test sperimentali su scala nanometrica mediante prove di nanoindentazione condotte su Nanotest Platform 3 (MicroMaterials®) ad una temperatura mantenuta intorno ai 28 °C (Figura 4.14). Il campione osseo è stato attaccato ad un supporto sulla superficie opposta a quella da esaminare e con la superficie lucidata rivolta verso l'indentatore (Figura 4.15). Sono state utilizzate per le prove sperimentali due punte di tipo Berkovich con compliance di 0.52 nm/mN e di 0.71 nm/mN per i campioni testati entro 48 h e dopo 5 mesi, rispettivamente.

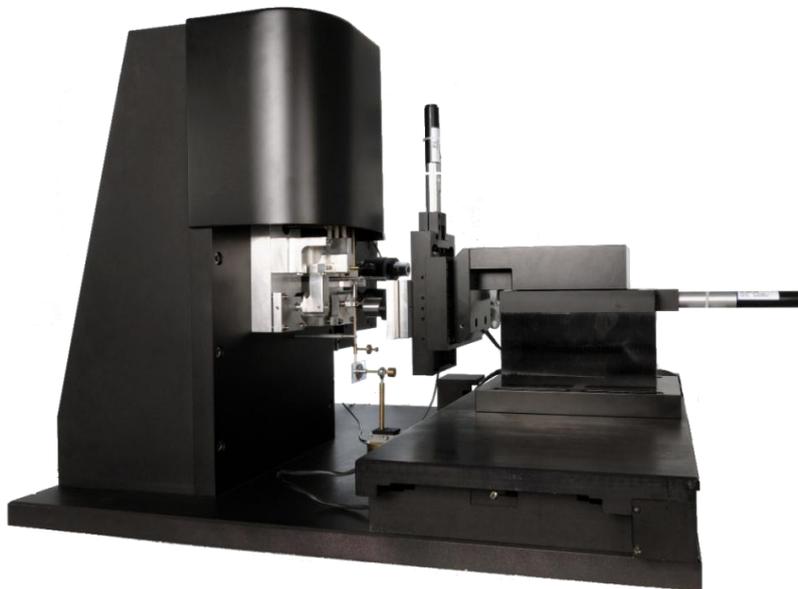


Figura 4.14: Macchinario utilizzato per le prove di nanoindentazione.

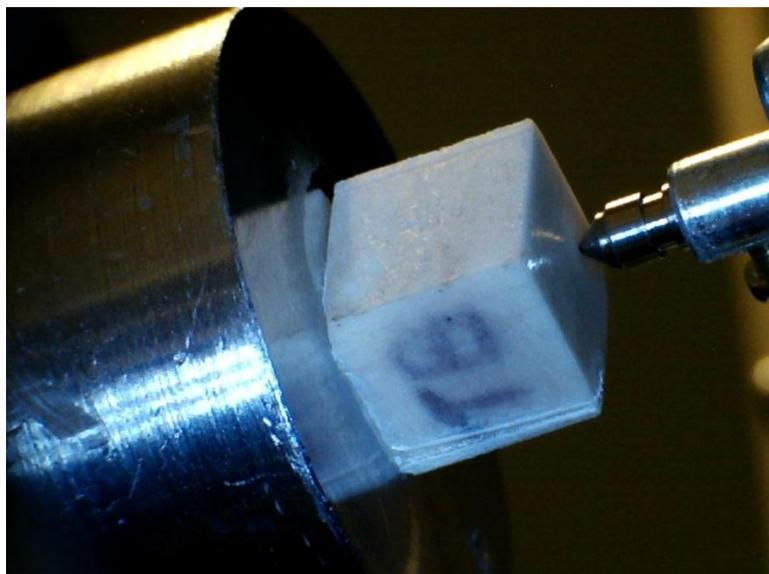


Figura 4.15: Campione osseo posizionato su un supporto pronto alla nanoindentazione.

Tutte le prove sui differenti campioni sono state eseguite applicando il medesimo protocollo di prova, sia per campioni assiali sia per campioni trasversali.

I campioni sono stati mantenuti in soluzione salina dal momento del completamento della lavorazione fino a pochi minuti prima dell'esecuzione dei test. I siti di indentazione sono selezionati dopo aver visionato la superficie al microscopio e aver scansionato la morfologia della zona interessata con un tastatore.

Le prove consistono nell'applicazione di carichi progressivamente crescenti nello stesso sito di indentazione per 8 differenti livelli di forza, rilevando la penetrazione conseguente in modo da valutare le proprietà meccaniche alla nanoscala all'aumento dell'affondamento o del carico applicato. Sia la velocità di carico che quella di scarico sono impostate a 0.5 mN/s (Figura 4.16).

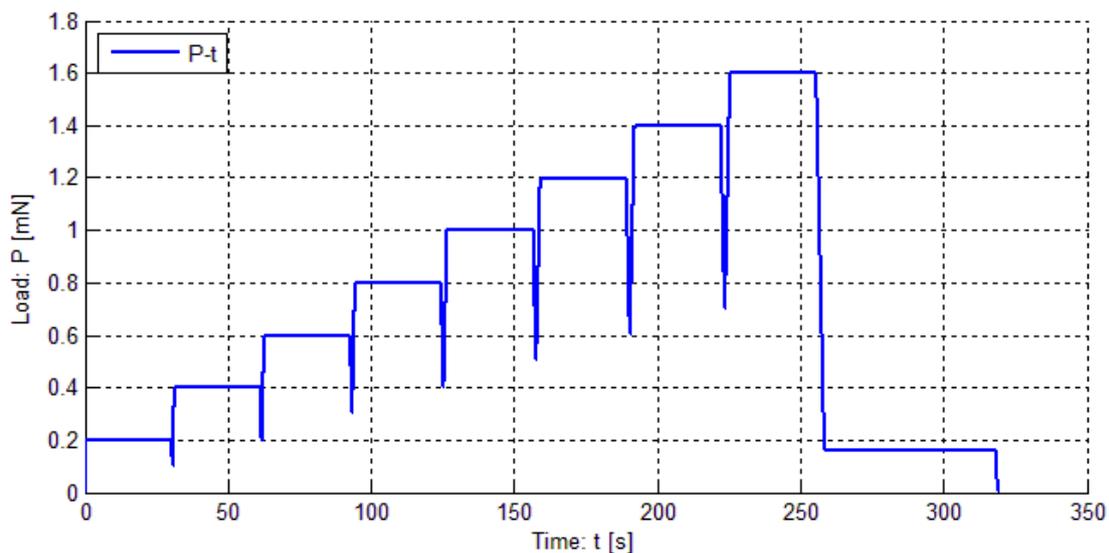


Figura 4.16: Curve P-t relative al protocollo di prova.

Nel dettaglio i test sono stati condotti secondo questa procedura:

- 1) carico fino a 0.2 mN, hold di 30 s e scarico del 50% (a 0.1 mN);
- 2) carico fino a 0.4 mN, hold di 30 s e scarico del 50% (a 0.2 mN);
- 3) carico fino a 0.6 mN, hold di 30 s e scarico del 50% (a 0.3 mN);
- 4) carico fino a 0.8 mN, hold di 30 s e scarico del 50% (a 0.4 mN);
- 5) carico fino a 1.0 mN, hold di 30 s e scarico del 50% (a 0.5 mN);
- 6) carico fino a 1.2 mN, hold di 30 s e scarico del 50% (a 0.6 mN);
- 7) carico fino a 1.4 mN, hold di 30 s e scarico del 50% (a 0.7 mN);
- 8) carico fino a 1.6 mN, hold di 30 s e scarico totale (a 0 mN).

Il protocollo descritto rappresenta una tipologia innovativa di test di nanoindentazione su tessuto osseo corticale, come dimostra l'assenza di letteratura in proposito. In Figura 4.17 è rappresentata una tipica curva P-h, risultato del test applicato.

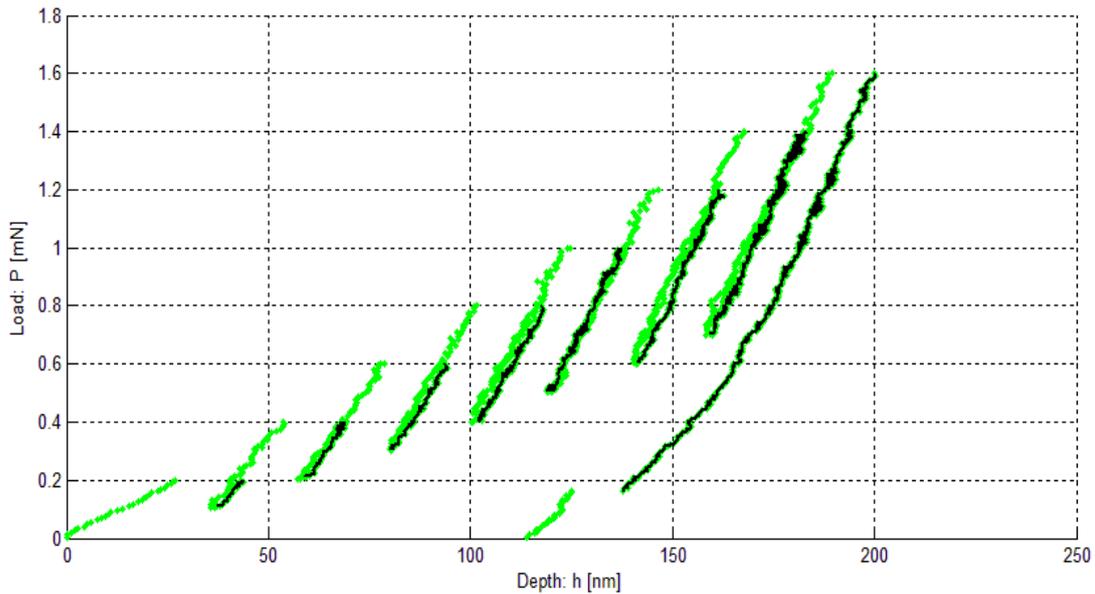


Figura 4.17: Curva P-h ottenuta nei test di nanoindentazione. Sono evidenziati in nero gli scarichi relativi.

Queste prove permettono di avere a disposizione su un singolo sito di indentazione otto curve di scarico, analizzabili attraverso la teoria di Oliver-Pharr descritta in precedenza.

Tutte le curve P-h sono state corrette considerando la compliance della punta utilizzata, secondo la relazione:

$$h = h_0 - CP \quad (4.4)$$

dove h_0 rappresenta il valore di spostamento originale restituito dalla macchina, C il valore noto di compliance dell'indentatore e P il carico rilevato in corrispondenza di h_0 .

Il primo passo eseguito è stato il calcolo della rigidità iniziale di scarico S , calcolata ad ognuno degli 8 livelli di P_{max} applicati e definita come:

$$S = \left. \frac{dP}{dh} \right|_{h=h_{max}} \quad (4.5)$$

Nella pratica per il calcolo delle rigidità vengono considerati i punti sperimentali di scarico delle curve P-h compresi tra il 95% e il 50% di P_{max} , seguendo così il protocollo solitamente utilizzato per normali prove di nanoindentazione. Per l'ottenimento di S è stata eseguita una interpolazione lineare su questo intervallo di dati.

I valori di h_{max} e P_{max} necessari per procedere con l'analisi di Oliver-Pharr sono stati ottenuti considerando i valori di inizio unloading, al termine dell'holding di 30 s, come mostrato in Figura 4.18.

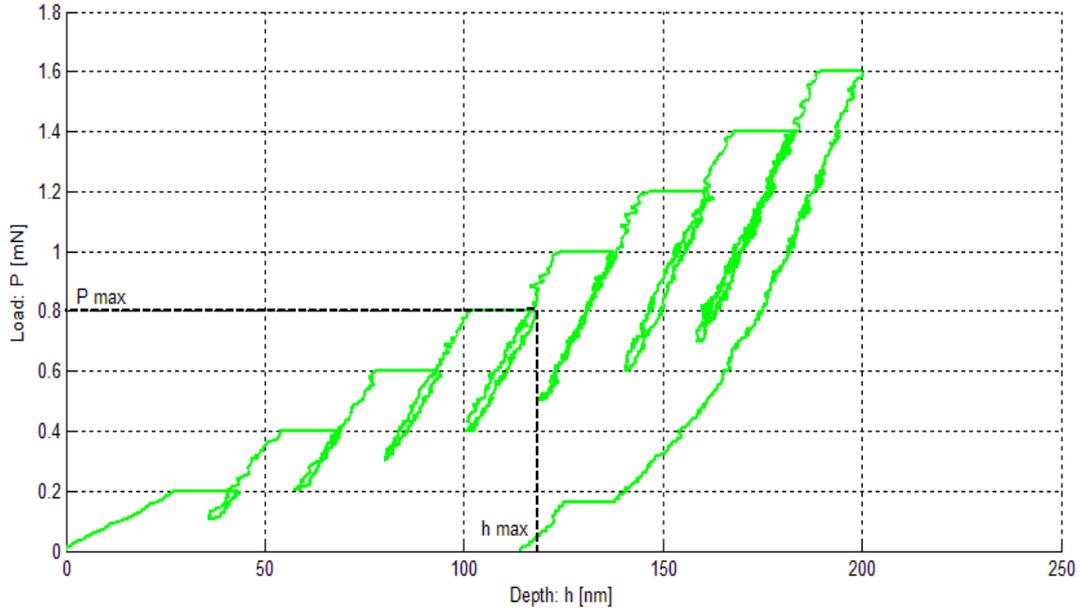


Figura 4.18: Rilevazione di P_{max} e h_{max} dopo il periodo di holding.

È stato quindi calcolato il valore di h_c secondo la seguente equazione:

$$h_c = h_{max} - \frac{2(\pi - 2)}{\pi} \frac{P_{max}}{S} \quad (4.6)$$

Necessario successivamente al calcolo dell'area di contatto A . Nell'analisi sperimentale non è stata considerata l'area ideale illustrata precedentemente nel Capitolo 2, bensì l'area corretta mediante la Diamond Area Function (DAF). I coefficienti della DAF sono dati e vanno implementati in una funzione frazionaria o polinomiale per il corretto calcolo di A come illustrato di seguito:

$$A_{frazionaria} = B1h_c^2 + B2h_c + B3h_c^{\frac{1}{2}} + B4h_c^{\frac{1}{4}} + B5h_c^{\frac{1}{8}} + B6h_c^{\frac{1}{16}} \quad (4.7)$$

$$A_{polinomiale} = B1h_c^4 + B2h_c^3 + B3h_c^2 + B4h_c. \quad (4.8)$$

Come è possibile osservare dal grafico in scala logaritmica in Figura 4.19, per bassi affondamenti si presentano differenze tra le due aree calcolate con le due diverse formule, mentre per affondamenti maggiori risultano avere valori più simili. In particolare si nota che la teoria di Oliver-Pharr sottostima l'area di contatto effettiva. Dal confronto tra DAF polinomiale e frazionaria si osserva invece che le due funzioni tendono a convergere verso gli stessi valori per h_c superiori a 150 nm, mentre nel tratto iniziale si presenta un'instabilità della DAF frazionaria che nel range d'interesse tende a sottostimare l'area rispetto alla polinomiale. Tale sottostima è del 35% circa per valori di h_c di circa 40nm, del 10% circa per valori di circa 100 nm, mentre oltre tale valore tende a zero. Per questi motivi si è scelto di utilizzare nell'analisi dei dati dal DAF polinomiale.

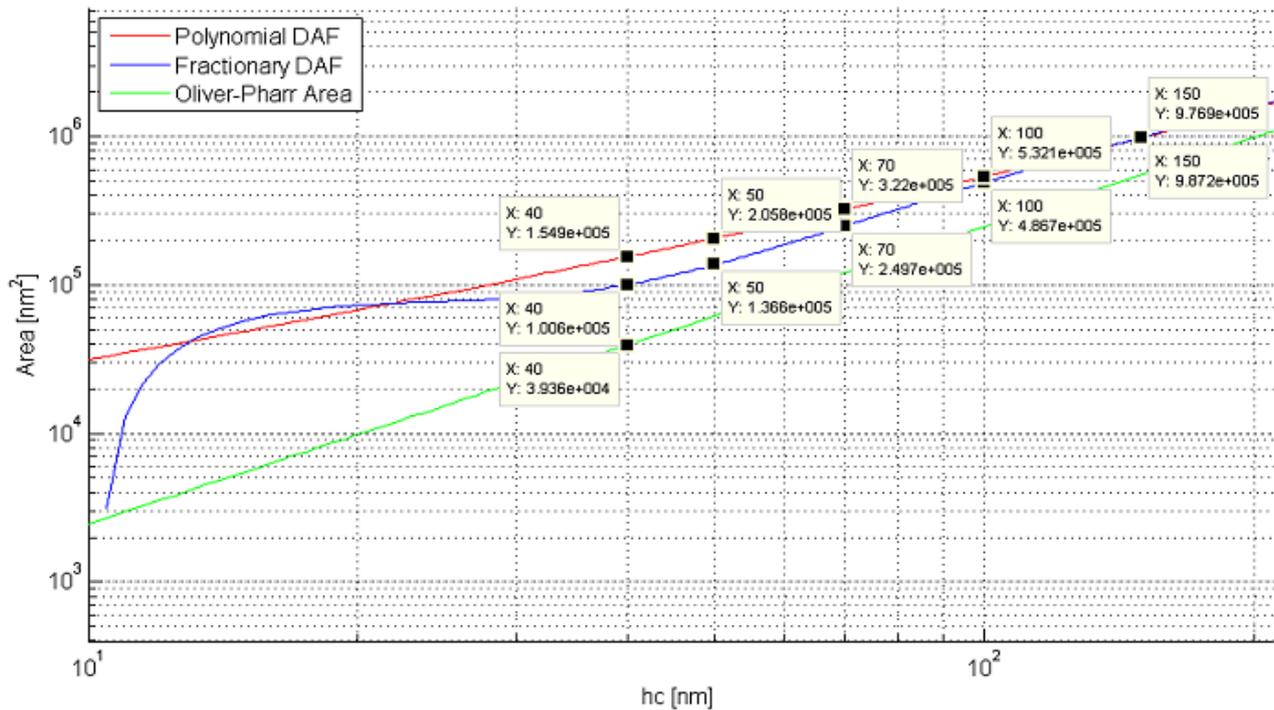


Figura 4.19: Confronto tra DAF in scala logaritmica.

Sono stati calcolati successivamente i due valori di interesse, la durezza:

$$H = \frac{P_{max}}{A} \quad (4.9)$$

ed il modulo ridotto:

$$E^* = \frac{S}{2\beta} \sqrt{\frac{\pi}{A}} \quad (4.10)$$

con $\beta=1.034$ per una punta di tipo Berkovich come quella utilizzata in questi test. Attraverso la relazione:

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1 - \nu_i^2}{E_i} + \frac{1 - \nu_s^2}{E_s} \quad (4.11)$$

dove $\nu_i=0.07$ ed $E_i=1141$ GPa sono rispettivamente il coefficiente di Poisson e il modulo di Young dell'indenter, a partire dal modulo ridotto E^* è stato calcolato il modulo di indentazione M :

$$M = \frac{E_s}{1 - \nu_s^2} \quad (4.12)$$

dove E_s e ν_s sono rispettivamente il modulo elastico e il coefficiente di Poisson del materiale. Infine è stata affiancata una stima dello strain rate (VanLandingham, 2003):

$$\dot{\epsilon} = \frac{\dot{h}}{h}. \quad (4.13)$$

4.5 Elaborazioni e analisi delle prove a carichi multipli in Matlab

Al fine di automatizzare le procedure di correzione delle curve sperimentali, di riconoscimento dei vari scarichi e di analisi dei dati sperimentali per ottenere i parametri meccanici di interesse, sono state implementate delle funzioni Matlab. In particolare sono state approntate due problematiche illustrate di seguito nel dettaglio:

- trattare i dati P-h rilevati dalla macchina durante le prove di nanoindentazione per renderli utilizzabili per l'analisi di Oliver-Pharr ed estrarre in automatico i parametri di interesse per le varie prove a carichi multipli (`function Nanotest`, riportata in appendice);
- ricostruire la morfologia 3D della superficie scansionata dalla macchina in fase di imaging al fine di studiare i siti di indentazione, in modo da capire se escludere o meno alcuni risultati, anche attraverso il calcolo della rugosità superficiale (`function Roughness`, riportata in appendice).

4.5.1 Trattamento delle curve P-h

La macchina di prova restituisce i dati di carico applicato (P), i corrispondenti affondamenti rilevati (h) e il tempo di prova (t), valori che sono stati opportunamente trattati prima di effettuare l'analisi di Oliver-Pharr al fine di ottenere risultati attendibili. Inoltre, data la numerosità delle prove, si è dimostrata necessaria l'implementazione di un riconoscimento automatico delle differenti indentazioni e, all'interno di esse, dei diversi cicli di scarico.

Si illustra ora in dettaglio il funzionamento dell'implementazione Matlab effettuata per questo lavoro di tesi.

La prima parte del codice permette di operare un corretto filtraggio delle curve P-h. È stata notata infatti all'inizio del primo carico di una prova a carichi multipli una fase in cui il contatto tra indentatore e campione non è propriamente corretto, a causa del basso affondamento e del basso carico applicato. Tale problematica incide sulla curva P-h con una sorta di plateau iniziale, in cui è possibile notare un netto aumento delle h rilevate senza che vi sia un concreto aumento di P sino al momento della corretta interazione tra indenter e tessuto (Figura 4.20). Questo fenomeno introduce un errore nella prova in quanto gli affondamenti rivestono un ruolo determinante nell'analisi di Oliver-Pharr.

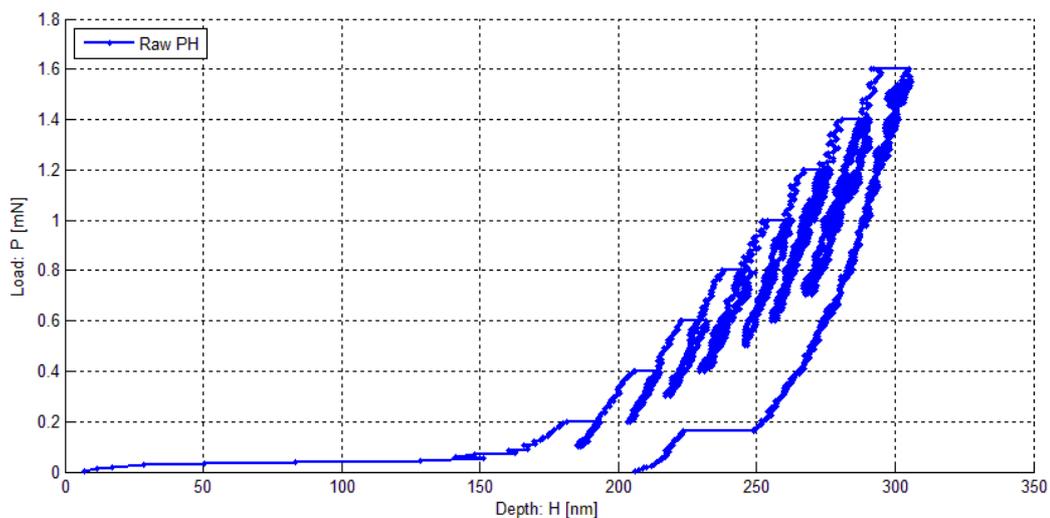


Figura 4.20: Curva P-h che presenta plateau iniziale.

È stato dunque necessario operare una correzione che elimini il plateau della curva e reimpostare correttamente i valori di h. Osservando la morfologia di una normale prova di nanoindentazione o una prova a carichi multipli in cui si attua il corretto contatto sin da subito, si è deciso di eliminare tale plateau e sostituirlo con un'interpolazione lineare (Figura 4.21) che permetta di reimpostare correttamente la curva sugli assi P-h.

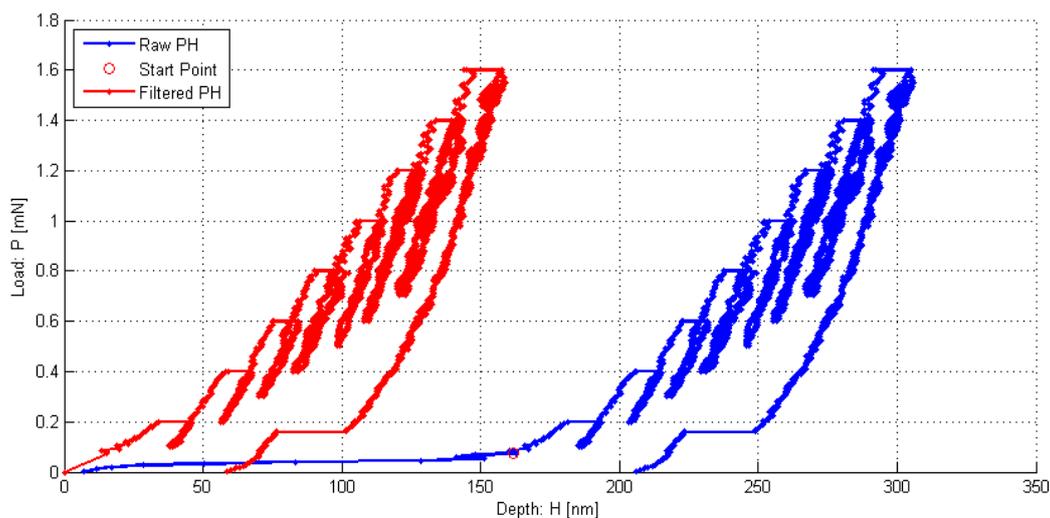


Figura 4.21: Correzione della curva originale a partire da un punto di start tramite una interpolazione lineare dei dati.

