

ALLEGATO B

P.O.R FSE 2007-2013 OBIETTIVO COMPETITIVITÀ REGIONALE E OCCUPAZIONE

Asse IV Capitale umano

Linee di Attività I.1.1

BANDO BORSE DI RICERCA,, DI DURATA BIENNALE, A FAVORE DI DOTTORI DI RICERCA/RICERCATORI.

PRIMA FASE: MANIFESTAZIONE DI INTERESSE DA PARTE DI IMPRESE CON SEDE LEGALE E/O OPERATIVA NEL TERRITORIO REGIONALE

SCHEDA TECNICA RELATIVA ALLA MANIFESTAZIONE DI INTERESSE DA PARTE DI IMPRESE CON SEDE LEGALE E/O OPERATIVA NEL TERRITORIO REGIONALE

La scheda tecnica non può essere modificata, se non in termini di descrizione delle attività e degli obiettivi da perseguire.

*Anche nel caso di rete di imprese, dovrà essere redatta un'unica **scheda tecnica**, sottoscritta dai rappresentanti legali di ciascuna impresa partner, nonché dall'impresa con funzioni di capofila.*

DESCRIZIONE GENERALE DELLA SCHEDA TECNICA

Ambito di riferimento (art 6, punto 7.3 del Bando)	B. Biotecnologie e scienze della vita
Titolo della scheda tecnica	Valutazione della biocompatibilità e tossicità di materiali nanometrici e nanostrutturati tramite test in vitro con cellule umane staminali mesenchimali adulte

B.1 Situazione attuale

(Illustrare le attività caratterizzanti l'impresa/e. Nel caso di rete di imprese dovranno essere illustrate le attività caratterizzanti ciascuna impresa appartenente alla rete – Massimo 5.000 caratteri)

L'impresa DNM (Dense Nanostructured Materials) Srl, spin off dell'Università di Cagliari, è una società a responsabilità limitata nata nel luglio 2009. I prodotti sviluppati dall'impresa DNM (Dense Nanostructured Materials) Srl sono realizzati con materiali avanzati anche innovativi, in particolare ceramici, compositi ed intermetallici, che possono essere utilizzati in più settori industriali offrendo un livello di qualità e controllo talvolta superiori all'esistente, e possono essere offerti a prezzi minori. Per la produzione di questi materiali la D.N.M. Srl fa uso di tecnologie nelle quali risiede il carattere innovativo del prodotto sviluppato. In particolare il metodo Self-propagating High-temperature Synthesis (SHS) permette di preparare rapidamente (ordine di secondi) i prodotti in forma di polveri. La tecnica SHS basata su forti reazioni esotermiche che, una volta ignite sono capaci di propagarsi come un'onda di combustione attraverso l'intera miscela reagente senza bisogno di ulteriore apporto energetico e consente in tempi estremamente brevi di ottenere una larga varietà di materiali, sotto forma di polveri o porosi. Inoltre grazie alla tecnologia MM (Mechanical Milling) la DNM Srl è in grado di produrre polveri nano strutturate.

L'impresa BT (Biomedical Tissues) Srl è una società a responsabilità limitata nata nel giugno 2008 nell'ambito del programma "Creazione di nuove iniziative imprenditoriali da parte di giovani laureati" bandito da Sardegna Ricerche, le cui attività si inseriscono nel campo della medicina rigenerativa. In particolare la società si occupa dello sviluppo di protocolli per l'espansione, su supporti statici o dinamici, sia di cellule del

tessuto cartilagineo (condrociti), sia di cellule staminali adulte, prelevate, in sede ospedaliera, da soggetti con danni articolari. Tali cellule, isolate e accresciute in numero, vengono reimpiantate nel donatore per ripristinare i tessuti danneggiati. Un'altra attività svolta dalla BT sempre nell'ambito della medicina rigenerativa riguarda lo sviluppo di protocolli per la decellularizzazione e ripopolamento di vasi sanguigni con l'obiettivo di realizzare nuove protesi vascolari biologiche. Inoltre la BT si sta attualmente occupando dello sviluppo di nuovi protocolli di modificazione genetica di cellule staminali mesenchimali da utilizzare nell'ambito della terapia genica per la cura di diverse patologie e dello sviluppo di nuovi test di tossicità acuta in vitro basati sull'utilizzo di cellule staminali mesenchimali.

