

**ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
CAMPUS DI CESENA  
SCUOLA DI INGEGNERIA E  
ARCHITETTURA**

**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA  
BIOMEDICA**

**Sintesi e caratterizzazione di  
nuovi copoliesteri alifatici per il  
rilascio controllato dei farmaci**

Elaborato in:  
**FONDAMENTI DI CHIMICA**

Relatore:

*Prof.ssa Nadia Lotti*

Presentata da:

*Elena Gulotta*

Correlatore:

*Michelina Soccio*

Sessione II

**Anno Accademico 2015-2016**



# INDICE

<b>CAPITOLO 1: INTRODUZIONE</b>	<b>8</b>
<b>1.1 BIOMATERIALI</b>	<b>8</b>
1.1.1 UTILIZZI	9
1.1.2 CLASSIFICAZIONE	10
<i>1.1.2.1 MATERIALI METALLICI</i>	<i>10</i>
<i>1.1.2.2 MATERIALI CERAMICI</i>	<i>12</i>
<i>1.1.2.3 MATERIALI POLIMERICI</i>	<i>13</i>
<i>1.1.2.4 MATERIALI BIOLOGICI</i>	<i>15</i>
<i>1.1.2.5 MATERIALI COMPOSITI</i>	<i>16</i>
<b>1.2 MATERIALI POLIMERICI</b>	<b>17</b>
1.2.1 STRUTTURA E CRISTALLINITÀ	17
1.2.2 PROPRIETÀ DEI POLIMERI	18
<i>1.2.2.1 PROPRIETÀ TERMOMECCANICHE</i>	<i>18</i>
<i>1.2.2.2 GRADO DI POLIMERIZZAZIONE E PESO MOLECOLARE</i>	<i>20</i>
1.2.3 FORMAZIONE DEI POLIMERI	22
<i>1.2.3.1 POLICONDENSAZIONE</i>	<i>22</i>
<i>1.2.3.2 POLIADDIZIONE</i>	<i>22</i>
<i>1.2.3.3 RING OPENING POLYMERIZATION</i>	<i>23</i>
<i>1.2.3.4 REACTIVE BLENDING</i>	<i>25</i>
1.2.4 LAVORAZIONE	25
1.2.5 DEGRADAZIONE	27
1.2.6 CLASSIFICAZIONE PER ORIGINE	28
<i>1.2.6.1 POLIMERI DI ORIGINE NATURALE</i>	<i>28</i>
1.2.6.1.1 COLLAGENE	28
1.2.6.1.2 POLISACCARIDI	29
1.2.6.1.3 PROTEOGLICANI	29
1.2.6.1.4 POLIPEPTIDI	30
1.2.6.1.5 CHITINA	30
<i>1.2.6.2 POLIMERI DI ORIGINE SINTETICA</i>	<i>31</i>
1.2.6.2.1 POLIANIDRIDI	31
1.2.6.2.2 POLIAMMIDI	31

1.2.6.2.3 POLIORTOESTERI	32
1.2.6.2.4 POLICARBONATI ALIFATICI	32
<b>1.2.7 POLIMERI USATI IN AMBITO BIOMEDICO</b>	<b>33</b>
<i>1.2.7.1 POLIESTERI ALIFATICI</i>	<i>33</i>
<i>1.2.7.2 POLIOLEFINE</i>	<i>35</i>
<i>1.2.7.3 POLISTIRENE</i>	<i>37</i>
<i>1.2.7.4 POLITETRFLUOROETILENE</i>	<i>37</i>
<i>1.2.7.5 POLISILOSSANI</i>	<i>38</i>
<i>1.2.7.6 POLIURETANI</i>	<i>38</i>
<i>1.2.7.7 POLIMETILMETACRILATO</i>	<i>39</i>
<i>1.2.7.8 POLIPROPILENE FUMARATO</i>	<i>39</i>
<i>1.2.7.9 ACIDO POLI-DL-LATTICO-CO-GLICOLICO</i>	<i>40</i>
<i>1.2.7.10 POLI-ε-CAPROLATTONE</i>	<i>40</i>
<i>1.2.7.11 POLIIDROSSIALCANOATI</i>	<i>41</i>
<b>1.3 COPOLIMERI</b>	<b>41</b>
<b>1.3.1 COPOLIMERI A BLOCCHI</b>	<b>42</b>
<b>1.3.2 COPOLIMERI STATISTICI</b>	<b>44</b>
<b>1.4 CONTROLLED DRUG DELIVERY</b>	<b>46</b>
<b>1.4.1 MECCANISMI DI RILASCIO CONTROLLATO</b>	<b>48</b>
<b>1.4.2 SISTEMI DI TRASPORTO</b>	<b>49</b>
<i>1.4.2.1 SISTEMI A DIFFUSIONE CONTROLLATA</i>	<i>50</i>
<i>1.4.2.2 SISTEMI CONTROLLATI CHIMICAMENTE</i>	<i>50</i>
<i>1.4.2.3 SISTEMI ATTIVATI DAL SOLVENTE</i>	<i>50</i>
<i>1.4.2.4 SISTEMI A RILASCIO MODULATO</i>	<i>51</i>
<b>1.4.3 INTERFACCE DI RILASCIO</b>	<b>51</b>
<i>1.4.3.1 STENT</i>	<i>51</i>
<i>1.4.3.2 MICROPARTICELLE</i>	<i>52</i>
1.4.3.2.1 SISTEMI BIOERODIBILI	53
1.4.3.2.2 IDROGELI	53
1.4.3.2.3 TECNICHE DI MICROCAPSULAZIONE	55
1.4.3.2.3.1 EMULSIONE	55
1.4.3.2.3.2 SEPARAZIONE DI FASE	56
1.4.3.2.3.3 SPRAY A SECCO	56
1.4.3.2.3.4 <u>POLIMERIZZAZIONE INTERFACCIALE</u>	56

<b>1.4.3.3 NANOVETTORI</b>	<b>57</b>
<b>1.4.3.3.1 CONTRIBUTO DEI POLIMERI AI NANOVETTORI</b>	<b>58</b>
1.4.3.3.1.1 <u>CONTRIBUTO DI POLIESTERI ALIFATICI FUNZIONALI AI NANOVETTORI DI "PRIMA GENERAZIONE"</u>	59
1.4.3.3.1.2 <u>CONTRIBUTO DEL POLI(OSSIDO DI ETILENE) E DEI COPOLIESTERI AI NANOVETTORI DI "SECONDA GENERAZIONE"</u>	59
1.4.3.3.1.3 <u>CONTRIBUTO DI COPOLIESTERI FUNZIONALI AI NANOVETTORI DI "TERZA GENERAZIONE"</u>	60
<b>1.4.4 POLIMERI NEL DRUG DELIVERY</b>	<b>60</b>
<b>1.5 STATO DELL'ARTE DEL POLI(BUTILENE SUCCINATO), POLI(TRIETILENE SUCCINATO) E DELL'ACIDO POLILATTICO</b>	<b>61</b>
<b>1.5.1 PBS: STRUTTURA E PROPRIETÀ DELL'OMOPOLIMERO</b>	<b>61</b>
<b>1.5.2 PTES: AGGIUNTA IN COPOLIMERI E MODULAZIONE DI PROPRIETÀ</b>	<b>63</b>
<b>1.5.3 ACIDO POLILATTICO (PLA)</b>	<b>66</b>
<b><u>CAPITOLO 2: SCOPO DELLA TESI</u></b>	<b>68</b>
<b><u>CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI</u></b>	<b>72</b>
<b>3.1. SINTESI</b>	<b>72</b>
<b>3.1.1 REAGENTI</b>	<b>72</b>
<i>3.1.1.1 DIMETILSUCCINATO</i>	72
<i>3.1.1.2 TRIETILENGLICOLE</i>	72
<i>3.1.1.3 1,4-BUTANDIOLO</i>	73
<i>3.1.1.4 TITANIO (IV) TETRABUTOSSIDO</i>	73
<i>3.1.1.5 STAGNO OTTANOATO</i>	73
<b>3.1.2 DESCRIZIONE DELLA SINTESI</b>	<b>74</b>
<i>3.1.2.1 SINTESI DEL PBS-OH</i>	74
<i>3.1.2.2 SINTESI DEL PTES-OH</i>	74
<i>3.1.2.3 SINTESI DEL COPOLIMERO <math>P(BS_{13}TES_{12})-OH</math></i>	74
<i>3.1.2.4 SINTESI DEL COPOLIMERO <math>P(BS_2TES_2)-OH</math></i>	75
<i>3.1.2.5 SINTESI DEL COPOLIMERO <math>PLLAP(BS_{13}TES_{12})</math></i>	75
<i>3.1.2.6 SINTESI DEL COPOLIMERO <math>PLLAP(BS_2TES_2)</math></i>	75
<b>3.1.3 STRUMENTAZIONE</b>	<b>75</b>

<b>3.1.4 PURIFICAZIONE DEGLI OMOPOLIMERI E DEI COPOLIMERI</b>	<b>76</b>
<b>3.1.5 PREPARAZIONE DELLE NANOPARTICELLE</b>	<b>77</b>
<b>3.2 CARATTERIZZAZIONE</b>	<b>78</b>
<b>3.2.1 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE</b>	<b>78</b>
<i>3.2.1.1 RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE (NMR)</i>	<i>78</i>
<i>3.2.1.2 CROMATOGRAFIA A PERMEAZIONE SU GEL (GPC)</i>	<i>80</i>
<b>3.2.2 CARATTERIZZAZIONE TERMICA</b>	<b>82</b>
<i>3.2.2.1 CALORIMETRIA DIFFERENZIALE A SCANSIONE (DSC)</i>	<i>82</i>
<i>3.2.2.2 ANALISI TERMOGRAVIMETRICA (TGA)</i>	<i>84</i>
<b>3.2.3 ANALISI DIFFRATTOMETRICA A RAGGI X (XRD)</b>	<b>86</b>
<b>3.2.4 CARATTERIZZAZIONE DI NANOPARTICELLA</b>	<b>87</b>
<i>3.2.4.1 LIGHT SCATTERING DINAMICO</i>	<i>87</i>
<i>3.2.4.2 CINETICA DI RILASCIO DEL FARMACO</i>	<i>90</i>
<i>3.2.4.2.1 SPETTROFOTOMETRO A DOPPIO RAGGIO</i>	<i>91</i>
<b><u>CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONI</u></b>	<b><u>93</u></b>
<b>4.1 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE</b>	<b>93</b>
<b>4.2 CARATTERIZZAZIONE TERMICA E DIFFRATTOMETRICA</b>	<b>101</b>
<b>4.3 REALIZZAZIONE DI NANOPARTICELLE VUOTE E CONTENENTI DEXAMETASONE</b>	<b>107</b>
<b>4.3.1 STUDI DI CINETICA DI RILASCIO DEL FARMACO</b>	<b>109</b>
<b><u>CAPITOLO 5: CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE</u></b>	<b><u>112</u></b>
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	<b><u>114</u></b>
<b><u>RINGRAZIAMENTI</u></b>	<b><u>118</u></b>



# CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE

La scienza dei materiali è un ambito multi- e inter-disciplinare basato sulla chimica, sulla fisica e in parte sull'ingegneria, che si occupa della progettazione, produzione e uso di tutte le classi esistenti di materiali (tra cui i metalli, le ceramiche, i polimeri e i biomateriali) e l'interazione di questi con l'ambiente, la salute, l'economia e l'industria. Non sorprende, dunque, che ingenti risorse umane e finanziarie siano impiegate in tale ambito. In particolare, la scienza dei materiali è focalizzata sullo studio della struttura microscopica dei materiali stessi e le relazioni esistenti tra sintesi, lavorazione e proprietà finali dei materiali. Le loro proprietà possono essere migliorate significativamente agendo sulla composizione chimica, sulla disposizione atomica o molecolare tramite l'uso delle nanotecnologie, oppure sulle dimensioni, forma, orientazione di un materiale cristallino.

Per poter ottenere tali miglioramenti è necessario dapprima comprendere la relazione che esiste tra struttura del materiale e caratteristiche chimico-fisiche dello stesso, andando anche a valutare come si può controllarne la struttura tramite trattamenti chimici, termici e meccanici, per citare solo alcuni esempi.

### 1.1 BIOMATERIALI

L'impiego di materiali, sia sintetici che naturali, risale a tempi antichissimi: gli Aztechi, ad esempio, adoperavano legni resinosi introdotti nel canale midollare delle ossa lunghe con funzione di infibulo; Ovidio, nelle *Metamorfosi*, parlando di Pelope menziona una sostituzione protesica: "...una spalla già mangiata da Demetrio fu sostituita con un'articolazione d'avorio...".

È solo negli ultimi decenni, però, che si è assistito ad una vera e propria rivoluzione nel settore dei biomateriali, i quali vengono oggi impiegati sempre più frequentemente, a seguito di sofisticate manipolazioni, come materiali per la sostituzione anche totale di tessuti ed organi fondamentali (ad esempio protesi d'anca e cardiovascolari).

Il concetto stesso del termine "biomateriale" ha subito un'evoluzione nel corso del tempo.

La prima definizione ufficiale fu concordata nel 1982 in occasione di una conferenza del *National Institute of Health*. In quest'occasione, fu descritto come biomateriale "ogni sostanza o combinazione di sostanze, diverse dai farmaci, d'origine sintetica o naturale, che può essere impiegata per qualsiasi periodo, da sola o come parte di un sistema che tratta, aumenta o sostituisce un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo". Nel 1986, la Società Europea dei Biomateriali a Chester (UK), propose come definizione "una sostanza non vivente utilizzata nella fabbricazione di un dispositivo medico che ha in qualche punto un'interfaccia con un tessuto vivente". Attualmente viene invece riconosciuta quella stabilita nel 1991 presso il *2nd International Consensus Conference on Biomaterial* (Chester - UK) che definisce il biomateriale come "un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici al fine di valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo".

L'ultima definizione sancisce il passaggio concettuale da una visione passiva e inerte del biomateriale ad una attiva, che presuppone un'interazione temporale con l'organismo ospite; lo scopo principale di questi materiali è dunque creare un contatto, di qualsiasi durata, con il tessuto vivente, determinandone una reazione favorevole (biocompatibilità). Le interazioni biomateriale/tessuto devono inoltre essere tali da non suscitare risposte immunogeniche e di tossicità; i biomateriali devono anche essere inerti nei confronti dell'aggregazione piastrinica.

### **1.1.1 UTILIZZI**

I biomateriali vantano un campo di applicabilità molto ampio, ma nonostante ciò sono oggetto di costanti ricerche per il miglioramento delle loro prestazioni. Gli impieghi più importanti sono:

- assistenza per la guarigione;
- ausilio per la diagnosi;
- ausilio per la terapia clinica;
- correzione di anormalità estetiche;
- correzione di anormalità funzionali;
- ripristino di capacità funzionali;
- sostituzione di parti malate o mancanti.

Per quanto riguarda il primo ambito, esempi esplicativi sono le suture (tecnologie biorassorbibili), le viti e le placche ossee. Nella categoria dell'ausilio per la diagnosi compaiono cateteri e sensori, sia miniaturizzati in punta di catetere che trasduttori esterni al corpo. Nella terza tipologia di finalità, figurano cateteri vescicali, drenaggi, dializzatori e ossigenatori primari. Le correzioni di anomalie estetiche sono interventi sul corpo con lo specifico scopo di migliorarne l'estetica; in questa categoria ricadono le protesi mammarie, quelle dentarie e le protesi cosmetiche dell'orecchio esterno. Una tipica correzione di anomalie funzionale è invece rappresentata dai distrattori per la spina dorsale, strumenti con cui è possibile raddrizzare e mantenere in asse la colonna vertebrale. Nell'ambito del ripristino di capacità funzionali, si devono citare le lenti a contatto e i pacemaker cardiaci. Infine, l'ultima categoria comprende la pelle artificiale, le protesi ossee e articolari, il cuore artificiale e le protesi valvolari cardiache.

## 1.1.2 CLASSIFICAZIONE

In base alla loro natura chimica i biomateriali possono essere classificati come indicato in Tabella 1.1:

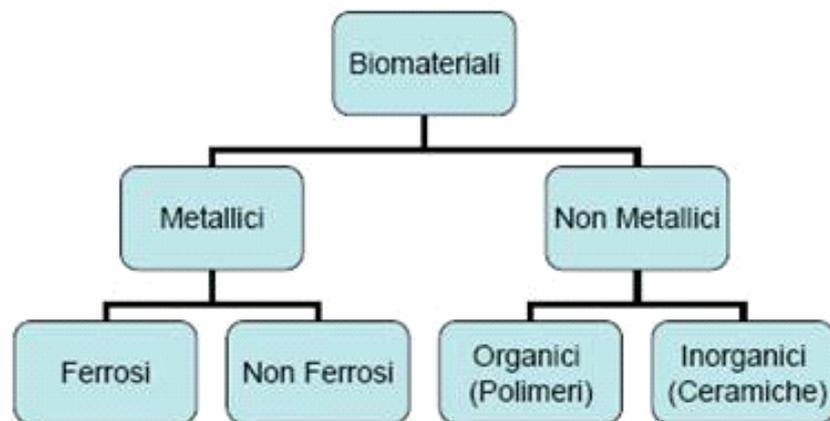


Tabella 1.1 Suddivisione dei biomateriali in base alla loro natura chimica.