La funzione Matlab, mediante un criterio basato sulla pendenza e sulla mediana dei dati, scansiona i punti sperimentali e una volta trovata la fine del plateau, identifica in automatico il punto da cui si attua il corretto contatto (punto di start). Tuttavia questa procedura in alcuni casi può risultare non propriamente corretta, ad esempio a causa dell'insufficienza di punti sperimentali nella zona. In tal caso il programma permette all'utente di operare una selezione manuale del punto desiderato. Il codice prosegue eseguendo successivamente l'interpolazione lineare e reimpostando correttamente la curva all'origine degli assi, permettendo dunque una corretta analisi dei dati.

La seconda parte del codice svolge l'elaborazione di Oliver-Pharr, precedentemente trattata, per ciascuno scarico di ogni indentazione eseguita. Il programma identifica in automatico sia l'inizio di ogni prova, sia l'inizio e la fine di ogni scarico, mediante una scansione dei tempi di prova restituiti dalla macchina. Infatti, all'inizio di un test di indentazione il tempo viene azzerato, mentre il tempo di holding di 30 s (molto più grande del tempo di scansione) che precede ogni scarico permette facilmente di riconoscere l'inizio di ogni unloading. I parametri di interesse H ed E^* sono quindi automaticamente calcolati, già suddivisi per sito di indentazione e per ciclo di scarico.

L'ultima parte del codice si occupa del salvataggio dei risultati ottenuti, mettendoli a disposizione per eventuali analisi future attraverso la scrittura di un file Excel.

4.5.2 Analisi della morfologia superficiale

In fase di imaging sono state ottenute le varie coordinate x , y , z dei punti di scansione sulla superficie di interesse del campione, che generalmente è un quadrato compreso tra i 40 e i 50 μm per lato. Inoltre, sempre in questa fase, grazie anche alle immagini ottenute al microscopio, è stato possibile selezionare i siti di indentazione e fissarne le coordinate da utilizzare per i test.

Per sfruttare questi dati è stata implementata una nuova funzione Matlab che permette di ricostruire la morfologia superficiale, visualizzare la posizione delle indentazioni e procedere al calcolo di una serie di parametri di interesse sulla totalità della superficie e in un intorno dei siti di prova. Si riporta di seguito il funzionamento della funzione implementata.

La prima parte della funzione importa i file '.txt' che contengono le coordinate x , y , z dei punti scansionati. La macchina di prova sonda il campione fissando una coordinata x e scorrendo tutte le coordinate y rilevando le corrispondenti altezze z . Una volta scansionate tutte le coordinate y , si sposta alla coordinata x successiva e ripete l'operazione, finché tutta la superficie x - y di interesse non è stata sondata. Il macchinario restituisce però solo 3 colonne di coordinate x , y , z ottenuti con tale modalità. È stato quindi necessario procedere innanzitutto alla ricostruzione ordinata di una matrice spaziale in cui le coordinate sono riorganizzate secondo i punti di appartenenza sulla superficie di interesse. Si realizza così una superficie di punti scansionati di cui sono note le 3 coordinate x , y , z . Di seguito la funzione genera una mesh che permette di vedere la morfologia dell'area di imaging.

Nel passo successivo, la funzione permette all'utente, attraverso la selezione manuale di 3 punti, di effettuare un tilt della superficie, ovvero di correggere, se necessario, la superficie di interesse mediante un'operazione di rotazione, per ovviare a possibili imprecisioni del macchinario in fase di imaging. La selezione del tilt non è comunque un'operazione banale e richiede un serio e attento confronto tra superficie ricostruita e immagini al microscopio al fine di non introdurre ulteriori errori. L'equazione è riportata in appendice insieme all'implementazione Matlab della funzione. Grazie ad un confronto tra le coordinate dei siti di indentazione e quelle dell'intera superficie scansionata è possibile visualizzare sulla mesh le zone in cui sono state condotte le prove, come illustrato in Figura 4.22. La fase di riconoscimento dei vari spot di indentazione riveste comunque un ruolo importante nell'analisi dei dati, in quanto permette di valutare la profilometria lungo x o lungo y e il calcolo di varie misure di rugosità per ogni singola indentazione.

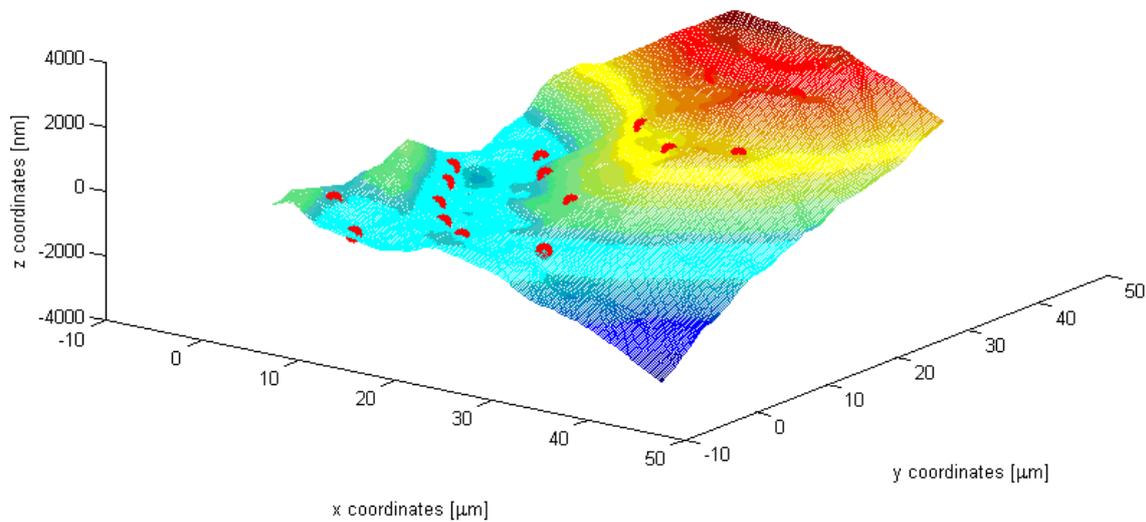


Figura 4.22: Rilevamento dei siti di indentazione sulla ricostruzione della superficie analizzata.

L'ultima parte del codice ottiene le profilometrie e la linea media del profilo lungo x o y in relazione al sito di indentazione (Figura 4.23) e fornisce quindi valori di rugosità (Caligaris, 2005). È calcolata la rugosità media R_a :

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i| \quad (4.14)$$

dove gli y_i sono gli scostamenti del profilo rilevato dalla linea media sugli n punti di scansione. Analogamente si ottiene la rugosità quadratica media R_q :

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2} \quad (4.15)$$

Queste grandezze vengono calcolate sia sull'intera lunghezza di scansione, generalmente compresa tra 40 e 50 μm , sia in un intorno del sito di indentazione di 1-2 μm , assumendo questo valore come una distanza abbastanza grande rispetto alle deformazioni causate dalla punta.

Tali misure, unite allo studio della posizione del sito di indentazione sul campione, permettono di valutare in maniera migliore i risultati delle proprietà meccaniche ottenute dalle varie prove, evidenziando eventuali problematiche ed eventuali test da scartare.

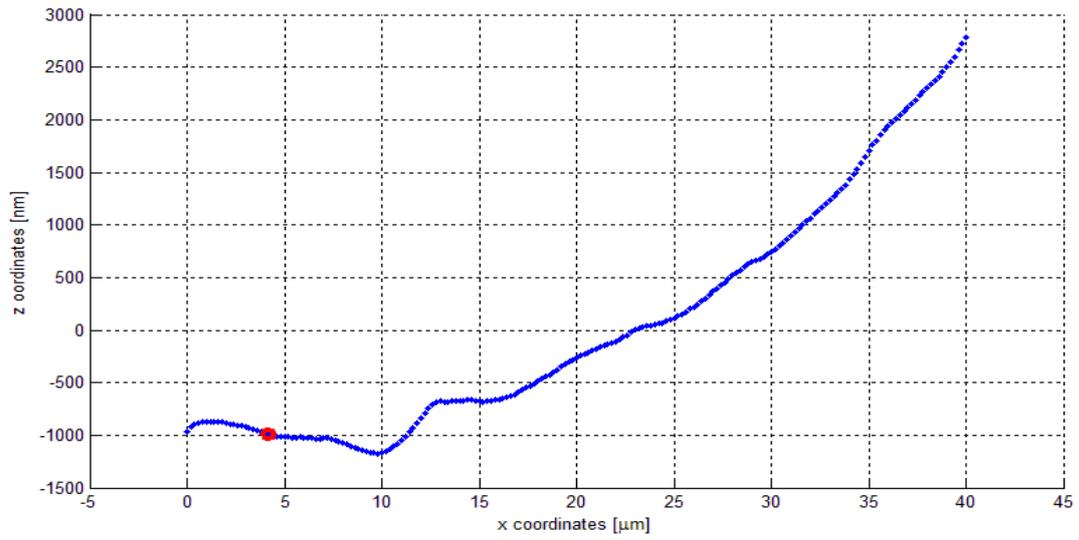


Figura 4.23: Esempio di profilometria lungo un asse relativa ad un singolo spot di nanoindentazione (cerchio rosso).

Capitolo 5

Risultati

La sezione 5.1 riporta i risultati ottenuti dalle prove macroscopiche di compressione monoassiale, testando provini cilindrici di tessuto osseo corticale in direzione assiale e trasversale. Tra le proprietà meccaniche investigate a questa scala rientrano il modulo di elasticità e lo sforzo di snervamento del materiale.

Nella sezione 5.2 segue una dettagliata presentazione dei risultati ottenuti dalle prove di nanoindentazione. Sono illustrati i risultati generali ed i risultati in funzione del tipo e del numero di lamella in cui è stata condotta la prova. Inoltre sono riportati i valori di rugosità ottenuti per le varie indentazioni sulla base delle procedure di imaging.

Infine nella sezione 5.3 sono analizzati i risultati delle prove macroscopiche in base ai dati reperiti da vari autori, mentre nella sezione 5.4 è presente la discussione dei valori ottenuti dai test di nanoindentazione, in base ai risultati di test statistici e ad un raffronto con la letteratura della nanoindentazione classica e con lo stato dell'arte della nanoindentazione a carichi multipli.

5.1 Risultati delle prove macroscopiche

Dallo stesso tessuto da cui sono stati ottenuti i campioni per le prove di nanoindentazione, sono stati ricavati dei provini cilindrici per alcuni test di compressione monoassiale alla scala macroscopica.

Sono stati prodotti e testati 11 campioni in direzione assiale e 6 campioni in direzione trasversale. Hanno dato risultati analizzabili, giungendo a snervamento e quindi a rottura, 10 test in direzione longitudinale e 5 in direzione trasversale.

In Tabella 5.1 e 5.2 sono riportati i valori di sforzo di snervamento σ_y e di modulo di Young E per ogni provino non fallito nelle due direzioni di prova. Sono inoltre riportati i corrispondenti strain rate risultanti, ricordando che tutti i test sono stati condotti a 2 mm/min.

Direzione Longitudinale		
E [GPa]	σ_y [MPa]	$\dot{\epsilon}$ [s^{-1}]
9.71	167.13	0.004
8.78	159.89	0.004
11.53	155.27	0.002
10.79	163.41	0.002
10.27	157.23	0.002
10.23	163.01	0.002
9.64	157.29	0.003
10.26	161.30	0.003
10.49	165.72	0.004
10.45	152.38	0.003

Tabella 5.1: Risultati dei moduli di elasticità e degli sforzi di snervamento con i corrispondenti strain rate per i 10 campioni longitudinali.

Direzione Trasversale		
E [GPa]	σ_y [MPa]	$\dot{\epsilon}$ [s^{-1}]
5.19	123.20	0.003
6.51	125.62	0.003
7.43	127.69	0.003
6.48	125.38	0.003
7.22	126.49	0.003

Tabella 5.2: Risultati dei moduli di elasticità e degli sforzi di snervamento con i corrispondenti strain rate per i 5 campioni trasversali.

In Tabella 5.3 sono invece riportati i risultati medi con le relative deviazioni standard nelle due direzioni di prova, assiale e trasversale.

Direzione Longitudinale	
E [GPa]	σ_y [MPa]
10.38 ± 0.62	160.26 ± 4.72

Direzione Trasversale	
E [GPa]	σ_y [MPa]
6.69 ± 0.90	125.69 ± 1.66

Tabella 5.3: Risultati medi e deviazioni standard dei moduli di elasticità e degli sforzi di snervamento in direzione longitudinale e trasversale.

Tenendo conto della porosità media del tessuto, stimabile in maniera qualitativa e costante per tutti i campioni intorno al 5%, è possibile stimare un modulo E apparente rispettivamente di 10.72 ± 0.77 GPa per i campioni longitudinali e di 6.89 ± 0.92 GPa per i campioni trasversali.

5.2 Risultati delle prove di nanoindentazione

Di seguito sono illustrati i vari risultati ottenuti dalle prove di nanoindentazione a carichi multipli, analizzando i differenti parametri da cui essi possono dipendere. Innanzitutto sono presentati i risultati dei moduli di indentazione M e della durezza H , ottenuti sui differenti campioni, considerando le differenti direzioni di prova e il differente stato di conservazione.

Successivamente sono presentati i risultati dei diversi test, tenendo conto del tipo di lamella su cui è stata eseguita l'indentazione, in modo da osservare l'andamento del modulo di indentazione e della durezza su lamelle spesse (chiare) e sottili (scure).

Infine sono riportati i risultati ottenuti in funzione del numero di lamella, cioè i valori di M e di H in funzione della distanza dal canale di Havers.

In Figura 5.1 sono presentate le varie curve P-h ottenibili su un singolo provino tramite test di nanoindentazione a carichi multipli.

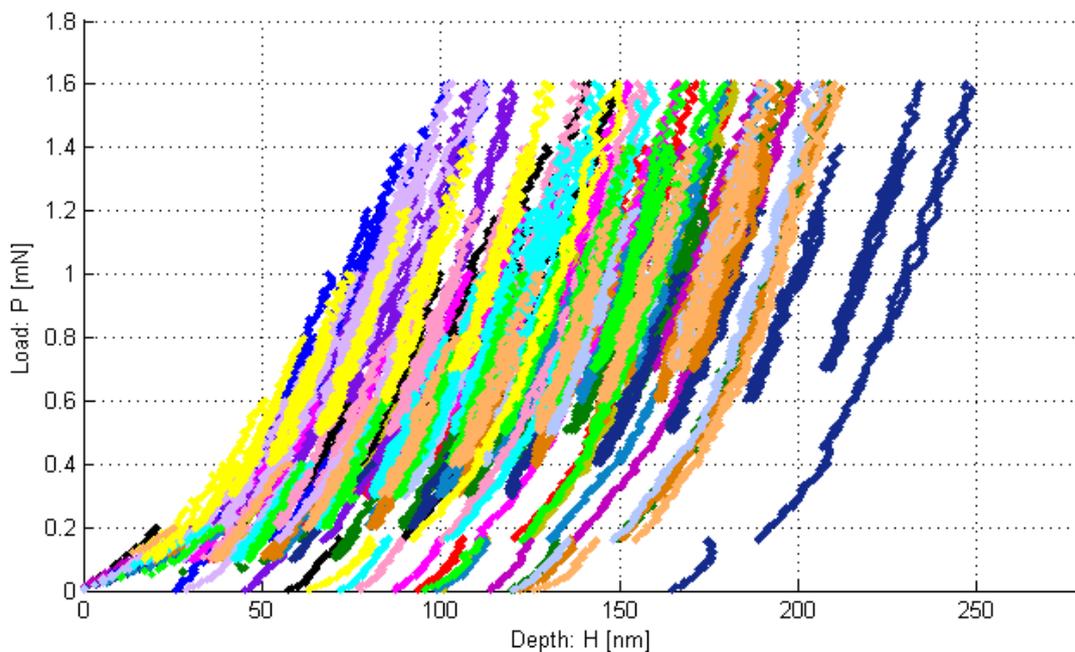


Figura 5.1: Esempio di curve P-h ottenibili su un singolo provino tramite test di nanoindentazione a carichi multipli.

5.2.1 Risultati medi in direzione longitudinale

In direzione longitudinale sono stati testati due provini con tempo di conservazione inferiore alle 48 h e due provini conservati in frigorifero in soluzione salina per 5 mesi.

Sui primi due campioni (#L1_48h e #L2_48h) sono state selezionate sulla base delle procedure di imaging e dei calcoli della rugosità, rispettivamente 10 e 14 indentazioni a carichi multipli da 8 livelli di carico massimo ciascuna. Sono ottenuti quindi, sia per il modulo di indentazione sia per la durezza, 80 e 112 valori sui due diversi campioni, il che rimarca ancora una volta le potenzialità di questa innovativa metodica di prova. I risultati sono riportati in funzione degli affondamenti massimi h_{max} per permettere un raffronto con i pochi dati presenti in letteratura. In Tabella 5.4 e 5.5 sono presentati i valori medi di M ed H rispettivamente dei provini da 10 e 14 indentazioni, raggruppati per differenti livelli di carico, senza particolari ulteriori considerazioni.

Per quanto riguarda invece i due campioni (#L1_5mesi e #L2_5mesi) conservati per 5 mesi è stato possibile selezionare 10 indentazioni sul primo e 7 indentazioni sul secondo provino, per un totale di 80 e 56 valori di parametri meccanici rispettivamente. I relativi risultati medi del modulo di indentazione e della durezza sono riportati in Tabella 5.6 e 5.7.

10x Longitudinale 48h (#L1_48h)			
P_{max} [mN]	H [GPa]	M [GPa]	\bar{h}_{max} [nm]
0.2	2.93 (0.49)	45.36 (6.24)	46.20
0.4	2.53 (0.55)	40.89 (4.81)	66.69
0.6	2.31 (0.50)	37.53 (4.33)	83.54
0.8	2.20 (0.39)	35.48 (4.60)	98.23
1.0	2.10 (0.38)	34.16 (5.03)	111.81
1.2	1.91 (0.40)	33.00 (4.83)	123.49
1.4	1.81 (0.46)	31.26 (4.91)	134.95
1.6	1.71 (0.46)	30.44 (4.95)	145.65

Tabella 5.4: Valori medi (deviazione standard) di M ed H con i rispettivi affondamenti medi per il primo provino longitudinale con tempo di conservazione di 48 h (10 siti di indentazione).

14x Longitudinale 48h (#L2_48h)			
P_{max} [mN]	H [GPa]	M [GPa]	\bar{h}_{max} [nm]
0.2	3.06 (0.87)	42.05 (7.57)	39.82
0.4	2.31 (0.81)	35.61 (6.04)	72.31
0.6	1.98 (0.65)	32.04 (3.94)	94.68
0.8	1.78 (0.54)	29.55 (4.79)	114.85
1.0	1.66 (0.44)	27.25 (4.33)	133.84
1.2	1.53 (0.39)	25.08 (3.70)	151.28
1.4	1.46 (0.42)	23.73 (3.77)	173.10
1.6	1.36 (0.41)	22.76 (3.71)	194.35

Tabella 5.5: Valori medi (deviazione standard) di M ed H con i rispettivi affondamenti medi per il secondo provino longitudinale con tempo di conservazione di 48 h (14 siti di indentazione).

10x Longitudinale 5mesi (#L1_5mesi)			
P_{max} [mN]	H [GPa]	M [GPa]	\bar{h}_{max} [nm]
0.2	1.08 (0.38)	20.95 (6.99)	69.48
0.4	0.78 (0.27)	16.23 (4.38)	126.94
0.6	0.63 (0.15)	15.07 (3.51)	182.22
0.8	0.56 (0.11)	13.83 (2.60)	232.31
1.0	0.52 (0.10)	13.66 (2.55)	275.60
1.2	0.49 (0.10)	13.45 (2.42)	315.63
1.4	0.46 (0.09)	13.34 (2.78)	352.66
1.6	0.47 (0.10)	11.55 (2.65)	386.59

Tabella 5.6: Valori medi (deviazione standard) di M ed H con i rispettivi affondamenti medi per il primo provino longitudinale con tempo di conservazione di 5 mesi (11 siti di indentazione).

7x Longitudinale 5mesi (#L2_5mesi)			
P_{max} [mN]	H [GPa]	M [GPa]	\bar{h}_{max} [nm]
0.2	1.29 (0.06)	20.18 (3.04)	78.12
0.4	0.83 (0.11)	16.19 (2.71)	126.17
0.6	0.65 (0.14)	14.13 (2.20)	182.47
0.8	0.60 (0.12)	12.64 (2.64)	230.79
1.0	0.54 (0.12)	11.44 (2.26)	277.49
1.2	0.50 (0.11)	10.90 (2.14)	319.20
1.4	0.48 (0.11)	10.39 (1.82)	356.40
1.6	0.48 (0.10)	8.89 (1.49)	394.09

Tabella 5.7: Valori medi (deviazione standard) di M ed H con i rispettivi affondamenti medi per il secondo provino longitudinale con tempo di conservazione di 5 mesi (7 siti di indentazione).

In Figura 5.2 è riportato l'andamento della durezza H in funzione dell'affondamento massimo medio corrispondente ad ogni livello di scarico per i quattro campioni testati in direzione longitudinale.

In Figura 5.3 è invece mostrato l'andamento del modulo di indentazione M in funzione della penetrazione massima media dell'indenter nei test condotti in direzione assiale.

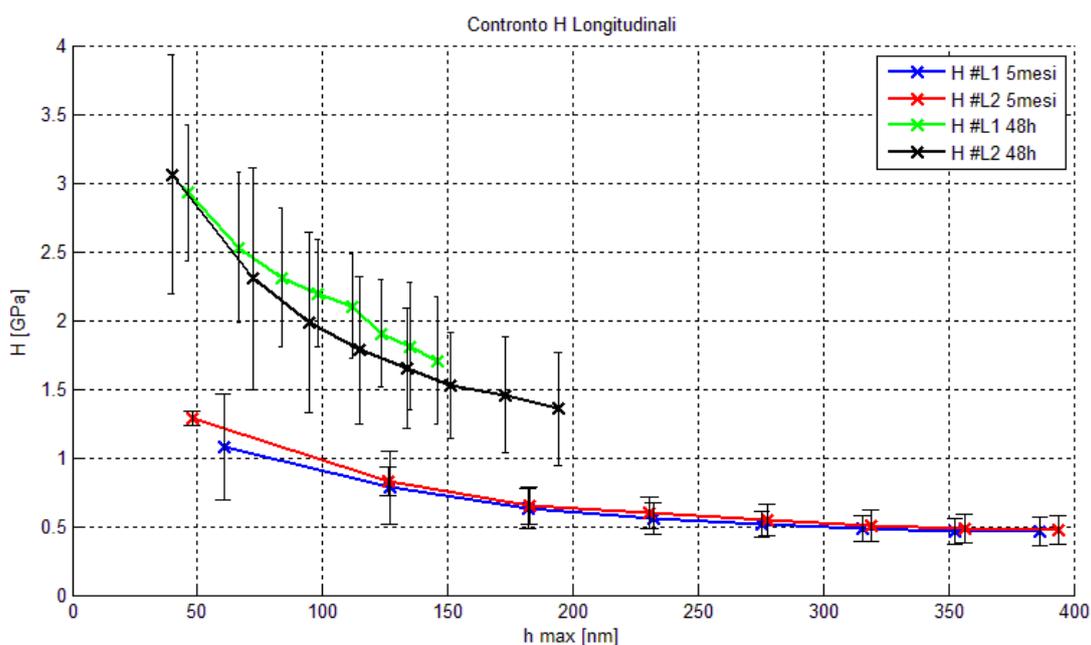


Figura 5.2: Durezza H in funzione dell'affondamento massimo h_{max} per i campioni longitudinali.

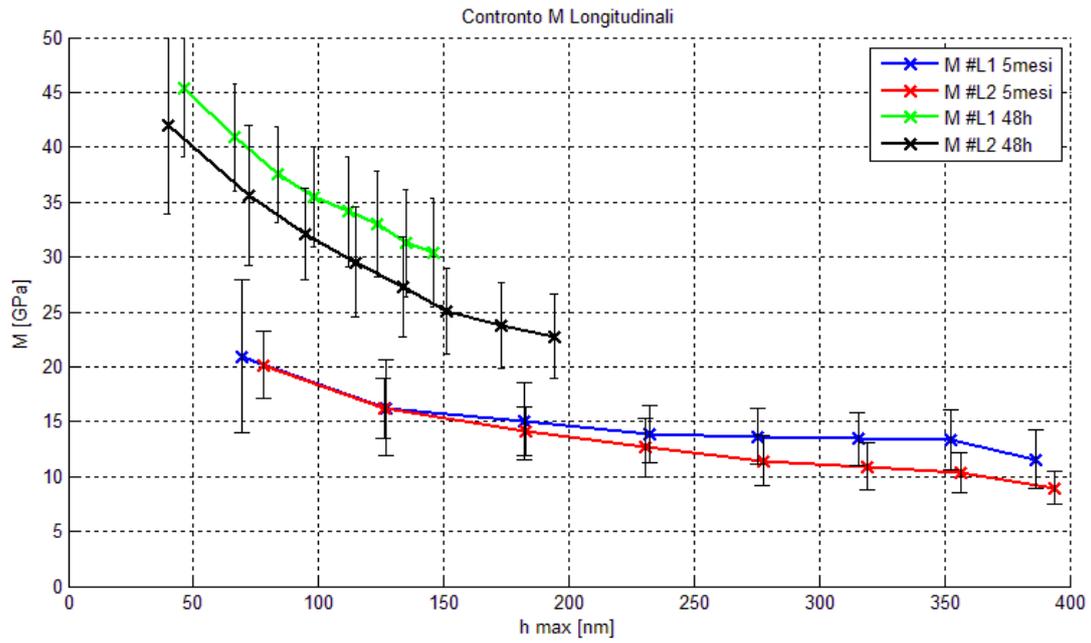


Figura 5.3: Modulo di indentazione M in funzione dell'affondamento massimo h_{max} per i campioni longitudinali.