L'impresa IM (Innovative Materials) Srl, spin off dell'Università di Cagliari, è una società a responsabilità limitata nata nel febbraio 2007. I prodotti sviluppati dall'impresa IM Srl sono manufatti realizzati con materiali avanzati anche innovativi, in particolare ceramici, compositi ed intermetallici. Per la produzione di questi materiali la I.M. Srl farà uso di una tecnologia nella quale risiede il carattere innovativo del prodotto sviluppato. In particolare il metodo Spark Plasma Sintering (SPS) che consente di ottenere materiali estremamente densi in tempi relativamente brevi (nell'ordine dei minuti) con microstruttura più fine rispetto a quella ottenuta con tecnologie convenzionali. La consolidazione delle polveri di partenza avviene attraverso un passaggio di corrente elettrica pulsata attraverso le polveri stesse e al riscaldamento per effetto Joule che ne consegue anche se molti aspetti del processo SPS non sono ancora del tutto chiari.

I processi effettuati con un apparecchio SPS permettono di effettuare la sinterizzazione a temperature inferiori rispetto alla tradizionale tecnologia HP (Hot pressing) e in tempi più brevi ma comunque sufficienti per raggiungere la completa densificazione del materiale.

B.2. Illustrazione della scheda tecnica

(Analisi e proposta delle nuove attività da realizzare rispetto agli obiettivi da perseguire. Illustrazione delle criticità attuali – Massimo 5.000 caratteri)

L'obiettivo dell'attività proposta è la produzione di nanopolveri attraverso tecnologia MM e SHS, il consolidamento dei nanomateriali prodotti attraverso tecnologia SPS e la successiva valutazione della citotossicità in vitro dei nanomateriali sinterizzati.

I sistemi che verranno sottoposti a densificazione mediante tecnica SPS e sui quali verranno eseguiti successivamente i test di tossicità sono:

- polveri di ossido di alluminio (Al_2O_3)
- polveri di ossido di zirconio (ZrO_2)
- polveri della lega Nickel- Titanio (NiTi)
- polveri di Widia (WC-Co)
- polveri elementari di Tantalio (Ta)

Per ciascun sistema verranno prodotti dei provini di diametro $D = 14.7$ mm e altezza $H = 3$ mm da sottoporre ai test di citotossicità. Di seguito si riportano nel dettaglio le caratteristiche specifiche dei sistemi da densificare e le criticità ad essi connesse.

L'ossido di alluminio (o allumina) è l'ossido ceramico dell'alluminio di formula chimica Al_2O_3 . Questo materiale, all'apparenza molto fragile e poco utilizzabile, nasconde proprietà interessanti in campo industriale, quali la resistenza agli acidi e la scarsa conducibilità termica, oltre ad essere un catalizzatore d'interesse industriale. Viene utilizzato in moltissimi campi, quali l'elettronica e la meccanica, ma in particolare viene utilizzato fin dai primi anni '70 come materiale da innesto, specialmente per protesi artificiali, e impianti dentali grazie alle sue eccellenti compatibilità con i tessuti e alle sue buone proprietà meccaniche.

L'ossido di zirconio (o zirconia) è il principale ossido ceramico dello zirconio di formula chimica ZrO_2 . Al pari dell'allumina, anch'esso presenta una notevole quantità di utilizzi in diversi settori applicativi. Tra questi particolarmente importante risulta l'uso della zirconia in campo odontoiatrico quale materiale privilegiato per la produzione di protesi dentarie. Tale peculiarità è da attribuirsi al fatto che rispetto alle altre leghe dentali presenta un aspetto estetico di certo non raggiungibile con i metalli, soprattutto in termini di traslucidità e mostra compatibilità biologica, stabilità ionica e peso specifico ridotto. Aspetto molto importante è che nel procedimento di ceramizzazione la forma (macrostruttura) della struttura cristallina non si modifica sostanzialmente, dunque la parte interessata non subisce modifiche.

Le leghe Nickel-Titanio, il cui nome generico è Nitinol, rappresentano l'esempio più importante di materiali così detti "a memoria di forma". Tali materiali hanno come caratteristica quella di essere in grado di recuperare una forma macroscopica preimpostata per effetto del semplice cambiamento della temperatura o dello stato di sollecitazione applicato, sono cioè capaci di subire trasformazioni cristallografiche reversibili, in funzione dello stato tensionale e termico. Grazie a queste proprietà i materiali a memoria di forma trovano impiego in numerosi settori, e soprattutto in medicina, per la produzione di strumenti ortopedici, chirurgici e ortodontici. Le leghe Nickel-Titanio vengono infatti utilizzate in chirurgia maxillofacciale e in ortopedia da circa 15 anni.