### 1.1.2.1 MATERIALI METALLICI

I metalli trovano larghissimo impiego come materiali per la realizzazione di dispositivi biomedici, quali componenti di apparecchiature, protesi ortopediche e dentali (o parti di esse), mezzi di osteosintesi. Essi vengono, inoltre, utilizzati per la fabbricazione di strumentario chirurgico. Sono materiali che ben si prestano per

la risoluzione di problemi legati alla sostituzione di tessuti duri, quali ossa e denti (Figura 1.1), in forza delle loro elevate proprietà meccaniche, che rendono possibile la realizzazione di protesi in grado di sopportare carichi elevati a fronte di piccole sezioni.

I materiali metallici presentano interessanti caratteristiche quali:

- elevato modulo elastico (100÷200 GPa), elevata resistenza di snervamento (300÷1000 MPa) così da rendere possibile la costruzione di strutture in grado di sopportare carichi elevati senza elevate deformazioni elastiche, né deformazioni plastiche permanenti;
- buona duttilità e malleabilità: quando la sollecitazione applicata supera la resistenza di snervamento, la struttura si deforma plasticamente, invece di rompersi in maniera fragile. Ciò permette di intervenire sostituendo il componente deformato prima che si rompa;
- elevata resistenza alla fatica meccanica, che li rende indicati in tutte le applicazioni per le quali sono previsti cicli di carico.

La biocompatibilità dei metalli è tendenzialmente scarsa, a causa dei meccanismi di corrosione che si innescano quando essi vengono a contatto con i fluidi biologici. Durante tali processi avviene il rilascio di ioni metallici con due possibili conseguenze: la perdita di funzionalità dell'impianto e la contaminazione sia dei tessuti circostanti che dell'intero organismo (la maggior parte degli ioni metallici risulta tossica), con danno anche grave per la salute del paziente. Ulteriori problemi sono legati alle elevate densità e rigidità, che possono portare al fenomeno dello *stress shielding*. Per far fronte a queste problematiche si usano leghe di metalli diversi o interfacce con altri materiali più bioinerti, quali le ceramiche.

Tra i metalli maggiormente impiegati in ambito biomedicale figurano gli acciai inossidabili (austenitici e martensitici) nei mezzi di osteosintesi e nei ferri chirurgici, le leghe di titanio nelle protesi ortopediche, nelle placche di osteosintesi e negli strumenti odontoiatrici, le leghe di cobalto nelle protesi articolari e, infine, le leghe auree in odontoiatria.



Figura 1.1 Protesi d'anca.

### 1.1.2.2 MATERIALI CERAMICI

La struttura atomica dei materiali ceramici (natura del legame ionico e microstruttura) conferisce loro un'elevatissima resistenza al calore e all'attacco degli agenti chimici (refrattarietà), e garantisce un ottimo isolamento elettrico e termico, nonché buona resistenza ai carichi di compressione. Purtroppo tale struttura, che non consente il movimento relativo degli atomi, è anche causa di un comportamento meccanico tipicamente fragile. Hanno caratteristiche tribologiche migliori rispetto a quelle di altre classi di materiali, in quanto il coefficiente di attrito è estremamente basso, sono resistenti alla corrosione e presentano un'elevata biocompatibilità. A causa, però, delle spiccate durezza e fragilità e della bassa tenacità, risultano difficilmente lavorabili e inadeguati per la realizzazione di interi componenti, ma possono essere vantaggiosamente impiegati come rivestimento per conferire particolari proprietà superficiali a manufatti realizzati con altri materiali.

In base alla loro potenziale compatibilità biologica, i biomateriali ceramici si classificano in due principali categorie: ceramici bioinerti (non inducono, né subiscono alterazioni chimiche o biologiche in seguito al contatto con l'ambiente corporeo) e ceramici bioattivi (sono in grado di indurre una risposta nei tessuti attivando processi chimici e biologici all'interfaccia).

In generale i materiali ceramici sono distinti in ceramici tradizionali e ceramici avanzati (neoceramiche). Tra i primi sono usualmente annoverati i ceramici a pasta porosa (terrecotte e maioliche) e quelli a pasta compatta (porcellana). Tra le neoceramiche invece figurano i sali ionici, i silicati ed altri composti del silicio come feldspati e feldspatoidi, gli ossidi di alluminio (allumina e spinelli), i vetri inorganici, il carbonio turbostrato (carbonio pirolitico o ULTI carbon), le

idrossiapatiti, gli alluminati e i solfati di calcio, l'ossido di zirconio, i biocoralli ed i carbonati (calcite e aragonite).

Per quanto riguarda le applicazioni, i ceramici sono generalmente utilizzati nella realizzazione di dispositivi per la sostituzione funzionale di tessuti duri in ambito ortopedico, come protesi articolari e mezzi di osteosintesi, nel settore odontoiatrico, per l'implantologia e la realizzazione di denti artificiali (Figura 1.2), oppure in chirurgia cardiovascolare come protesi valvolari cardiache.



Figura 1.2 Capsule dentarie in materiale ceramico.

### 1.1.2.3 MATERIALI POLIMERICI

I materiali polimerici sono sostanze generalmente organiche (ma esistono anche importanti polimeri inorganici) costituite da molecole di grandi dimensioni (macromolecole) formate dalla ripetizione di unità, uguali o differenti, dette monomeri. Sono caratterizzati da legami sia ionici sia covalenti, in ogni caso più forti del legame metallico, e derivano per lo più da idrocarburi, ossia composti carbonio-idrogeno, attraverso sostituzioni con specifici gruppi funzionali che li differenziano.

La loro struttura può variare significativamente (esistono polimeri a catena lineare, ramificata ecc.) e sono caratterizzati da cattiva conducibilità elettrica, bassa densità e basse temperature di rammollimento. Le proprietà meccaniche sono estremamente variabili in funzione della natura dei costituenti e del tipo di struttura del polimero. L'affinità chimica esistente tra molti polimeri e i tessuti dell'organismo conferisce a questi materiali eccellenti caratteristiche di biocompatibilità, intesa come interazione che promuove l'accettazione del materiale da parte dell'organismo ospite. Talvolta questa interazione può condurre a una sorta di metabolizzazione del polimero che nel tempo viene degradato e successivamente eliminato. Questi polimeri vengono impiegati per la

realizzazione di dispositivi per applicazioni temporanee (es. fili di sutura e sistemi di osteosintesi), i quali si degradano in tempi compatibili con quelli necessari al dispositivo per esplicare la sua azione.

Esistono, oltre ai polimeri naturali, quali il collagene, le proteine, la cellulosa e gli acidi nucleici, anche polimeri sintetici (materie plastiche, fibre tessili, elastomeri). Alcuni di essi presentano una struttura chimica molto simile a quella dei polimeri naturali contenuti nei tessuti biologici, tanto che in alcuni casi è possibile ottenere dei legami chimici tra le catene dei polimeri naturali e quelle dei polimeri sintetici al fine, ad esempio, di prevenire la coagulazione del sangue e di fissare protesi artificiali al tessuto osseo.

Si possono scegliere diversi modi per classificare i polimeri<sup>(1)</sup>: ad esempio, la classificazione secondo la natura dei costituenti divide i polimeri in omopolimeri, costituiti da una sola tipologia monomerica, e copolimeri, i quali sono caratterizzati dalla presenza di due o più tipi di monomeri. In base al peso molecolare i polimeri si dividono in oligomeri, se la loro catena è costituita da meno di 1500 unità, polimeri a basso peso molecolare, se presentano dalle 1500 alle 5000 unità, e polimeri ad elevato peso molecolare, costituiti da più di 10000 unità.

Questi materiali trovano un numero molto elevato di applicazioni, anche perché rendono facilmente possibile la realizzazione di manufatti di differenti forme, quali fibre, tessuti, pellicole, barre, forme geometricamente complesse, liquidi viscosi. È possibile inoltre fabbricare gran parte dei materiali compositi, in cui i polimeri possono assumere sia la funzione di matrice, sia quella di riempitivo.

I polimeri costituiscono inoltre circa il 45% dei biomateriali<sup>(2)</sup>, e le loro tipiche applicazioni in biomedicina spaziano dall'ortopedia, alle protesi cardiovascolari, fino alla realizzazione d'interi organi artificiali; polimeri liquidi o in forma di gel sono largamente impiegati nel settore oftalmico per la produzione di lenti a contatto e come riempitivi nelle protesi di tipo cosmetico. Occorre tenere presente che i materiali polimerici ad uso biomedico differiscono dagli stessi materiali impiegati per altre applicazioni in quanto devono contenere quantità molto limitate di additivi e di residui monometrici che potrebbero essere rilasciati nei tessuti.

Nella Tabella 1.2 sono riportati i polimeri di maggiore rilievo in ambito biomedicale.

Per una trattazione più specifica di questi materiali si faccia riferimento al paragrafo 1.2.

Tabella 1.2 Principali polimeri impiegati nel settore biomedicale.

<b>Polimero</b>	<b>Sigla</b>	<b>Principali applicazioni</b>
Acido poliglicolico	PGA	Suture biodegradabili, placche e chiodi intramidollari, placche di frattura degradabili
Acido polilattico	PLA	Placche e chiodi intramidollari, legamento artificiali, placche di frattura degradabili, somministrazione controllata di farmaci
Copolimeri Butadiene-Stirene	BS	Articoli monouso, imballaggi
Copolimeri Stirene-Acrilonitrile	SAN	Aspiratori per sangue, componenti di emodializzatori
Poliacrilonitrile	PAN	Membrane per emodialisi
Poliammidi		Suture
Policarbonato	PC	Membrane per ossigenatori ed emodialisi, linee ematiche
Polidrossietilmetacrilato	PHEMA	Lenti a contatto, legamenti artificiali
Polietilene	PE; LDPE	Film, imballaggi, cateteri, tubi connettori, somministrazione controllata di farmaci
Polietilene (pm > 2000000)	UHMWPE	Superfici articolari, fibre per compositi, placche ortopediche, rivestimenti steli femorali
Polieterileneftalato	PET	Protesi vascolari, anelli di sutura, suture, passaggi transcutanei, componenti di protesi valvolari, componenti di assistenza cardiaca
Polimetilmetacrilato	PMMA	Cemento osseo, lenti a contatto, lenti intraoculari, membrane per emodialisi, materiali dentari
Polipropilene	PP	Imballaggi sterili, siringhe, connettori, membrane per ossigenatori, fili di sutura, anse di supporto lenti intraoculari
Polisolfone		Membrane per ossigenatori ed emodialisi
Politetrafluoroetilene	PTFE	Protesi vascolari, componenti di protesi valvolari, legamenti artificiali, rivestimenti
Poliuretani	PURs	Cateteri, cannule, tubi endotracheali, protesi valvolari, membrane per emodialisi, sacche ventricolari, rivestimenti emocompatibili, dispositivi di assistenza cardiaca, somministrazione controllata di farmaci, protesi vascolari
Polivinilcloruro	PVC	Sacche per sangue, tubi indotracheali, guanti monouso, cateteri, accessori monouso
Siliconi		Cateteri, drenaggi, membrane, pelle artificiale, impianti per chirurgia plastica, protesi vascolari, protesi tracheali, rivestimenti, infusori, componenti di protesi valvolari

#### 1.1.2.4 MATERIALI BIOLOGICI

I materiali biologici sono costituiti da parti espianate, animali o umane, che vengono utilizzate dopo essere state opportunamente trattate al fine di eliminare la componente deteriorabile e stabilizzare la matrice tissutale<sup>(3)</sup>. I materiali provenienti da tessuti molli vengono solitamente impiegati come protesi valvolari e vascolari, mentre quelli provenienti da tessuti duri vengono utilizzati in ambito ortopedico in qualità di riempitivi. Il principale vantaggio dei materiali biologici è

l'ottima biocompatibilità, mentre i principali problemi derivano dalla loro scarsa affidabilità, dalla difficoltà di conservazione e trattamento, e dalla forte calcificazione a cui vanno incontro nel tempo, che ne irrigidisce e deteriora la struttura. I materiali connettivi sono la classe di tessuti biologici risultata di maggiore interesse; appartengono a tale categoria ossa, cartilagini, sangue, endoteli e linfa.

### **1.1.2.5 MATERIALI COMPOSITI**

Con tale accezione si identificano i materiali le cui proprietà possono essere modulate in ragione della destinazione d'uso e nei quali la distinzione di fase è percettibile solo su scala microscopica.

In base alla percentuale e alla relativa disposizione di tali costituenti, essi prendono il nome di matrice (la componente più abbondante) e carica (rinforzo o riempitivo). La carica può essere costituita da piccole particelle puntiformi (composti particellari), piccole fibre allungate (composti rinforzati con fibre) o lunghe fibre disposte ordinatamente (composti strutturati), e ha la funzione di incrementare le proprietà meccaniche (rinforzo), oppure decrementarle (riempitivo). Pur essendo caratterizzati da difficile lavorabilità e scarsa coesione tra i diversi componenti, i compositi presentano un notevole vantaggio in termini di facile modulabilità delle proprietà a seconda dell'utilizzo richiesto. Il termine compositi è generalmente riservato ai materiali nei quali le proprietà risultano significativamente diverse rispetto a quelle di un materiale omogeneo: secondo questa definizione sono considerati materiali compositi la vetroresina, e le plastiche rinforzate; non lo sono invece l'acciaio e le leghe. La grande importanza e diffusione dei materiali compositi è motivata dal fatto che essi possono fornire prestazioni migliori rispetto a quelle dei materiali omogenei. Le loro applicazioni in ambito biomedico sono numerosissime e consistono in particolare in riempitivi per protesi odontoiatriche, protesi porose, cementi ossei rinforzati e impianti ortopedici personalizzati.

In Tabella 1.3 è riportata una schematizzazione dei diversi biomateriali e delle loro principali caratteristiche.

Tabella 1.3 Classificazione dei biomateriali.

<i>Materiali</i>	<i>Vantaggi</i>	<i>Svantaggi</i>	<i>Applicazioni</i>
Metallici (acciai, titanio e leghe, leghe di cobalto)	Elevate caratteristiche meccaniche, resistenza alla usura	Scarsa biocompatibilità, alta densità di massa, facilità di corrosione in ambiente fisiologico	Mezzi di osteosintesi, protesi per ortopedia e odontoiatria
Polimerici (siliconi, poliuretani, polietilene, acrilati, fluorurati, poliesteri)	Tenacia, bassa densità, facilità di lavorazione	Bassa resistenza meccanica, degradabilità nel tempo	Suture, cateteri, drenaggi, protesi cardiovascolari, cementi per ossa, dispositivi per il trattamento del sangue
Ceramici (ossidi di alluminio, alluminati di calcio, ossidi di titanio, carboni)	Buona biocompatibilità, inerzia chimica, elevata resistenza alla compressione, resistenza alla corrosione	Bassa affidabilità meccanica, bassa resistenza alla trazione impulsiva, alta densità di massa, fragilità, difficoltà di lavorazione	Protesi d'anca, protesi dentali, dispositivi percutanei
Compositi (metalli rivestiti con ceramici, matrici rinforzate con fibre)	Buona biocompatibilità, inerzia chimica, buone caratteristiche meccaniche, resistenza alla corrosione	Scarsa coesione tra i componenti, difficoltà di lavorazione	Protesi valvolari cardiache, protesi di ginocchio
Biologici (vene, pericardio, valvole cardiache)	Ottima biocompatibilità	Scarsa affidabilità meccanica, difficoltà di trattamento e conservazione	Protesi vascolari, protesi valvolari, rivestimenti

## 1.2 MATERIALI POLIMERICI

Per la trattazione generale si rimanda al paragrafo 1.1.2.3.

### 1.2.1 STRUTTURA E CRISTALLINITA'

La struttura è uno dei fattori che più influenza le caratteristiche di un polimero.

I polimeri a catena lineare presentano lunghe sequenze di unità costituenti, quelli a catena ramificata presentano catene secondarie laterali che si diramano dalla principale, mentre i polimeri reticolati contengono catene unite tra loro da ponti a legami covalenti, a formare un'unica macromolecola (Figura 1.3).

I polimeri a catena lineare o ramificata sono meno rigidi, e in generale possiedono proprietà meccaniche peggiori rispetto a quelle dei polimeri reticolati. Infatti, le catene lineari e ramificate sono legate fra loro da legami deboli (del tipo Van der Waals, dipolo-dipolo, etc.), che consentono, quando il polimero è sottoposto a sollecitazione, lo scorrimento delle catene l'una rispetto all'altra. Tale scorrimento, di tipo viscoso, è responsabile del comportamento viscoelastico dei polimeri a catena lineare o ramificata.

Nel caso dei polimeri reticolati, la particolare conformazione strutturale delle catene, unite tra loro mediante legami covalenti, fa sì che esse scorrano con

maggior difficoltà a causa degli impedimenti fisici che si generano. I polimeri reticolati hanno una massa assimilabile ad una sola macromolecola che si estende tridimensionalmente e, quindi, possiedono proprietà di rigidità e resistenza meccanica superiori.