5.2.2 Risultati medi in direzione trasversale

In direzione trasversale sono stati testati due campioni conservati meno di 48 h in soluzione salina. I siti di indentazione selezionati sono 14 per il primo provino (#T1_48h) e 19 per il secondo (#T2_48h), per un totale di 112 e 172 scarichi analizzabili rispettivamente. In Tabella 5.8 e 5.9 sono riportati i risultati medi e le relative deviazioni standard ottenuti con l'analisi di Oliver-Pharr.

14x Trasversale 48h (#T1_48h)			
P_{max} [mN]	H [GPa]	M [GPa]	\bar{h}_{max} [nm]
0.2	2.70 (1.26)	31.89 (8.07)	53.26
0.4	2.28 (1.01)	28.79 (9.46)	79.56
0.6	1.78 (0.78)	24.71 (7.17)	112.00
0.8	1.46 (0.55)	22.56 (6.13)	143.18
1.0	1.31 (0.45)	20.32 (5.47)	173.16
1.2	1.19 (0.39)	18.49 (4.64)	204.39
1.4	1.07 (0.34)	17.61 (4.64)	235.59
1.6	1.05 (0.35)	15.06 (3.78)	266.42

Tabella 5.8: Valori medi (deviazione standard) di M ed H con i rispettivi affondamenti medi per il primo provino trasversale con tempo di conservazione di 48 h (14 siti di indentazione).

19x Trasversale 48h (#T2_48h)			
P_{max} [mN]	H [GPa]	M [GPa]	\bar{h}_{max} [nm]
0.2	2.57 (0.78)	32.99 (8.54)	54.14
0.4	2.16 (0.81)	28.38 (5.28)	84.21
0.6	1.74 (0.73)	26.28 (5.47)	108.86
0.8	1.61 (0.55)	25.12 (4.82)	131.56
1.0	1.55 (0.48)	24.18 (4.53)	152.58
1.2	1.50 (0.46)	23.30 (3.97)	173.48
1.4	1.42 (0.44)	22.05 (3.78)	193.17
1.6	1.39 (0.44)	19.87 (3.38)	213.97

Tabella 5.9: Valori medi (deviazione standard) di M ed H con i rispettivi affondamenti medi per il secondo provino trasversale con tempo di conservazione di 48 h (19 siti di indentazione).

In Figura 5.4 e 5.5 sono riportati gli andamenti grafici dei valori medi di M ed H in funzione della penetrazione massima per i due campioni testati in direzione trasversale.

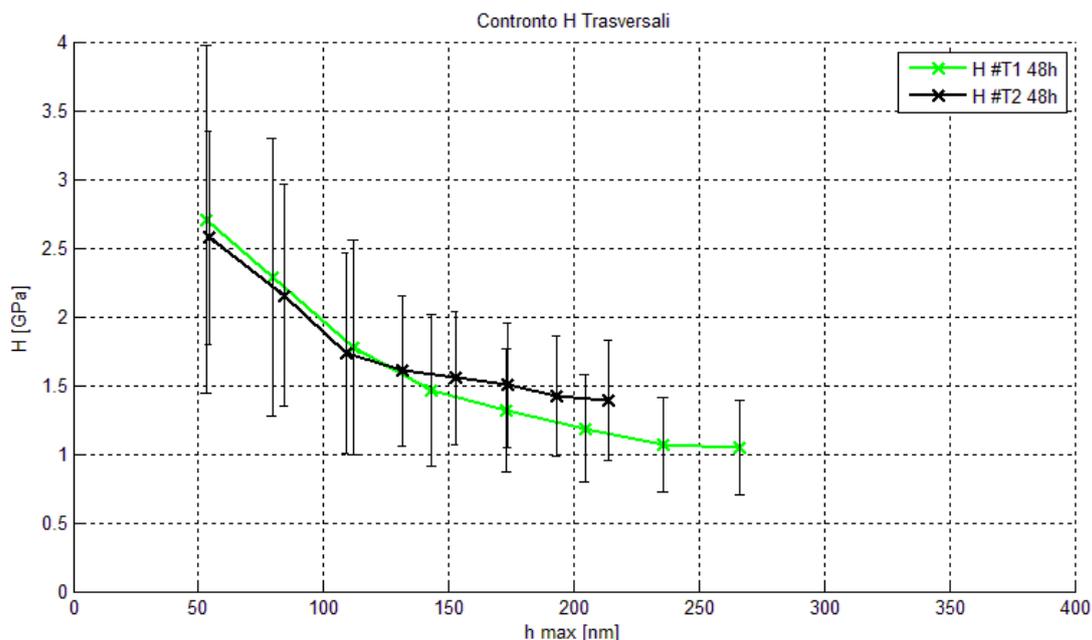


Figura 5.4: Durezza H in funzione dell'affondamento massimo h_{max} per i campioni trasversali.

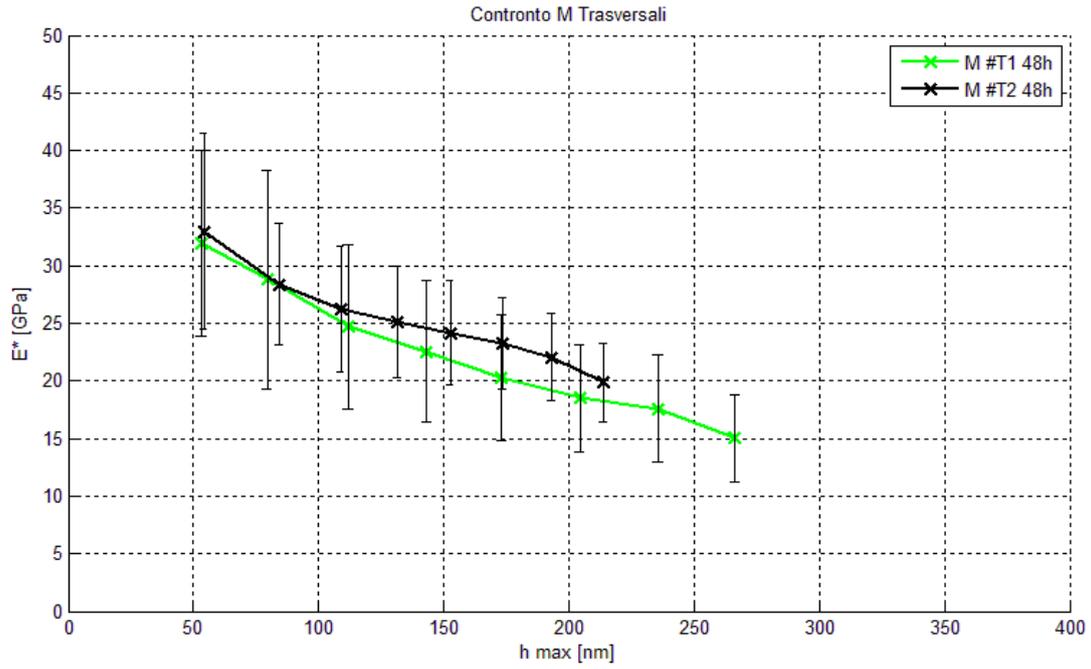


Figura 5.5: Modulo di indentazione M in funzione dell'affondamento massimo h_{max} per i campioni trasversali.

5.2.3 Risultati su lamelle chiare e scure

Per ogni campione, le varie indentazioni sono state successivamente suddivise in base al tipo di lamella su cui è stata condotta la prova. Infatti grazie alle immagini ottiche pre e post-indentazione, unite alla ricostruzione 3D che permette di visualizzare la posizione di ogni indentazione, è possibile osservare se la prova è stata condotta su una lamella chiara (spessa) o scura (sottile).

Per quanto riguarda i campioni longitudinali, sul provino #L1_48h (10 indentazioni totali) sono state indentate solo lamelle chiare, i risultati pertanto corrispondono a quelli già illustrati e non è possibile fare un raffronto con le lamelle scure. Il provino #L2_48h (14 indentazioni) invece presenta due indentazioni su lamelle scure e dodici su lamelle chiare: un'analisi di questo tipo su questo campione risulterebbe quindi poco significativa. Per questo studio sono stati scartati perché poco significativi il campione #L1_5mesi (10 indentazioni), che presenta due indentazioni su lamelle scure e otto su lamelle chiare, e il campione #L2_5mesi (7 indentazioni), che presenta anch'esso solo una indentazione su lamelle scure.

Tra i campioni trasversali il #T1_48h (14 indentazioni totali) presenta cinque prove condotte su lamelle scure e nove su lamelle chiare, mentre il #T2_48h (19 indentazioni) ne presenta solo due su lamelle scure, pertanto il primo è risultato utile per questo tipo di analisi, mentre il secondo è stato scartato.

In Tabella 5.10 sono quindi riportati i risultati di H ed M sulla lamelle chiare e scure per il campione #T2_48h.

#T1_48h						
	Lamelle scure			Lamelle chiare		
P_{max} [mN]	H [GPa]	M [GPa]	\bar{h}_{max} [nm]	H [GPa]	M [GPa]	\bar{h}_{max} [nm]
0.2	2.19 (1.64)	31.45 (8.59)	46.83	2.99 (1.00)	32.14 (8.29)	56.83
0.4	2.57 (1.23)	30.52 (11.30)	71.36	2.12 (0.91)	27.83 (8.86)	84.12
0.6	1.97 (0.79)	24.63 (8.94)	104.62	1.67 (0.80)	24.76 (6.60)	116.10
0.8	1.49 (0.51)	21.60 (7.23)	140.26	1.45 (0.60)	23.08 (5.83)	144.80
1.0	1.28 (0.42)	19.23 (5.79)	174.19	1.33 (0.48)	20.93 (5.55)	172.59
1.2	1.14 (0.38)	16.64 (4.44)	209.67	1.21 (0.42)	19.52 (4.66)	201.45
1.4	1.00 (0.32)	16.05 (4.81)	244.46	1.11 (0.37)	18.48 (4.58)	230.66
1.6	0.98 (0.32)	13.37 (3.54)	276.19	1.08 (0.37)	16.00 (3.77)	260.99

Tabella 5.10: Valori medi (deviazioni standard) di M ed H sulle 5 lamelle scure e sulle 9 lamelle chiare nel campione #T1_48h.

In Figura 5.6 è riportato l'andamento grafico dei moduli ridotti nelle lamelle chiare e scure sul campione trasversale in esame.

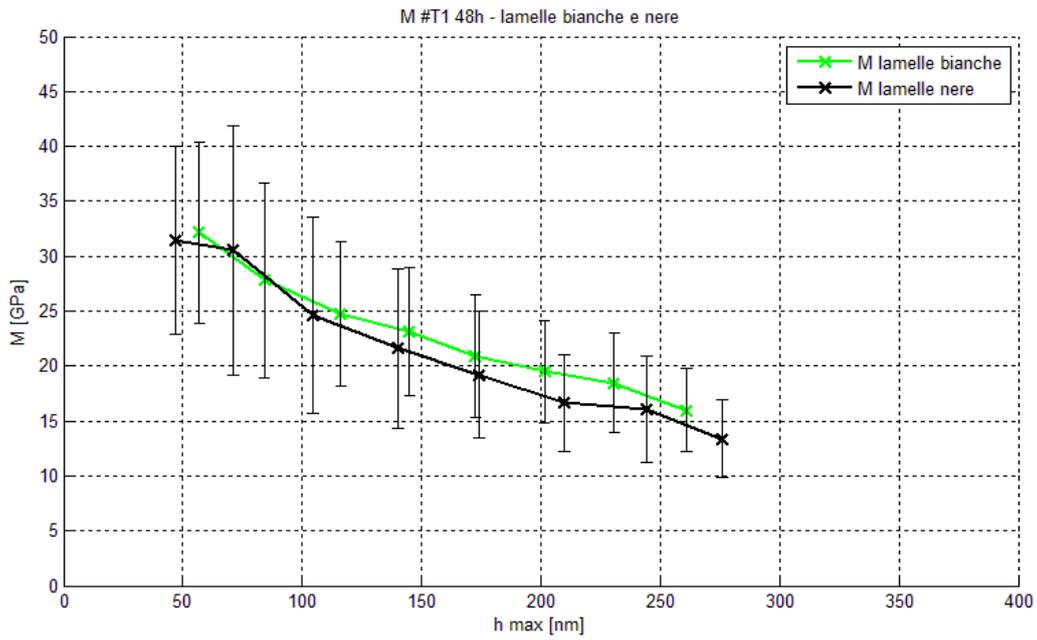


Figura 5.6: Andamento di M su lamelle chiare (curva verde) e scure (curva nera) nel campione #T1_48h.

5.2.4 Risultati in funzione della distanza dal centro dell'osteone

Procedendo come nel caso appena illustrato, grazie alle procedure di imaging è stato possibile identificare il numero di lamella su cui è stata condotta l'indentazione, numerando le lamelle in modo crescente a partire da quella più vicina al centro dell'osteone. Questo equivale ad analizzare gli andamenti del modulo di indentazione e della durezza in funzione della loro distanza dal canale di Havers.

Solo in tre campioni è stato possibile ottenere due lamelle con quattro o più indentazioni, di conseguenza solo questi provini sono stati utilizzati per eseguire delle analisi statistiche che verificassero l'esistenza o meno di differenze significative al variare del numero di lamella.

In Tabella 5.11, 5.12 e 5.13 sono riportati i valori medi e deviazioni standard di H in funzione della lamella di appartenenza. Valori medi e deviazioni standard del modulo di indentazione M sono invece riportate in Tabella 5.14, 5.15 e 5.16. Si chiarisce immediatamente che a causa dello scarso numero di risultati utili, le considerazioni finali sulla dipendenza delle proprietà meccaniche dalla distanza dal centro dell'osteone sono orientate maggiormente verso considerazioni qualitative, nonostante siano comunque stati eseguiti test statistici t di Student tra lamelle con un numero sufficiente di indentazioni appartenenti ad uno stesso provino.

In Figura 5.7 è mostrato a titolo esemplificativo l'andamento del modulo di indentazione M per lamelle differenti in funzione dell'affondamento massimo h_{max} nel campione #T2_48h. In Figura 5.8 è invece presentato per lo stesso campione l'andamento di M in funzione del numero di lamella per diversi carichi massimi P_{max} fissati. Il trend delle curve appena presentate, apparentemente senza variazioni sostanziali di M all'aumentare della distanza dal canale di Havers, è il medesimo anche nei restanti campioni e per la durezza H .

#L2_48h H [GPa]				
P_{max} [mN]	lamella#1	lamella#2	lamella#3	lamella#4
0.2	3.22 (0.46)	3.27 (1.28)	3.58	2.05
0.4	2.41 (0.29)	2.47 (1.15)	2.75	1.51
0.6	1.86 (0.16)	2.22 (1.11)	2.35	1.45
0.8	1.58 (0.24)	1.94 (0.72)	2.24	1.39
1.0	1.42 (0.26)	1.94 (0.67)	1.81	1.44
1.2	1.21 (0.24)	1.79 (0.55)	1.67	1.45
1.4	1.10 (0.32)	1.71 (0.54)	1.60	1.44
1.6	1.01 (0.35)	1.57 (0.49)	1.41	1.47

Tabella 5.11: Valori medi di H (deviazioni standard se sono presenti almeno 4 indentazioni) in funzione del numero di lamella per il campione #L2_48h.

#T1_48h H [GPa]				
P_{max} [mN]	lamella#1	lamella#2	lamella#3	lamella#4
0.2	2.19	4.38 (1.64)	1.98	3.32 (0.31)
0.4	2.57	3.65 (1.23)	1.08	2.44 (0.23)
0.6	1.97	2.01 (0.79)	0.64	2.22 (0.23)
0.8	1.49	1.62 (0.51)	0.67	1.88 (0.16)
1.0	1.28	1.50 (0.42)	0.70	1.68 (0.05)
1.2	1.14	1.25 (0.38)	0.68	1.52 (0.04)
1.4	1.00	1.11 (0.32)	0.65	1.39 (0.05)
1.6	0.98	1.03 (0.32)	0.62	1.37 (0.07)

Tabella 5.12: Valori medi di H (deviazioni standard se sono presenti almeno 4 indentazioni) in funzione del numero di lamella per il campione #T1_48h.

#T2_48h H [GPa]						
P_{max} [mN]	lamella#1	lamella#2	lamella#3	lamella#4	lamella#5	lamella#6
0.2	2.08 (0.78)	3.29	3.12	2.41	2.60 (0.56)	1.99
0.4	1.46 (0.83)	2.88	2.39	2.26	2.28 (0.84)	1.66
0.6	1.12 (0.91)	1.82	1.84	1.96	2.72 (0.56)	1.50
0.8	1.20 (0.74)	1.65	1.91	1.68	2.09 (0.38)	1.46
1.0	1.19 (0.61)	1.69	1.83	1.59	2.01 (0.40)	1.33
1.2	1.17 (0.55)	1.63	1.95	1.48	1.80 (0.34)	1.29
1.4	1.12 (0.50)	1.60	1.98	1.25	1.55 (0.33)	1.23
1.6	1.15 (0.53)	1.65	1.74	1.04	1.37 (0.36)	1.27

Tabella 5.13: Valori medi di H (deviazioni standard se sono presenti almeno 4 indentazioni) in funzione del numero di lamella per il campione #T2_48h.

#L2_48h M [GPa]				
P_{max} [mN]	lamella#1	lamella#2	lamella#3	lamella#4
0.2	40.36 (8.42)	47.59 (8.46)	41.83	37.15
0.4	35.99 (8.11)	39.47 (5.22)	32.61	32.98
0.6	31.45 (2.42)	35.46 (4.73)	29.77	30.56
0.8	29.42 (3.31)	34.17 (5.11)	25.57	27.57
1.0	27.33 (4.01)	30.50 (5.30)	22.96	27.08
1.2	25.06 (2.43)	28.18 (3.78)	20.67	25.36
1.4	23.54 (3.13)	27.25 (3.55)	19.65	23.37
1.6	22.26 (3.94)	25.93 (2.92)	18.85	23.11

Tabella 5.14: Valori medi di M (deviazioni standard se sono presenti almeno 4 indentazioni) in funzione del numero di lamella per il campione #L2_48h.

#T1_48h M [GPa]				
P_{max} [mN]	lamella#1	lamella#2	lamella#3	lamella#4
0.2	31.45	31.30 (8.59)	24.35	36.99 (3.17)
0.4	30.52	26.93 (11.30)	17.87	33.98 (2.99)
0.6	24.63	23.81 (8.94)	17.09	29.54 (1.79)
0.8	21.60	22.39 (7.23)	16.05	27.44 (1.52)
1.0	19.23	18.10 (5.75)	14.63	25.27 (1.32)
1.2	16.64	17.38 (4.44)	14.55	22.93 (2.01)
1.4	16.05	15.26 (4.81)	13.60	22.05 (1.49)
1.6	13.37	12.95 (3.54)	12.18	18.90 (1.08)

Tabella 5.15: Valori medi di M (deviazioni standard se sono presenti almeno 4 indentazioni) in funzione del numero di lamella per il campione #T1_48h.

#T2_48h M [GPa]						
P_{max} [mN]	lamella#1	lamella#2	lamella#3	lamella#4	lamella#5	lamella#6
0.2	25.82 (13.17)	31.74	33.61	34.19	31.11 (7.30)	38.59
0.4	23.84 (6.02)	29.09	30.83	31.34	27.85 (6.62)	28.46
0.6	19.31 (6.62)	29.15	29.15	28.50	26.98 (4.21)	25.28
0.8	21.09 (5.96)	27.68	28.23	25.02	25.39 (3.86)	23.67
1.0	21.13 (6.25)	26.20	26.80	22.09	23.09 (3.72)	24.20
1.2	20.65 (4.27)	25.37	26.01	22.33	23.72 (3.40)	21.94
1.4	19.93 (3.89)	24.46	24.63	19.80	22.51 (3.41)	20.61
1.6	18.04 (3.85)	21.36	22.26	17.62	20.69 (3.39)	19.09

Tabella 5.16: Valori medi di M (deviazioni standard se sono presenti almeno 4 indentazioni) in funzione del numero di lamella per il campione #T2_48h.

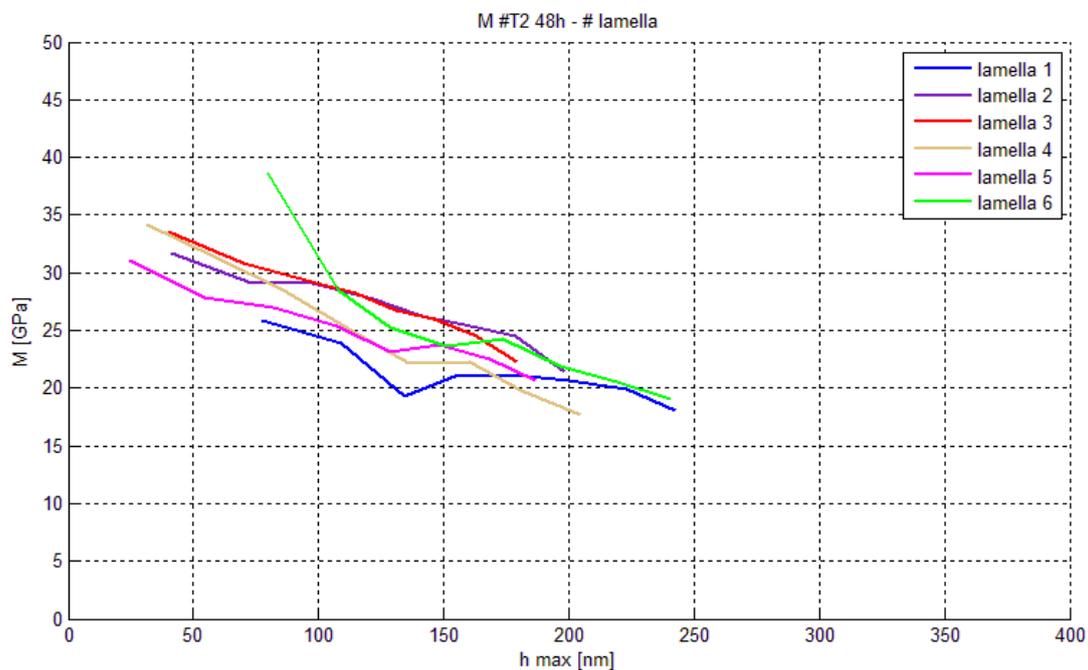


Figura 5.7: Andamento del modulo di indentazione M per lamelle differenti in funzione dell'affondamento massimo h_{max} nel campione #T2_48h.

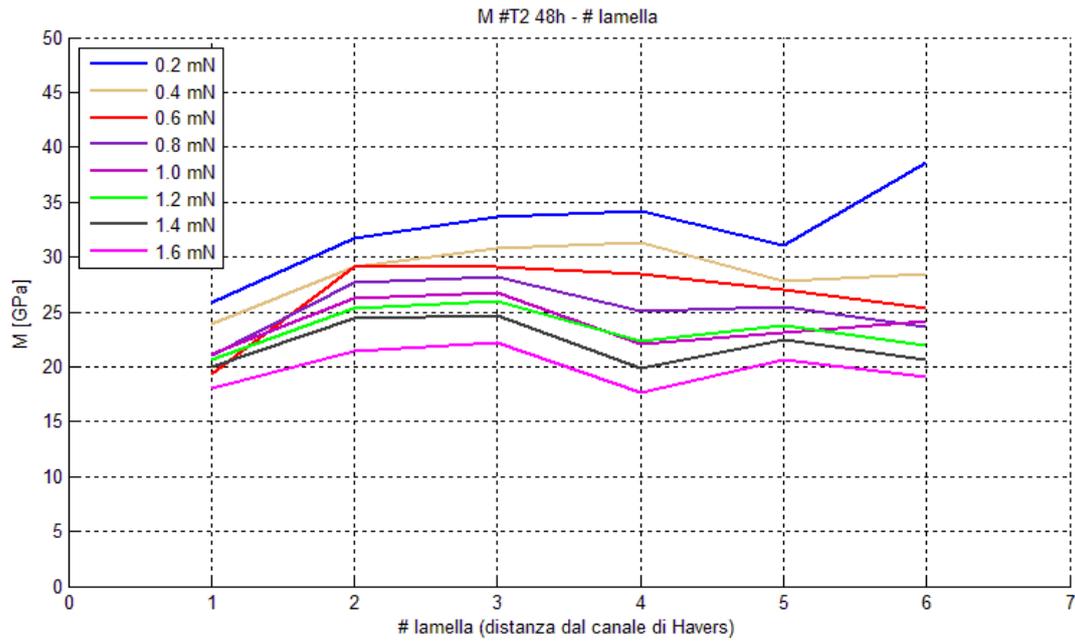


Figura 5.8: Andamento di M in funzione del numero di lamella per diversi carichi massimi P_{max} fissati in funzione dell'affondamento massimo h_{max} nel campione #T2_48h.