Il composito WC-Co è un materiale costituito da particelle dure di carburo di tungsteno inglobate in una matrice metallica di cobalto, meglio noto come Widia. E' noto che tali materiali possiedono proprietà meccaniche molto interessanti, quali resistenza ad abrasione e usura, elevata durezza e modulo elastico,

nonché buona tenacità a frattura, caratteristiche che fanno sì che siano estensivamente utilizzati in diversi campi, soprattutto come utensili da taglio e da lavorazione meccanica. Il carburo di tungsteno e cobalto è attualmente classificato come cancerogeno per l'uomo dalla IARC (International Agency for Research on Cancer), è infatti noto che le nanoparticelle di Wc-Co portano a lisi delle cellule.

Le polveri elementari di tantalio costituiscono l'ultimo sistema oggetto di studio. Tali polveri risultano dotate di elevata resistenza alla corrosione, proprietà che fa sì che esso venga impiegato nella costruzione di impianti chimici, nonché di una discreta inerzia chimica, che lo rende candidato ideale nella produzione di strumenti destinati ad essere impiegati in ambito medico, quali strumenti chirurgici e protesi intracorporee. Le applicazioni biomediche del Tantalio in campo ortopedico sono piuttosto recenti, ma diversi studi hanno già dimostrato il suo possibile utilizzo come scaffold per la rigenerazione ossea.

I test di citotossicità in vitro saranno eseguiti tramite il saggio del Neutral Red Uptake basato sull'accumulo nei lisosomi citoplasmatici del colorante rosso neutro. Il sequestro ed immagazzinamento del colorante è un processo attivo, quindi la quantità di colorante accumulato è proporzionale al numero di cellule vive presenti. Questo test fornisce importanti informazioni e consente dunque di fare una fine valutazione dei livelli di sofferenza cellulare e del potenziale citotossico delle sostanze testate.

B.3 Innovazione e prospettive di mercato

(Illustrazione dei livelli di innovatività individuati rispetto alle nuove attività da realizzare anche in termini di acquisizione di livelli più competitivi e di inserimento nel mercato - – Massimo 5.000 caratteri)

Con il rapido sviluppo delle nanotecnologie e delle sue applicazioni, un'ampia gamma di materiali nanostrutturati viene attualmente utilizzata in campo farmaceutico, cosmetico, biomedico e industriale. Nonostante i molti benefici delle nanotecnologie, diversi studi indicano che i nanomateriali possono anche avere un impatto dannoso sulla salute umana, e tale impatto è differente a seconda delle dimensioni, della struttura, della composizione chimica e dello stato di ossidazione del materiale, i quali dipendono dalla tecnica di produzione. I nanomateriali sintetizzati dalla DNM Srl, vengono forniti alla BT Srl per la valutazione della citotossicità in vitro previa sinterizzazione presso la IM Srl.

Il metodo SHS permette di preparare rapidamente (ordine di secondi) le nanopolveri. La tecnica SHS è basata su forti reazioni esotermiche che, una volta ignite sono capaci di propagarsi come un'onda di combustione attraverso l'intera miscela reagente senza bisogno di ulteriore apporto energetico. Questa tecnica si caratterizza per semplici apparati, basso consumo di energia, elevata temperatura di combustione (fino a 4000 K) e una velocità di propagazione del fronte di circa 25 cm per secondo. Attraverso la tecnica SHS, in tempi estremamente brevi, è stato possibile ottenere una larga varietà di materiali, sotto forma di polveri o porosi, come ceramici, intermetallici, compositi, soluzioni solide, ecc. Inoltre è stato dimostrato che, le polveri sintetizzate via SHS, sono caratterizzate da una maggiore sinterabilità rispetto alle polveri disponibili in commercio o prodotte con altri metodi.