Quanto al grado di cristallinità di un polimero, esso è definito come la percentuale in peso della sostanza allo stato cristallino rispetto al peso totale. In generale, il grado di cristallinità è molto elevato nei polimeri a struttura lineare non ramificata, mentre diminuisce drasticamente per quelli costituiti da monomeri fortemente asimmetrici, fortemente ramificati, o con frequenti legami trasversali (reticolati). In questo caso i polimeri presentano una prevalente fase amorfa con la formazione, solo localmente, di una fase cristallina. Anche la presenza di gruppi funzionali può incidere positivamente sulla cristallinità: essi, infatti, possono favorire la formazione di legami deboli tra le catene.

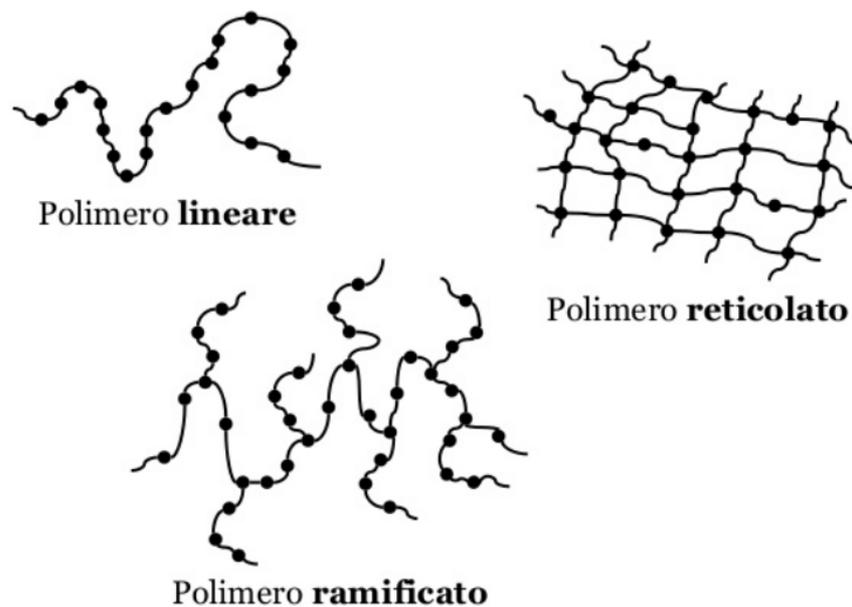


Figura 1.3 Esempi di polimeri: lineare, reticolato e ramificato.

## 1.2.2 PROPRIETA' DEI POLIMERI

### 1.2.2.1 PROPRIETA' TERMOMECCANICHE

I materiali polimerici sono classificabili, in base alle loro proprietà termomeccaniche, in:

- termoplastici;
- termoindurenti.

I termoplastici, a catena lineare o ramificata, presentano un progressivo rammollimento con l'aumentare della temperatura, senza alterazione delle loro proprietà meccaniche. Questo li rende modellabili e riutilizzabili plasticamente un numero praticamente illimitato di volte, purché ciò avvenga in un certo intervallo di temperature.

I termoindurenti, invece, dopo un iniziale rammollimento, subiscono alterazioni chimiche dovute proprio al calore, il quale determina il completamento della polimerizzazione ed il conseguente indurimento del polimero.

I dispositivi medici impiantabili sono realizzati nella maggior parte dei casi con polimeri termoplastici. Questi materiali, come conseguenza delle proprietà termomeccaniche e viscoelastiche delle macromolecole costituenti, hanno diagrammi sforzo-deformazione che dipendono da:

- velocità di deformazione;
- temperatura.

L'analisi delle curve sforzo-deformazione ottenute per differenti valori della temperatura o della velocità di deformazione, mostrano due aspetti importanti:

- il polimero diventa più fragile all'aumentare della velocità di deformazione;
- il polimero diventa meno fragile all'aumentare della temperatura.

Per i materiali polimerici, si definiscono, inoltre, alcune temperature caratteristiche:

- la temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ), tipica per ogni polimero, in corrispondenza della quale il polimero passa dallo stato vetroso (caratterizzato da maggiore rigidità) a quello gommoso, o viceversa;
- la temperatura di rammollimento ( $T_r$ ) alla quale un polimero amorfo passa dallo stato solido gommoso a quello fuso liquido;
- la temperatura di fusione ( $T_m$ ), analoga della  $T_r$ , per i polimeri cristallini;
- la temperatura limite di stabilità chimica ( $T_L$ ), oltre la quale il polimero si degrada irreversibilmente in seguito alla rottura dei legami chimici. Tale temperatura rappresenta perciò il limite del campo d'analisi del comportamento dei polimeri in funzione della temperatura,

Il grafico riportato in Figura 1.4 mostra un confronto fra i comportamenti del modulo elastico (in scala logaritmica), al variare della temperatura, per tre classi di polimeri: un polimero reticolato, uno parzialmente cristallino, ed uno amorfo. Il

primo non mostra cambiamenti nella rigidità all'aumentare della temperatura. Nel secondo, invece, il modulo elastico diminuisce leggermente al superamento della temperatura di transizione vetrosa e sensibilmente al superamento della temperatura di fusione. Il terzo, infine, subisce simili variazioni di rigidità sia al superamento della temperatura di transizione vetrosa, sia dopo quella di rammollimento.

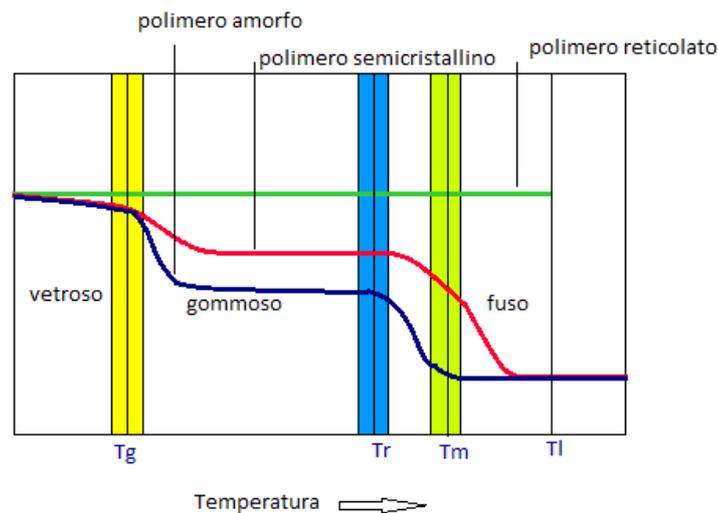


Figura 1.4 Andamento del modulo di elasticità, in funzione della temperatura, per polimeri a differente struttura.

### 1.2.2.2 GRADO DI POLIMERIZZAZIONE E PESO MOLECOLARE

Il peso molecolare dei materiali polimerici è un parametro molto importante che influenza alcune proprietà del materiale stesso, tra cui:

- viscosità;
- resistenza a rottura;
- temperatura di transizione vetrosa.

In generale macromolecole provenienti da uno stesso processo di polimerizzazione sono costituite da catene con differenti lunghezze e, per questo motivo, il polimero è caratterizzato da una distribuzione dei pesi molecolari piuttosto che da un unico peso molecolare.

Allo scopo di stimare il peso molecolare complessivo, si fa riferimento ad un grado di polimerizzazione medio, ottenuto dal rapporto tra numero di molecole di

monomero e numero complessivo delle macromolecole. In particolare, si può far riferimento a due diverse grandezze:

- il peso molecolare medio numerale ( $M_n$ ) dato dal rapporto fra una determinata quantità di materiale ed il numero di macromolecole presenti al suo interno:

$$M_n = \sum W_i / \sum N_i,$$

dove  $i$  rappresenta la  $i$ -esima frazione di un campione e  $N_i$  sono le moli di peso molecolare  $M_i$  e massa complessiva  $W_i$ , esprimibile anche come:

$$M_n = \sum n_i M_i,$$

dove  $n_i$  è la frazione numerica (o molare) della specie  $i$ -esima, definita come il rapporto tra le moli della specie  $i$  e la somma di tutte le moli presenti nel campione:

$$n_i = N_i / \sum N_i.$$

Per analogia si definisce grado di polimerizzazione medio numerico ( $X_n$ ):

$$X_n = \sum n_i X_i.$$

Come si evince dalle precedenti formule i valori medi sono ottenibili dalla somma dei valori assunti dalle diverse macromolecole moltiplicate per un opportuno peso statistico, tale per cui:

$$0 < n_i < 1,$$

$$\sum n_i = 1.$$

Sebbene il grado di polimerizzazione e il peso molecolare siano quantità discrete, conviene considerarle nel calcolo come continue e riformularle in termini di integrali del prodotto della funzione di distribuzione per l'infinitesimo incremento  $dM$  (o  $dX$ ):

$$M_n = \int M \cdot n(M) \cdot dM,$$

$$X_n = \int X \cdot n(X) \cdot dX$$

- il peso molecolare medio ponderale ( $M_w$ ), cioè la media pesata sulla massa delle macromolecole presenti:

$$M_w = \sum w_i M_i,$$

dove  $w_i$  è la frazione ponderale, data dal rapporto tra il peso molecolare  $i$ -esimo e il peso totale del campione ( $w_i = (N_i \cdot M_i) / \sum (N_i \cdot M_i)$ ).

Il parametro utilizzato per descrivere l'ampiezza della distribuzione dei pesi molecolari è l'indice di polidispersità D:

$$D = M_w/M_n,$$

il cui limite inferiore teorico è 1, ma che può assumere, nel caso di matrici polimeriche, valori anche superiori a 2 (mediamente è compreso tra 1.5 e 2.5).

### 1.2.3 FORMAZIONE DEI POLIMERI

Con il termine polimerizzazione si intende il processo che porta alla formazione dei polimeri a partire dai monomeri. Tra i principali processi di polimerizzazione figurano la policondensazione, la poliaddizione, la polimerizzazione ad apertura di anello (ROP), e la miscelazione reattiva o *reactive blending*.

#### 1.2.3.1 POLICONDENSAZIONE

È una tecnica di sintesi in cui, in seguito all'unione dei vari monomeri, viene prodotta una piccola molecola di scarto (spesso acqua, ma anche NaCl, CH<sub>3</sub>OH e HCl). Tale processo, che coinvolge l'intera massa dei reagenti, risulta piuttosto lento e tende ad interrompersi prima di ottenere catene molto lunghe (proprietà migliori a pesi molecolari più alti). I polimeri ottenuti mediante policondensazione presentano una formula chimica differente rispetto a quella dei monomeri costituenti.

Alcuni esempi di polimeri sintetizzati mediante policondensazione sono i poliesteri, le poliammidi, i poliuretani e i polisilossani.

#### 1.2.3.2 POLIADDIZIONE

Si tratta di una reazione a catena in cui l'unione tra monomeri avviene direttamente senza sottoprodotti di reazione; per questo motivo la formula chimica del polimero non varia da quella del monomero. Questa tecnica, attraverso cui si possono ottenere catene anche di lunghezza e peso molecolare molto elevati, prevede tre distinte fasi:

- fase iniziale o induzione: le molecole d'iniziatore attivano le molecole di monomero (l'attivazione può essere chimica o fisica), che presenterà al termine di questo step un elettrone spaiato pronto ad essere coinvolto in un legame covalente. Può essere descritta dalla seguente formula:  $R\cdot + M \Rightarrow$

$RM\cdot$ , dove  $R\cdot$  è il radicale con l'elettrone spaiato,  $M$  il monomero non attivato e  $RM\cdot$  il dimero;

- fase di propagazione: le catene polimeriche si accrescono in lunghezza, seguendo un processo iterativo secondo cui l'elettrone spaiato di  $RM\cdot$  si lega ad un secondo elettrone di legame reso disponibile da un monomero non ancora attivato. Questa seconda fase può essere dunque esplicitata come:  $RM\cdot + M \Rightarrow RMM\cdot$  per poi svilupparsi nella forma  $RM_nM\cdot \Rightarrow RM_{(n+1)}M\cdot$ ;
- fase di terminazione: è la fase di inattivazione molecolare, e coincide con la chiusura del legame aperto rappresentato dall'elettrone spaiato. Può avvenire in diverse modalità: interazione tra una catena attiva e un radicale iniziatore  $R\cdot$ , ovvero:  $RM_nM\cdot + R\cdot \Rightarrow RM_{(n+1)}R$ , trasferimento del sito attivo a un'altra molecola ( $RM_nM\cdot + RH \Rightarrow RM_{(n+1)}H + R\cdot$ ), per interazione con altre sostanze o impurezze (se l'impurezza è indicata con  $S\cdot$ :  $RM_nM\cdot + S\cdot \Rightarrow RM_{(n+1)}S$ ), oppure a causa di interazioni tra due catene attive. In quest'ultimo caso si può avere accoppiamento, se le due catene si uniscono ( $RM_nM\cdot + RM_mM\cdot \Rightarrow RM_{(n+m+2)}R$ ), o disproporzionamento, se le due catene si rendono inattive rimanendo entità separate ( $RM_nM\cdot + RM_mHM\cdot \Rightarrow RM_{(n+1)}H + R-M_{(m-1)}-M=M$ ).

La reazione di poliaddizione è rapida e altamente esotermica: quest'ultimo aspetto pone dei seri problemi per quanto riguarda la polimerizzazione diretta *in situ* biologico, che potrebbe causare eccessivi aumenti di temperatura locale, con effetti deleteri per l'organismo.

Tra i polimeri ottenuti per poliaddizione figurano il polietilene, il polimetilmetacrilato, il polipropilene, e il polivinilcloruro.

#### 1.2.3.4 RING OPENING POLYMERIZATION

Un altro metodo di sintesi molto promettente è la *Ring Opening Polymerization* (ROP) di lattoni (esteri ciclici) e di lattidi, esteri intermolecolari che si formano per reazione tra due molecole di un acido  $\alpha$ -idrossicarbossilico (Figura 1.5).

Si tratta di una poliaddizione che, potendo essere condotta in presenza di limitate reazioni secondarie, agevola il controllo di proprietà quali il peso molecolare<sup>(4)</sup> e la sua distribuzione, o la presenza di opportuni gruppi funzionali terminali. Nel caso del lattide impiegato come monomero di partenza, la reazione fu realizzata

per la prima volta da Carothers nel 1932, ma non furono ottenuti polimeri ad elevato peso molecolare, finché nel 1954 DuPont non migliorò le tecniche di purificazione del lattide (Garlotta, 2002), processo che è stato poi perfezionato e brevettato dalla Cargill Dow.

La polimerizzazione ad apertura di anello è un processo in cui, attraverso una propagazione di tipo ionico, il gruppo terminale di una catena polimerica funge da centro attivo su cui altri monomeri ciclici si congiungono formando catene polimeriche lineari di maggiore lunghezza contenenti un gruppo estereo. Il meccanismo della reazione si basa su una sorta di attivazione del monomero. A seconda della natura del centro reattivo della catena di propagazione si può avere una polimerizzazione ad apertura di anello anionica o cationica. Il meccanismo cationico (applicato alla maggior parte dei monomeri eterociclici per ottenere poliacetali, poliammidi, polieteri e poliesteri), consiste nella protonazione o nell'alchilazione dell'ossigeno carbossilico ottenendo di conseguenza un'attivazione elettrofilica del legame. Questo legame è poi rotto dall'attacco nucleofilo di un altro monomero, un processo che si ripete finché non si ha la terminazione a causa di un nucleofilo, come ad esempio l'acqua<sup>(5)</sup>.

Il meccanismo anionico, applicato al propilene solfuro, l'ossido di etilene e l' $\epsilon$ -caprolattame, prevede che sia lo stadio d'attivazione sia quello di propagazione si basino su un attacco nucleofilo di un anione sul gruppo CO del lattide, seguito dalla rottura del legame CO-O. L'attacco può anche deprotonare il carbonio in posizione iniziale, causando delle reazioni di deprotonazione/riprotonazione che portano a racemizzazione (una reazione secondaria impossibile da evitare, e che limita l'impiego di questa tecnica a livello industriale<sup>(6)</sup>).

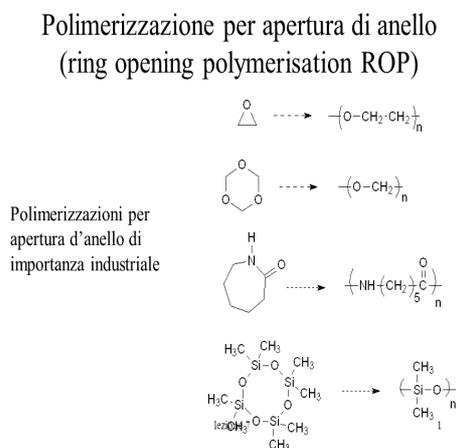


Figura 1.5 Esempi di ROP.