5.2.5 Risultati relativi alla rugosità

Sono ora presentati i valori di rugosità R , ottenuti tramite le formule riportate nel paragrafo 4.5.2, grazie alle procedure di imaging pre-test attuate sui sei campioni esaminati.

In Tabella 5.17 sono riportati i valori ottenuti sull'intera superficie scansionata, un quadrato di 40-50 μm per lato, mentre in Tabella 5.18 sono riportati valori di rugosità locale, ottenuti nell'intorno dei siti di indentazione considerando delle aree di interesse con raggio di circa 1-2 μm , valori sufficienti in relazione agli affondamenti in gioco.

In entrambe le tabelle sono riportate le medie e le deviazioni standard dei sei provini esaminati per i vari valori di rugosità aritmetica R_a e di rugosità quadratica media R_q , calcolate lungo le coordinate x ed y e sull'area x - y grazie all'implementazione Matlab. Chiaramente, le rugosità d'area calcolate sull'intera superficie di interesse presentano per ogni campione un unico valore e di conseguenza la deviazione standard è nulla.

Le misure di rugosità nell'intorno hanno presentato valori decisamente accettabili per test di nanoindentazione, soprattutto considerando che, per non alterare le misure, sono consigliati valori di rugosità al massimo pari ad $1/3$ della profondità di penetrazione h_{max} (Donnelly et al., 2006).

Come è possibile notare per l'intera superficie sono stati ottenuti valori di qualche centinaio di nm, mentre i valori calcolati in un intorno raggiungono poche decine di nm. Questo sottolinea che l'imprecisione nelle misure dei moduli di indentazione M e delle durezza H è limitata ai primi affondamenti in cui h_{max} è minore di 60-90 nm, cioè penetrazioni molto più piccole di quelle normalmente utilizzate in letteratura.

R totale [nm]							
Provino		R_{a x}	R_{a y}	R_{a xy}	R_{q x}	R_{q y}	R_{q xy}
#L1_48h	Media	237.56	828.13	653.97	285.55	957.11	857.73
	Dev.st	70.46	248.31	-	75.07	261.92	-
#L248h	Media	181.18	174.30	209.74	256.85	214.91	298.01
	Dev.st	82.83	74.24	-	125.57	99.98	-
#T1_48h	Media	323.67	78.19	352.00	421.92	94.49	590.21
	Dev.st	154.90	24.82	-	222.28	29.94	-
#T2_48h	Media	360.91	284.77	450.13	454.04	339.69	557.59
	Dev.st	25.02	36.26	-	19.17	40.37	-
#L1_5mesi	Media	272.11	334.40	406.99	345.90	390.19	501.54
	Dev.st	59.34	103.60	-	91.26	128.15	-
#L2_5mesi	Media	792.74	483.41	955.05	884.11	563.11	1189.54
	Dev.st	482.50	398.57	-	525.75	429.99	-

Tabella 5.17: Valori medi e deviazioni standard ottenuti sull'intera superficie scansionata.

R intorno [nm]							
Provino		R_{a x}	R_{a y}	R_{a xy}	R_{q x}	R_{q y}	R_{q xy}
#L1_48h	Media	16.06	30.02	34.27	19.35	34.26	40.55
	Dev.st	5.90	29.41	24.14	6.39	32.65	27.63
#L248h	Media	32.56	23.62	38.36	38.99	27.57	46.79
	Dev.st	18.41	16.77	16.39	21.46	18.89	19.16
#T1_48h	Media	20.44	14.80	24.52	24.42	17.22	29.72
	Dev.st	11.26	10.21	10.59	12.75	10.85	12.42
#T2_48h	Media	8.60	4.75	10.09	9.65	5.60	11.89
	Dev.st	4.12	3.26	3.90	5.00	3.92	4.59
#L1_5mesi	Media	72.35	40.78	82.63	84.11	47.36	97.94
	Dev.st	38.62	24.04	34.05	43.03	28.41	38.32
#L2_5mesi	Media	76.77	62.49	106.68	87.52	72.42	126.69
	Dev.st	56.20	44.49	45.38	64.53	49.95	53.39

Tabella 5.18: Valori medi e deviazioni standard rugosità locale, ottenuti nell'intorno dei siti di indentazione.

5.3 Analisi dei risultati delle prove macroscopiche

Dalle prove di compressione monoassiale sono stati ottenuti valori (riportati in Tabella 5.3) di 10.38 ± 0.62 GPa per il modulo elastico E_L in direzione longitudinale e di 6.69 ± 0.90 GPa per il modulo elastico E_T in direzione trasversale.

Sebbene tali valori siano più bassi della maggior parte dei dati reperibili in letteratura, è possibile fare alcune considerazioni.

Innanzitutto si deve tenere conto del fatto che le prove sono condotte su provini mantenuti in soluzione salina fino a pochi minuti prima del test di compressione e quindi i campioni sono da considerare idratati. Questo fatto, come è noto (Cowin, 2001; Rho and Pharr, 1999), contribuisce a restituire valori di modulo di Young e di sforzo di snervamento più bassi rispetto a campioni secchi o deidratati.

In secondo luogo velocità dell'attuatore imposta, a causa delle dimensioni ridotte dei provini e del set-up sperimentale a disposizione, è stata impostata a 2 mm/min. Questo valore corrisponde a una velocità di deformazione di circa 0.003 s^{-1} , a fronte di range analizzati in letteratura compresi tra 0.001 s^{-1} e 1500 s^{-1} . Le prove effettuate quindi si pongono in corrispondenza dei più bassi strain rate analizzati generalmente. È nota l'influenza di questo fattore sui parametri meccanici rilevati: all'aumentare della velocità di deformazione infatti corrispondono valori progressivamente maggiori dello sforzo di snervamento σ_y e del modulo di Young E .

McHelaney (1966) riporta un trend del modulo elastico crescente all'aumentare dello strain rate. Eseguendo test di compressione su osso umano e bovino a strain rate variabili tra 0.001 e 1500 s^{-1} , ha ottenuto un incremento del modulo elastico da circa 14 a 23 GPa imponendo degli strain rate compresi tra 0.001 e 1 s^{-1} . Manilay et al. (2012) riportano valori di 20.5 ± 2.3 GPa per il modulo elastico in direzione longitudinale e di 13.0 ± 2.3 GPa per il modulo elastico in direzione trasversale per compressione su tessuto corticale femorale bovino. Yu et al. (2011) hanno invece ottenuto valori in direzione longitudinale compresi tra 13 e 17.5 GPa, ma a fronte di strain rate compresi tra 0.26 e 260 s^{-1} , cioè su un range di velocità di deformazioni maggiori di quelle utilizzate nei test sperimentali di questo lavoro.

In ogni caso, altri autori hanno ottenuto risultati simili o comparabili a quelli prodotti da questo lavoro di tesi. Ad esempio Simkin e Robin (1974) presentano un valore di modulo elastico in direzione longitudinale per test di compressione a bassi strain rate su tibia bovina di 7.10 ± 1.05 , mentre Ferreira et al. (2006) riportano valori in direzione assiale di 9.9 ± 2.7 GPa e in direzione trasversale di 6.8 ± 2.1 , valori vicini a quelli da noi ottenuti. Adharapurapu et al. (2006) riportano invece, per il femore bovino, un modulo elastico longitudinale di circa 8 GPa con uno strain rate dell'ordine di 10^{-3} s^{-1} .

Per quanto riguarda invece i valori di sforzo di snervamento, essi si avvicinano molto di più alla maggior parte dei dati riportati in letteratura, anche se in alcuni casi risultano leggermente più bassi, fatto però spiegabile grazie allo strain rate utilizzato. Sono stati ottenuti valori di sforzo di snervamento in direzione longitudinale σ_{YL} pari a 160.26 ± 4.72 MPa, mentre in direzione trasversale è risultato uno sforzo di snervamento σ_{YT} di 125.69 ± 1.66 MPa.

Ad esempio, Reilly et al. (1974), tramite test di compressione a rottura su tessuto corticale femorale bovino, rilevano valori compresi tra 129 e 182 MPa, mentre per il tessuto corticale tibiale presentano valori di 152 ± 17 MPa. Cowin e Doty (2007) riportano invece valori di snervamento assiali di 196 ± 18.5 MPa e trasversali di 150 ± 30.7 MPa. Adharapurapu et al. (2006) hanno ottenuto valori di sforzo di snervamento mediante compressione in direzione longitudinale pari a circa 150 MPa. Infine Manilay et al. (2012) riportano una resistenza a compressione di 184 ± 14.7 Mpa in direzione longitudinale e di 156.5 ± 5.3 MPa in direzione trasversale.

Infine è possibile trarre alcune ulteriori considerazioni per validare i risultati ottenuti. Una caratteristica che non dovrebbe risentire delle variazioni delle condizioni o dei parametri di prova è il grado di anisotropia del tessuto, che può essere rappresentato dal rapporto dei moduli in direzione longitudinale e trasversale, cioè dal rapporto E_L/E_T . I valori ottenuti nelle prove sperimentali restituiscono un rapporto di anisotropia tra i valori medi dei moduli pari ad 1.55. Il risultato è in linea con quanto riportato da Manilay et al. (2012) che per campioni non trattati di osso corticale bovino maturo riportano un rapporto di anisotropia di 1.58 ± 0.21 . Calcolando i rapporti tra i valori medi nelle due direzioni riportati da altri autori si ottengono valori di 1.74 da Martin e Burr (1998) e di 1.46 da Ferreira et al. (2006), mentre i risultati di Novistkaya et al. (2011) permettono di calcolare sia un rapporto tra il modulo elastico in direzione longitudinale e quello in direzione trasversale, pari a 1.40, sia un rapporto tra modulo in direzione longitudinale e modulo in direzione radiale di 1.82. In tal senso i risultati ottenuti sono quindi coerenti ed in linea con quanto presente in letteratura.

5.4 Analisi dei risultati delle prove di nanoindentazione

Di seguito sono discussi i risultati ottenuti mediante le prove di nanoindentazione a carichi multipli, seguendo gli stessi aspetti principali secondo cui sono stati presentati i valori ottenuti.

In primo luogo sono stati analizzati i risultati generali nelle due direzioni di prova, osservando la dipendenza dalla profondità di penetrazione, dalla direzione di prova e dal tempo di conservazione. Successivamente è stata studiata invece l'influenza sia del tipo sia del numero di lamella su cui è stata condotta la prova.

5.4.1 Dipendenza dalla profondità di penetrazione

Il primo aspetto che emerge osservando tutte le raccolte dati presentate nella sezione 5.2 riguarda l'andamento decrescente del modulo di indentazione M e della durezza H all'aumentare del carico massimo P_{max} imposto e della corrispondente penetrazione massima h_{max} ottenuta. Questo trend è riscontrabile sia nei test in direzione longitudinale, su campioni freschi e conservati per 5 mesi, sia nelle prove condotte in direzione trasversale. Tale comportamento risulta anche per i valori raccolti su lamelle chiare o scure e su lamelle a differenti distanze dal canale di Havers. In definitiva, è un aspetto che emerge in tutti i test condotti.

Ad esempio per i campioni testati entro 48 h M decresce da valori compresi tra 42 e 45 GPa a circa 50 nm di affondamento fino a valori compresi tra circa 30 e 25 GPa per penetrazioni di circa 150 nm in direzione assiale. In direzione trasversale i valori decrescono da 31 e 32 GPa a circa 50 nm fino a valori di circa 18 e 19 GPa intorno ai 200 nm.

Tale andamento è riscontrato peraltro da tutti gli autori (Isakkson et al., 2010; Lucchini et al., 2011) che hanno esaminato la dipendenza del modulo di indentazione e della durezza dal carico massimo o dalla profondità massima di penetrazione, sia che si trattasse semplicemente di normali test di nanoindentazione singola ripetuti a diversi P_{max} o h_{max} , sia di nanoindentazioni a carichi multipli.

Il lavoro svolto da Lucchini et al. (2011) è stato assunto come principale fonte di riferimento per molti aspetti delle prove condotte, sia per il medesimo tipo di tessuto osseo esaminato, sia per le stesse condizioni di conservazione applicate ai campioni. Gli autori hanno riportato tassi di decadimento del modulo di indentazione M del 29% e del 21% rispettivamente in direzione longitudinale e trasversale, per indentazioni condotte ad affondamenti massimi tra 50 nm e 450 nm (Figura 5.9).

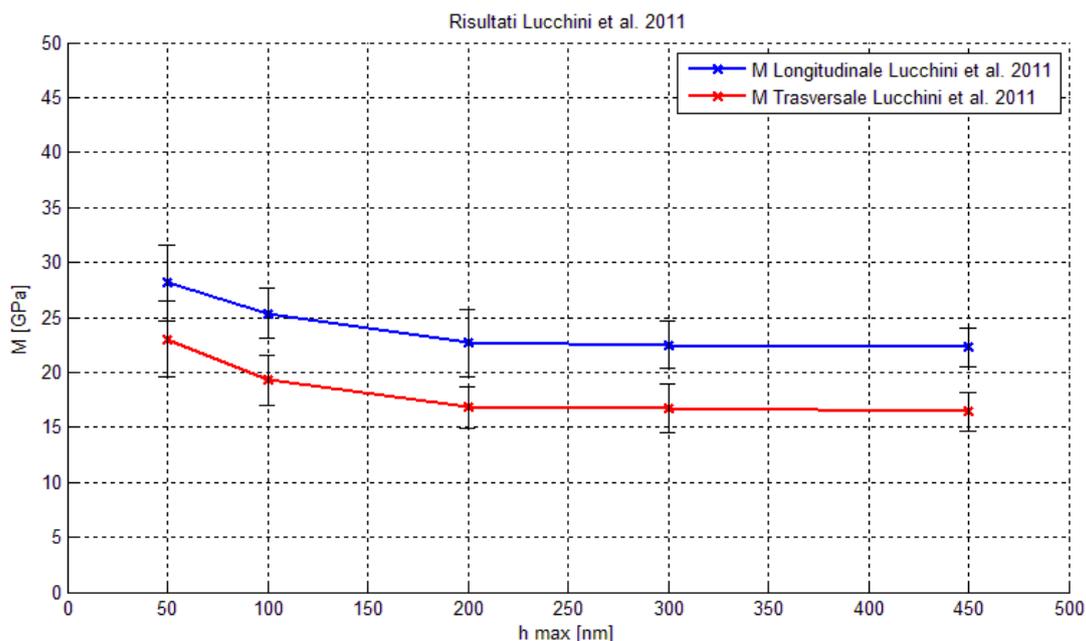


Figura 5.9: Valori del modulo di indentazione M in direzione longitudinale e trasversale (Lucchini et al., 2011).

Tale grafico prova che a penetrazioni maggiori corrispondono valori minori di M , fino a che non si raggiungono valori di h per cui l'effetto si attenua e i moduli tendono a rimanere costanti pur aumentando l'affondamento.

In questo lavoro di tesi per i campioni testati entro 48 h sono stati rilevati decadimenti tra il primo e l'ottavo scarico del 32.9 % (h_{max} tra 46 e 146 nm circa) e del 45.9 % (tra 40 e 194 nm circa) in direzione longitudinale, mentre per i provini trasversali i decadimenti ottenuti sono del 52.8 % (tra 53 e 266 nm circa) e del 39.8 % tra (54 e 214 nm circa). Considerando invece solo gli intervalli di penetrazione in comune, per i campioni longitudinali si rilevano dei decadimenti del 32.9% e del 40.4%, mentre in direzione trasversale si hanno decadimenti del 40.0% e del 39.8%.

Infine, oltre al tasso di decadimento, si è voluto verificare tramite test statistici t-test il decremento effettivo tra la seconda e l'ottava indentazione del ciclo a carichi multipli, sia per i moduli, sia per le durezze. La prima indentazione non è stata considerata per questo studio perché si ritiene che le misure ottenute non siano totalmente affidabili, dati i bassi carichi e le conseguenti penetrazioni poco profonde, nell'ordine anche dei 20-30 nm, circa un decimo dei più bassi affondamenti utilizzati generalmente in letteratura. Infatti, in questi range di affondamenti, sia la rugosità, sia l'accuratezza della DAF possono dare effetti importanti sulle misure dei parametri della nanoindentazione. Si ricordano i lavori di Donnelly et al. (2006) e di Ebenstein and Pruitt (2006), in cui è stato valutato l'effetto della rugosità.

Oltre al confronto tra il secondo e l'ottavo livello di carico, sono stati eseguiti anche confronti tra il secondo e il terzo livello allo scopo di verificare una differenza significativa nel decadimento delle proprietà meccaniche. Infine, qualora non vi fossero già al terzo affondamento differenze significative rispetto al secondo livello, è stata eseguita una ricerca del primo livello di carico massimo per cui tale differenza viene raggiunta. Il risultato fondamentale di queste osservazioni è che i t-test (per $p < 0.05$) sulle medie hanno rilevato in tutti i 6 campioni differenze significative tra i risultati di M ed H al secondo e all'ultimo livello di carico, mentre solo in un provino e solo per la durezza è stata trovata una differenza significativa tra il secondo e il terzo affondamento. In generale, il primo livello di scarico a cui si notano differenze significative rispetto al secondo affondamento è compreso tra la quarta e la quinta penetrazione. Il concetto è esplicito in Figura 5.10 dove è evidenziato graficamente tale confronto per il modulo di indentazione del campione #L2_48h. I simboli ** e // indicano rispettivamente la presenza o meno di differenze significative.

I risultati dettagliati sono riportati in Tabella 5.19, dove sono presentati i confronti tra seconda e terza (2-3) e tra seconda e ottava (2-8) indentazione, seguiti dal confronto tra il secondo affondamento e il primo che presenta rispetto ad esso significative differenze.

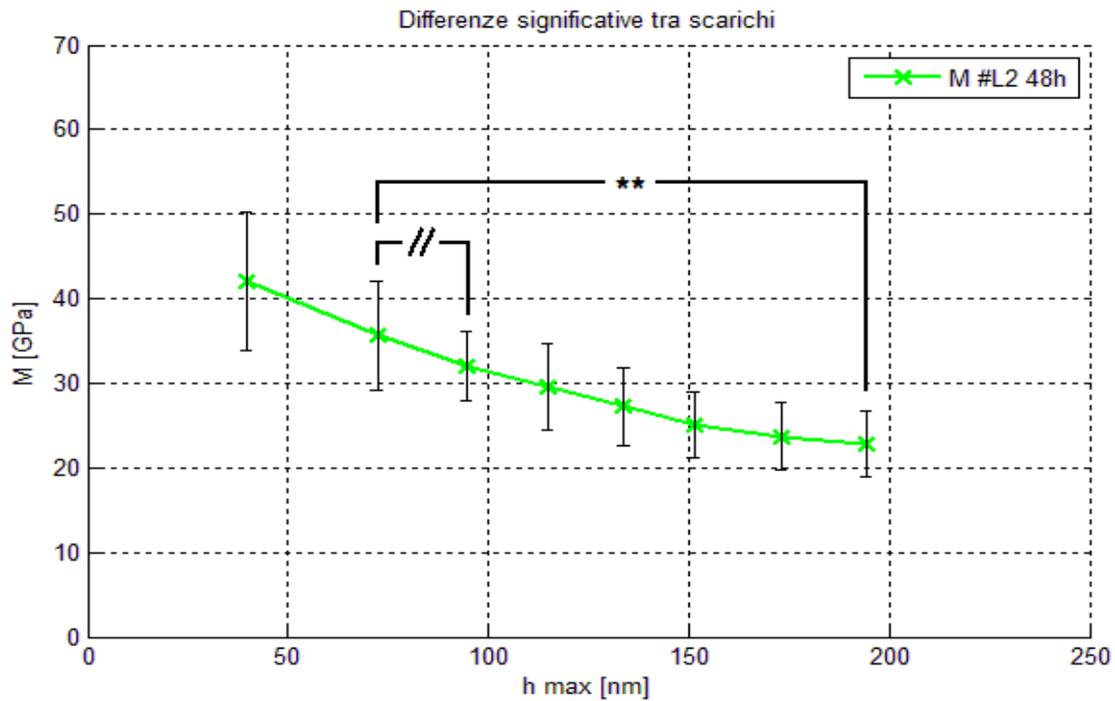


Figura 5.10: Andamento del modulo di indentazione M in funzione di h_{max} . I simboli ** e // indicano rispettivamente la presenza o meno di differenze significative.

#L1_48h				#L2_48h			
H - Scarichi confrontati	p-value	M - Scarichi confrontati	p-value	H - Scarichi confrontati	p-value	M - Scarichi confrontati	p-value
2-3	No	2-3	No	2-3	No	2-3	No
2-6	Sì 0.0091	2-4	Sì 0.0191	2-5	Sì 0.0135	2-4	Sì 0.0101
2-8	Sì 0.0019	2-8	Sì 0.0001	2-8	Sì 0.0006	2-8	Sì 0.0000

#T1_48h				#T2_48h			
H - Scarichi confrontati	p-value	M - Scarichi confrontati	p-value	H - Scarichi confrontati	p-value	M - Scarichi confrontati	p-value
2-3	No	2-3	No	2-3	No	2-3	No
2-4	Sì 0.0131	2-4	Sì 0.0499	2-4	Sì 0.0191	2-5	Sì 0.0126
2-8	Sì 0.0002	2-8	Sì 0.0000	2-8	Sì 0.0009	2-8	Sì 0.0000

#L1_5mesi				#L1_5mesi			
<i>H</i> - Scarichi confrontati	p- value	<i>M</i> - Scarichi confrontati	p- value	<i>H</i> - Scarichi confrontati	p- value	<i>M</i> - Scarichi confrontati	p- value
2-3	No -	2-3	No -	2-3	Sì 0.0208	2-3	No -
2-4	Sì 0.0250	-	-	-	-	2-4	Sì 0.0288
2-8	Sì 0.0023	2-8	Sì 0.0096	2-8	Sì 0.0000	2-8	Sì 0.0000

Sì: sono presenti differenze significative tra le lamelle (riportato il p-value)

No: non sono presenti differenze significative tra le lamelle (non riportato il p-value)

Tabella 5.19: Confronto tra i valori di *M* e *H* dei vari scarichi dei campioni, evidenziando la presenza o meno di differenze significative tra essi.

5.4.2 Dipendenza dalla direzione di prova

Dall'analisi dei campioni testati entro 48 h nelle due direzioni di prova si notò immediatamente, come a livello macroscopico, proprietà nettamente maggiori nella direzione assiale rispetto a quella longitudinale per quanto riguarda il modulo di indentazione. Questo aspetto è noto e prevedibile anche a livello della nanoscala (Figura 5.11). Non sono state invece trovate differenze significative tra le durezze in direzione longitudinale e trasversale (Figura 5.12).

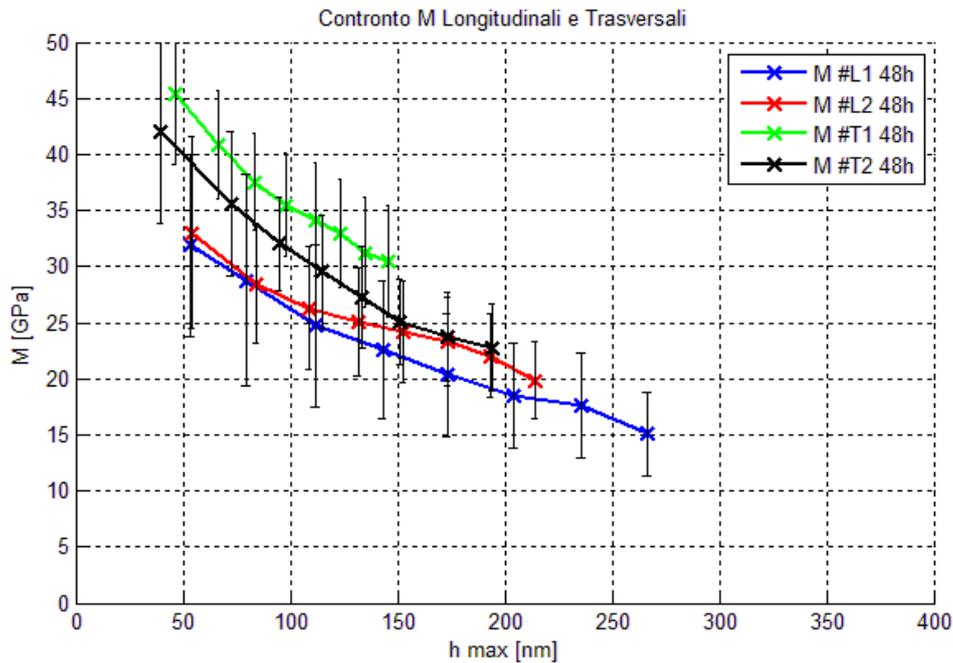


Figura 5.11: Confronto tra i moduli di indentazione M dei campioni trasversali e longitudinali testati entro 48h.