Il consolidamento delle nanopolveri viene effettuato grazie alla tecnologia nota come SPS. Il processo SPS rappresenta una tecnologia di sinterizzazione innovativa rispetto a quelle tradizionali, quali la pressatura a caldo (HP) e la pressatura isostatica a caldo (HIP), per l'ottenimento di materiali densi anche nanostrutturati. La tecnica consiste essenzialmente nella simultanea applicazione di una corrente elettrica pulsata e di un carico meccanico uniassiale al compatto di polveri da sinterizzare, e consente tipicamente di ottenere il prodotto finale denso a temperature più basse e in tempi più brevi rispetto alle tecnologie di produzione tradizionali.

Il processo SPS nello specifico non necessita di temperature di sinterizzazione troppo alte come richiesto dal processo HP per l'ottenimento di prodotti completamente densi. Inoltre, i tempi di lavorazione sono notevolmente ridotti, vale a dire 4-7 min quando si adotta la tecnica SPS rispetto alle circa 5 ore richieste dall'HP. Infine, andando a confrontare l'energia totale richiesta nel corso di ogni esperimento SPS o HP, è stato riscontrato che l'uso della tecnologia SPS determina un risparmio energetico nell'ordine del 90-95%. Questo fatto rende la tecnologia SPS notevolmente vantaggiosa dal punto di vista ambientale ed economico rispetto all'HP. Quest'ultimo aspetto permetterà alle aziende l'inserimento dei propri prodotti nel mercato dei nanomateriali con prezzi estremamente competitivi.

Un aspetto particolarmente innovativo nell'ambito delle presenti attività, è rappresentato dalla tipologia di test che verrà utilizzato per valutare la tossicità dei materiali nanometrici e nanostrutturati che verranno prodotti. Negli ultimi anni, con l'intensificazione delle campagne mediatiche per la salvaguardia degli animali, sono state istituite diverse organizzazioni che coordinano e finanziano studi di validazione di saggi in vitro, promuovendo sia la salute umana, sia il benessere degli animali, attraverso lo sviluppo di metodi avanzati sempre più affidabili. In genere tali test vengono condotti con linee cellulari trasformate o immortalizzate, o con cellule primarie. Le cellule immortalizzate sono prontamente disponibili e facilmente mantenibili in coltura, ma spesso manifestano un comportamento e un fenotipo anomali, non sovrapponibili a quelli delle cellule normali. Al contrario le cellule primarie possono essere considerate il miglior modello in vitro per la tossicologia predittiva, ma sono disponibili in quantità limitata e non sempre facilmente mantenibili in coltura, inoltre vengono isolate da animali, conseguentemente non rappresentano un modello sufficientemente predittivo per l'uomo ed è spesso necessario il sacrificio dell'animale da cui vengono prelevate. Recentemente, è stato sviluppato e testato con successo, un nuovo test di tossicità acuta basato sull'utilizzo di cellule mesenchimali umane [Scanu, M, Mancuso, L, and Cao, G.(2011). "Evaluation of the

use of human Mesenchymal Stem Cells for acute toxicity tests. "Toxicology in vitro 25 (8):1989-1995]. Tale test verrà pertanto utilizzato per valutare la citotossicità in vitro dei materiali prodotti.

B.4 Esperienza già acquisita

(Indicazione delle esperienze già maturate in termini di ricerca e sviluppo – Massimo 5.000 caratteri)

La DNM Srl ha beneficiato del finanziamento da parte del MIUR del progetto "Sviluppo ed ottimizzazione della tecnologia SPS (Spark Plasma Sintering) per la produzione di materiali nanostrutturati densi" presentato ai sensi dell'art. 11 del D.M. 593/2000. Il progetto di ricerca, dal costo complessivo di 698.000,00 €, porta un contributo significativo allo sviluppo ed alla ottimizzazione della tecnologia innovativa SPS, che si sta dimostrando particolarmente promettente per l'ottenimento di materiali massivi a struttura nanometrica, in virtù delle sue peculiari caratteristiche (tempi di processo relativamente brevi e basse temperature, se confrontati con quelli dei metodi tradizionali, accoppiati all'applicazione simultanea di carichi meccanici). Tale tecnologia è affiancata da altre metodologie, tra cui quella di "Ball Milling", che consentiranno di produrre sia nanopolveri sia verdi, da sottomettere al trattamento di densificazione mediante SPS.