### 1.2.3.5 REACTIVE BLENDING

Per *reactive blending* (o miscelazione reattiva), si intende la miscelazione tra due polimeri o tra un polimero e un composto a basso peso molecolare che porta alla formazione di un nuovo materiale polimerico. Grazie alle alte temperature che vengono raggiunte durante questi processi, si verificano numerose reazioni di scambio tra i vari gruppi funzionali dei diversi polimeri coinvolti; tali reazioni di scambio possono coinvolgere sia i gruppi terminali, sia i gruppi funzionali presenti all'interno delle catene. Inoltre, all'aumentare dei tempi di reazione, si riscontra un progressivo cambiamento nella struttura chimica della macromolecola, che può evolvere da struttura a blocchi a una struttura random<sup>(7)</sup>. Il *reactive blending* può essere effettuato in soluzione, allo stato solido e in fase fusa, quest'ultima indubbiamente la più vantaggiosa: la possibilità di lavorare in assenza di solventi permette la riduzione dei costi associati alla rimozione, al recupero, ed alle perdite dello stesso solvente, ma anche di attenersi alle vigenti normative ambientali. In secondo luogo, si ha la possibilità di ottenere un buon controllo della temperatura, una buona efficienza di pompaggio, ed un risparmio economico derivante dall'integrazione di più operazioni in un'unica apparecchiatura. Occorre poi ricordare che la lavorazione da fuso permette di ridurre la probabilità di contaminazione per i prodotti finali. Tale metodica richiede, d'altra parte, reazioni rapide (per garantire l'economicità del processo), in grado di avvenire ad alte temperature, in cui i reagenti coinvolti ed i legami chimici ottenuti siano termicamente stabili.

### 1.2.4 LAVORAZIONE

La fabbricazione di un dispositivo polimerico, nel caso in cui si tratti di un polimero termoplastico, si compone di cinque fasi fondamentali (Figura 1.6):

- polimerizzazione;
- preparazione termica del polimero, fornito in forma di grani, polveri, barre o fogli: in questa fase i componenti polimerici di base vengono scaldati fino alla  $T_g$ ;
- modellazione del polimero fuso nella forma voluta attraverso diverse tecniche, tra cui estrusione, stampaggio per compressione, stampaggio a

iniezione, stampaggio per soffiatura, stampaggio sotto vuoto e fusione diretta;

- lavorazione meccanica per asportare il truciolo in eccesso, utilizzando tornio, fresa e altre rifinitrici;
- finitura finale, in cui si migliorano le proprietà superficiali del materiale.

Per quanto riguarda i polimeri termoindurenti, gli step si riducono a quattro:

- posizionamento degli iniziatori di catena negli stampi;
- cessione di calore e applicazione di pressione o altri agenti catalitici: formazione in stampi per fusione diretta, stampaggio per compressione o stampaggio ad iniezione;
- estrazione dallo stampo e lavorazione meccanica primaria;
- finitura finale.

Lo stampaggio a compressione nella sua forma più generale prevede l'utilizzo di una lastra preformata; la successiva applicazione di pressione spinge la resina preriscaldata contro le pareti dello stampo corrispondente al negativo del componente desiderato e, continuando il riscaldamento, si giunge alla completa reticolazione della resina termoindurente. Nello stampaggio ad iniezione i granuli di materia plastica vengono caricati sulla superficie di una vite roteante; la rotazione della vite forza i granuli contro le pareti riscaldate del cilindro, provocandone la fusione a causa del calore di compressione e dell'attrito. Il processo si arresta quando la giusta quantità di materia plastica arriva allo stampo, posto al termine della vite. I vantaggi riscontrati con questo processo sono l'elevata velocità di produzione, l'alta qualità dei pezzi ottenuti, la complessità di forma che si può ottenere, ed una buona finitura superficiale. Lo stampaggio per soffiatura, invece, consiste nel posizionamento della plastica preriscaldata all'interno di uno stampo caldo, la sua compressione contro le pareti insufflando aria compressa, ed il finale raffreddamento dello stampo. Una variante dello stampaggio per soffiatura è lo stampaggio (o formatura) sottovuoto: questa tecnica consiste nel riscaldamento di una piastra di polimero e la sua successiva adesione allo stampo mediante il vuoto. Infine, l'estrusione è una tecnica di modellazione basata sul rammollimento, compattamento e fusione del polimero e sulla successiva forzatura del fuso contro matrici, rappresentanti il negativo del pezzo voluto, attraverso viti elicoidali senza fine.

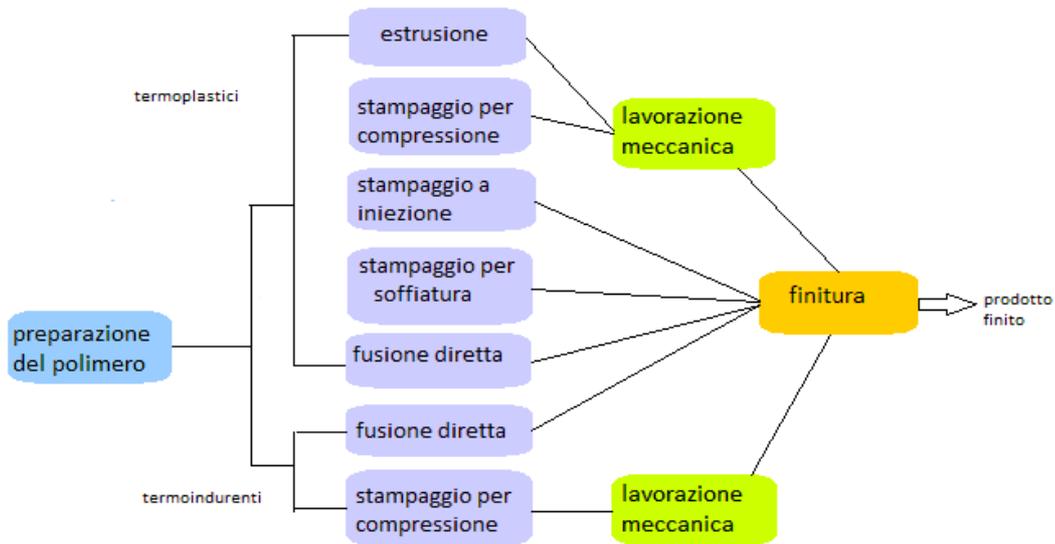


Figura 1.6 Fasi della lavorazione dei polimeri.

## 1.2.5 DEGRADAZIONE

Una delle caratteristiche più interessanti dei materiali polimerici è sicuramente quella di poter essere degradati dall'organismo fino anche alla dissoluzione totale, senza lasciare tracce nel sito d'impianto e senza rilasciare sostanze nocive per l'organismo stesso. Dal punto di vista del materiale, la degradazione consiste in una graduale alterazione chimica della struttura, dovuta alla rottura di legami appartenenti alla catena principale o a gruppi laterali, che ne modifica profondamente anche le caratteristiche fisiche; tale processo può essere artificialmente indotto ad un tempo specifico dopo l'inserimento dell'impianto, oppure può innescarsi fin dal primo contatto con i fluidi corporei, proseguendo poi con una velocità definita dalle condizioni in cui il materiale si trova. Gli effetti responsabili della degradazione polimerica sono distinguibili in:

- effetti chimici: rotture casuali delle catene e rottura di legami chimici con formazione di prodotti secondari;
- effetti della sterilizzazione: necessaria al fine di evitare infezioni da parte di microrganismi patogeni e saprofiti; le modalità attraverso cui tale processo si attua variano in funzione del polimero in analisi. Il metodo di sterilizzazione più dispendioso in termini economici, ma con minori rischi di degradazione, prevede l'uso di agenti chimici quali gas o soluzioni a basse temperature;

- effetti meccano-chimici: sollecitazioni meccaniche, statiche o cicliche, possono indurre la frammentazione del polimero ed il conseguente rilascio di residui e particelle con elevato rapporto superficie-volume, entrambi fattori che contribuiscono alla degradazione;
- effetti dell'ambiente biologico: l'aggressività dell'ambiente biologico nei confronti dei polimeri è dovuta a ioni (in particolare lo ione  $\text{OH}^-$ ) ed all'ossigeno presenti. Alla biodegradazione ossidativa si affiancano anche quella enzimatica e quella idrolitica.

La scelta di un polimero più o meno idrolizzabile e più o meno resistente all'assorbimento di acqua è strettamente collegata al tipo di applicazione e destinazione d'uso.

## 1.2.6 CLASSIFICAZIONE PER ORIGINE

I polimeri ad uso biomedicale possono essere suddivisi in base alla loro origine: si può parlare quindi di polimeri di origine naturale e polimeri di origine sintetica.

### 1.2.6.1 POLIMERI DI ORIGINE NATURALE

#### 1.2.6.1.1 Collagene

Il collagene è una proteina strutturale, naturalmente sintetizzata dall'organismo umano, caratterizzata dall'alternanza dei seguenti amminoacidi: -X-GLY-PRO-HYP-GLY-Y, dove GLY rappresenta la glicina, PRO la prolina, HYP l'idrossiprolina, e X e Y due altri generici amminoacidi (Figura 1.7). Il collagene si trova all'interno dell'organismo nella pelle, nei tendini, nelle ossa, nelle cartilagini e nei tessuti cardiovascolari, con la funzione di limitare la deformazione dei tessuti, rendendoli più rigidi e resistenti ed impedendone brusche rotture. A partire dai singoli amminoacidi salendo fino alla fibra di collagene si incontrano diverse strutture: gli amminoacidi (GLY, PRO e HYP), le sequenze primarie di amminoacidi (-X-GLY-PRO-HYP-GLY-Y-), le singole eliche (disposizione primaria), le singole eliche avvolte in un superavvolgimento, triple eliche in cui si legano tre singole eliche avvolte l'una sull'altra e unite attraverso legami ad idrogeno e *cross-link*, minifibrille costituite dall'impacchettamento delle triple eliche, fibrille di collagene ottenute dall'unione

di più minifibrille, ed infine le macrofibre di collagene. Le principali caratteristiche del collagene sono l'ottima resistenza a trazione (indispensabile per l'espletamento, da parte dei tessuti, delle varie funzionalità richieste), l'elevato modulo di Young (dell'ordine dei GPa) e l'alto sforzo a rottura (nel range dei 50 - 100MPa). Grazie alla sua elevata biocompatibilità, esso trova applicazione nel campo dell'ingegneria tissutale, dove i tessuti ricchi di collagene espianati possono essere utilizzati, dopo opportuni trattamenti, per la realizzazione di protesi impiantabili, quali protesi valvolari, vasi sanguigni, pericardio, tendini e legamenti.

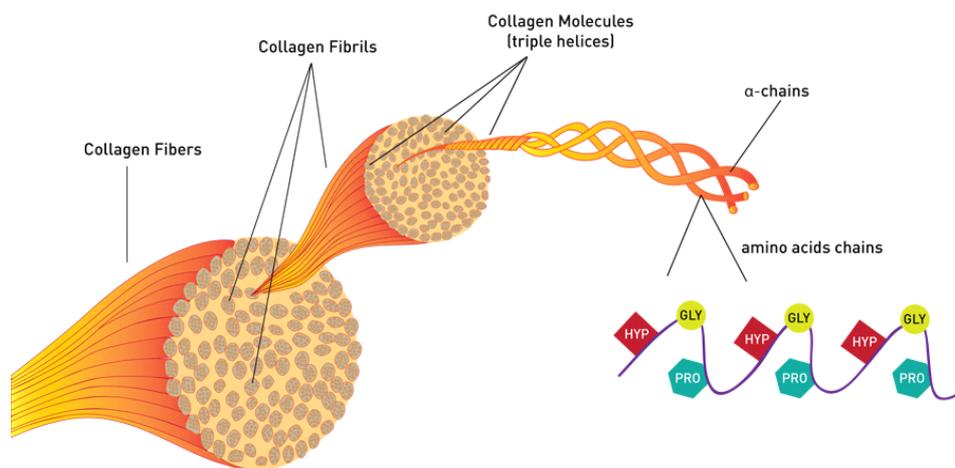


Figura 1.7 Struttura del collagene.

### 1.2.6.1.2 Polisaccaridi

I polisaccaridi sono presenti negli organismi animali con funzione energetica, oltre a costituire una delle maggiori componenti dei tessuti vegetali (la cellulosa, ad esempio, rappresenta la principale componente del tessuto fibroso delle pareti cellulari vegetali). Risultano materiali molto interessanti in campo biomedico in quanto biodegradabili e caratterizzati da facile lavorabilità.

### 1.2.6.1.3 Proteoglicani

I proteoglicani sono macromolecole composte da un asse proteico (*core*) a cui sono legate covalentemente lunghe catene di disaccaridi o glicosamminoglicani (GAG). I proteoglicani possono trovarsi nella matrice extracellulare oppure inseriti nella membrana plasmatica come proteine integrali. I proteoglicani

presenti nella matrice si associano non covalentemente e in gran numero a una singola molecola diacido ialuronico; intercalate a questi enormi aggregati proteoglicanici si trovano proteine fibrose come collagene, fibronectina ed elastina, che formano una rete complessa in grado di conferire resistenza meccanica alla matrice stessa. In biomedicina, i proteoglicani vengono sfruttati in combinazione con il collagene in alcuni tipi di *scaffold* per l'ingegneria tissutale.

#### 1.2.6.1.4 Polipeptidi

I polipeptidi sono polimeri le cui unità monomeriche sono costituite da amminoacidi tenuti assieme da legami peptidici, e i cui composti sono le proteine. Queste ultime vengono impiegate soprattutto nell'ingegneria tissutale per la ricostruzione di ossa, cartilagini e tessuti molli, poiché sono caratterizzate da ottima biocompatibilità e capacità di favorire la crescita cellulare. Essi però presentano problematiche in termini di difficile lavorabilità e di velocità di degradazione, variabile da soggetto a soggetto e difficilmente predicibile.

#### 1.2.6.1.5 Chitina

La chitina (Figura 1.8) costituisce uno dei principali componenti dell'esoscheletro degli insetti, della parete cellulare dei funghi, ed è presente anche nell'epidermide o in altre strutture superficiali di molti invertebrati. Dopo la cellulosa, la chitina è il più abbondante biopolimero presente in natura. Un suo derivato, il chitosano, presenta un'elevata biocompatibilità in vivo, ed è considerato un potenziale materiale per la realizzazione di *scaffold* per la ricostruzione di ossa, cartilagini e pelle.

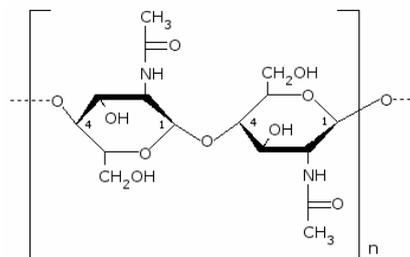


Figura 1.8 Unità strutturale della chitina.

## 1.2.6.2 POLIMERI DI ORIGINE SINTETICA

### 1.2.6.2.1 Polianidridi

Le polianidridi sono polimeri caratterizzati dalla presenza di due gruppi carbonilici legati attraverso un legame estereo (Figura 1.9). I loro legami sono idroliticamente instabili, proprietà che ne limita fortemente le applicazioni: essi infatti vengono impiegati quasi esclusivamente per la realizzazione di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci.

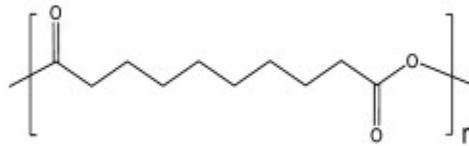


Figura 1.9 Esempio di polianidride.

### 1.2.6.2.2 Poliammidi

Le poliammidi sono polimeri da policondensazione ottenuti dall'unione di un diacido e una diammina (Figura 1.10); fra queste si ricordano il Nylon e le ammidi aromatiche (o poliaramidi). Sono caratterizzate da legami estremamente stabili idroliticamente, erodibili solo da enzimi specifici, e presentano la tendenza a formare fibre, grazie ai legami ad idrogeno intercatena; sono inoltre caratterizzate da elevata cristallinità, che ne accresce la resistenza in direzione della fibra. Inoltre, il numero e la distribuzione dei gruppi ammidici (-CONH-) influenzano proprietà come il carico di rottura, l'allungamento a rottura, il modulo elastico e la temperatura di rammollimento ( $T_r$ ).

Tra le ammidi aromatiche, il poli-(p-fenilene tereftalamide), noto come Kevlar, risulta essere una delle più importanti. Questo materiale, ampiamente usato per la realizzazione di compositi, viene facilmente trasformato in fibre che hanno resistenza cinque volte maggiore rispetto a quella dell'acciaio.

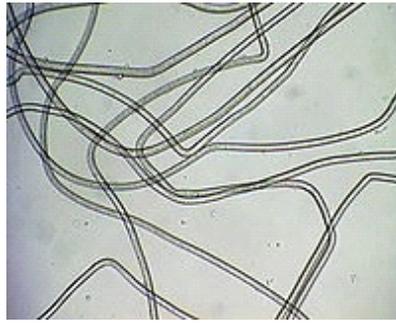


Figura 1.10 Poliammide vista al microscopio.

### 1.2.6.2.3 Poliortoesteri

I poliortoesteri sono polimeri idrofobi e amorfi caratterizzati dalla presenza di tre legami eterei (Figura 1.11). Dal momento che possono andare incontro ad erosione superficiale, e tendono a diventare sottili senza però sgretolarsi, risultano particolarmente adatti alla realizzazione di matrici per il rilascio controllato di farmaci.