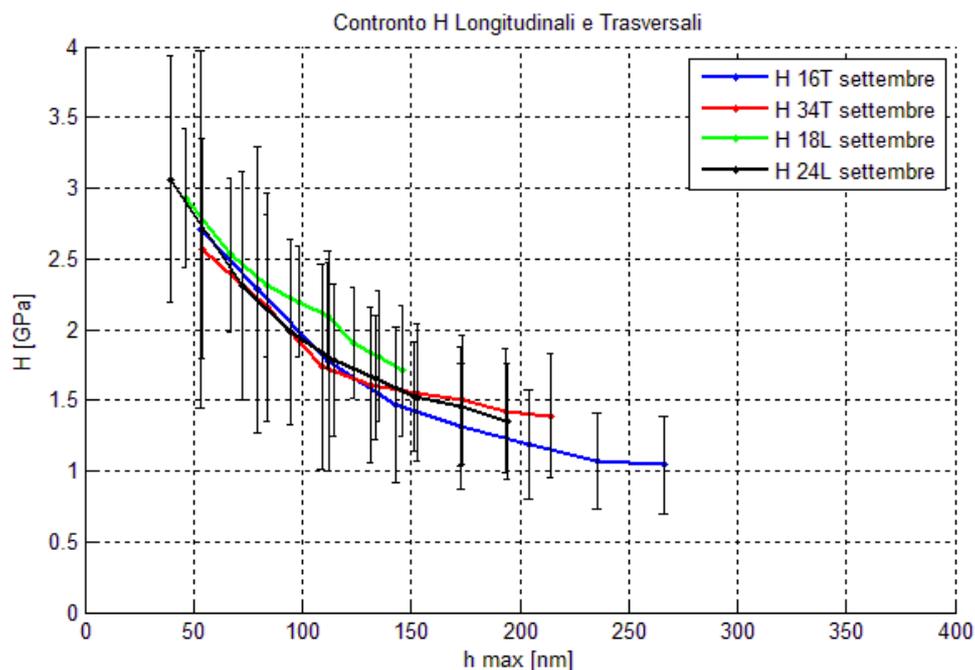


Figura 5.12: Confronto tra i moduli di indentazione H dei campioni trasversali e longitudinali.

Come è possibile notare dalla Figura 5.13 e 5.14, dove sono riportati in funzione di h_{max} sia i moduli di indentazione M ottenuti in questo studio sia quelli riportati da Lucchini et al. (2011), i valori risultano più alti di quelli attesi, sia in direzione longitudinale sia in direzione trasversale.

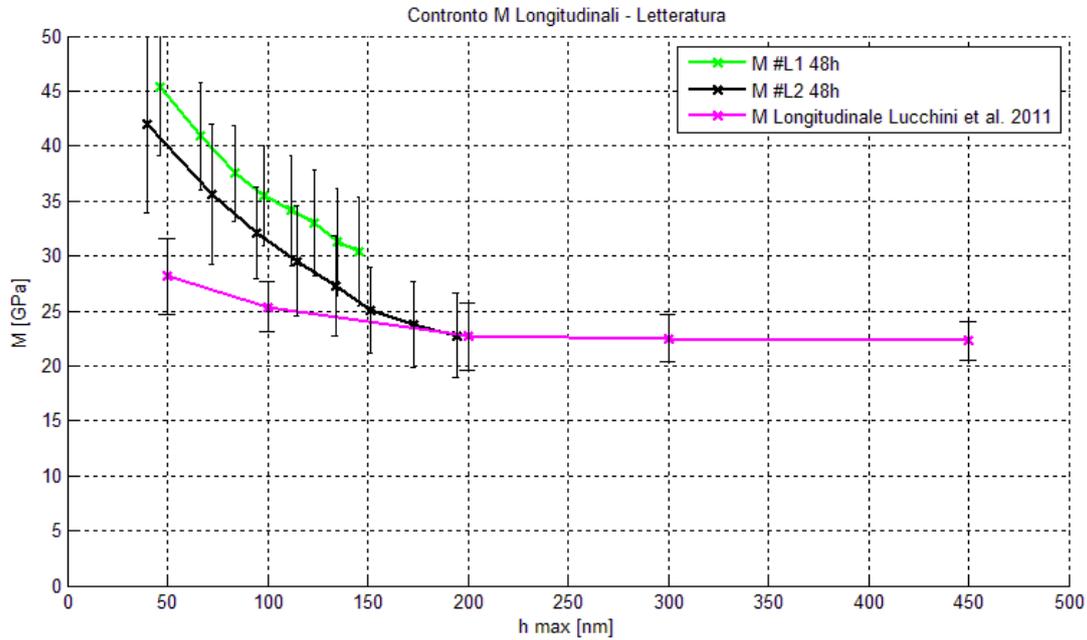


Figura 5.13: Confronto dei valori di M in direzione longitudinale tra i risultati ottenuti e il lavoro di Lucchini et al. (2011).

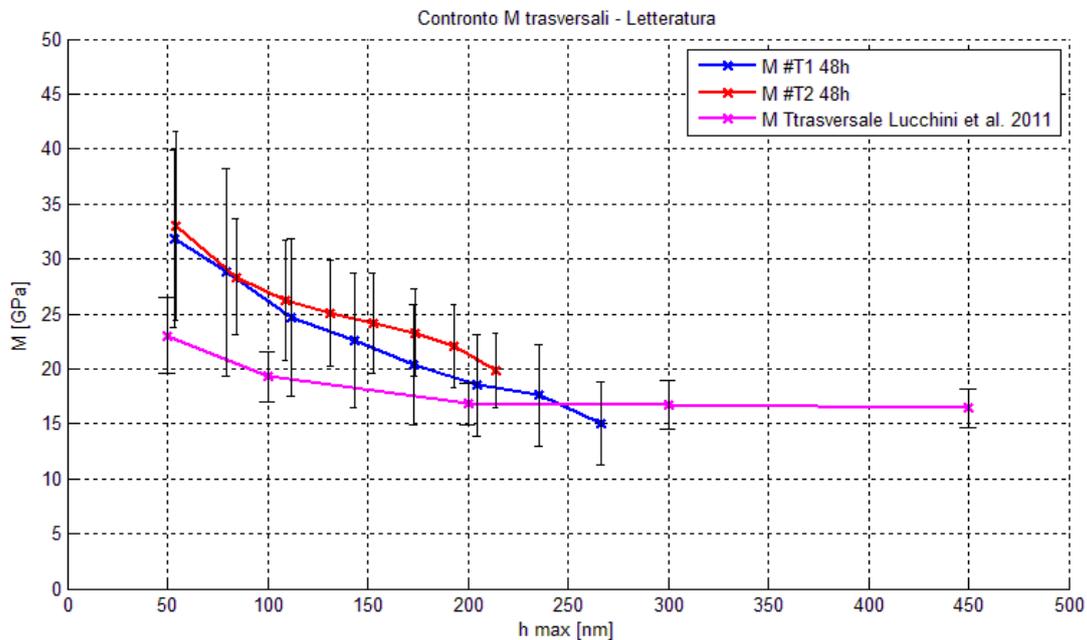


Figura 5.14: Confronto dei valori di M in direzione trasversale tra i risultati ottenuti e il lavoro di Lucchini et al. (2011).

Tuttavia in letteratura molti altri autori hanno rilevato valori coerenti con quelli riportati in questo lavoro.

Hengsberger et al. (2003), su diafisi femorale bovina hanno eseguito indentazioni a 900 nm con carichi di 10 mN ad uno strain rate di 0.066 s^{-1} , ottenendo valori di M in direzione longitudinale compresi tra 22.1 ± 3.6 e 31.6 ± 3.3 GPa.

Wang et al. (2006) hanno svolto invece test di nanoindentazione a carico singolo, in direzione longitudinale e trasversale, su campioni deidratati di tibia bovina. Il carico massimo raggiunto è di 20 mN, raggiungendo così una profondità massima tra 900 e 1000 nm. Il modulo elastico E_b ottenuto in direzione assiale è di 24.7 ± 2.5 GPa per lamelle osteonali e di 30.1 ± 2.4 GPa per lamelle interstiziali, mentre in direzione trasversale il modulo di Young è di 19.8 ± 1.6 GPa. Questo lavoro presenta valori simili a quelli ottenuti in questo lavoro, sia in direzione longitudinale sia in direzione trasversale.

Si noti comunque che nel seguente studio sono stati attuati dei test a carichi multipli con carico variabile tra 0.2 mN e 1.6 mN, valori volutamente molto bassi rispetto alla maggior parte dei valori di letteratura e corrispondenti a bassi affondamenti rilevati tra 30-40 e 150-200 nm.

Dalla letteratura si ritrova che anche il valore dello strain rate ha effetti rilevanti sulle prove di nanoindentazione (Hoffler et al., 2005). Il protocollo utilizzato in questo lavoro, con carichi e scarichi eseguiti a 0.5 mN/s , ha previsto strain rate dell'ordine medio di circa 0.1 s^{-1} , decrescente nelle successive profondità di affondamento fino a quasi 0.01 s^{-1} . Questo spiega in parte sia i risultati elevati sia la loro differenza rispetto a quelli dei test macroscopici, condotti ad uno strain rate di 0.001 s^{-1} .

Successivamente sono stati condotti dei test statistici (con significatività $p < 0.05$) che provano le differenze significative tra i moduli di indentazione dei due campioni longitudinali e dei due trasversali testati entro 48h. Tra campioni testati nella stessa direzione invece, i t-test non rilevano differenze significative dei valori di M , dimostrando la buona ripetibilità delle prove. Per quanto riguarda la durezza H i valori rilevati sono abbastanza alti rispetto ai pochi lavori reperibili in letteratura riguardanti questa grandezza. Ad esempio nei longitudinali si rilevano valori variabili dai 3.06 ± 0.86 GPa rilevati ad una h_{max} media di 39.82 nm ai 1.36 ± 0.41 ad una h_{max} media di 194.35 nm, mentre nei trasversali i risultati sono compresi tra 2.70 ± 1.26 GPa a 53.26 nm e 1.05 ± 0.35 GPa a 266.42 nm.

Carnelli et al. (2010) riportano valori di durezza in direzione assiale H_A di 0.74 ± 0.07 e in direzione trasversale H_T di 0.64 ± 0.11 . Lucchini et al. (2011) hanno rilevato una durezza H del tessuto in direzione assiale variabile tra 1.02 ± 0.22 GPa a 50 nm di penetrazione e 0.73 ± 0.04 GPa a 450 nm di affondamento, mentre in direzione trasversale i valori sono compresi tra 0.92 ± 0.18 GPa a 50 nm e 0.61 ± 0.09 GPa a 450 nm. Sulla base di questo confronto, ancora una volta si ipotizza che i bassi affondamenti indagati abbiano potuto incidere sulle misurazioni rilevate. Si può notare infatti che, generalmente all'ultimo livello di carico, i risultati non hanno ancora raggiunto un valore asintotico, quindi si può attendere che decadano ulteriormente aumentando la penetrazione della punta nel campione.

Ad esempio Tai e Ortiz (2006), applicando a campioni di osso corticale tibiale bovino un carico massimo di 0.01 mN con una profondità massima inferiore a 50 nm, hanno ottenuto un valore di durezza in direzione longitudinale molto elevato, pari a 8.3 ± 3.4 GPa. Inoltre Wang et al. (2006) con carichi e penetrazioni elevate, rispettivamente di 20 mN e 900-1000 nm, hanno

rilevato valori di durezza di 0.811 ± 0.155 GPa in direzione longitudinale e di 0.647 ± 0.060 GPa in direzione trasversale.

In ogni caso, la durezza è una proprietà del materiale raramente indagata in letteratura ed ancora meno è studiata la sua dipendenza dal carico massimo applicato o dalla massima penetrazione rilevata. Infatti, anche a causa delle incertezze riguardanti l'area di contatto (si ricorda che $H = P_{max}/A$), essa non sempre risulta una misura pienamente affidabile o significativa.

Infine si evidenzia che le deviazioni standard risultano elevate sia per i moduli di indentazione sia per la durezza, soprattutto sui primi livelli di carico. Questo fatto può essere spiegato con alcune considerazioni. Infatti, in letteratura, alcuni autori (Donnelly et al., 2006) spiegano che laddove la rugosità raggiunge valori superiori ad $1/3$ di h_{max} , la variabilità dei risultati e la loro imprecisione aumentano, mentre Ebenstein e Pruitt (2006) fissano questo limite addirittura a $1/10$. Tali effetti sono stati comunque limitati mediante la procedura di correzione delle curve P-h tramite lo start point. Infatti la regione di plateau iniziale osservata a basse penetrazioni all'inizio della prova, che è stata di fatto eliminata tramite tale procedura, può rappresentare l'effetto delle asperità che risiedono sulla superficie.

5.4.3 Dipendenza dal tempo di conservazione

Come già esposto in precedenza, sono stati esaminati in direzione longitudinale due campioni testati entro 48 h dalla loro produzione e due campioni indentati dopo 5 mesi. I risultati hanno evidenziato un netto decremento delle proprietà meccaniche del tessuto, sia per quanto riguarda i moduli di indentazione M sia per le durezze H , con valori molto più bassi di quelli attesi in letteratura. In particolare, in Figura 5.15 è riportato un confronto tra i due gruppi di campioni testati in questo lavoro e i valori rilevati da Lucchini et al. (2011).

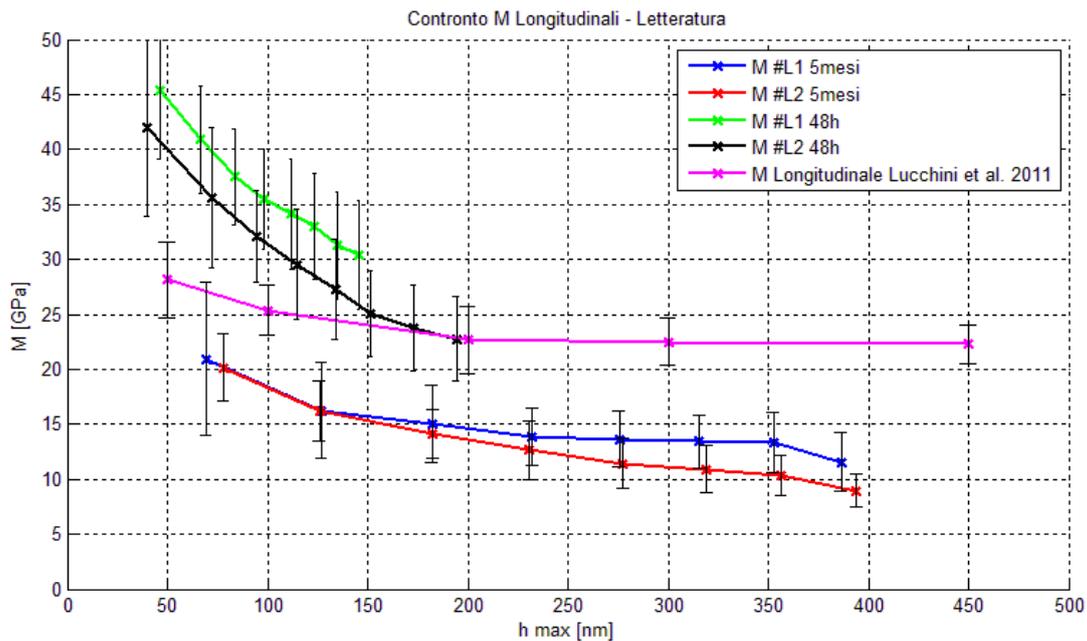


Figura 5.15: Confronto tra i valori del modulo di indentazione M dei campioni testati in questo lavoro e rilevati da Lucchini et al. (2011).

I valori tendono a dimezzarsi rispetto ai campioni freschi per entrambe le grandezze di interesse, con affondamenti massimi che raddoppiano da un massimo di 194.35 nm per i campioni testati entro 48 h ad un massimo di 394.09 nm per i campioni testati dopo 5 mesi. Questi due fenomeni sono conseguenza della possibile degradazione del tessuto, mantenuto per un lungo periodo di tempo in soluzione salina in frigorifero, tale per cui il materiale offre meno resistenza alla penetrazione della punta, risultando più soffice. Il trend riconosciuto risulta comunque coerente con i risultati riportati in questo lavoro e i valori di Lucchini et al. (2011).

I test statistici hanno rilevato differenze significative (per $p < 0.05$) tra i due campioni indentati entro due giorni e quelli testati dopo cinque mesi, mentre tra provini appartenenti allo stesso gruppo non sono state evidenziate differenze significative, il che dimostra una buona ripetibilità delle prove anche tra campioni conservati per lungo tempo e quindi la validità dei risultati ottenuti.

Risultati analoghi sono stati ottenuti da Linde et al. (1993), che hanno testato provini cilindrici di osso trabecolare dell'epifisi prossimale tibiale dopo un intervallo di tempo variabile tra 1.5 e 2.5 ore dall'asportazione dell'arto e nuovamente dopo 24 ore, conservando i provini in

soluzione salina. I risultati hanno evidenziato una diminuzione del 10% nella rigidità e nell'energia rilasciata allo scarico (area sotto la curva forza-spostamento misurata in fase di scarico), e un incremento del 10% nel rapporto tra l'energia d'isteresi e quella di carico, quantificando con questo parametro la variazione della pendenza tra la curva di carico e quella di scarico.

È possibile dunque che un trascorso di cinque mesi abbia di fatto avuto un effetto sulle proprietà meccaniche del tessuto, comportando variazioni anche del 50%.

5.4.4 Dipendenza dal tipo e dal numero di lamella

Nel paragrafo 5.2.3 è stata illustrata la separazione dei risultati a seconda della loro appartenenza a lamelle chiare e scure. In particolare è stato evidenziato che solo il campione #T1_48h presenta un numero di indentazioni sufficienti su entrambi i tipi di lamella per attuare delle considerazioni statistiche valide.

Ciò che emerge dai t-test (significatività per $p < 0.05$) è che sia per H che per M non si rilevano differenze significative tra lamelle chiare e scure. Questo risultato può sembrare errato in prima analisi, in realtà Xu et al. (2003) hanno dimostrato, mediante un confronto tra campioni tagliati al microtomo, ma non lucidati e provini su cui è stato eseguito il polishing, che l'asportazione di materiale superficiale provocata da questa procedura annulla le differenze significative, altrimenti rilevabili, tra i due tipi di lamella.

L'andamento grafico, con le curve delle lamelle scure che non si discostano da quelle delle lamelle chiare, è il medesimo anche sugli altri campioni, dove a causa dello scarso numero di dati non è stato possibile effettuare test statistici validi. Da questa analisi qualitativa basata sui grafici si può perciò ritenere, soprattutto alla luce di quanto riportato in letteratura, che questa assenza di differenze tra i due tipi di lamelle non sia una peculiarità del campione #T1_48h, ma un aspetto caratteristico di tutti i provini testati.

Per quanto riguarda invece le considerazioni sul numero di lamella, si rilevano degli andamenti che fanno pensare che ad un allontanamento progressivo dal centro dell'osteone non corrisponda una variazione sostanziale delle durezza H o dei moduli di indentazione M . I test statistici condotti tra lamelle con almeno quattro indentazioni appartenenti ad uno stesso campione dimostrano questo fatto per entrambe le grandezze indagate, come riportato in Tabella 5.20.

#L2_48h		#T1_48h		#T2_48h	
H	No	H	No	H	No
p-value	0.2584	p-value	0.8573	p-value	0.1496
M	No	M	No	M	No
p-value	0.2957	p-value	0.0672	p-value	0.1726
Confronto tra lamelle 1-2		Confronto tra lamelle 2-4		Confronto tra lamelle 1-5	

No: assenza di differenze significative tra le lamelle

Si: presenza di differenze significative tra le lamelle

Tabella 5.20: Presenza o meno di differenze significative tra i parametri H e M dei vari campioni.

Tale aspetto è riscontrato e verificato anche da altri autori tra cui Burket et al. (2011) e Faingold et al. (2012), pertanto si può ritenere che anche questo aspetto sia rilevato efficacemente dai test di indentazione a carichi multipli.

5.5 Confronto tra risultati macroscopici e alla nanoscala

Tra i risultati ottenuti da test di nanoindentazione a carichi multipli e quelli ottenuti dalle prove di compressione monoassiale si notano delle notevoli differenze. I valori ottenuti alla nanoscala sono infatti sensibilmente più alti al di là del fatto che si tratti di moduli di indentazione M , ricordando che $M=E_b/1-\nu^2$. Il coefficiente di Poisson non è stato valutato in questo lavoro, ma dalla letteratura è ipotizzabile pari a $\nu=0.27$ (Ko, 1953; Reilly and Burstein, 1974; Jutley et al., 2002). È stato possibile quindi presupporre un valore di E_b a partire da M e quindi confrontare le due scale in scala logaritmica (Figura 5.16 e 5.17).

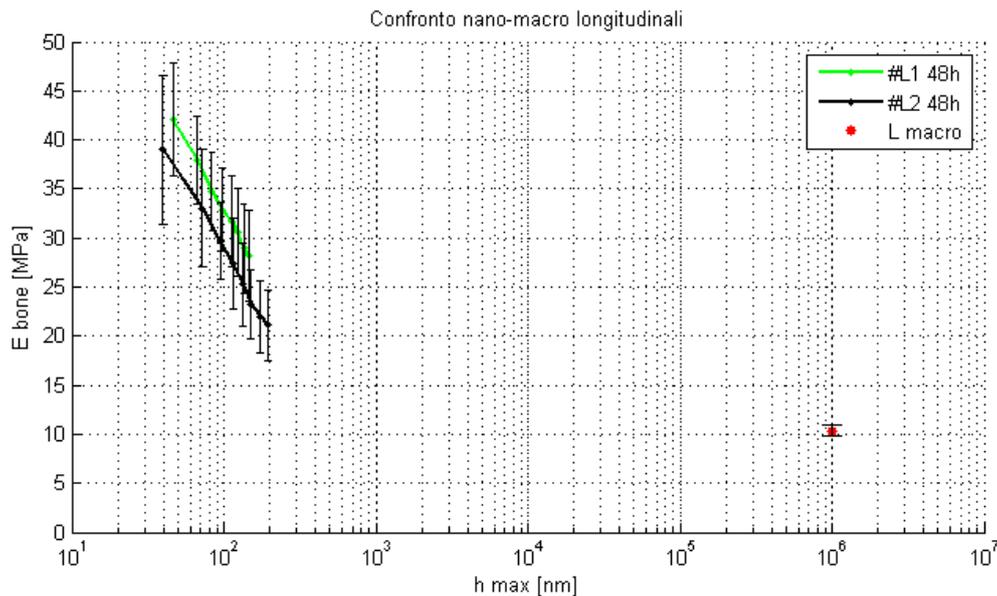


Figura 5.16: Confronto dei moduli elastici in direzione longitudinale tra macroscale e nanoscale.

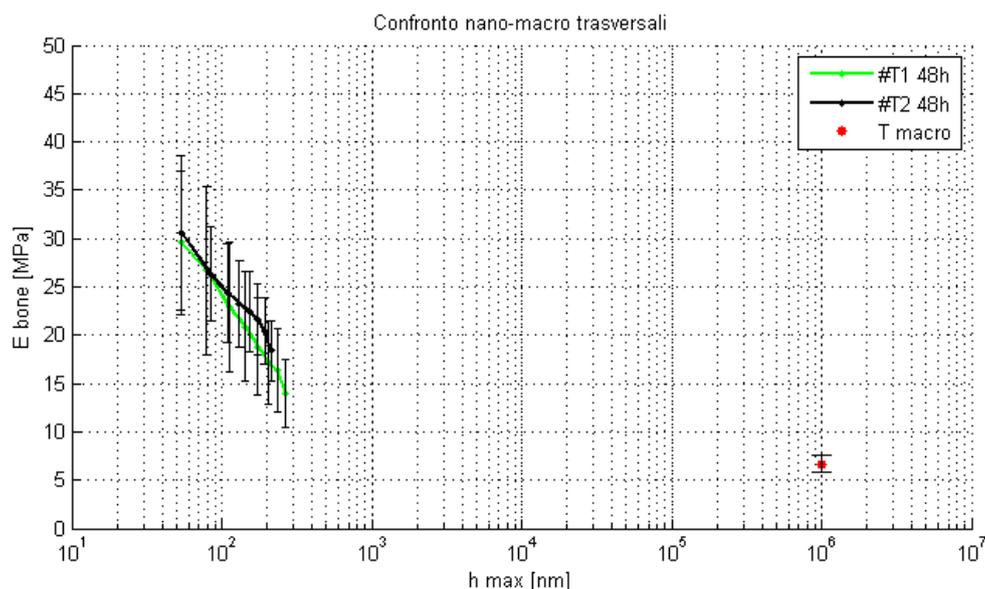


Figura 5.17: Confronto dei moduli elastici in direzione trasversale tra macroscale e nanoscale.

Questo fatto è però spiegabile attraverso alcune considerazioni. Innanzitutto è già stato illustrato nei capitoli precedenti che l'effetto dello strain rate influenza i risultati ad entrambe le scale indagate. Come già spiegato, per esigenze sperimentali, a livello macroscopico è stata

impostata una bassa velocità di deformazione corrispondente a strain rate di circa 0.003 s^{-1} , mentre a livello nanometrico, a causa dell'innovativo protocollo ancora da perfezionare, sono state svolte prove con carichi e scarichi ad una velocità di 0.5 mN/s , corrispondenti ad uno strain rate mediamente intorno a 0.1 s^{-1} . Tali differenze di ordine di grandezza tra gli strain rate spiegano parzialmente le differenze di risultati tra macro e nanoscala.