La IM Srl ha realizzato in proprio negli ultimi tre anni due piani di sviluppo aziendale:

- nell'ambito del bando EBI-Italy (Incubatore d'impresa ESA per l'Italia presso ESRIN), promossa da ESA-ESRIN attraverso il partner BIC Lazio dal titolo "UHTC".
- nell'ambito del bando Pacchetti Integrati di Agevolazioni promosso dalla Regione Autonoma della Sardegna per lo "Sviluppo di tecnologie produttive di materiali innovativi basate sulla combinazione dei processi di macinazione meccanica e di sinterizzazione attraverso SPS"

Altre attività pregresse e ancora in corso sono rappresentate da due progetti di ricerca e sviluppo:

- Development of Series Production Technology of Faceted Cutting Inserts based on Ceramic Nano-Composites using FAST/SPS method – (SeProFAST) finanziato nell'ambito del programma EUROSTARS EUREKA dalla comunità Europea, in partnership con Virial Ltd, Neomat Co, FCT Systeme GmbH, Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V.-IKTS, Dipartimento di Ingegneria Chimica e Materiali (UNICA), Frantsevich Institute for Problems of Materials Science (IPMS)
- Sviluppo di compositi idrossiapatite – vetro bioattivo: influenza della composizione e della tecnologia di microstruttura e proprietà (BIOHAp) finanziato nell'ambito del programma "Cooperazione scientifica e tecnologica nelle aree tematiche biotecnologie, ict in attuazione dell'allegato all'accordo di collaborazione sottoscritto dalla Regione Autonoma della Sardegna e dalla Regione Lombardia il 16 gennaio 2010" da Regione Sardegna e Regione Lombardia in partnership con il Politecnico di Milano.

L'azienda ha investito nell'acquisizione in leasing di una apparecchiatura SPS-FCT HP D 25 per la sinterizzazione di polveri SPS (Spark Plasma Sintering), costo 159.600,00 €.

I materiali già prodotti dall'impresa sono:

- MgB₂ superconduttore. Materiale il cui processo produttivo innovativo è stato brevettato di recente dal gruppo di ricerca costituito dai soci dell'impresa
- Compositi WC/Co. E' un materiale per utensili da taglio, che con la tecnica SPS acquisisce maggior durezza e resistenza a frattura. E' stato pubblicato un lavoro scientifico nel quale è descritta la sintesi innovativa e quindi non è possibile procedere al brevetto. Potrebbe essere brevettato un utilizzo in particolare del materiale.
- MoSi₂. Materiale altotondente utilizzato sia su mercati ad alta tecnologia sia in mercati tradizionali come materiale per elementi riscaldanti, in quanto è in grado di operare sopra i 1000 °C.
- TiC-TiB₂ sono materiali strutturali con elevata resistenza meccanica ad alte temperature di utilizzo. Oltre al materiale tradizionale a struttura micrometrica, viene prodotto anche un omologo nanostrutturato.
- xZrB₂-ySiC-zZrC sono materiali ceramici compositi UHTC di cui è stato brevettato e non pubblicato un nuovo processo di sintesi. Il materiale è un candidato ideale per l'utilizzo nella componentistica in campo aeronautico e aerospaziale, e per i veicoli di rientro di nuova generazione.

La BT Srl ha beneficiato di due finanziamenti:

- Incentivo Ricerca Polaris finanziato da Sardegna Ricerche, per un progetto dal titolo "Protesi Vascolari Innovative attraverso Decellularizzazione e Ripopolamento di Vasi Sanguigni".
- nell'ambito del bando Pacchetti Integrati di Agevolazioni promosso dalla Regione Autonoma della Sardegna per un progetto dal titolo "Ottimizzazione di protocolli di crescita cellulare in bioreattori".

L'impresa ha commissionato in passato progetti di ricerca per innovazione di processo relativamente alla realizzazione di bioreattori a perfusione per la proliferazione cellulare.

I risultati finora conseguiti possono essere così riassunti:

- Sviluppo di protocolli di isolamento/espansione hBMMSCs (human Bone Marrow Mesenchymal Stem

cells)

- Sviluppo di protocolli di isolamento e crescita in statico di condrociti primari
- Sviluppo di test in vitro di tossicità orale acuta basati sull'utilizzo di hBMMSCs

FIRMA del Rappresentante/i legale/iⁱ

Sestu, 29 Gennaio 2013

ⁱ La Scheda tecnica deve essere firmata e data dal rappresentante legale per le imprese singole, dal soggetto capofila e dai rappresentanti legali dei soggetti partner nel caso di Rete.