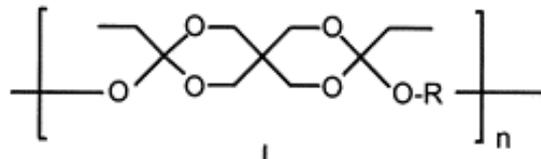


Figura 1.11 Esempio di poliortoestere.

### 1.2.6.2.4 Policarbonati alifatici

I policarbonati sono polimeri termoplastici ottenuti dall'acido carbonico (Figura 1.12). Hanno una struttura molecolare estremamente ordinata e cristallina, caratteristica che li rende estremamente tenaci e resistenti ad azioni meccaniche come il graffio, la perforazione e l'abrasione; inoltre la possibilità di sterilizzarli in autoclave ne ha permesso l'impiego per la fabbricazione di strumenti cardiocirurgici e per dialisi.

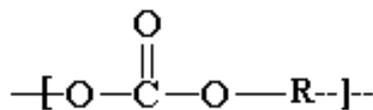


Figura 1.12 Acido carbonico, unità strutturale dei policarbonati alifatici.

## 1.2.7 POLIMERI IN AMBITO BIOMEDICALE

### 1.2.7.1 POLIESTERI

I poliesteri, polimeri identificati dal ricorrere dell'unità funzionale esterea nella catena carboniosa, si differenziano in aromatici e alifatici in relazione alla presenza o meno di anelli aromatici all'interno della struttura. Essi vengono sintetizzati principalmente attraverso due modalità: policondensazione di dioli, diacidi e idracidi, oppure *ring-opening polymerization* (ROP) di diesteri ciclici, lattoni e acetali chetonici ciclici con successiva policondensazione. La prima tecnica, a fronte di un'elevata semplicità, risulta piuttosto lenta e permette di realizzare, mediante l'eliminazione di molecole più semplici come acqua e acidi inorganici, polimeri con un limitato grado di polimerizzazione (problemi che possono essere limitati agendo sulla temperatura e sui tempi di reazione); la seconda modalità di sintesi, invece, permette di incrementare la velocità di reazione, di limitare le reazioni secondarie e di realizzare polimeri con un peso molecolare maggiore.

Alcuni poliesteri sono, inoltre, biodegradabili, caratteristica che li rende molto interessanti per applicazioni biomedicali; essi, infatti, possono essere gradualmente degradati ed eliminati dall'organismo, senza richiedere interventi chirurgici, fornendo prestazioni ottimali per periodi di tempo programmabili *ad hoc* per le specifiche destinazioni d'uso, quali ad esempio:

- impianti ortopedici;
- *stent* intravascolari;
- dispositivi dentali;
- sistemi per il rilascio controllato di farmaci;
- supporti temporanei per la crescita tissutale.

Tra i poliesteri maggiormente impiegati per applicazioni biomediche figurano:

- gli acidi poliglicolico (PGA) e polilattico (PLA);
- il polietilentereftalato (PET).

Il polietilentereftalato (PET) viene prodotto tramite policondensazione a partire da dimetil-tereftalato e glicole etilenico. Il PET (Figura 1.13) è un polimero resistente e deformabile, che può essere facilmente trasformato per filatura non solo in fibre, commercializzate con il nome di Dacron® o Terylene®, ma anche sotto forma di film molto resistenti alla lacerazione, noti come Mylar®.

Il PET, nelle sue diverse forme, viene spesso utilizzato in chirurgia cardiovascolare per protesi di largo diametro, per suture, e per la fabbricazione di anelli valvolari, i quali vengono progressivamente ricoperti da neoendotelio (tessuto costituito da cellule appiattite, che riveste l'interno dei vasi sanguigni e linfatici), risultando dunque emocompatibili. I tessuti di Dacron trovano anche interessanti applicazioni in ingegneria tissutale, come rinforzo per tessuti danneggiati, ad esempio nel caso delle ernie addominali o inguinali; un'altra importante applicazione è la sostituzione di tendini e legamenti (legamento Stryker-Dracon).

L'acido glicolico e l'acido lattico sono composti naturali normalmente presenti nell'organismo e sono, quindi, ben tollerati e facilmente metabolizzabili.

L'acido poliglicolico (PGA) è un poliestere alifatico dato dalla ripetizione del monomero [-O-CH<sub>2</sub>-CO-] (Figura 1.14). È un polimero semicristallino con temperatura di fusione piuttosto alta (220-226°C) e temperatura di transizione vetrosa superiore a quella ambiente, intorno ai 35-40°C. Il PGA viene lavorato e fabbricato in svariate forme, attraverso tecniche come lo stampaggio a iniezione, l'estrusione e lo stampaggio a compressione. Questo promettente materiale presenta, però, alcuni svantaggi, quali la scarsa solubilità in solventi comuni, l'elevata sensibilità all'umidità ed il rilascio in dosi massicce di acido glicolico durante la biodegradazione (che, pur essendo assorbibile dalle cellule ed eliminabile mediante il ciclo dell'acido citrico, in alte concentrazioni causa una forte risposta infiammatoria nei tessuti limitrofi). I principali campi di applicazione del PGA sono tre: l'ingegneria tissutale grazie alla sua lavorabilità, alle buone proprietà meccaniche e alla prevedibilità di degradazione, il *controlled drug release* (grazie alla possibilità di poter controllare ed ingegnerizzare il rateo di biodegradazione), e la realizzazione di suture chirurgiche in funzione delle sue ottime prestazioni biodegradative e della resistenza chimico-fisica.

Per quanto riguarda l'acido polilattico si rimanda al paragrafo 1.6.

Polimeri derivati dal PGA e dal PLA (ad esempio il PLGA, di cui si parla nel paragrafo 1.2.7.10) rappresentano i materiali biorassorbibili più utilizzati dal punto di vista applicativo e commerciale. PGA e PLA sono stati usati, oltre che come materiale di sutura, anche per fabbricare chiodi, viti e placche e per impianti

ortopedici e dentali, come mezzi per il rilascio controllato di farmaci e come supporti artificiali temporanei per la crescita di tessuti. Il PLA, il PGA ed il PLGA sono  $\alpha$ -idrossiesteri, ossia poliesteri ottenuti dalla polimerizzazione di  $\alpha$ -idrossiacidi. Sono composti biocompatibili e biodegradabili i cui prodotti di degradazione, dovuti ad idrolisi non enzimatica dei legami esteri in ambiente fisiologico, sono composti a basso peso molecolare, quali acido lattico e acido glicolico, che rientrano nei normali percorsi metabolici (vengono infatti espulsi dall'organismo sotto forma di biossido di carbonio ed acqua). Inoltre, il PLGA presenta un ampio range di velocità di degradazione, da giorni ad anni, a seconda del rapporto dei due monomeri e/o del peso molecolare. Quest'ultimo aspetto si rivela molto importante in ambito di *drug delivery*, in cui l'erosione può avvenire in superficie, se ad essere coinvolto nel processo di degradazione è solo lo strato più esterno del materiale, oppure in *bulk*, dove la perdita di massa riguarda invece l'intero volume, favorita dalla presenza di legami esterei idroliticamente labili.

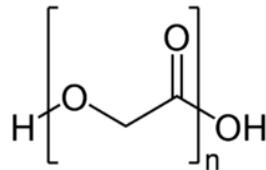


Figura 1.13. Formula di struttura del PET.

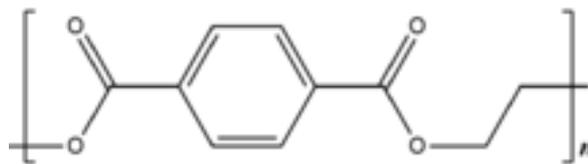


Figura 1.14. Formula di struttura del PGA.

### 1.2.7.2 POLIOLEFINE

Le poliolefine vengono usate in modo estensivo per la fabbricazione di componenti di impianti ortopedici, specialmente per le superfici sottoposte a forti carichi, come le protesi dell'anca e del ginocchio. Hanno una buona biocompatibilità e vengono usate o in forma compatta o, quando sia richiesto un certo grado di permeabilità ai gas, porosa.

Tra le poliolefine figurano:

- il polietilene;

- il polipropilene.

Il polipropilene (Figura 1.15) esiste nelle tre forme: atattico, sindiotattico, isotattico. L'atattico è amorfo a causa della distribuzione casuale dei gruppi metilici, mentre il sindiotattico e l'isotattico risultano generalmente cristallini; in particolare, un più elevato contenuto di molecole isotattiche aumenta il grado di cristallinità, la densità, la temperatura di rammollimento e la resistenza chimica. Tuttavia, la presenza di gruppi metilici limita il movimento delle catene, e di conseguenza l'indice di cristallinità raramente supera il 50-70% anche per un polimero quasi totalmente isotattico.

Il polipropilene presenta:

- una straordinaria resistenza alle flessioni ripetute: esso viene pertanto utilizzato per costruire giunture per protesi delle dita;
- un'ottima resistenza agli agenti ambientali: ha una permeabilità ai gas simile a quella del polietilene.

Il polietilene (Figura 1.16) è un polimero costituito dalla ripetizione del monomero  $[-CH_2-CH_2-]$ , che può essere classificato in base al peso molecolare in: *low density polyethylene* (LDPE), *linear low density polyethylene* (LLDPE), *high density polyethylene* (HDPE) e *ultra high molecular weight polyethylene* (UHMWPE).

Le tipiche applicazioni biomediche di LDPE (ramificato) e LLDPE sono la fabbricazione di pellicole, contenitori e tubi. HDPE e UHMWPE sono per lo più usati in ortopedia (cotile d'anca, piatto tibiale nel ginocchio), soprattutto perché presenta proprietà antiattrito, di biocompatibilità e resistenza meccanica a carichi impulsivi e a fatica. Tuttavia, essendo esposti a elevate deformazioni da *creep*, sono soggetti ad usura e ossidazione.

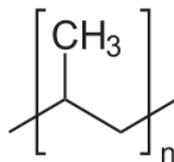


Figura 1.15 Unità ripetitiva del PP.

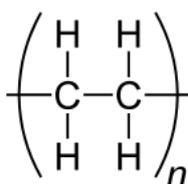


Figura 1.16 Unità ripetitiva del PE.

### 1.2.7.3 POLISTIRENE

Il polistirene (PS o polistirolo) è un polimero caratterizzato dalla ripetizione del monomero [-CH<sub>2</sub>-CHS\*<sup>-</sup>] dove S\* rappresenta l'anello benzenico (Figura 1.17). Conosciuto nella forma di polistirene espanso negli imballaggi, il PS viene impiegato nel settore biomedicale per la realizzazione di dispositivi extracorporei, grazie alla sua eccezionale inerzia chimica e alla sua completa insolubilità in solventi organici clorurati. Viene inoltre utilizzato come comonomero nella preparazione di *scaffold* per l'ingegneria tissutale a causa della sua lenta degradazione e all'inerzia chimica.

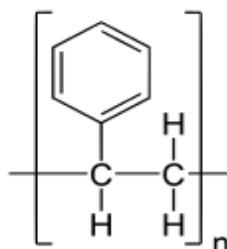


Figura 1.17 Formula di struttura del PS.

### 1.2.7.4 POLITETRAFLUORETILENE

Il politetrafluoretilene (Figura 1.18), noto con il nome commerciale di Teflon, è un polimero costituito dalla ripetizione dell'unità [-CF<sub>2</sub>-CF<sub>2</sub>-], caratterizzato da elevati peso molecolare (nell'ordine di 10<sup>6</sup> u.m.a.) e cristallinità, e da una buona biocompatibilità, dovuta in gran parte alla sua elevata inerzia chimica, che lo rende stabile nel tempo. Esso presenta inoltre eccellenti proprietà antiattrito, ma modeste proprietà meccaniche, fra cui un basso limite elastico. Per aumentare le proprietà meccaniche si possono usare dei riempitivi, ottenendo così compositi a matrice di PTFE.

Un particolare tipo di PTFE, noto con il nome commerciale di Gore-Tex, consiste in microfibrille orientate di PTFE tenute insieme da nodi solidi anch'essi in PTFE.

Il tessuto in fibre di PTFE e, più recentemente, il Gore-Tex, sono impiegati per la fabbricazione di protesi vascolari e di protesi di legamenti.

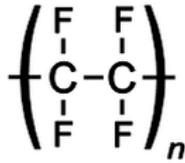


Figura 1.18 Formula strutturale del PTFE.

### 1.2.7.5 POLISILOSSANI

I polisilossani (o siliconi) (Figura 1.19) sono polimeri caratterizzati dalla ripetizione del monomero  $[-R_1SiR_2-O-]$  (dove  $R_1$  e  $R_2$  sono gruppi funzionali organici), dalle eccellenti proprietà chimico-fisiche, di biocompatibilità e di stabilità nel tempo in ambiente biologico. Comprendono lubrificanti, materiali quali elastomeri, gel, fluidi, antischiumanti e adesivi. Fra i maggiori impieghi dei polisilossani (il più comune dei quali è il SILASTIC, un elastomero impiegato in biomedicina) vi è la fabbricazione di cateteri e di tubatismi sia per condurre fluidi biologici (incluso il sangue) sia per veicolare altre sostanze fluide all'interno dell'organismo. Gli elastomeri ed i gel in polisilossano vengono entrambi utilizzati in chirurgia plastica come riempitivi per ricostruire tessuti mancanti o asportati (come quello mammario).

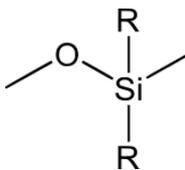


Figura 1.19 Formula strutturale dei silossani.

### 1.2.7.6 POLIURETANI

I poliuretani (Figura 1.20) sono polimeri costituiti dalla ripetizione del monomero  $[-O-CO-NH-R_1-NH-CO-O-R_2-]$ , dove  $R_1$  e  $R_2$  rappresentano due gruppi funzionali che, se scelti opportunamente, possono contribuire a far sì che i materiali ottenuti presentino proprietà anche molto diverse tra loro. Si possono inoltre realizzare copolimeri a segmenti o a blocchi, composti da due fasi, una più morbida, detta *soft segment*, ed una più rigida, denominata *hard segment*, le cui caratteristiche meccaniche dipendono strettamente dal rapporto in peso tra le due fasi.

Per quanto riguarda le applicazioni, essi vengono applicati come elastomeri per protesi vascolari e per le superfici interne di cuori artificiali, poiché emocompatibili e dotati di un'elasticità simile a quella delle arterie.

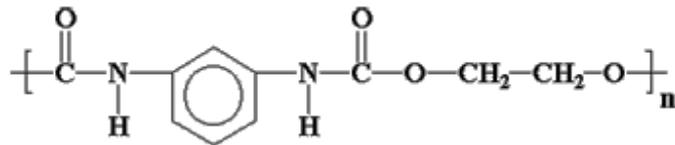


Figura 1.20 Esempio di un poliuretano.

### 1.2.7.7 POLIMETILMETACRILATO

Il polimetilmetacrilato, o PMMA, (Figura 1.21), è un polimero ottenuto dalla ripetizione dell'unità strutturale  $[-CH_2-COOCH_3 \cdot C \cdot CH_3-]$ , commercialmente noto con il nome di Plexiglas o Perspex.

Esso possiede eccellenti proprietà di resistenza chimica alle condizioni ambientali. Risulta piuttosto rigido, ma con buone proprietà meccaniche, e dal punto di vista della lavorazione può essere stampato, fuso o lavorato con le macchine tradizionali. Viene largamente utilizzato per la fabbricazione di filtri, pompe, ossigenatori, contenitori, lenti a contatto, lenti impiantabili, cementi ossei per la fissazione di protesi delle giunture, protesi dentali e maxillo-facciali.

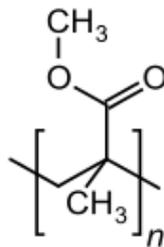


Figura 1.21 Unità strutturale del PMMA.

### 1.2.7.9 POLIPROPILENE FUMARATO

Il polipropilene fumarato è un polimero caratterizzato dalla formula:  $HO-CH \cdot CH_3-[-CH_2-O-CO-C=C-CO-O-CH \cdot CH_3-]_n-CH_2-OH$ , in cui  $n$  è il numero delle unità monomeriche. Questa complessa macromolecola, grazie alla sua rigidità e alla capacità di trasmettere carichi, trova impiego nella rigenerazione ossea, poiché particolarmente adatta come cemento ortopedico.

### 1.2.7.10 ACIDO POLI-DL-LATTICO-CO-GLICOLICO

L'acido polilattico-co-glicolico (PLGA) è un copolimero *random*, con unità derivanti sia dall'acido lattico che da quello glicolico, la cui struttura, riportata in Figura 1.22, può essere riassunta nella formula:  $\text{HO}[-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}]_x[-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}]_y-\text{H}$ , dove  $x$  e  $y$  sono numeri interi. Nelle sue diverse forme, tende ad essere amorfo più che cristallino, ed è solubile in molti solventi comuni, differentemente dagli omopolimeri costituenti. E' un biomateriale ampiamente studiato, il cui utilizzo presenta diversi vantaggi, grazie alla sua biodegradabilità e alle proprietà di durata nel tempo e flessibilità. Una caratteristica molto interessante di questo polimero è la modulabilità delle sue proprietà attraverso la variazione delle percentuali relative di PLA e PGA (ad esempio, il PLGA degrada a una velocità direttamente proporzionale al contenuto di acido glicolico). Questo biomateriale viene utilizzato con successo per la realizzazione di suture chirurgiche, di dispositivi per il rilascio controllato (in forma di nanofibre, nanosfere, microsfele e microcapsule per trattamenti chemioterapici, antibiotici, antinfiammatori, analgesici e compensatori), e nell'ingegneria tissutale (sia da solo che incorporato a polimeri naturali come il collagene), a causa della sua buona adesione, proliferazione e vitalità cellulare. Il principale svantaggio rappresentato da questo copolimero è la difficoltà nella modulazione della velocità di degradazione, e l'elevata acidità e nocività dei prodotti primari di degradazione.