Un altro fattore d'influenza riguarda la porosità. Le misure attuate con la nanoindentazione infatti, non risentono di questo effetto, poiché viene indentato esclusivamente tessuto corticale, evitando grazie all'imaging e alle dimensioni molto piccole della punta zone di vuoto. Dalle immagini acquisite al microscopio, si può notare la presenza di porosità varie tra cui canali di Havers, lacune e canalicoli evidenziate per un campione longitudinale nella Figura 5.18. È stato possibile valutare qualitativamente la porosità come rapporto tra superfici vuote su superficie totale.

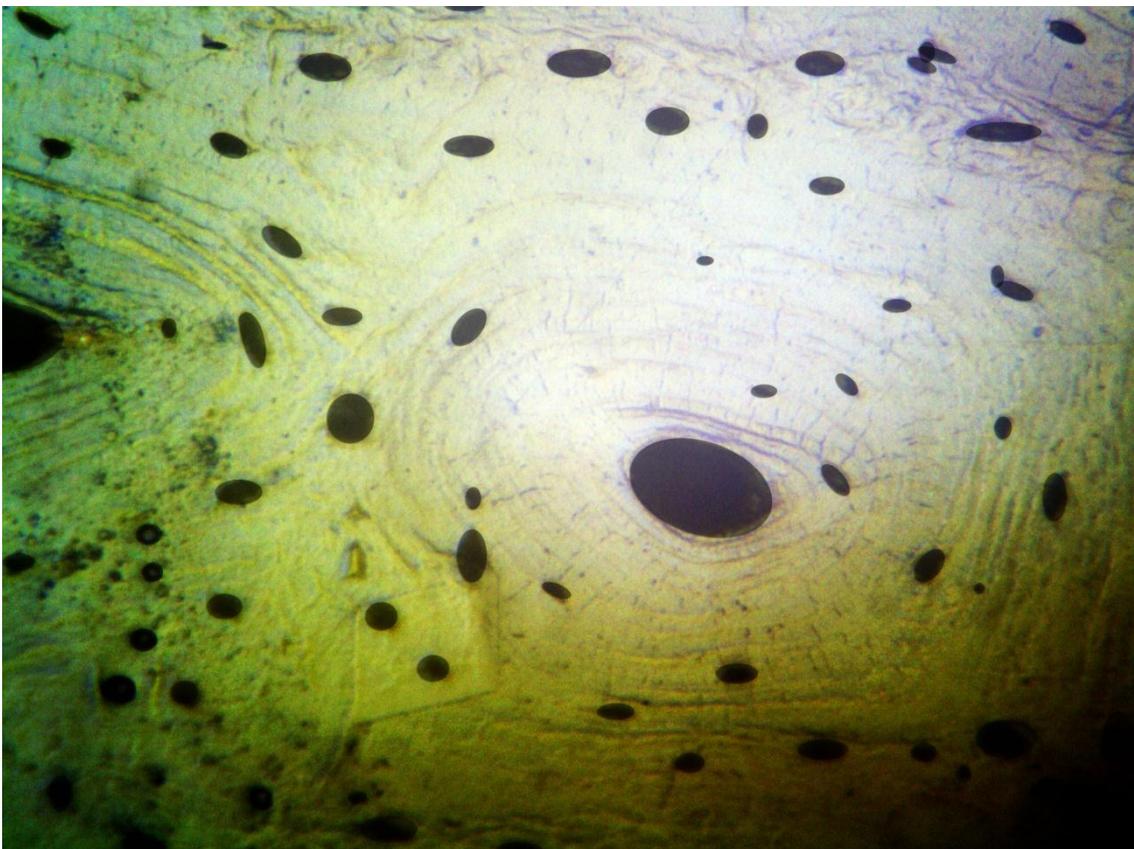


Figura 5.18: Rappresentazione qualitativa della porosità in direzione longitudinale.

Tale porosità ammonta approssimativamente al 5% e al 2.5% della sezione rispettivamente in direzione longitudinale e trasversale. Considerando le sezioni analizzate, come rappresentative di tutte le superfici dei campioni testati, possiamo ritenere che le effettive aree resistenti nei test di compressione monoassiale macroscopia siano il 95% e il 97.5% delle aree apparenti utilizzate nei calcoli degli sforzi. Di conseguenza gli sforzi effettivi sopportati dalla matrice ossea sarebbero maggiori di quelli apparenti calcolati e di conseguenza anche i moduli elastici risulterebbero più elevati, seppur solo di un fattore ~ 1.05 in direzione longitudinale e ~ 1.03 in direzione trasversale.

Questi due fattori concorrono quindi a provocare le differenze di risultati osservate tra nanoindentazione e test macroscopici, che ovviamente, come già accennato, si attenuerebbero ulteriormente estraendo il modulo elastico E dal modulo di indentazione M , cosa possibile solo conoscendo il coefficiente di Poisson, non determinato in tale lavoro, ma ipotizzabile pari a $\nu=0.27$.

Le proprietà meccaniche tra i due livelli risultano dunque differenti. Per quanto riguarda l'organizzazione gerarchica del tessuto osseo, una possibile configurazione è data dai modelli di omogeneizzazione microstrutturale indicati in Figura 5.19. Il comportamento meccanico del materiale complessivo, cioè il rapporto tra deformazioni omogenee che agiscono sul bordo di un elemento di volume rappresentativo (RVE) e lo sforzo medio risultante, può essere stimato dal comportamento meccanico dei diversi sottodomini contraddistinti da proprietà simili che costituiscono il materiale, ossia le suddette fasi omogenee (che rappresentano le disomogeneità all'interno dell'RVE), dalla loro quantità all'interno di un RVE, dalle loro forme caratteristiche e dalle loro interazioni. Analizzando quindi le proprietà meccaniche delle singole fasi è possibile risalire alle proprietà meccaniche di livelli gerarchici superiori (Fritsch and Hellmich, 2007). Rimane tuttavia ancora da capire quale sia l'effettiva relazione tra le proprietà meccaniche tra i vari livelli e la possibilità di applicare tale modello ai risultati ottenuti in questo lavoro.

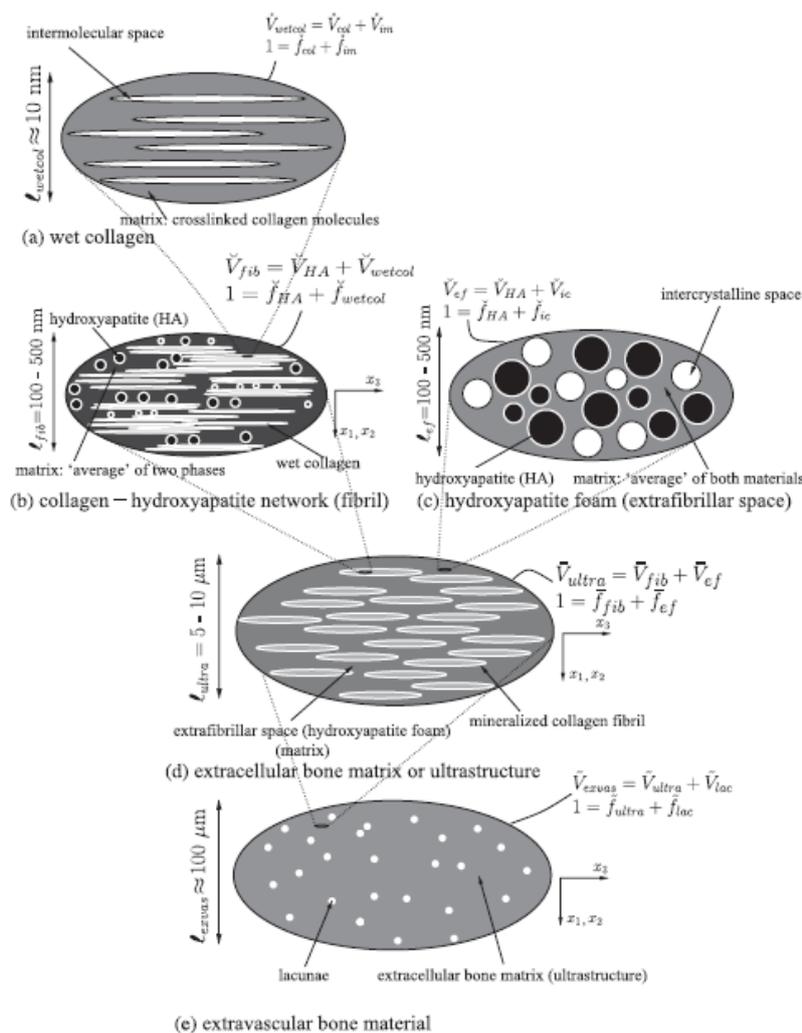


Figura 5.19: Rappresentazione gerarchica dei livello nano- e microstrutturali (Fritsch and Hellmich, 2007).

Capitolo 6

Conclusioni e sviluppi futuri

Nel seguente capitolo si riportano le conclusioni relative all'analisi dei risultati ottenuti in termini di confronto con obiettivi e motivazioni del lavoro. Tale valutazione viene effettuata suggerendo anche possibili limitazioni del protocollo sviluppato, accompagnate da spunti e da possibili modifiche alternative per sviluppi futuri sull'argomento.

Il lavoro di tesi svolto getta le basi per lo sviluppo di un protocollo per test di nanoindentazione ciclica a carichi multipli con affondamenti molto contenuti. Sono stati impiegati approcci sperimentali al fine di investigare le proprietà meccaniche del tessuto osseo dipendenti dalla direzione di prova e dalla scala di analisi, aspetto caratteristico tipico di un materiale altamente gerarchico quale l'osso. I due tipi di indagine diversi applicati alla macroscale e alla nanoscale hanno portato risultati consistenti.

Per quanto riguarda la macroscale, i test di compressione hanno ottenuto risultati piuttosto consoni a quelli riportati in letteratura. I valori ottenuti confermano l'anisotropia del tessuto, evidenziando maggiori proprietà meccaniche in direzione longitudinale rispetto alla direzione trasversale. I test effettuati a bassi strain rate hanno riportato valori leggermente più bassi dei valori medi ritrovati in letteratura, mediamente eseguiti a strain rate maggiori.

A livello della nanoscale è stata constatata innanzitutto l'ipotesi del decadimento delle proprietà meccaniche a livello della nanoscale, per quanto riguarda i parametri M e H . I risultati principali ottenuti mediante elaborazioni Matlab indicano che M e H diminuiscono in maniera evidente, fino al raggiungimento di un valore asintotico all'aumentare della penetrazione in tutti i test effettuati, con decadimenti del modulo di indentazione tra il secondo e l'ottavo livello di carico compresi tra il 32% e il 40%. In direzione longitudinale, infatti, M decresce da valori compresi tra 42 e 45 GPa a circa 50 nm di affondamento fino a valori compresi tra circa 30 e 25 GPa per penetrazioni di circa 150 nm. In direzione trasversale, invece, i valori decrescono da circa 31-32 GPa a circa 50 nm fino a valori di circa 18-19 GPa intorno ai 200 nm. Anche a tale livello di scala emerge dunque l'aspetto dell'anisotropia, con risultati più alti in direzione longitudinale rispetto a quella trasversale. Il decadimento delle proprietà meccaniche riscontrato è probabilmente causato dal danneggiamento della superficie causato dall'affondamento stesso dell'indenter. Altro parametro che può aver influenzato tale comportamento è il progressivo decremento di strain rate con l'aumento della penetrazione. Si ipotizza quindi che il decadimento delle proprietà meccaniche dipende da cofattori quali danneggiamento della superficie e diminuzione intrinseca dello strain rate in funzione dell'aumento di profondità di penetrazione. Le deviazioni standard dei parametri meccanici più ampie riscontrate a livello dei primi scarichi possono essere risultato di imperfezioni della geometria della punta o di un contatto non ottimale a bassi carichi.

La superficie dei campioni ha presentato un comportamento mediamente omogeneo, con basse rugosità, ottenendo una bassa variabilità di profondità di affondamento a parità di carico imposto. Si presuppone quindi che la procedura di polishing abbia avuto un buon successo.

I risultati ottenuti sono stati successivamente elaborati per sottolineare l'influenza o meno di parametri quali la distanza dell'indentazione dal centro dell'osteone, l'indentazione di lamelle chiare o scure ed il tempo di conservazione dei campioni. I primi due parametri non hanno presentato particolari effetti significativi sulle proprietà meccaniche dei campioni, non riscontrando quindi differenze significative tra lamelle più o meno lontane dal centro dell'osteone o lamelle di tipo chiaro o scuro. Il tempo di conservazione (5 mesi), invece, ha portato un decadimento delle proprietà meccaniche misurate pari circa al 50%.

Successivamente il confronto tra macro e nanoscala suggerisce un diverso comportamento meccanico da parte del tessuto alle diverse scale. È ipotizzabile dunque che a livello della nanoscala il modulo elastico risulti superiore per un apporto maggiore nella resistenza meccanica offerto dai cristalli minerali.

Sono emerse in particolare le difficoltà di avere delle misure precise e affidabili per affondamenti al di sotto dei 50-60 nm, così come si è evidenziata chiaramente l'importanza di avere una rugosità estremamente controllata nell'intorno dell'indentazione, soprattutto per i primi livelli di carico. I risultati del lavoro rappresentano un possibile riferimento per successive prove sperimentali, presentando l'analisi di possibili fattori di influenza dei test.

Possibili sviluppi futuri sono ad esempio l'esecuzione delle medesime prove a livello della macro e della nanoscala a pari strain o load rate, valutando così l'effetto di questo parametro sulle prove. Un ulteriore possibile suggerimento riguarda la procedura di polishing, la quale ha comunque fornito basse rugosità superficiali. Si suggerisce anche l'esecuzione della medesima campagna sperimentale con diverse procedure di polishing, quali ad esempio l'utilizzo di un microtomo per una maggiore uniformità della superficie, per identificare l'effetto della rugosità e distinguerlo dalle caratteristiche intrinseche del materiale. Inoltre è possibile che la modalità di conservazione a lungo termine possa influire negativamente sulle proprietà meccaniche del tessuto, si consiglia quindi la ricerca di nuove modalità di conservazione al fine di non alterare i parametri meccanici.

Al fine di una maggiore validazione dei possibili risultati, si suggerisce infine lo sviluppo di un modello agli elementi finiti al fine di confrontare i valori sperimentali ottenuti tramite nanoindentazione.

Bibliografia

Adharapurapu, R. R., Jiang, F., and Vecchio, K. S. (2006). Dynamic fracture of bovine bone. *Mater. Sci. Eng. C*, 26(8):1325-1332.

Ambrosi, G., Castano, P., Donato, R., Cantino, D., Correr, S., D'Este, L., Familiari, G., Fornai, F., Gulisano, M., Iannello, A., Magaudda, L., Marcello, M., Martelli, A. M., Pacini, P., Rende, M., Rossi, P., Sforza, S., Tacchetti, C., Toni, R. and Zummo, G. (2006). *Anatomia dell'uomo*. Edi. Ermes, 2^a edizione.

Aoubiza, B., Crolet, J. M., and Meunier, A. (1996). On the mechanical characterization of compact bone structure using the homogenization theory. *J. Biomech.*, 29(12):1539-1547.

Ascenzi, A. and Benvenuti, A. (1986). Orientation of collagen fibers at the boundary between two successive osteonic lamellae and its mechanical interpretation. *J. Biomech.*, 19:455-463.

Ascenzi, A. and Bonucci, E. (1967). The tensile properties of single osteon. *Anat. Rec.*, 58:375-386.

Ascenzi, A. and Bonucci, E. (1968). The compressive properties of single osteon. *Anat. Rec.*, 61:377-392.

Ascenzi, A. and Bonucci, E. (1970). The mechanical properties of the osteon in relation to its structural organization. In E.A. Balazs (ed.) *Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix*, Academic Press, New York.

Ascenzi, A. and Bonucci, E. (1976). Relationship between ultrastructure and pin test in osteons. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 121:275-294.

Ascenzi, A., Baschieri, P., and Benvenuti, A. (1994). The torsional properties of single selected osteons. *J. Biomech.*, 27:875-884.

Ascenzi, A., Improta, S., Portigliatti-Barbos, M., Carando, S., and Boyde, A. (1987). Distribution of lamellae in human femoral shafts deformed by bending with inferences on mechanical properties. *Bone*, 8:319-325.

Ashman, R. B., Cowin, S. C., Van Buskirk, W. C., and Rice, J. C. (1984). A continuous wave technique for the measurements of the elastic properties of bone. *J. Biomech.*, 17:349-361.

Bartel D. L., Davy D. T. and Keaveny T. M. (2006). *Orthopedic Biomechanics*, Pearson Prentice Hall, New Jersey.

Bedini, R., Ioppolo, P., Pecci, R., Marinozzi, F., Bini, F., Pepe, E. and Marinozzi, A. (2009). *Misura delle caratteristiche di tessuto osseo umano in condizioni patologiche tramite analisi microtomografica: primi risultati*. Roma: Istituto Superiore di Sanità. (Rapporti ISTISAN 09/7).

- Biltz, R. and Pellegrino, E. (1969). The chemical anatomy of bone. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 51-A(3):456-466.
- Bobji, M. and Biswas, K. (1998). Estimation of hardness by nanoindentation of rough surfaces. *Journal of Materials Research*, 13(11):3227-3233.
- Bobji, M. and Biswas, K. (1999). Hardness of a surface containing uniformly spaced pyramidal asperities. *Tribol. Lett.*, 7(1):51-56.
- Bobji, M., Shivakumar, K., Alehossein, H., Venkateshwarlu, V. and Biswas, S. (1999). Influence of surface roughness on the scatter in hardness measurements - a numerical study. *International Journal of Rock Mechanics and Mining Sciences*, 36:399-404.
- Bolshakov, A. and Pharr, G. (1998). Influence of pile-up on the measurement of mechanical properties by load and depth sensing indentation techniques. *Journal of Materials Research*, 13(4):1049-1058.
- Burket, J., Gourion-Arsiquaud, S., Havill, L. M., Baker, S. P., Boskey, A. L., and Van Der Meulen, M. C. H. (2011). Microstructure and nanomechanical properties in osteons relate to tissue and animal age. *J. Biomech.*, 44(2):277-284.
- Burstein, A., Currey, J. D., Frankel, V. H. and Reilly, D. T. (1972). The ultimate properties of bone tissue: the effects of yielding. *J. Biomech.*, 5(1):35-42.
- Burstein, A., Reilly, D. T. and Martens, M. (1976). Aging of bone tissue: mechanical properties. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 58:82-86.
- Busa, B., Miller, L. M., Rubin, C. T., Qin, Y. X., and Judex, S. (2005). Rapid establishment of chemical and mechanical properties during lamellar bone formation. *Calcif. Tissue Int.*, 77:386-394.
- Caligaris, L., Fava, S. and Tomasello, C. (2005). *Manuale di meccanica*. Hoepli editore.
- Carnelli, D. (2010). *Orientation and length-scale dependent mechanical properties in lamellar bone at the micro and nanostructural hierarchical levels*. Ph.D. thesis in structural, seismic and geotechnical engineering, Politecnico di Milano.
- Carnelli, D., Lucchini, R., Ponzoni, M., Contro, R., and Vena, P. (2011). Nanoindentation testing and finite element simulations of cortical bone allowing for anisotropic elastic and inelastic mechanical response. *J. Biomech.*, 44(10):1852-1858.
- Carter, D. R. and Hayes, W. C. (1977). The compressive behavior of bone as a two phase porous structure. *J. Bone Jt. Surg.*, 59A:954-967.
- Carter, D. R. and Spengler, D. M. (1978). Mechanical properties and composition of cortical bone. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 135:192-217.
- Cezayirlioglu, H., Bahniuk, E., Davy, D. and Heiple, K. (1985). Anisotropic yield behavior of bone under combined axial force and torque. *Journal of Biomechanics*, 18(1):61-69.

- Chang, R. W., Etsion, I. and Bogy, D. B. (1987). An elastic-plastic model for the contact of rough surfaces. *Journal of Tribology*, 109:257-263.
- Cowin, S. (1989). *Bone Mechanics*. CRC, Boca Raton, Florida.
- Cowin, S. (2001). *Bone mechanics handbook*. 2nd edition. CRC Press Inc.
- Cowin, S. C. and Doty, S. B. (2007). *Tissue mechanics*. Springer.
- Crowninshield, R. D., and Pope, M. H. (1974). The response of compact bone in tension at various strain rates. *Ann. Biomed. Eng.*, 2:217-225.
- Currey, J. D. (1960). Differences in the blood supply of bone of different histological type. *Q. J. Microsc. Sci.*, 101:351-370.
- Currey, J. D. (1964). Three analogies to explain the mechanical properties of bone. *Biorheol.*, 2:1-10.
- Currey, J. D. (1969). The relationship between the stiffness and the mineral content of bone. *J. Biomech.*, 2:477-480.
- Currey, J. D. (1975). The effects of strain rate, reconstruction and mineral content on some mechanical properties of bovine bone. *J. Biomech.*, 8:81-86.
- Currey, J. D. (1998). Mechanical properties of vertebrate hard tissues. *Proc. Inst. Mech. Eng. H. J. Eng. Med.*, 212(6):399-411.
- Currey, J. D. (2006). *Bones: structure and mechanics*, Princeton University Press.
- Donnelly, E., Baker, S. P., Boskey, A. L., and Van Der Meulen, M. C. H. (2006). Effects of surface roughness and maximum load on the mechanical properties of cancellous bone measured by nanoindentation. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 77(2):426-435.
- Ebenstein, D. M., and Pruitt, L. A. (2006). Nanoindentation of biological materials. *Nano Today*, 1(3):26-33.
- Erts, D., Gathercole, L. J., and Atkins, E. D. T. (1994). Scanning probe microscopy of crystallites in calcified collagen. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 5:200-206.
- Evans, G. P., Behiri, J. C., Vaughan, L. C., and Bonfield, W. (1992). The response of equine cortical bone to loading at strain rates experienced in vivo by the galloping horse. *Equine Vet. J.*, 24:125-128.
- Faingold, A., Cohen, S. R., and Wagner, H. D. (2012). Nanoindentation of osteonal bone lamellae. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 9:198-206.
- Fan, Z. and Rho, J. (2002). Effects of viscoelasticity and time-dependent plasticity on nanoindentation measurements of human cortical bone. *J. Biomed. Mater. Res.*, 67:208-214.

- Fan, Z., Smith, P. A., Eckstein, E. C., and Harris, G. F. (2006). Mechanical properties of OI type III bone tissue measured by nanoindentation. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 79A:71–77.
- Fan, Z., Swadener, J. G., Rho, J. Y., Roy, M. E. and Pharr, G. M. (2002). Anisotropic properties of human tibial cortical bone as measured by nanoindentation. *Journal of Orthopaedic Research*, 20:806–810.
- Feng, L. and Jasiuk, I. (2010). Effect of specimen geometry on tensile strength of cortical bone. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 95 A(2):580-587.
- Feng, L. and Jasiuk, I. (2011). Multi-scale characterization of swine femoral cortical bone. *Journal of Biomechanics*, 44:313–320.
- Feng, L., Chittenden, M., Schirer, J., Dickinson, M., and Jasiuk, I. (2012). Mechanical properties of porcine femoral cortical bone measured by nanoindentation. *J. Biomech.*, 45(10):1775-1782.
- Ferreira, F., Vaz, M. A., and Simões, J. A. (2006). Mechanical properties of bovine cortical bone at high strain rate. *Materials Characterization*, 57(2):71-79.
- Franzoso, G. (2008). *Elastic anisotropy of lamellar bone measured by nanoindentation*. Ph.D. thesis, Politecnico di Milano, Milano, Italy.
- Franzoso, G. and Zysset, P. K. (2009). Elastic anisotropy of human cortical bone secondary osteons measured by nanoindentation. *ASME J. Biomech. Eng.*, 131:021001.1 – 021001.11.
- Fratzl, P. and Gupta, H. S. (2007). Nanoscale mechanisms of bone deformation and fracture. In: Bauerlein E. editor. *Handbook of biomineralization*, vol. 1. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Fratzl, P. and Weinkamer, R. (2007). Nature's hierarchical materials. *Progress Mater. Sci.*, 52:1263–1334.
- Fritsch, A., and Hellmich, C. (2007). 'Universal' microstructural patterns in cortical and trabecular, extracellular and extravascular bone materials: Micromechanics-based prediction of anisotropic elasticity. *Journal of Theoretical Biology*, 244(4):597-620
- Gao, H. (2006). Application of fracture mechanics concepts to hierarchical biomechanics of bone and bone-like materials. *International Journal of Fracture*, 138(1-4):101-137.
- Gao, X. Y. and Fan, H. (2002). A micro-mechanism based analysis for size-dependent indentation hardness. *Journal of Materials Science*, 37:4493-4498.
- Gebhardt, W. (1906). *Ueber funktionell wichtige. Anordnungsweisen der feineren und groberen Bauelemente des Wirbeltierknochens. II. Spezieller Teil. 1. Der Bau der Haverssohen Lamellensysteme und seine funktionelle Bedeutung. Arch. Entwickl. Mech. Org.*, 20:187–322.
- Gerberich, W. W., Yu, W., Kramer, D., Strojny, A., Bahr, D., Lilleodden, E., and Nelson, J. (1998). Elastic loading and elastoplastic unloading from nanometer level indentations for modulus determinations. *J. Mater. Res.*, 13:421–439.