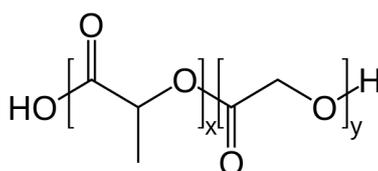


Figura 1.22 Unità strutturale del PLGA.

### 1.2.7.11 POLI-ε-CAPROLATTONE

Il poli-ε-caprolattone (PCL) è un poliesteri alifatico semicristallino utilizzato in particolar modo nel *drug delivery* (Figura 1.23), e caratterizzato da elevata biocompatibilità, permeabilità, buone proprietà meccaniche e limitato rilascio di prodotti dannosi per l'organismo. Presenta una velocità di biodegradazione piuttosto lenta (si decompone in ambiente corporeo in circa 2 anni) e per questo

motivo viene utilizzato per dispositivi a rilascio continuo di farmaco anche per lunghi periodi di tempo, oppure nella terapia orale, dove l'eliminazione della matrice polimerica è più veloce ed immediata. Altre possibili applicazioni sono nell'ambito dell'ingegneria tissutale, per la realizzazione di *scaffold* per la rigenerazione di ossa, legamenti, cartilagini, pelle, tessuto vascolare e nervoso.

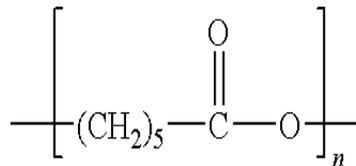


Figura 1.23 Unità strutturale del PCL.

### 1.2.7.12 POLIIDROSSIALCANOATI

I poliidrossialcanoati o PHA (Figura 1.24) sono poliesteri caratterizzati dalla ripetizione del monomero [-O-CH·R-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO-] dove n è il numero dei gruppi -CH<sub>2</sub> ed R è solitamente un gruppo alchilico lineare o ramificato. Sono polimeri termoplastici sintetizzati da diversi batteri attraverso la fermentazione di zuccheri o lipidi. La composizione dei poliidrossialcanoati è molto variabile, e funzione del tipo di batteri da cui sono ottenuti, nonché della matrice di coltura. Sono impiegati, inoltre, nella *tissue engineering* dell'osso grazie alle loro buone proprietà in termini di biodegradabilità, ottima trasmissibilità dei carichi e rigidità compatibile con quella del tessuto osseo.

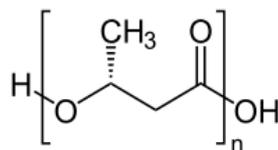


Figura 1.24 Struttura chimica del PHB, un esempio di PHA.

## 1.3 COPOLIMERI

I copolimeri sono particolari polimeri costituiti da due o più monomeri di diversa tipologia. Il loro principale vantaggio consiste nella possibilità di modulare le proprietà agendo sulla struttura chimica, quantità dei monomeri, e sulla loro disposizione lungo la catena macromolecolare. Il copolimero presenta generalmente proprietà intermedie rispetto a quelle dei omopolimeri di riferimento.

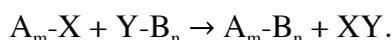


blocco può includere un terzo monomero C ( $A_m-B-C$ ), distribuito in modo casuale, alternato, in sequenze decrescenti, etc.;

- tri-blocchi:  $A_m-B_n-A_m$ ,  $A_m-B_n-A_q$ ,  $A_m-B_n-C_q$ , copolimeri contenenti tre blocchi così distribuiti;
- multi-blocchi, copolimeri segmentati:  $A_m-B_n-A_m-B_q-A_m-B_q$ ;
- copolimeri a di-blocchi ripetuti:  $(A_m-B_n)_X$ ;
- copolimeri a blocchi sovrapposti, o *overlapped*,  $A_m-(A_x, B_y)-B_n$ ;
- copolimeri a stella, multi-braccia, collegate da un'unità di giunzione: possono essere considerati un caso particolare di copolimeri ad innesto.

Le vie di sintesi dei copolimeri a blocchi sono due:

- creazione di centri o siti attivi (radicalici, anionici, cationici) su una catena polimerica che può in seguito innescare la polimerizzazione di un secondo monomero. Se non è precisata l'ubicazione terminale del centro attivo, in questa definizione rientrano anche i copolimeri ad innesto;
- condensazione tra gruppi funzionali situati al termine del polimero o pre-polimero:



I copolimeri costituiti da blocchi cristallizzabili e non cristallizzabili di sequenze A e B incompatibili formano, come conseguenza di una separazione di fase, domini cristallini e microdomini amorfi. Le transizioni termiche in tali sistemi multifasici microsegregati sono fortemente influenzate dalla morfologia, che a sua volta dipende, oltre che dalle caratteristiche molecolari del copolimero a blocchi, dal metodo di preparazione del campione (effetto della storia termica, meccanica, del solvente, ecc.). Si distinguono quindi due tipologie di copolimeri a blocchi: quelli con blocchi non cristallizzabili e quelli con blocchi cristallizzabili.

#### Blocchi non cristallizzabili

Ad ogni fase amorfa presente corrisponde una transizione vetrosa che, in linea di principio e nell'ipotesi di una separazione di fase che porti a microdomini nettamente distinti, è facilmente correlabile alla  $T_g$  dell'omopolimero corrispondente. La situazione reale si avvicina a quella descritta solo quando il peso molecolare dei blocchi è elevato e la loro incompatibilità è molto marcata. Nei copolimeri a blocchi che formano domini separati, la piccola dimensione dei

domini porta ad un elevato rapporto superficie/volume con conseguente aumento delle interazioni tra fasi diverse. Inoltre, la continuità della catena attraverso l'interfaccia tra i domini promuove la trasmissione cooperativa dei moti molecolari da una microfase all'altra; come conseguenza di tali interazioni, le transizioni termiche caratteristiche subiscono spostamenti e variazioni d'intensità e ampiezza.

Nei casi in cui il volume interfacciale sia cospicuo e si formi una vera e propria interfase, oltre alle  $T_g$  delle due microfasi si può osservare un'altra transizione vetrosa a temperatura intermedia, relativa all'interfase (in alcuni casi essa diventa la transizione termica principale).

#### Blocchi cristallizzabili

Se nel copolimero uno o entrambi i blocchi sono cristallizzabili, la segregazione di fase comporta la formazione di domini cristallini, che possono dare luogo a strutture organizzate con un arrangiamento periodico, oppure a strutture prive di organizzazione.

Quando entrambi i blocchi sono cristallizzabili, la morfologia è dettata dal blocco che cristallizza per primo; il secondo componente deve adattarsi a cristallizzare in presenza delle restrizioni steriche imposte dai domini cristallini già formati.

Nel caso di un solo blocco cristallizzabile (A), il componente amorfo (B) può inibire la cristallizzazione se vetrifica prima che A abbia potuto cristallizzare. In caso contrario A cristallizza formando strutture regolari alternate di strati amorfi e cristallini.

La morfologia dei copolimeri con blocchi cristallizzabili risulta inoltre molto influenzata dall'uso di solventi che solvatano selettivamente uno dei blocchi.

### **1.3.2 COPOLIMERI STATISTICI**

La maggior parte dei copolimeri statistici (*random*) è ottenuta mediante processi di poliaddizione in cui la reattività dei due monomeri è generalmente diversa. La composizione di un copolimero, che può essere definita in corrispondenza a una certa miscela di alimentazione, è una composizione istantanea, risultante dopo una conversione infinitesima di monomeri. La fusione della componente cristallina e la transizione vetrosa della fase amorfa, che si manifestano rispettivamente alle temperature  $T_m$  e  $T_g$ , sono transizioni termiche fondamentali anche nei copolimeri.

Questi ultimi possono, inoltre, mostrare più di una singola fase amorfa e cristallina, e di conseguenza è possibile individuare più processi di fusione o di transizione vetrosa.

La transizione vetrosa dei copolimeri statistici nella maggioranza dei casi varia in maniera monotona con la composizione. Inoltre, quando una o entrambe le unità monomeriche possono cristallizzare, tali copolimeri esibiscono un comportamento di cristallizzazione molto complesso. La transizione vetrosa che caratterizza la fase amorfa si manifesta ad una temperatura  $T_g$  intermedia rispetto a quelle caratteristiche dei due omopolimeri,  $T_{gA}$  e  $T_{gB}$ . L'andamento della  $T_g$  nel copolimero può essere descritto dalle equazioni di Fox o Couchman (che legano con una curva monotona crescente la  $T_g$  e la composizione copolimerica). In riguardo alla  $T_m$  si può far riferimento all'equazione di Flory, che assume che la temperatura di fusione sia indipendente dalla natura del comonomero B, a patto che esso risulti escluso dal reticolo.

Per ciò che concerne la fase cristallina dei copolimeri, occorre precisare che, se nella catena di un omopolimero (A) cristallizzabile, vengono introdotte unità chimicamente o strutturalmente diverse (B) è prevedibile che la capacità di cristallizzazione del polimero A venga modificata.

In generale, le unità B possono:

- venire totalmente escluse dal reticolo cristallino;
- entrare nel reticolo cristallino in condizioni di equilibrio;
- entrare nel reticolo cristallino sotto forma di difetto, ossia in condizioni di non-equilibrio.

Nel caso di comonomeri esclusi dal reticolo cristallino, entrambe le fasi cristalline risultano pure.

I copolimeri a distribuzione statistica possono, inoltre, mostrare co-cristallizzazione, cioè sostituzione isomorfa delle unità comonomeriche, analogamente a quanto avviene nelle sostanze a basso peso molecolare. Se ciò avviene, i copolimeri assumono un elevato grado di cristallinità in tutto il campo di composizione.

Si possono distinguere due tipi di sostituzione isomorfa:

- 1) quando gli omopolimeri dei due comonomeri hanno struttura cristallina molto simile, il copolimero mostra una fase cristallina i cui parametri

cambiano gradualmente al variare della composizione, da quelli caratteristici di un omopolimero a quelli dell'altro;

- 2) se i due omopolimeri hanno struttura cristallina differente, una delle unità monomeriche risulta inclusa in una struttura cristallina diversa da quella del proprio omopolimero: si parla allora di "isodimorfismo". Esiste una composizione precisa alla quale il copolimero passa da una struttura cristallina all'altra e, a causa delle unità estranee ospitate, i parametri del reticolo cristallino variano rispetto a quelli dell'omopolimero corrispondente.

## **1.4 CONTROLLED DRUG DELIVERY**

Una delle principali linee di ricerca nel settore tecnologico farmaceutico punta l'attenzione sullo sviluppo di formulazioni in grado di liberare farmaci nell'organismo in quantità e velocità controllate, sensibili e capaci di rispondere direttamente agli stimoli patologici. Esistono già numerose forme farmaceutiche dalle quali il rilascio può essere ritardato, o mediante le quali la velocità e la durata della liberazione del principio attivo possono essere programmate: tali formulazioni sono definite appunto sistemi a rilascio controllato e consentono la regolazione del livello ematico del farmaco, in modo da evitare fenomeni di sotto- o sovraddosaggio e di minimizzare gli effetti collaterali indesiderati. Dispositivi dalle dimensioni nano-micrometriche possono massimizzare l'efficienza dei trattamenti terapeutici, in quanto in grado di individuare ed isolare rapidamente, all'interno dell'organismo, la patologia, e di agire senza intervenire sulle cellule ed i tessuti sani (come accade ad esempio durante la chemioterapia), a totale vantaggio del paziente.

I metodi convenzionali di somministrazione dei farmaci, normalmente, non permettono di ottenere un rilascio controllato nel tempo del principio attivo: in molti casi, si ha un repentino rilascio senza il raggiungimento dei siti recettoriali specifici localizzati sulle cellule bersaglio. Di conseguenza può essere necessario l'impiego di dosi maggiori, con il rischio di raggiungere in breve tempo il limite di tossicità, ossia la concentrazione a cui il principio attivo comporta effetti collaterali o tossici indesiderati. Una volta somministrato il farmaco, esso mantiene per un periodo relativamente breve il limite terapeutico (che equivale

alla concentrazione minima al di sotto della quale non si produce l'effetto desiderato) e successivamente i suoi livelli ematici diminuiscono lentamente fino alla successiva somministrazione. Gli effetti terapeutici desiderati si potranno ottenere, dunque, solo mediante somministrazioni ripetute del farmaco, che risultano molto onerose per il paziente e decisamente costose (Figura 1.25).

La tecnologia del *controlled drug delivery* si pone come obiettivo proprio l'eliminazione di tali problemi, mediante l'utilizzo di sistemi, in genere polimerici, che consentano di:

- mantenere costante l'azione del farmaco conservando, per l'intera durata di un intervallo di tempo predeterminato, la concentrazione desiderata nell'organismo, riducendo nel contempo gli effetti collaterali associati ad un modello cinetico del tipo "dente di sega", caratteristico di iniezioni successive;
- localizzare spazialmente l'azione del farmaco, limitandola alla zona (tessuto o organo) che necessita del trattamento;
- specificare ulteriormente il target d'azione (a livello della tipologia di cellula) del farmaco, per mezzo di vettori o derivatizzazioni chimiche;
- somministrare farmaci con particolari proprietà in termini di instabilità fisica e chimica, suscettibilità alla degradazione enzimatica, caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche non favorevoli;
- ridurre il costo della terapia.

Risulta, così, evidente come, agendo sulla distribuzione spaziale e temporale del farmaco, si possano risolvere problemi legati alle tradizionali forme di dosaggio. Il risultato delle ricerche svolte in questo ambito è rappresentato anche dall'uso di particolari polimeri innovativi come mezzo di rilascio e direzionamento di molecole biologicamente attive; tali polimeri sono in grado di consentire un aumento del tempo di permanenza del farmaco nel circolo sanguigno o nella sede di applicazione, una riduzione dell'antigenicità, un'aumentata stabilità nei confronti di enzimi e, quindi, una maggiore biodisponibilità. Una vasta classe di farmaci può, inoltre, usufruire dei benefici dei sistemi a rilascio controllato, tra cui chemioterapici, immunosoppressori, agenti antiinfiammatori, antibiotici, oppiacei, steroidi, ormoni, anestetici, vaccini.

Queste innovazioni hanno riscosso notevole interesse non soltanto nella somministrazione per via sistemica, ma anche per le applicazioni legate al

trattamento di ferite, alla medicazione dell'epidermide e delle mucose: anche in questo caso risulta possibile controllare il rilascio nel sito d'interesse utilizzando micro o nanoparticelle di natura polimerica come serbatoio del farmaco.

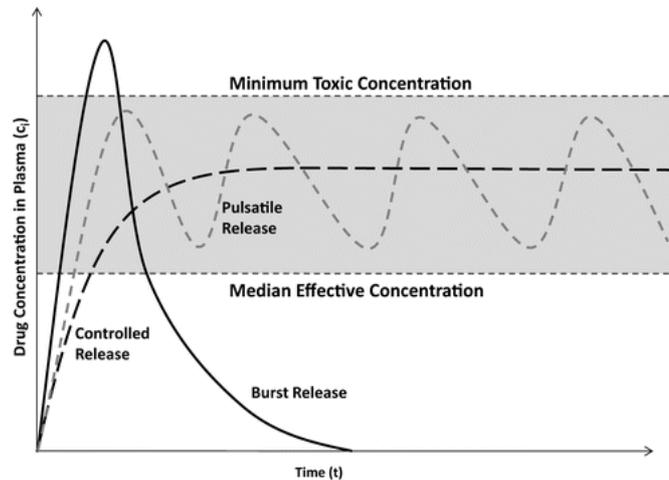


Figura 1.25 Andamento della concentrazione del farmaco nei tessuti dopo l'assunzione secondo la tecnica tradizionale e mediante rilascio controllato.

## 1.4.1 MECCANISMI DI RILASCIO CONTROLLATO

A causa della presenza di numerose variabili in gioco, tra cui la tipologia del farmaco, la dose da somministrare, il sito d'azione, la durata della terapia e la stabilità delle molecole attive, è necessario che i sistemi a rilascio controllato presentino diverse cinetiche e meccaniche di rilascio, che rispettino le diverse necessità di somministrazione e permettano la distribuzione del farmaco nei tessuti che necessitano del trattamento. È possibile individuare cinque diversi profili di rilascio del farmaco (Figura 1.26), di cui i primi due sono quelli più largamente utilizzati<sup>(9)</sup>:

- profilo I: curva a decadimento esponenziale con ritardo iniziale e rilascio non costante di farmaco (rilascio convenzionale);
- profilo II: rilascio di ordine zero, caratterizzato da un gradino con salita ripida e mantenimento del rilasciato nel tempo;
- profilo III: rilascio costante preceduto da un delay programmato (utile per i farmaci che svolgono la loro funzione durante la notte);

- profilo IV: picco di bassa intensità e di breve durata (profilo rettangolare) assimilabile a una somministrazione impulsiva ritardata (anche questo utile per i farmaci ad effetto notturno);
- profilo V: somministrazioni impulsive periodiche ritardate, con distanziamenti temporali modulabili.