- Giraud-Guille, M. M. (1987). Cholesteric twist of collagen in vivo and in vitro. *Mol. Crystals Liq. Crystals*, 153:15–30.
- Giraud-Guille, M. M. (1988). Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcif. Tissue Int.*, 42:167–180.
- Giraud-Guille, M. M., Besseau, L., and Martin, R. (2003). Liquid crystalline assemblies of collagen in bone and in vitro systems. *J. Biomech.*, 36:1571–1579.
- Goldstein, S. (1987). The mechanical properties of trabecular bone: dependence on anatomic location and function. *J. Biomech.*, 20:1055–1061.
- Gupta, H. S., Seto, J., Wagermaier, W., Zaslansky, P., Boesecke, P., and Fratzl, P. (2006a). Cooperative deformation of mineral and collagen in bone at the nanoscale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103:17741 – 17746.
- Gupta, H. S., Wagermaier, W., Zickler, G. A., Hartmann, J., Funari, S. S., Roschger, P., Wagner, H. D., and Fratzl, P. (2006b). Fibrillar level fracture in bone beyond the yield point. *Int. J. Fracture*, 139:425–436.
- Gupta, H. S., Wagermaier, W., Zickler, G. A., Raz-Ben Aroush, D., Funari, S. S., Roschger, P., Wagner, H. D., and Fratzl, P. (2005). Nanoscale deformation mechanisms in bone. *Nano Letters*, 5:2108–2111.
- Hansen, U., Zioupos, P., Simpson, R., Currey, J. D., and Hynd, D. (2008). The effect of strain rate on the mechanical properties of human cortical bone. *Journal of Biomechanical Engineering*, 130(1):11011-11018.
- Hasegawa, K., Turner, C. H., and Burr, D. B. (1994). Contribution of collagen and mineral to the elastic-anisotropy of bone. *Calcif. Tissue Int.* 55:381–386.
- Hengsberger, S., Boivin, G., and Zysset, P. K. (2002a). Morphological and mechanical properties of bone structural units: a two-case study. *JSME Int. J.*, 45(4):936–943.
- Hengsberger, S., Enstroem, J., Peyrin, F., and Zysset, P. (2003). How is the indentation modulus of bone tissue related to its macroscopic elastic response? A validation study. *Journal of Biomechanics*, 36:1503–1509.
- Hengsberger, S., Kulik, A., and Zysset, P. K. (2001). A combined atomic force microscopy and nanoindentation technique to investigate the elastic properties of bone structural units. *Europ. Cells Mater.*, 1:12–17.
- Hengsberger, S., Kulik, A., and Zysset, P. K. (2002b). Nanoindentation discriminates the elastic properties of individual human bone lamellae under dry and physiological conditions. *Bone*, 30(1):178–184.
- Hertz, H. (1882). Uber die berührung fester elastischer korper. *J. Reine Angew. Mathem.*, 92:156–171.

- Ho, S. P., Goodis, H., Balooch, M., Nonomura, G., Marshall, S. J. and Marshall, G. (2004). The effect of sample preparation technique on determination of structure and nanomechanical properties of human cementum hard tissue. *Biomaterials*, 25(19):4847-4857.
- Hoc, T., Henry, L., Verdier, M., Aubry, D., Sedel, L., and Meunier, A. (2006). Effect of microstructure on the mechanical properties of haversian cortical bone. *Bone*, 38:466–474.
- Hoffler, C. E., Guo, X. E., Zysset, P. K., and Goldstein, S. A. (2005). An application of nanoindentation technique to measure bone tissue lamellae properties. *ASME J. Biomech. Eng.*, 127(7):1046–1053.
- Hoffler, C. E., Moore, K. E., Kozloff, K., Zysset, P. K., Brown, M. B., and Goldstein, S. A. (2000). Heterogeneity of bone lamellar-level elastic moduli. *Bone*, 26(6):603–609.
- Hofmann, T., Heyroth, F., Meinhard, H., Franzel, W., and Raum, K. (2006). Assessment of composition and anisotropic elastic properties of secondary osteon lamellae. *J. Biomech.*, 39(12):2282–2294.
- Hoo R. P., Fratzl P., Daniels, J. E., Dunlop, J. W. C., Honkimäki, V. and Hoffman M. (2011). Cooperation of length scales and orientations in the deformation of bovine bone. *Acta Biomaterialia*, 7:2943–2951.
- Hoo, R. P., Fratzl, P., Daniels, J. E., Dunlop, J. W. C., Honkimäki, V., and Hoffman, M. (2011). Cooperation of length scales and orientations in the deformation of bovine bone. *Acta Biomaterialia*, 7(7):2943-2951.
- Isaksson, H., Nagao, S., Malkiewicz, M., Julkunen, P., Nowak, R. and Jurvelin, J. S. (2010). Precision of nanoindentation protocols for measurement of viscoelasticity in cortical and trabecular bone. *Journal of Biomechanics*, 43(12):2410–2417.
- Isaksson, H., Nagao, S., Małkiewicz, M., Julkunen, P., Nowak, R., and Jurvelin, J. S. (2010). Precision of nanoindentation protocols for measurement of viscoelasticity in cortical and trabecular bone. *J. Biomech.*, 43(12):2410-2417.
- Jakes, J. E., Bechle, N. J., Hamel, S., Gronvold, A. G., Hermanson, J. C., and Stone, D. S. (2010). *Investigating deformation in HDPE-Wood flour composites using uniaxial tension and nanoindentation experiments*. 10th International conference on wood and biofiber plastic composites and cellulose nanocomposites symposium.
- Ji, B. and Gao, H. (2004). Mechanical properties of nanostructure of biological materials. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 52:1963-1990.
- Jiang, W., Su, J. J. and Feng, X. Q. (2008). Effect of surface roughness on nanoindentation test of thin films. *Engineering Fracture Mechanics*, 75:4965-4972.
- Junqueira, L. C. and Carneiro, J. (1989). *Basic Histology*. Prentice-Hall, NewYork.

- Jutley, R. S., Watson, M. A., Shepherd, D. E. T., & Hukins, D. W. L. (2002). Finite element analysis of stress around a sternum screw used to prevent sternal dehiscence after heart surgery. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 216(5):315-321.
- Katz, J. L. and Bronzino, J. D. (2000). *The Biomedical Engineering Handbook*. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC, second edition.
- Katz, J. L. and Ukraincik, K. (1971). On the anisotropic elastic properties of hydroxyapatite. *J. Biomech.*, 4:221-227.
- Kim, J., Kang, S., Lee, J., Lee, Y. and Kwon, D. (2007). Influence of surface roughness on indentation size effect. *Acta Materialia*, 55:3555-3562.
- Klapperich, C., Komvopoulos, K. and Pruitt, L. (2001). Nanomechanical properties of polymers determined from nanoindentation experiments. *J. Tribol. Trans. ASME*, 123:624-631.
- Knets, I. and Malmeisters, A. (1977). *Deformability and strength of human compact bone tissue*. Bulgarian Academy of Sciences, Sofia.
- Ko, R (1953). The tension test upon the compact substance of the long bones of human extremities. *J. Kyoto Med. Univ.*, 53:503-525.
- Kuhn-Spearing, L., Rey, C., Kim, H. M., and Glimcher, M. J. (1996). Synthesis and processing of nanocrystalline powder. In: Bourell DL, editor. *The Minerals, Metals and Materials Society*, Warrendale, PA, USA.
- Kulin, R. M., Jaing, F., and Vecchio, K. S. (2008). Aging and loading rate effects on the mechanical behavior of equine bone. *JOM*, 60(6):39-44.
- Kulin, R. M., Jiang, F., and Vecchio, K. S. (2011). Effects of age and loading rate on equine cortical bone failure. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(1):57-75.
- Landis, W. J. (1995). The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone*, 16:533-544.
- Landis, W. J., Song, M. J., Leith, A., McEwen, L., and McEwen, B. F. (1993). Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tissue visualized in three dimensions by high voltage electron microscopic tomography and graphic image reconstruction. *J. Struct. Biol.*, 110:39-54.
- Lang, S. B. (1969). Elastic coefficients of animal bone. *Science*, 165:287-288.
- Lau, M. L., Lau, K. T., Yao-Yeo, Y. D., Au-Yeung, C. T. and Lee, J. H. (2010). Measurement of bovine bone properties through surface indentation technique. *Materials and Manufacturing Processes*, 25(5):324-328.

- Linde, F. and Sorensen, H.C.F (1993). The effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. *J. Biomech.*, 26:1249-1252.
- Lucas, G. L., Cooke, F. W., and Friis, E. A. (1999). *A primer on biomechanics*. Springer, New York.
- Lucchini, R., Carnelli, D., Ponzoni, M., Bertarelli, E., Gastaldi, D., and Vena, P. (2011). Role of damage mechanics in nanoindentation of lamellar bone at multiple sizes: Experiments and numerical modeling. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(8):1852-1863.
- Lucksanasombool, P., Higgs, W. A. J., Higgs, R. J. E. D. and Swain, M. V. (2003). Interfacial fracture toughness between bovine cortical bone and cements. *Biomater.*, 24:1159-66.
- Manilay, Z., Novitskaya, E., Sadovnikov, E., and McKittrick, J. (2012). A comparative study of young and mature bovine cortical bone. *Acta Biomaterialia*, DOI: 10.1016/j.actbio.2012.08.040.
- Marotti, G. (1993). A new theory of bone lamellation. *Calcif. Tissue Int.*, 53:547-556.
- Marotti, G. (1996). The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. *Arch. Ital. Anat. Embryol.*, 101:25-79.
- Marotti, G. and Muglia, M. A. (1988). A scanning electron microscope study of human bone lamellae. Proposal for a new model of collagen lamellar organization. *Arch. Ital. Anat. Embryol.*, 93:163-175.
- Martin, R. B. and Burr, D. B. (1998). *Skeletal Tissue Mechanics*. Springer-Verlag, New York.
- McElhaney, J. H. (1966). Dynamic response of bone and muscle tissue. *J. Appl. Physiol.*, 21:1231-1236.
- McElhaney, J. H., and Byars, E. F. (1965). Dynamic response of biological materials. *ASME*, 65-WA-HUF-9:1-8.
- McElhaney, J. H., Fogle, J., Byars, E. and Weaver, G. (1964). Effect of embalming on the mechanical properties of beef bone. *J. Appl. Physiol.*, 19:1234-6.
- Mehta, S. S. (1995). *Analysis of the mechanical properties of bone material using nondestructive ultrasound reflectometry*. Ph.D. Dissertation, The University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX, USA.
- Mencik, J. and Swain, M. V. (1995). Error associated with depth sensing micro-indentation. *J. Mater. Res.*, 10:1491.
- Meyers, M. A., Chen, P., Yu-Min Lin, A., and Seki, Y. (2008). Biological materials: Structure and mechanical properties. *Progress Mater. Sci.*, 53:1-206.
- Neville, A. C. (1993). *Biology of fibrous composites: development beyond the cell membrane*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Ni, W., Cheng, Y., Cheng, C. and Grummon, D. (2004). An energy based method for analyzing instrumented spherical indentation experiments. *Journal of Materials Research*, 19(1):149-157.
- Novitskaya, E., Chen, P. Y., Lee, S., Castro-Ceseña, A., Hirata, G., Lubarda, V. A., and McKittrick, J. (2011). Anisotropy in the compressive mechanical properties of bovine cortical bone and the mineral and protein constituents. *Acta Biomaterialia*, 7(8):3170-3177.
- Oliver, W. C. and Pharr, G. M. (1992). An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J. Mater. Res.*, 7:1564–1583.
- Oliver, W. C. and Pharr, G. M. (2004). Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. *Journal of Materials Research*, 19(1):3-20.
- Oyen, M. L. (2006). Nanoindentation hardness of mineralized tissues. *Journal of Biomechanics*, 39:2699–2702.
- Pani, C. (2011). *Caratterizzazione dell'osso corticale immaturo e studio di una placca in materiale composito*, tesi di dottorato di ricerca in ingegneria industriale, Università degli studi di Cagliari.
- Pidaparti, R. M. V., Chandran, A., Takano, Y., and Turner, C. H. (1996). Bone mineral lies mainly outside of collagen fibrils. predictions of a composite model for osteonal bone. *J. Biomech.*, 29:909–916.
- Pithioux, M., Subit, D., and Chabrand, P. (2004). Comparison of compact bone failure under two different loading rates: experimental and modelling approaches. *Med. Eng. Phys.*, 26:647–653.
- Qasmi, M., and Delobelle, P. (2006). Influence of the average roughness rms on the precision of the young's modulus and hardness determination using nanoindentation technique with a berkovich indenter. *Surface and Coatings Technology*, 201(3-4):1191-1199.
- Reilly, D. T. and Burstein, A. H. (1974). The mechanical properties of cortical bone. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 56:1001–1022.
- Reilly, D. T. and Burstein, A. H. (1975). The elastic and ultimate properties of compact bone tissue. *J. Biomech.*, 6:393–396.
- Reilly, D. T., Burstein, A. H. and Frankel, V. H. (1974). The elastic modulus for bone. *J. Biomech.*, 7:271–275.
- Rho, J. Y. (1991). *Mechanical properties of human cortical and cancellous bone*. Ph.D. Dissertation, The University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX, USA.

- Rho, J. Y. and Pharr, G. M. (1999). Effects of drying on the mechanical properties of bovine femur measured by nanoindentation. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 10:485–488.
- Rho, J. Y., Currey, J. D., Zioupos, P., and Pharr, G. M. (2001a). The anisotropic Young's modulus of equine secondary osteons and interstitial bone determined by nanoindentation. *J. Exp. Biol.*, 204:1775–1781.
- Rho, J. Y., Hobatho, M. C., and Ashman, R. B. (1995). Relations of density and ct numbers to mechanical properties for human cortical and cancellous bone. *Med. Eng. Phys.*, 17:347–355.
- Rho, J. Y., Kuhn-Spearing, L., and Zioupos, P. (1998). Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med. Eng. Phys.*, 18:1325–1330.
- Rho, J. Y., Mishra, S. R., Chung, K., Bai, J., and Pharr, G. M. (2001b). Relationship between ultrastructure and the nanoindentation properties of intramuscular herring bones. *Annals Biomed. Eng.*, 29:1082–1088.
- Rho, J. Y., Roy, M. E., Tsui, T. Y., and Pharr, G. M. (1999a). Elastic properties of microstructural components of human bone tissue as measured by nanoindentation. *J. Biomed. Mater. Res.*, 45:48–54.
- Rho, J. Y., Tsui, T. Y., and Pharr, G. M. (1997). Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomater.*, 18:1325–1330.
- Rho, J. Y., Zioupos, P., Currey, J. D., and Pharr, G. M. (1999b). Variations in the individual thick lamellar properties within osteons by nanoindentation. *Bone*, 25(3):295–300.
- Rho, J. Y., Zioupos, P., Currey, J. D., and Pharr, G. M. (2002). Microstructural elasticity and regional heterogeneity in human femoral bone of various ages examined by nano-indentation. *J. Biomech.*, 35:189–198.
- Robertson, D. M., and Smith, D. C. (1978). Compressive strength of mandibular bone as a function of microstructure and strain rate, *J. Biomech.*, 11:455–471.
- Roy, M. E., Rho, J., Tsui, T. Y., Evans, N. D., and Pharr, G. M. (1999). Mechanical and morphological variation of the human lumbar vertebral cortical and trabecular bone. *J. Biomed. Mater. Res.*, 44:191–197.
- Saha, S., and Hayes, W. C. (1974). Instrumented tensile impact tests of bone, *Exp. Mech.*, 14:473–478.
- Saha, S., and Hayes, W. C. (1976). Tensile impact properties of human compact bone, *J. Biomech.*, 9:243–251.
- Seto, J., Gupta, H. S., Zaslansky, P., Wagner, H. D., and Fratzl, P. (2008). Tough lessons from bone: extreme mechanical anisotropy at the mesoscale. *Adv. Funct. Mater.*, 18:1905–1911.
- Sevostianov, I. and Kachanov, M. (2000). Impact of the porous microstructure on the overall elastic properties of the osteonal cortical bone. *J. Biomech.*, 33:881–888.

- Simkin, A. and Robin, G. (1973). The mechanical testing of bone in bending. *J. Biomech.*, 6(1):31–39.
- Sneddon, I. N. (1965). The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *Int. J. Engng. Sci.*, 3:47–57.
- Swadener, J. G. and Pharr, G. M. (2001). Indentation of elastically anisotropic half-spaces by cones and parabolas of revolution. *Phil. Mag. A*, 81:447–466.
- Swadener, J. G., Rho, J. Y. and Pharr, G. M. (2001). Effects of anisotropy on elastic moduli measured by nanoindentation in human tibial cortical bone. *Journal of Biomedical Materials Research*, 57:108–112.
- Szabò, M. E., Taylor, M. and Thurner, P. J. (2011). Mechanical properties of single bovine trabeculae are unaffected by strain rate. *J. Biomech.*, 44(5):962-967.
- Tai, K., and Ortiz, C. (2006). *Positionally specific nanoindentation of adult bovine tibial cortical bone of varying mineral contents at the length scale of individual collagen fibrils*. 52nd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Paper No:1773.
- Tai, K., Qi, H. J., and Ortiz, C. (2005). Effect of mineral content on the nanoindentation properties and nanoscale deformation mechanisms of bovine tibial cortical bone. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 16(10):947–959.
- Tang, B., Ngan, A. H., and Lu, W. W. (2007). An improved method for the measurement of mechanical properties of bone by nanoindentation. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 18:1875–1881.
- Turner, C. H. and Burr, D. B. (1997). Orientation of collagen in osteonal bone. *Calcif. Tissue Int.*, 60:90-98.
- Turner, C. H., Chandran, A., and Pidaparti, R. (1995). The anisotropy of osteonal bone and its implications. *Bone*, 17:85–89.
- Turner, C. H., Rho, J., Takano, Y., Tsui, T. Y., and Pharr, G. M. (1999). The elastic properties of trabecular and cortical bone tissues are similar: results from two microscopic measurements techniques. *J. Biomech.*, 32:437–441.
- Ulm, F. J., Vandamme, M., Bobko, C., Ortega, J. A., Tai, K., and Ortiz, C. (2007). Statistical indentation techniques for hydrated nanocomposites: concrete, bone and shale. *J. Am. Cer. Soc.*, 90:2677–2692.
- Van Buskirk, W. C., Cowin, S. C., and Ward, R. N. (1981). Ultrasonic measurement of orthotropic elastic constants of bovine femoral bone. *ASME J. Biomech. Eng.*, 103:67–71.
- VanLandingham, M. R. (2003). Review of instrumented indentation. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.*, 108(4):249-265.

- Viguet-Carrin, S., Farlay, D., Bala, Y., Munoz, F., Boussein, M. L., and Delmas, P. D. (2008). An in vitro model to test the contribution of advanced glycation end products to bone biomechanical properties. *Bone*, 42(1):139-149.
- Wagermaier, W., Gupta, H. S., Gourrier, A., Burghammer, M., Roschger, P., and Fratzl, P. (2006). Spiral twisting of fiber orientation inside bone lamellae. *Biointerph.*, 1(1):1-5.
- Wagermaier, W., Gupta, H. S., Gourrier, A., Paris, O., Roschger, P., Burghammer, M., Riekel, C., and Fratzl, P. (2007). Scanning texture analysis of lamellar bone using microbeam synchrotron x-ray radiation. *J. Appl. Crystallogr.*, 40:11520.
- Wagner, H. D. and Weiner, S. (1992). On the relationship between the microstructure of bone and its mechanical stiffness. *J. Biomech.*, 25:1311-1320.
- Wainwright, S., Briggs, W., Currey, J. D. and Gosline, J. (1982). *Mechanical design in organisms*. Princeton University Press.
- Wang, X. J., Chen, X. B., Hodgson, P. D., and Wen, C. E. (2006). Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bovine bone measured by nanoindentation. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)*, 16(SUPPL.):s744-s748.
- Weiner, S. and Addadi, L. (1997). Design strategies in mineralized biological materials. *J. Mater. Chem.*, 7:689-702.
- Weiner, S. and Traub, W. (1992). Bone structure: from angstroms to microns. *FASEB J.*, 6:879-885.
- Weiner, S. and Wagner, H. D. (1998). The material bone: Structure mechanical function relations. *Annu. Rev. Mater. Sci.*, 28:271-298.
- Weiner, S., Addadi, L., and Wagner, H. D. (2000). Materials design in biology. *Mater. Sci. Eng. C*, 11:1-8.
- Weiner, S., Arad, T., and Traub, W. (1991). Crystal organization in rat bone lamellae. *FEBS Lett.*, 285:49-54.
- Weiner, S., Arad, T., Sabanay, I., and Traub, W. (1997). Rotated plywood structure of primary lamellar bone in the rat: orientations of the collagen fibril arrays. *Bone*, 20:509-514.
- Weiner, S., Traub, W., and Wagner, H. (1999). Lamellar bone: structure-function relations. *J. Struct. Biol.*, 126:241-255.
- Wright, T. M., and Hayes, W. C. (1976). Tensile testing of bone over a wide range of strain rates: effects of strain rate, microstructure and density, *Med. Biol. Eng.*, 14:671-680.
- Wu, Z., Baker, T. A., Ovaert, T. C., and Niebur, G. L. (2011). The effect of holding time on nanoindentation measurements of creep in bone. *J. Biomech.*, 44(6):1066-1072.

- Xu, J., Rho, J., Mishra, S. R., and Fan, Z. (2003). Atomic force microscopy and nanoindentation characterization of human lamellar bone prepared by microtome sectioning and mechanical polishing technique. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 67A:719–726.
- Yoon, H. S. and Katz, J. L. (1976a). Ultrasonic wave propagation in human cortical bone. I. theoretical considerations of hexagonal symmetry. *J. Biomech.*, 9:407–412.
- Yoon, H. S. and Katz, J. L. (1976b). Ultrasonic wave propagation in human cortical bone. II. measurements of elastic properties and microhardness. *J. Biomech.*, 9:459–464.
- Yu, B., Zhao, G. F., Lim, J. I., and Lee, Y. K. (2011). Compressive mechanical properties of bovine cortical bone under varied loading rates. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 225(10):941-947.
- Zebaze, R. M. D., Jones, A. C., Pandey, M. G., Knackstedt, M. A. and Seeman, E. (2011). Differences in the degree of bone tissue mineralization account for little of the differences in tissue elastic properties. *Bone*, 48:1246–1251.
- Zhang, J., Niebur, G. L. and Ovaert, T. C. (2008). Mechanical property determination of bone through nano- and micro-indentation testing and finite element simulation. *Journal of Biomechanics*: 41(2):267–275.
- Zhang, T. and Xu, W. (2002). Surface effects on nanoindentation. *Journal of Materials Research*, 17(7):1715-1720.
- Ziv, V. and Weiner, S. (1994). Bone crystal size: a comparison of transmission electron microscopic and x-ray diffraction line-width-broadening techniques. *Conn. Tissue. Res.*, 30:165–175.
- Ziv, V., Sabanay, I., Arad, T., Traub, W., and Weiner, S. (1996a). Transitional structures in lamellar bone. *Microsc. Res. Tech.*, 33:203–213.
- Ziv, V., Wagner, H. D., and Weiner, S. (1996b). Microstructure-microhardness relations in parallel-fibered and lamellar bone. *Bone*, 18:417–428.
- Zysset, P. K., Guo, X. E., Hoffler, C. E., Moore, K. E., and Goldstein, S. A. (1999). Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur. *J. Biomech.*, 32:1005–1012.