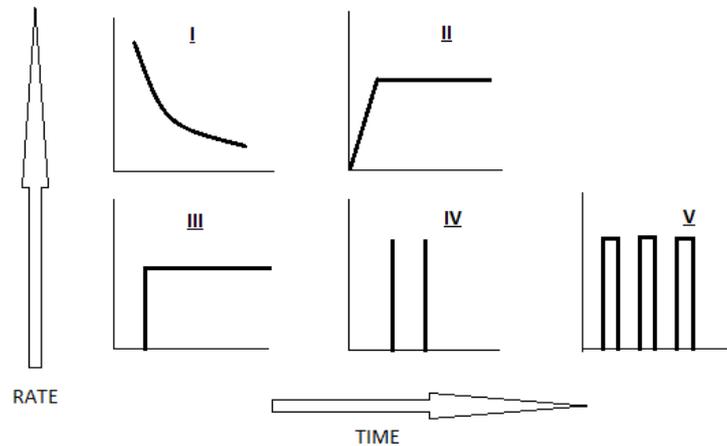


Figura 1.26 Profili di rilascio del farmaco.

## 1.4.2 SISTEMI DI TRASPORTO

I sistemi di trasporto si classificano, in base alla tipologia di meccanismo di rilascio, in sistemi a diffusione controllata, controllati chimicamente, attivati da un solvente e a rilascio modulato (Figura 1.27).

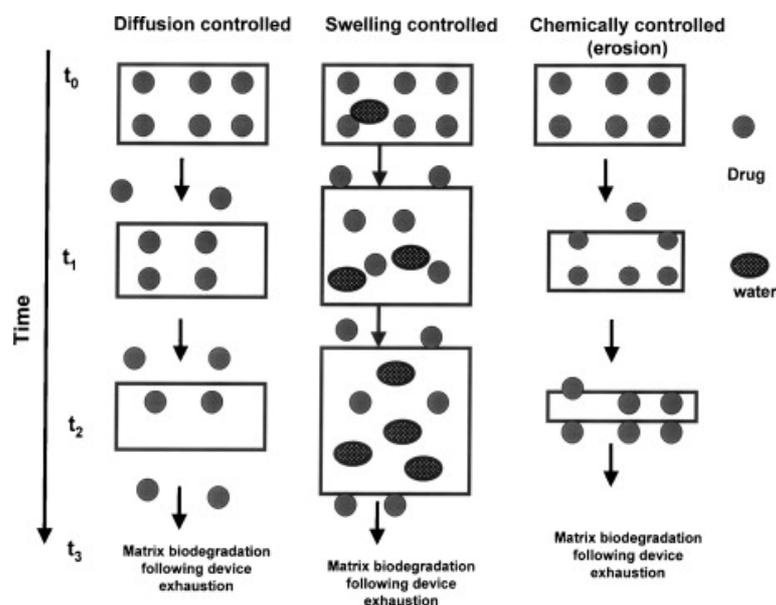


Figura 1.27 Schema di alcuni meccanismi diffusionali.

### 1.4.2.1 SISTEMI A DIFFUSIONE CONTROLLATA

I sistemi a diffusione controllata sfruttano il meccanismo di diffusione del farmaco attraverso il polimero, e si suddividono in sistemi a serbatoio (sistemi a membrana) e a matrice (sistemi monolitici). I primi sono caratterizzati da cinetica di ordine zero, poiché basati sulla diffusione semplice, dal cuore della capsula, contenente un'elevata concentrazione di principio attivo, verso l'esterno, in cui questo non è presente. Tali dispositivi sono generalmente costituiti da un nucleo centrale circondato da una membrana polimerica cava, e differiscono dai sistemi monolitici proprio per la loro struttura bifasica. Nel secondo gruppo invece si ritrovano strutture matriciali polimeriche omogenee in cui è uniformemente disciolto il farmaco. In questo caso la cinetica di rilascio è del primo ordine, caratterizzata da una velocità di diffusione elevata all'inizio e successivamente decrescente, dovuta all'aumentato percorso di diffusione e alla diminuzione dell'area della matrice.

### 1.4.2.2 SISTEMI CONTROLLATI CHIMICAMENTE

I sistemi controllati chimicamente si dividono in bioerodibili (biodegradabili) e a catena pendente. Il rilascio ha luogo in ambiente acquoso, dove il polimero si degrada a causa della presenza di legami labili idroliticamente o enzimaticamente, che coinvolgono soltanto la superficie oppure anche la parte centrale del dispositivo, detta *bulk*. Ciò da una parte evita la necessità di una rimozione chirurgica, ma dall'altra richiede che i prodotti della degradazione non provochino reazioni tossiche o cancerogene, effetto non sempre facile da ottenere. Nei sistemi bioerodibili il principio attivo è dissolto all'interno del dispositivo e solo l'azione di erosione da parte dell'acqua permette la fuoriuscita di farmaco, mentre nei sistemi a catena pendente la molecola del farmaco è legata chimicamente al polimero, e viene rilasciata mediante una scissione idrolitica o enzimatica, con velocità proporzionale a quella con cui i legami vengono rotti dall'azione dell'acqua o delle proteine.

### 1.4.2.3 SISTEMI ATTIVATI DAL SOLVENTE

I sistemi attivati da solvente sono particolari idrogeli costituiti da macromolecole a struttura reticolata create in modo da formare una maglia aggrovigliata che

funge da matrice per l'intrappolamento di farmaci. Quando queste grosse macromolecole entrano in contatto con un solvente compatibile, le loro strutture si modificano e si rilassano, permettendo all'acqua di penetrare all'interno e al farmaco incapsulato di fuoriuscire dalla matrice. I sistemi attivati da solvente si classificano in sistemi controllati osmoticamente, dove è il rapporto tra le osmosi di farmaco e quelle di solvente a determinare la cinetica del processo, e sistemi controllati mediante rigonfiamento, dove è l'entrata di importanti quantità di acqua a causare il rigonfiamento della struttura, con il conseguente allargamento dei pori e la fuoriuscita del principio attivo.

#### **1.4.2.4 SISTEMI A RILASCIO MODULATO**

Per quanto concerne questo tipo di sistemi, il rilascio viene controllato da stimoli esterni quali la temperatura, il pH, campi elettrici e magnetici, radiazioni elettromagnetiche, oppure raggi UV.

#### **1.4.3 INTERFACCE DI RILASCIO**

Le varie metodologie di rilascio descritte trovano impiego principalmente sotto forma di film, *stent*, oppure di micro- o nanoparticelle.

##### **1.4.3.1 STENT**

Lo *stent* (Figura 1.28) è una struttura metallica a maglie, cava e cilindrica, impiegata per il trattamento di stenosi, sia in fase acuta che a lungo termine. Esso viene introdotto nel lume dell'arteria ostruita e fatto espandere a livello dell'ostruzione, fino al raggiungimento di un diametro pari a quello originario del vaso. Poiché gli *stents* si trovano in contatto con l'apparato vascolare, la biocompatibilità, ed in particolare l'emocompatibilità, risultano essenziali: per questo motivo spesso tali dispositivi vengono ricoperti con polimeri carichi con agenti antitrombotici (per esempio eparina), oppure con polimeri inerti, i quali limitano l'adesione piastrinica.

Oltre a svolgere una funzione meccanica, gli *stents* possono contenere al loro interno anche farmaci o agenti antinfiammatori da rilasciare una volta a contatto con l'organismo, in modo da indirizzare la cura, localizzandola nel solo tessuto interessato. Le più comuni tecniche di realizzazione di questi dispositivi

consistono nello scioglimento di polimero e farmaco nello stesso solvente in modo da ottenere una soluzione omogenea; in seguito all'evaporazione del solvente si ottiene un polimero, contenente al suo interno molecole di farmaco, il quale può essere lavorato mediante stampaggio a compressione per ottenere la forma desiderata. Nei casi in cui il solvente rischia di alterare le proprietà del farmaco si ricorre direttamente all'estrusione. Un'innovazione nell'ambito dei dispositivi impiantabili è stata la creazione di *stents* riassorbibili di materiale polimerico i quali, dopo un periodo di tempo di qualche mese, vengono completamente degradati dall'organismo ospite, prevenendo così l'esigenza di un ulteriore intervento chirurgico di asportazione. Impianti di questo tipo si sono rivelati efficaci nella cura di malattie della retina e nel trattamento di stenosi tracheali refrattarie ai trattamenti tradizionali.

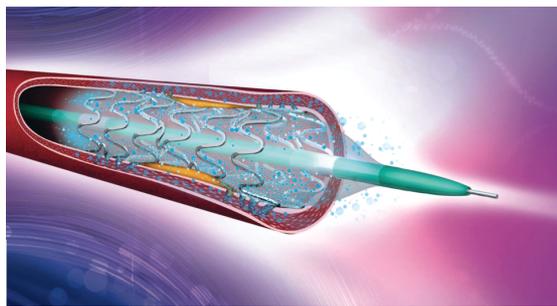


Figura 1.28 Stent coronarico a rilascio farmaci.

### 1.4.3.2 MICROPARTICELLE

Le microparticelle sono piccole gabbie polimeriche (dell'ordine del  $\mu\text{m}$ ) che inglobano, trasportano e rilasciano un determinato principio attivo. Le diverse tecniche di microincapsulamento esistenti variano in base alla natura e al peso molecolare della matrice polimerica, alla natura, alla grandezza e alla solubilità del farmaco da intrappolare, alla durata della terapia, e all'organo/tessuto bersaglio. Le microparticelle sono utilizzate per somministrare in maniera efficace piccole dosi di farmaco (anche insolubile o nocivo) a bassa frequenza e, data la capacità delle microsfele di aderire ai tessuti bersaglio, per somministrazioni continue e regolari nel tempo di dosi moderate<sup>(10)</sup>. La taglia delle microcapsule dipende da quella del materiale che andrà a formare il *core*. Per *core* solidi, se le dimensioni del materiale di partenza non risultano idonee, è necessario provvedere a riduzione della taglia tramite processi di micronizzazione. Anche gli

stessi materiali solidi da incapsulare devono essere finemente suddivisi. Nel caso di agglomerazione, invece, si dovrà intervenire tramite setacciatura o selezione delle migliori condizioni di conservazione (umidità, temperatura).

Le microparticelle si dividono, a seconda delle modalità di rilascio della sostanza incapsulata, in sistemi che vanno incontro a bioerosione (o biodegradazione) e in idrogeli.

#### 1.4.3.2.1 Sistemi bioerodibili

In sistemi di questo tipo il principio attivo viene confinato all'interno di una struttura polimerica; il farmaco può veicolare attraverso la microparticella per raggiungere i siti di destinazione come conseguenza di un processo di diffusione verso l'esterno, oppure a causa dell'erosione della particella stessa: a seguito della penetrazione dell'acqua nel rivestimento o nella matrice polimerica, si ha la scissione di vari legami nelle catene, con conseguente abbassamento del peso molecolare. Il principio attivo fuoriesce dal dispositivo bioerodibile attraverso i fenomeni dell'erosione e della diffusione semplice, se il farmaco è semplicemente disperso nel polimero, o attraverso la sola diffusione se l'agente attivo forma un *core* interno ben distinto dalla matrice polimerica confinante. La predominanza di un meccanismo sull'altro deriva dalle proprietà del polimero, quali l'idrofilicità, la flessibilità, la velocità di degradazione, il peso molecolare, la cristallinità, la geometria della particella e la porosità della matrice/rivestimento; la cinetica del rilascio risulta influenzata anche dalle caratteristiche del farmaco stesso, e principalmente dal suo peso molecolare, dalla sua solubilità in acqua e dalla sua distribuzione all'interno della matrice. Devono, poi, anche essere prese in considerazione le caratteristiche del mezzo esterno, quali la temperatura ed il pH.

#### 1.4.3.2.2 Idrogeli

Gli idrogeli sono strutture tridimensionali polimeriche reticolate che possono intrappolare il farmaco al loro interno, e che rigonfiano in presenza di acqua grazie alla loro elevata idrofilicità: essi, infatti, possono assorbire dall'atmosfera dal 10-20% fino a migliaia di volte il loro peso secco<sup>(11)</sup>. Quando gli idrogeli asciutti vengono a contatto con l'acqua, le catene di polimero si distendono permettendo un flusso di acqua verso il *core* interno e la fuoriuscita della

molecola attiva all'esterno. Dal momento in cui il solvente comincia a interagire con l'idrogel si osservano diverse fasi:

- un primo ingresso di acqua con conseguente idratazione dei gruppi più idrofilici e rigonfiamento della struttura che espone al solvente i gruppi più idrofobici;
- una seconda entrata di acqua causata dalla pressione osmotica e limitata dai forti legami covalenti costituenti l'idrogel;
- il raggiungimento di un equilibrio tra l'acqua uscente e quella entrante con sistemazione delle molecole di H<sub>2</sub>O negli spazi intercatena e nei larghi pori della struttura;
- degradazione dell'idrogel con una velocità legata alla struttura chimica (fase possibile solo nel caso in cui l'idrogel considerato sia biodegradabile).

Gli idrogeli vengono classificati in tre categorie: la prima comprende gli idrogeli sensibili alle variazioni di pH, la seconda quelli sensibili alle variazioni di temperatura, mentre la terza quelli sensibili a specifiche biomolecole (Figura 1.29). Gli idrogeli sono utilizzati principalmente, a causa della loro elevata biocompatibilità ed affinità con l'acqua, nell'ambito del *drug delivery*, ma anche per la realizzazione di *scaffold* e matrici vascolarizzate per l'ingegneria tissutale, dal momento che risulta possibile modularne alcune proprietà fisico-chimiche quali la permeabilità, i tempi di reazione, le caratteristiche superficiali, la biodegradabilità e la porosità.

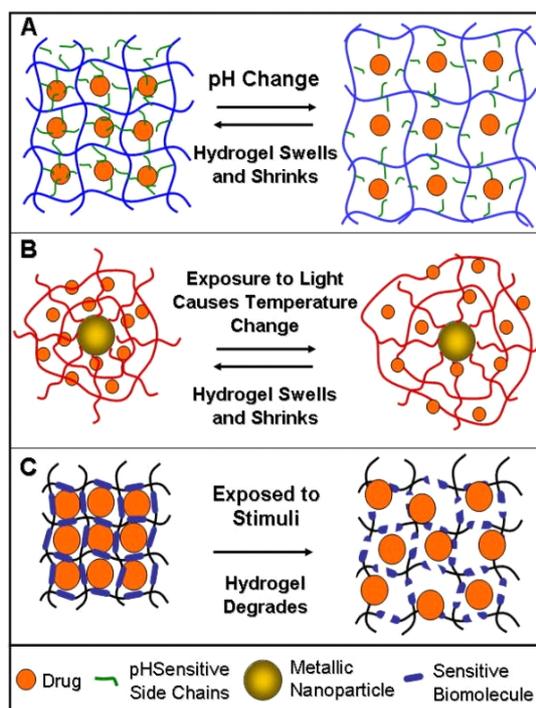


Figura 1.29 (a) Idrogeli sensibili alle variazioni di pH, (b) idrogeli sensibili alle variazioni di temperatura, (c) idrogeli sensibili alla presenza di biomolecole.

### 1.4.3.2.3 Tecniche di microincapsulazione

Le principali tecniche d'incapsulazione di principio attivo all'interno di microparticelle<sup>(12)</sup> sono l'emulsione, la separazione di fase, lo spray a secco e la polimerizzazione interfacciale.

#### 1.4.3.2.3.1 Emulsione

Le emulsioni sono sistemi dispersi formati da due fasi liquide non miscibili, una delle quali è dispersa nell'altra; il liquido disperso costituisce la fase interna (o dispersa), il liquido disperdente la fase esterna (o disperdente). Un esempio dei due liquidi non miscibili è dato dall'acqua e dall'olio; quando l'olio è la fase esterna si hanno emulsioni *water-in-oil*, ovvero W/O, mentre quando l'acqua è la fase esterna si hanno emulsioni *oil-in-water*, o O/W.

Nel caso della *drug delivery* si utilizzano prevalentemente processi O/W, in cui il polimero viene prima disciolto in solvente organico volatile, solitamente diclorometano (DCM), ed, in un secondo momento, viene aggiunto il farmaco in modo da creare un'emulsione; quest'ultima deve essere poi rimossa o per mezzo di un processo di estrazione o con semplice evaporazione, al fine di ottenere delle

goccioline solide che andranno lavate, raccolte e asciugate, giungendo così al prodotto finito. Occorre tenere presente, al fine di ottenere le dimensioni desiderate, che il diametro di tali particelle cresce all'aumentare della concentrazione relativa del polimero e in situazioni termiche estreme. Inoltre questa tecnica, nonostante presenti alcuni problemi, tra cui la forte dipendenza dalla temperatura e dalla viscosità relativa tra polimero, solvente e farmaco, si rivela ideale per incapsulare sostanze liposolubili come gli steroidi; per sostanze idrosolubili, come peptidi, proteine e vaccini, si preferisce invece una tecnica W/O.