Appendice

```
function Nanotest

% DESCRIZIONE: questo .m file è ideato per la correzione delle curve non
% trattate P-h ottenute dai test di nanoindentazione, dove tipicamente il primo
% set di punti sperimentali è affetto dal contatto tra indenter e campione,
% fornendo valori di h fuorvianti durante l'esperimento.

% NOTE: si possono utilizzare delta-h normalizzato e la pendenza per effettuare
% una calibrazione della procedura di filtraggio a seconda dello specifico set
% di esperimenti da processare.

-----

%% CELL 00: Reset
clear all;
close all;
clc;

-----

%% CELL 01: import tutti I dati sperimentali nella matrice D
directoryname = pwd;

%D=dlmread([directoryname,'\DATA\Nano1.txt'],'');
%D=dlmread([directoryname,'\DATA\Nano2.txt'],'');
%D=dlmread([directoryname,'\DATA\Nano3.txt'],'');
%D=dlmread([directoryname,'\DATA\Nano4.txt'],'');
%D=dlmread([directoryname,'\DATA\Nano5.txt'],'');
D=dlmread([directoryname,'\DATA\Nano6.txt'],'');

[n,m]=size(D);

-----

%% CELL 02: Divido D in ringole prove, valuto delta-h e la pendenza e filtro le
% curve non trattate P-h

% identifico l'inizio e la fine di ogni esperimento scansionando la Colonna dei
% tempi
k=1;
for i=1:n
    if D(i,m)==0
        count(k)=i;
        k=k+1;
    end
end

count(k)=n+1;
count=count';

% La lunghezza di count permette di calcolare il numero di campioni
n_sample=length(count)-1;

% Definisco il numero di misure usato per valutare il trend della pendenza delle
% curve P-h
ensemble=10;
% Correzione dei valori di h con la compliance C (2 valori differenti per le 2
% punte utilizzate)
```

```

%compliance1serie=0.710388721;
compliance2serie=0.5196;
%Hnew=D(:,2)-compliance1serie*D(:,1);
Hnew=D(:,2)-compliance2serie*D(:,1);
D(:,2)=Hnew;

%% Importo e filtro ogni curva
for i=1:n_sample
    P=D((count(i):(count(i+1)-1),1);
    H=D((count(i):(count(i+1)-1),2);
    T=D((count(i):(count(i+1)-1),3);
    % Calcolo la mediana della distribuzione di delta-h
    deltaH=abs(H(2:end)-H(1:end-1));
    deltaH_med(i)=median(deltaH);
    % Calcolo il trend della pendenza lungo la curva non trattata P-h
    for j=1:(length(P)-ensemble)
        LinFit=polyfit(H(j:j+ensemble),P(j:j+ensemble),1);
        slope(j)=LinFit(1);
        offset(j)=LinFit(2);
    end
    slope=slope';
    slope_med(i)=median(slope);

% ALGORITMO DI FILTRAGGIO
    for k=1:length(slope)
        % se H(k) è troppo lontano da H(k+1) NON è il nostro punto di partenza;
        % se H(k) è molto vicino a H(k+1), POTREBBE ESSERE il nostro punto di
        % partenza;
        % se H(k) è molto vicino a H(k+1), ma la sua pendenza è trascurabile,
        % NON è il nostro punto di partenza.
        if (abs(deltaH(k)/deltaH_med(i))<1.08 &&
            abs(slope(k)/max(slope))>0.02)
            break;
        end
    end

% Fitting ad H0
% y=slope(x-H0)
% y=P(k)
% x=H(k)
% ==>H0=H(k)-P(k)/slope

% H0 è un vettore che contiene tutti i singoli valori di H0 (uno per sito di
% indentazione)
pos(1,i)=k;
Hs(1,i)=H(k);
Ps(1,i)=P(k);
H0(1,i)=H(k)-P(k)/slope(k);

% Grafico delle curve filtrate
figure();
hold on;
plot(H,P,'b.',H,P,'b',H(k),P(k),'ro',[H0(1,i);(H(k:end)-
    H0(1,i))],[0;P(k:end)],'r. ');
legend('Raw PH','Start Point','Filtered PH','Location','NorthWest');
xlabel('Depth: H [nm]');
ylabel('Load: P [mN]');
grid on;

% Correzione manuale nel caso la procedura automatica non sia efficace

```

```

% Apre una finestra di dialogo in cui si può scegliere se effettuare una
% selezione manuale del punto h0

choice=questdlg(['E' il punto corretto? Se non lo è, ',...
'selezionare due punti nel tratto lineare iniziale per eseguire '...
'un'interpolazione lineare e reimpostare le curve correttamente.'],...
'PH correction', ...
'Sì','No','Sì');

switch choice
case 'Sì'
    %%H0(1,i)=H0(1,i);
case 'No'
    [HX,PY]=ginput(2);
    Hs(1,i)=HX(1);
    Ps(1,i)=PY(1);
    H0(1,i)=HX(2);

    yy=1;
    distanza=2364532764;
    for yy=1:(counterparziale(1,i)-1)
        if P(yy)<0.2
            distanzatemp=abs(P(yy)-Ps(1,i));
            if distanzatemp<distanza
                distanza=distanzatemp;
                posmin=yy;
            end
        end
    end
    pos(1,i)=posmin;

    % Grafico correzione manuale
    figure();
    hold on;
    plot(H,P,'b.',HX(1),PY(1),'ro',[H0(1,i);(H(posmin:end)-H0(1,i))],
        [0;P(posmin:end)],'r. ');
    legend('Raw PH','Start Point','Filtered PH','Location',
        'NorthWest');
    xlabel('Depth: H [nm]');
    ylabel('Load: P [mN]');
    grid on;
end
end

close all;

-----
%% CELL 03: Identifico il punto d'inizio di ogni scarico
% Uno scarico inizia quando la differenza di tempo tra due righe consecutive è
% >1 secondo

% La posizione di start 't+1' di ogni scarico è salvata in 'counter(j) '

for i=1:n_sample
    j=1;
    for t=(count(i):(count(i+1)-2))
        if (D(t+1,3)-D(t,3)>1)
            counter(j,i)=t+1;
            j=j+1;
        end
    end
end
end

```

```

counter(j,i)=n+1; %% fine ultimo scarico
[a,b]=size(counter);
n_unloading=a-1;
jj=1;
treno=4;
for t=(count(i):(count(i+1)-1-treno))

if t<counter((n_unloading-1),i)
    if ( t>=counter(jj,i) && D(t,1)<D(t+treno,1)) %
        counterP(jj,i)=t; %% detector della fine dello scarico
        jj=jj+1;
    end
end
    if (t>=counter((n_unloading-1),i) && D(t+1,3)-D(t,3)>1)
        counterP(jj,i)=t;
        jj=jj+1;
    end
end

% Per ogni scarico di ogni singola curva Ph sono costruiti I vettori Pu, Hu,
% Tu, dove sono contenuti carichi, spostamenti e tempi degli scarichi
% Su è la pendenza dello scarico calcolata tra 95%Pmax e 40%Pmax (rigidezza
% di contatto iniziale in fase di scarico

beta=1.034;
set=1;

for count_unloading=1:n_unloading-1
    tt=1;
    start_unloading=counter(count_unloading,i);
    finish_unloading=counterP(count_unloading,i);
    Pu=D(start_unloading:finish_unloading,1);
    Hu=D(start_unloading:finish_unloading,2)-H0(1,i);

    Pu95=0.95*abs(D(start_unloading,1));
    Pu49=0.50*abs(D(start_unloading,1));
    Matrice(count_unloading,1)=Pu50;
    Matrice(count_unloading,2)=Pu95;
    for cc=1:length(Pu)
        if Pu(cc)>Pu50
            if Pu(cc)<Pu95
                Ptemp(tt)=Pu(cc);
                Htemp(tt)=Hu(cc);
                tt=tt+1;
            end
        end
    end
end

% ELABORAZIONE SECONDO LA TEORIA DI OLIVER-PHARR
% Calcolo Hc, Area, Hardness, E*

Linear=polyfit(Htemp(1:(tt-1)),Ptemp(1:(tt-1)),1);
Su(count_unloading,i)=abs(Linear(1));
Hmax(count_unloading,i)=Hu(1);
Pmax(count_unloading,i)=Pu(1);
Q=2*(3.141592-2)/3.141592;
Hc(count_unloading,i)=Hmax(count_unloading,i)-
    (Q*Pmax(count_unloading,i))/
    Su(count_unloading,i);

```

```

% Coefficienti DAF

%DAF frazionaria 5 mesi
%serie1B1=14.42;%Hc2
%serie1B2=64894.17; %Hc
%serie1B3=-7713665.07; %Hc1/2
%serie1B4=103276303.83; %Hc1/4
%serie1B5=-298473177.13;%Hc1/8
%serie1B6=206388152.20;%Hc1/16

%DAF frazionaria 48h
%serie2B1=40.1488073357193;%Hc2
%serie2B2=-79187.1082343527; %Hc
%serie2B3=8543718.97209523; %Hc1/2
%serie2B4=-104035056.242714; %Hc1/4
%serie2B5=286194591.149735;%Hc1/8
%serie2B6=-193007418.77916;%Hc1/16

%DAF polinomiale 48h
serie2B1=2895.56451781956;%Hc1
serie2B2=24.5867215962817; %Hc2
serie2B3=-0.00364396838695758; %Hc3
serie2B4=3.30742133484202E-06; %Hc4

% Area frazionaria 5mesi
% A(count_unloading,i)=serie1B1*((Hc(count_unloading,i))^2)+
    serie1B2*(Hc(count_unloading,i))+
    serie1B3*((Hc(count_unloading,i))^(1/2))+
    serie1B4*((Hc(count_unloading,i))^(1/4))+
    serie1B5*((Hc(count_unloading,i))^(1/8))+
    serie1B6*((Hc(count_unloading,i))^(1/16));

% Area frazionaria 48h
% A(count_unloading,i)=serie2B1*((Hc(count_unloading,i))^2)+
    serie2B2*(Hc(count_unloading,i))+
    serie2B3*((Hc(count_unloading,i))^(1/2))+
    serie2B4*((Hc(count_unloading,i))^(1/4))+
    serie2B5*((Hc(count_unloading,i))^(1/8))+
    serie2B6*((Hc(count_unloading,i))^(1/16));

% Area polinomiale 48h
A(count_unloading,i)=serie2B1*((Hc(count_unloading,i))^1)+
    serie2B2*((Hc(count_unloading,i))^2)+
    serie2B3*((Hc(count_unloading,i))^3)+
    serie2B4*((Hc(count_unloading,i))^4);

Hardness(count_unloading,i)=Pmax(count_unloading,i)/A(count_unloading,i)
    *10^6;% [GPa]
E_reduced(count_unloading,i)=(Su(count_unloading,i)/(2*beta))*
    (sqrt(3.141592/A(count_unloading,i)))*10^6;
    % [GPa]

end
end

-----
%% CELL 04: Stampa a schermo risultati (grafici e valori)

% stampa numero curve e numero scarichi per ogni provino testato
Number_of_samples=n_sample
Number_of_unloadings_in_each_sample=n_unloading

```

```
% vettori e matrici per controllare la corretta implementazione
% le matrici sono nella forma (n_unloading x n_sample)
```

```
% Vector_of_H0_for_Hmax_traslation=H0
% Matrix_of_Pmax=Pmax
% Matrix_of_Hmax_not_corrected=Hmax_not_corrected
% Matrix_of_Hmax=Hmax
% Matrix_of_S=Su
% Matrix_of_E_reduced=E_reduced
% Vector_of_E_reduced_mean_in_the_same_sample=mean(E_reduced)
% Vector_of_E_reduced_mean_at_the_same_Pmax=mean(E_reduced,2)
% Vector_of_E_reduced_mean_in_the_same_sample=mean(E_reduced)
% Vector_of_E_reduced_mean_at_the_same_Pmax=mean(E_reduced,2)
```

```
% Grafico unico con tutte le curve P-h del provino
```

```
figure();
hold on;
for i=1:n_sample
    P=[];
    H=[];
    T=[];
    P=D((count(i):(count(i+1)-1),1);
    H=D((count(i):(count(i+1)-1),2);
    T=D((count(i):(count(i+1)-1),3);
    H_ok=H-H0(1,i);
    plot(H_ok(pos(1,i):end),P(pos(1,i):end),'r. ');
    legend('All PH curves','Location','NorthWest');
    xlabel('Depth: H [nm]');
    ylabel('Load: P [mN]');
    grid on;
end
```

```
-----
%% CELL 05: Esportazione dati in Excel
% Scrive un nuovo file excel con Su, Pmax, Hmax, H0, A, E* e Hardness calcolati
```

```
%% NANO1
% xlswrite('Ax-indentation2_14052012.xls',Su,1,'a1');
% xlswrite('Ax-indentation2_14052012.xls',Pmax,1,'a12');
% xlswrite('Ax-indentation2_14052012.xls',Hmax,1,'a23');
% xlswrite('Ax-indentation2_14052012.xls',H0,1,'a34');
% xlswrite('Ax-indentation2_14052012.xls',Hardness,2,'a1');
% xlswrite('Ax-indentation2_14052012.xls',E_reduced,2,'a12');
% xlswrite('Ax-indentation2_14052012.xls',Hc,3,'a1');
% xlswrite('Ax-indentation2_14052012.xls',A,3,'a12');
```

```
%% NANO2
% xlswrite('BONE_16052012_indentation.xls',Su,1,'a1');
% xlswrite('BONE_16052012_indentation.xls',Pmax,1,'a12');
% xlswrite('BONE_16052012_indentation.xls',Hmax,1,'a23');
% xlswrite('BONE_16052012_indentation.xls',H0,1,'a34');
% xlswrite('BONE_16052012_indentation.xls',Hardness,2,'a1');
% xlswrite('BONE_16052012_indentation.xls',E_reduced,2,'a12');
% xlswrite('BONE_16052012_indentation.xls',Hc,3,'a1');
% xlswrite('BONE_16052012_indentation.xls',A,3,'a12');
```

```
%% NANO3
% xlswrite('18xmultiload_0p2tolp6mNx8_LA_imag2.xls',Su,1,'a1');
% xlswrite('18xmultiload_0p2tolp6mNx8_LA_imag2.xls',Pmax,1,'a12');
% xlswrite('18xmultiload_0p2tolp6mNx8_LA_imag2.xls',Hmax,1,'a23');
```

```

% xlswrite('18xmultiload_0p2tolp6mNx8_LA_imag2.xls',H0,1,'a34');
% xlswrite('18xmultiload_0p2tolp6mNx8_LA_imag2.xls',Hardness,2,'a1');
% xlswrite('18xmultiload_0p2tolp6mNx8_LA_imag2.xls',E_reduced,2,'a12');
% xlswrite('18xmultiload_0p2tolp6mNx8_LA_imag2.xls',Hc,3,'a1');
% xlswrite('18xmultiload_0p2tolp6mNx8_LA_imag2.xls',A,3,'a12');

%% NANO4
% xlswrite('18xmultiload_0p2tolp6mNx8_TB_imag1.xls',Su,1,'a1');
% xlswrite('18xmultiload_0p2tolp6mNx8_TB_imag1.xls',Pmax,1,'a12');
% xlswrite('18xmultiload_0p2tolp6mNx8_TB_imag1.xls',Hmax,1,'a23');
% xlswrite('18xmultiload_0p2tolp6mNx8_TB_imag1.xls',H0,1,'a34');
% xlswrite('18xmultiload_0p2tolp6mNx8_TB_imag1.xls',Hardness,2,'a1');
% xlswrite('18xmultiload_0p2tolp6mNx8_TB_imag1.xls',E_reduced,2,'a12');
% xlswrite('18xmultiload_0p2tolp6mNx8_TB_imag1.xls',Hc,3,'a1');
% xlswrite('18xmultiload_0p2tolp6mNx8_TB_imag1.xls',A,3,'a12');

%% NANO5
% xlswrite('34xmultiload_0p2tolp6mNx8_TB_imag3.xls',Su,1,'a1');
% xlswrite('34xmultiload_0p2tolp6mNx8_TB_imag3.xls',Pmax,1,'a12');
% xlswrite('34xmultiload_0p2tolp6mNx8_TB_imag3.xls',Hmax,1,'a23');
% xlswrite('34xmultiload_0p2tolp6mNx8_TB_imag3.xls',H0,1,'a34');
% xlswrite('34xmultiload_0p2tolp6mNx8_TB_imag3.xls',Hardness,2,'a1');
% xlswrite('34xmultiload_0p2tolp6mNx8_TB_imag3.xls',E_reduced,2,'a12');
% xlswrite('34xmultiload_0p2tolp6mNx8_TB_imag3.xls',Hc,3,'a1');
% xlswrite('34xmultiload_0p2tolp6mNx8_TB_imag3.xls',A,3,'a12');

%% NANO6
xlswrite('24xmultiload_0p2tolp6mNx8_LB_imag1.xls',Su,1,'a1');
xlswrite('24xmultiload_0p2tolp6mNx8_LB_imag1.xls',Pmax,1,'a12');
xlswrite('24xmultiload_0p2tolp6mNx8_LB_imag1.xls',Hmax,1,'a23');
xlswrite('24xmultiload_0p2tolp6mNx8_LB_imag1.xls',H0,1,'a34');
xlswrite('24xmultiload_0p2tolp6mNx8_LB_imag1.xls',Hardness,2,'a1');
xlswrite('24xmultiload_0p2tolp6mNx8_LB_imag1.xls',E_reduced,2,'a12');
xlswrite('24xmultiload_0p2tolp6mNx8_LB_imag1.xls',Hc,3,'a1');
xlswrite('24xmultiload_0p2tolp6mNx8_LB_imag1.xls',A,3,'a12');

```

```

function Roughness

% DESCRIZIONE: questo .m file è ideato per la correzione dell'inclinazione
% della superficie, per la visualizzazione dei singoli spot su di essa
% e la valutazione della rugosità media totale o in un intorno dello spot

-----

%% CELL 00: Reset
clear all;
close all;
clc;

-----

%% CELL 01: Importazione delle curve sperimentali nella matrice D

directoryname = pwd;

D=dlmread([directoryname, '\IMMAGINI\Nano1.txt'], '');
%D=dlmread([directoryname, '\IMMAGINI\Nano2.txt'], '');
%D=dlmread([directoryname, '\IMMAGINI\Nano3.txt'], '');
%D=dlmread([directoryname, '\IMMAGINI\Nano4.txt'], '');
%D=dlmread([directoryname, '\IMMAGINI\Nano5.txt'], '');
%D=dlmread([directoryname, '\IMMAGINI\Nano6.txt'], '');

[n,m]=size(D);

-----

%% CELL 02: Importazione delle coordinate delle immagini nella matrice C

directoryname = pwd;

C=dlmread([directoryname, '\COORDINATE\Nano1.txt'], '');
%C=dlmread([directoryname, '\COORDINATE\Nano2.txt'], '');
%C=dlmread([directoryname, '\COORDINATE\Nano3.txt'], '');
%C=dlmread([directoryname, '\COORDINATE\Nano4.txt'], '');
%C=dlmread([directoryname, '\COORDINATE\Nano5.txt'], '');
%C=dlmread([directoryname, '\COORDINATE\Nano6.txt'], '');

[r,c]=size(C);

-----

%% CELL 03: Separazione delle varie colonne da D

% Ricerca dei punti di inizio e fine delle varie colonne
count(1)=1;
k=2;
for i=2:n-1
    if D(i+1,2)-D(i,2)<(-10)
        count(k)=i+1;
        k=k+1;
    end
end

count(k)=n+1;
n_column=length(count)-1;

for j=1:n_column
    X=D((count(j)):(count(j+1)-1),1);
    Y=D((count(j)):(count(j+1)-1),2);
    Z=D((count(j)):(count(j+1)-1),3);

```

```

n_row=length(X);
for t=1:n_row
    Xtot(t,j)=X(t);
    Ytot(t,j)=-Y(t);
    Ztot(t,j)=Z(t);
end
end

```

```

n_colonne=n_column
n_righe=n_row

```

```

%% CELL 04: Ricerca delle coordinate delle nanoindentazioni in D

```

```

for jj=1:r
    if C(jj,2)>0
        C_n(jj,1)=C(jj,1);
        C_n(jj,2)=C(jj,2);
    end
end

```

```

for jj=1:r
    if C(jj,2)>0
        for j=1:n_column
            for t=1:n_row
                if C(jj,2)==Xtot(t,j)
                    if -C(jj,1)==Ytot(t,j)
                        C_n(jj,1)=C(jj,1);
                        C_n(jj,2)=C(jj,2);
                        startpoint(jj,1)=t;
                        startpoint(jj,2)=j;
                        startcoo(jj,1)=Ytot(t,j);
                        startcoo(jj,2)=Xtot(t,j);
                    end
                end
            end
        end
    end
end
end

```

```

[w,ww]=size(C_n);

```

```

%% CELL 05: Procedura di Tilt

```

```

a=figure;
hold on;
mesh(Xtot,Ytot,Ztot);

```

```

%Finestra di dialogo per la procedura di Tilt

```

```

choice=questdlg(['Vuoi eseguire la procedura di Tilt?',...
    ' Scegli 3 punti sulla superficie'...
    'Yes','No','Yes']);
% Handle response
switch choice
    case 'Yes'
        dcm_obj2 = datacursormode(a);
        set(dcm_obj2,'DisplayStyle','datatip',...
            'SnapToDataVertex','off','Enable','on');

```

```

pos=[];
for i=1:3
    pause
    event_obj2 = getCursorInfo(dcm_obj2);
    pos(i,:) = event_obj2.Position;
end
%pos
x1=pos(1,1);
y1=pos(1,2);
z1=pos(1,3);
x2=pos(2,1);
y2=pos(2,2);
z2=pos(2,3);
x3=pos(3,1);
y3=pos(3,2);
z3=pos(3,3);
for i=1:n_column
    for j=1:n_row
        Znew(j,i)=Ztot(j,i)+(Xtot(j,i)*y1*z2 - Xtot(j,i)*y2*z1 -
x1*Ytot(j,i)*z2 + x2*Ytot(j,i)*z1 - Xtot(j,i)*y1*z3 + Xtot(j,i)*y3*z1 +
x1*Ytot(j,i)*z3 - x3*Ytot(j,i)*z1 + Xtot(j,i)*y2*z3 - Xtot(j,i)*y3*z2 -
x2*Ytot(j,i)*z3 + x3*Ytot(j,i)*z2 - x1*y2*z3 + x1*y3*z2 + x2*y1*z3 - x2*y3*z1 -
x3*y1*z2 + x3*y2*z1)/(x1*y2 - x2*y1 - x1*y3 + x3*y1 + x2*y3 - x3*y2);
    end
end
Ztotold=Ztot;
Ztot=Znew;
figure();
hold on;
mesh(Xtot,Ytot,Ztot);
mesh(Xtot,Ytot,Ztotold);
hold off;
case 'No'
    Ztot=Ztot;
end

```

```

%% CELL 06: Calcolo delle rugosità

```

```

for z=1:w
    row=startpoint(z,1);
    column=startpoint(z,2);

    %% Test posizione per non uscire dalla matrice
    intorno=6;
    val1=abs(n_row-row);
    val2=row;
    val3=abs(n_column-column);
    val4=column;
    vettore=[val1;val2;val3;val4;];
    valtot=min(vettore);

    if intorno<valtot
        %Ztotred=Ztot(row-intorno:row+intorno,column-intorno:column+intorno);
        x=intorno;
    else
        %Ztotred=Ztot(row-valtot:row+valtot,column-valtot:column+valtot);
        x=valtot;
        %dire che l'intorno è troppo grande
    end
end

```

```

% Rugosità totale

% Valori medi
mediazx=sum(Ztot(row,:))/length(Xtot(row,:));
mediazy=sum(Ztot(:,column))/length(Ytot(:,column));
mediazxy=sum(sum(Ztot))/(length(Xtot(row,:))*length(Ytot(:,column)));

% Rugosità media
Rax=sum(abs(Ztot(row,:)-mediazx))/length(Xtot(row,:));
Ray=sum(abs(Ztot(:,column)-mediazy))/length(Ytot(:,column));
Raxy=sum(sum(abs(Ztot-
mediazxy)))/(length(Xtot(row,:))*length(Ytot(:,column)));

R(z,1)=Rax;
R(z,2)=Ray;
R(z,3)=Raxy;

% Rugosità quadratica media
Rqx=sqrt(sum((Ztot(row,:)-mediazx).^2)/length(Xtot(row,:)));
Rqy=sqrt(sum((Ztot(:,column)-mediazy).^2)/length(Ytot(:,column)));
Rqxy=sqrt(sum(sum((Ztot-
mediazxy).^2)/(length(Xtot(row,:))*length(Ytot(:,column)))));

R(z,4)=Rqx;
R(z,5)=Rqy;
R(z,6)=Rqxy;

%% Rugosità su intorno dell'indentazione

% Valori medi
mediazx=sum(Ztot(row,column-x:column+x))/length(Xtot(row,column-
x:column+x));
mediazy=sum(Ztot(row-x:row+x,column))/length(Ytot(row-x:row+x,column));
mediazxy=sum(sum(Ztot(row-x:row+x,column-
x:column+x)))/(length(Xtot(row,column-x:column+x))*length(Ytot(row-
x:row+x,column)));

%Rugosità media
Rax=sum(abs(Ztot(row,column-x:column+x)-mediazx))/length(Xtot(row,column-
x:column+x));
Ray=sum(abs(Ztot(row-x:row+x,column)-mediazy))/length(Ytot(row-
x:row+x,column));
Raxy=sum(sum(abs(Ztot(row-x:row+x,column-x:column+x)-
mediazxy)))/(length(Xtot(row,column-x:column+x))*length(Ytot(row-
x:row+x,column)));

Ri(z,1)=Rax;
Ri(z,2)=Ray;
Ri(z,3)=Raxy;

% Rugosità quadratica media
Rqx=sqrt(sum((Ztot(row,column-x:column+x)-
mediazx).^2)/length(Xtot(row,column-x:column+x)));
Rqy=sqrt(sum((Ztot(row-x:row+x,column)-mediazy).^2)/length(Ytot(row-
x:row+x,column)));
Rqxy=sqrt(sum(sum((Ztot(row-x:row+x,column-x:column+x)-
mediazxy).^2)/(length(Xtot(row,column-x:column+x))*length(Ytot(row-
x:row+x,column)))));

Ri(z,4)=Rqx;

```

```
Ri(z,5)=Rqy;  
Ri(z,6)=Rqxy;
```

```
end
```

```
figure();  
hold on;  
mesh(Xtot,Ytot,Ztot);
```

```
for z=1:w  
    row=startpoint(z,1);  
    column=startpoint(z,2);  
    plot3(Xtot(row,column),Ytot(row,column),Ztot(row,column),'ro');  
end  
hold off;
```

```
-----  
%% CELL 07: Esportazione dei dati in Excel
```

```
%Matrice delle rugosità (numero_indentazione x tipo_di_rugosità)
```

```
xlswrite('Rugosità.xls',R,1,'b3');  
xlswrite('Rugosità.xls',Ri,2,'b3');
```