#### 1.4.3.2.3.2 Separazione di fase

E' una tecnica che consiste nel diminuire la solubilità del polimero mediante l'aggiunta di un terzo componente alla soluzione organica. Questo porta alla formazione di due fasi separate, una più densa composta dal polimero e l'altra più liquida, in sospensione, carente di materiale polimerico: in questo modo il farmaco che era disperso o dissolto nella soluzione polimerica viene rivestito dal polimero. La presente tecnica, rispetto alla precedente, ha come vantaggio quello di permettere l'incapsulamento di farmaci sia liposolubili che idrosolubili, mentre presenta uno svantaggio legato alla necessità di grandi quantitativi di solvente organico, costosi e difficili da separare dalle microparticelle ottenute.

#### 1.4.3.2.3.3 Spray a secco

Quella dello spray a secco è una tecnica molto più rapida, conveniente e facile rispetto alle precedenti, dipendente in minore misura dalla solubilità sia del polimero che del farmaco. Consiste in due fasi principali: un primo scioglimento del farmaco che si desidera incapsulare in solvente, ed una successiva nebulizzazione della sospensione ottenuta in forma di spray a secco. Attraverso questa tecnica si possono ottenere particelle con dimensioni anche inferiori a 5  $\mu\text{m}$ .

#### 1.4.3.2.3.4 Polimerizzazione interfacciale

Le tecniche di polimerizzazione interfacciale riguardano tutti quei processi in cui all'interfaccia tra due liquidi immiscibili si forma chimicamente il polimero che

costituirà il rivestimento della particella (che dovrà essere insolubile in entrambi le fasi). Si distinguono tecniche di polimerizzazione interfacciale per condensazione e per addizione.

Nella polimerizzazione interfacciale per condensazione il polimero si forma a partire da due diversi tipi di monomeri (uno solubile in fase organica e l'altro solubile in fase acquosa) che reagiscono all'interfaccia tra una fase acquosa e una fase organica. Farmaco e monomero A sono disciolti nel solvente A, che tramite agitazione meccanica viene suddiviso in goccioline di taglia opportuna, per poi essere mescolato con il solvente B, in cui è disciolto il monomero B. Questi due monomeri reagiscono all'interfaccia formando un polimero insolubile, contenente al suo interno il farmaco.

Nella polimerizzazione interfacciale per addizione (detta anche polimerizzazione *in situ*) il polimero si forma per reazione tra un monomero e un catalizzatore, solubili in due solventi differenti. Anche in questo caso la reazione avverrà all'interfaccia tra una fase acquosa e una fase organica, ed il polimero finale risulterà insolubile nei due solventi.

### 1.4.3.3 NANOVETTORI

La nascita del concetto di nanoparticella, intesa come dispositivo dalle dimensioni dell'ordine del nanometro, si colloca negli anni '70, quando i primi substrati di trasporto vennero utilizzati per convogliare in siti specifici farmaci contro il cancro e vaccini. Attualmente l'applicazione dei *carrier* nanometrici si è estesa a diversi campi, tra cui il trasporto di farmaci, la diagnosi precoce di patologie e allergie, la cura di scompensi metabolici attraverso l'immissione di proteine ed acidi nucleici trasportati direttamente alle cellule bersaglio, e terapie nel breve e lungo periodo, con rilasci modulati in relazione alle diverse esigenze. La dimensione così ridotta è imposta dalla necessità, da parte del vettore, di poter viaggiare anche nei capillari senza il pericolo di ostruirli, poter penetrare all'interno delle cellule e nello stesso tempo di essere sufficientemente grande da poter superare le difese immunitarie dell'organismo; inoltre, queste particelle sono caratterizzate da un prolungato tempo di circolazione (dal momento che non vengono né catturate dal fegato né escrete a livello renale), fattore che rende spesso difficile il rilascio di grandi dosi di farmaco. L'elevato rapporto

superficie/volume<sup>(13)</sup> consente, inoltre, di legare chimicamente diversi gruppi funzionali come agenti diagnostici e terapeutici, e una tale versatilità permette di realizzare sistemi capaci di riconoscere il sito bersaglio dove è in atto la patologia, garantendo un'elevata specificità di targeting: per questo motivo tali nanostrutture mostrano potenzialità per l'impiego in chemioterapia<sup>(14)</sup>. Le nanoparticelle possono essere progettate, inoltre, per rispondere a specifici stimoli sia chimici (presenza di un attivatore chimico specifico o variazione di pH) sia fisici (cambiamenti di pressione, temperatura o applicazione di onde elettromagnetiche luminose, campi elettromagnetici o ultrasuoni), e possono essere ulteriormente suddivisi in due categorie: particelle biodegradabili, in cui la diffusione del farmaco è possibile dopo la degenerazione polimerica, e nanogel, nei quali la fuoriuscita di principio attivo è favorita da un rigonfiamento della matrice (*swelling*), e dal conseguente allargamento dei pori di uscita. Allo stesso modo delle microparticelle, i nanovettori vengono preparati mediante emulsione e separazione di fase, sia *oil-in-water* che *water-in-oil*, ma anche tramite nanoprecipitazione, che consiste in un primo scioglimento del polimero e del farmaco in acetone (portato poi in soluzione acquosa), e nella successiva evaporazione a bassa pressione del solvente.

#### 1.4.3.3.2 Contributo dei polimeri ai nanovettori

I copolimeri anfifilici (dove per anfifilico s'intende un materiale contenente gruppi sia idrofilici che idrofobici, caratteristica che permette alle molecole, se inserite in ambiente acquoso, di riarrangiarsi in modo tale da formare un doppio strato caratterizzato all'esterno dalla presenza delle teste idrofiliche, e all'interno dalle code idrofobiche) risultano materiali chiave per la realizzazione di micelle e nanoparticelle. Il ruolo del nucleo interno idrofobico è quello di dissolvere e proteggere i farmaci idrofobici, mentre il guscio idrofilo, invece, non solo stabilizza le nanodispersioni, ma, soprattutto, è responsabile delle interazioni con i liquidi fisiologici e con i tessuti viventi. La composizione chimica dei copolimeri anfifilici utilizzati risulta di primaria importanza in relazione alle performance finali dei nanovettori, sulla base delle quali si può effettuare una distinzione tra

nanovettori di prima, seconda e terza generazione<sup>(15)</sup>:

- nanovettori di prima generazione: questa categoria comprende tutti i sistemi nanostrutturati con la semplice funzione di *carrier*;
- nanovettori di seconda generazione: presentano, rispetto ai primi, alcune funzionalità che consentono loro di raggiungere il sito specifico e di rilasciare il principio attivo in maniera controllata;
- nanovettori di terza generazione: sono costituiti da nanocarrier multifunzionali, che possono contenere al loro interno diverse tipologie di farmaci da rilasciare in tempi diversi, oppure che possono svolgere contemporaneamente diverse funzioni (come ad esempio diagnosi e terapia).

#### 1.4.3.3.2.1 Contributo di poliesteri alifatici funzionali ai nanovettori di "prima generazione"

Poiché offrono nello stesso tempo biocompatibilità e biodegradabilità, PLA e PCL risultano i principali candidati per la realizzazione di nanovettori di prima generazione, anche se la loro idrofobicità intrinseca presenta un notevole inconveniente: tali dispositivi vengono riconosciuti, da parte del sistema immunitario, come corpi estranei. Questo perché numerose proteine plasmatiche, le opsonine, vengono assorbite sulla superficie dei nanovettori attraverso interazioni idrofobiche, e gli organismi macrofagi del sistema immunitario, che possiedono recettori specifici per le opsonine, respingono tali nanodispositivi principalmente nel fegato.

#### 1.4.3.3.2.2 Contributo del poli(ossido di etilene) e dei copoliesteri ai nanovettori di "seconda generazione"

Al fine di limitare l'assorbimento di opsonine da parte della superficie dei nanovettori, si può ricorrere alla modifica superficiale, che potrebbe portare all'inibizione delle interazioni idrofobiche. Fino ad ora, i migliori risultati sono stati ottenuti innestando sulla superficie catene di poli(ossido di etilene), o PEO, un polimero idrofilico, neutro e flessibile. Il PEO è, infatti, un repellente per le proteine, proprietà che implica per i *nanocarrier* tempi di permanenza più lunghi

nel vano sistemico. Sebbene non degradabile, il PEO con peso molecolare inferiore a 20.000 g/mol può essere facilmente eliminato dai reni.

#### 1.4.3.3.2.3 Contributo di copoliesteri funzionali ai nanovettori di "terza generazione"

Il *targeting* selettivo di tessuti o cellule specifiche richiede che i nanovettori di seconda generazione siano ulteriormente modificati collegando ligandi specifici (quali anticorpi, peptidi, zuccheri, acido folico) alle loro superfici; i ligandi ideali risultano quelli che riconoscono selettivamente i recettori sulla superficie delle cellule bersaglio. Una volta che l'interazione tra i ligandi e recettori sovraespressi è stata stabilita, il passo successivo è l'endocitosi nella cellula, seguita dal rilascio intracellulare del farmaco e l'espressione della sua attività terapeutica.

### **1.4.4 POLIMERI NEL DRUG DELIVERY**

Ingegnerizzare i mezzi a rilascio modulato significa trovare biomateriali che possano garantire il raggiungimento di diversi obiettivi; una possibile scelta ricade sui materiali polimerici, che permettono di superare due grandi problemi legati alla diffusione tradizionale: da una parte è possibile limitare l'interazione tra farmaco e cellule sane grazie alla grande specificità del sito attivo di legame (*linking* preferenziale), dall'altra si garantisce il raggiungimento, da parte del farmaco, di specifici siti bersaglio, anche quelli impossibili da raggiungere attraverso i mezzi di infusione tradizionali (si pensi ad esempio ai farmaci agenti sulle cellule cerebrali, che devono attraversare la barriera emato-encefalica). Occorre però ricordare che le varie tecniche di polimerizzazione presentano l'inconveniente di fornire un prodotto finale inquinato da sostanze residue indesiderate, in alcuni casi anche tossiche, per cui è necessario effettuare a valle operazioni di separazione e purificazione, come filtrazioni e lavaggi, che vanno a incidere sul costo finale del preparato e che creano sottoprodotti difficili da smaltire.

Le caratteristiche che questa ingegnerizzazione permette di ottenere sono:

- maggior stabilità nei fluidi fisiologici;
- degradazione nei naturali prodotti di scarto dell'organismo<sup>(9)</sup>;

- possibilità di terapia endovenosa e orale;
- caratteristiche chimico-fisiche ottimali (elasticità, piccole dimensioni, ecc.)

Per quanto riguarda le tipologie di polimeri maggiormente utilizzati in questo campo, si devono citare le polianidridi, le poliammidi, i poliortoesteri, e i poliesteri, tra cui l'acido polilattico, l'acido poliglicolico, l'acido poli-DL-lattico-co-glicolico, il poli- $\epsilon$ -caprolattone e il poli(butilene/trietilene succinato).

## **1.5 STATO DELL'ARTE DEL POLI(BUTILENE SUCCINATO), DEL POLI(TRIETILENE SUCCINATO) E DELL'ACIDO POLILATTICO**

### **1.5.1 PBS: STRUTTURA E PROPRIETA'**

Il poli(butilene succinato), o PBS, la cui unità ripetitiva è riportata in figura 1.30, è un poliesteri alifatico caratterizzato da alto peso molecolare, marcata cristallinità e consistenza solida a temperatura ambiente, in forma di polvere opaca dal colore giallo chiaro.

Presenta bassi costi di produzione, semplicità di sintesi, e proprietà facilmente modulabili attraverso la copolimerizzazione con differenti tipi e quantità di monomeri<sup>(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)(24)</sup>. Tra le sue proprietà peculiari figurano:

- buona lavorabilità, mediante le tecniche di estrusione, stampaggio a iniezione e termoformatura;
- alto modulo elastico, elevata rigidità, resistenza agli urti;
- bassa temperatura di transizione vetrosa;
- carattere idrofobico, particolarmente utile nell'assorbimento delle proteine;
- elevata cristallinità e simmetria molecolare;
- tempi di degradazione lunghi e facilmente controllabili;
- possibilità di sintetizzare il polimero a partire da monomeri derivati da fonti rinnovabili con conseguente produzione di un polimero *bio-based*.

Grazie alle sue proprietà meccaniche, lavorabilità e resistenza al calore, il PBS e suoi copolimeri vengono utilizzati in una vasta gamma di applicazioni in diversi settori: nell'agricoltura, nella pesca, nella silvicoltura, nell'ingegneria civile e nel

settore dell'imballaggio. In ambito biomedicale viene utilizzato per la realizzazione di impianti in chirurgia vascolare o ortopedica, per la sintesi di membrane semplici o strutture porose, e come matrice impiantabile per il rilascio controllato di farmaci chemioterapici all'interno del corpo, in forma di film e nano- o micro-particelle; inoltre, in materia di *tissue engineering*, il PBS è risultato un buon materiale per la realizzazione di *scaffold* per la rigenerazione di tessuti ossei e della cartilagine.

Al fine di essere utilizzato in contatto con le cellule del corpo, il polimero deve necessariamente essere biocompatibile: in questa direzione sono stati compiuti diversi test, sia *in vitro* sia *in vivo*, che hanno evidenziato buoni risultati. Nelle analisi *in vitro* sono state prese in considerazione alcune cellule animali e umane poste in contatto diretto o indiretto con la base polimerica, mentre nelle analisi *in vivo* il componente sintetizzato è stato impiantato chirurgicamente in piccoli roditori (topi e conigli). Per quanto riguarda gli studi *in vitro*, sono state adoperate diverse tipologie cellulari (sia nel caso di cellule animali che umane): cellule staminali (cellule non specializzate capaci di trasformarsi in altre cellule), fibroblasti (responsabili della sintesi di alcuni componenti della matrice extracellulare, tra cui il collagene), osteoblasti (cellule che sintetizzano il tessuto osseo), condrociti (appartenenti al tessuto cartilagineo), splenociti (specifiche cellule della milza), cardiomiociti e cardiomioblasti (provenienti dal muscolo cardiaco).

Gli studi di citotossicità indiretta non hanno evidenziato alcuna differenza tra il controllo negativo e i polimeri studiati, confermando la biocompatibilità da contatto indiretto. Contemporaneamente si sono svolti studi di immunoistochimica (tecnica grazie alla quale si possono individuare specifiche molecole o strutture intra- e extra-cellulari), per determinare il grado di mutazione cellulare indotta dal film polimerico, che hanno dato esito negativo (le cellule poste in contatto con polimeri *PBS-based* mantengono inalterati i marker caratteristici dei cardiomiociti). Negli studi *in vivo*, strutture omo- o copolimeriche a base di PBS sono state impiantate in piccole cavie. In seguito all'impianto chirurgico, a fronte di una iniziale risposta infiammatoria, si è riscontrata una successiva stabilizzazione della zona d'impianto, a conferma della biocompatibilità anche *in vivo*. Nonostante tutti gli studi confermino la

biocompatibilità e l'utilità del PBS, quest'ultimo non è stato ancora approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per utilizzi in ambito biomedicale.

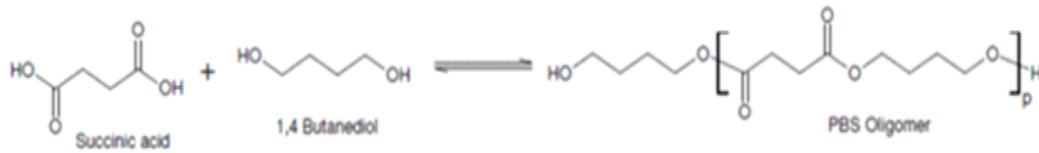


Figura 1.30 Sintesi del PBS.

## 1.5.2 PTES: AGGIUNTA IN COPOLIMERI E MODULAZIONE DI PROPRIETÀ

Il PTES, poli(trietilene succinato), (Figura 1.31), ha una struttura chimica simile al PBS: entrambi sono caratterizzati da gruppi estere distribuiti lungo una catena alifatica satura. La differenza consiste nella presenza nel TES di una sub-unità *PEG-like* contenente due atomi di ossigeno etero (Figura 1.32).

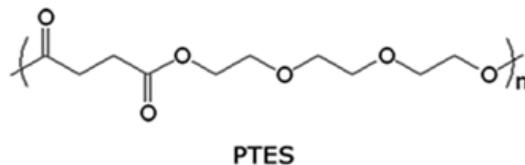


Figura 1.31: unità ripetitiva del PTES.

La sub-unità viene chiamata *PEG-like* poiché presenta una struttura simile al glicole polietilenico, ovvero il PEG.

Il PTES risulta completamente amorfo, con temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) di  $-33\text{ }^\circ\text{C}$ . L'incapacità a cristallizzare può essere ascritta alla presenza degli atomi di ossigeno etero che riducono la simmetria della catena. Il PTES risulta inoltre molto idrofilico, proprio grazie alla presenza della sub-unità *PEG-like*.

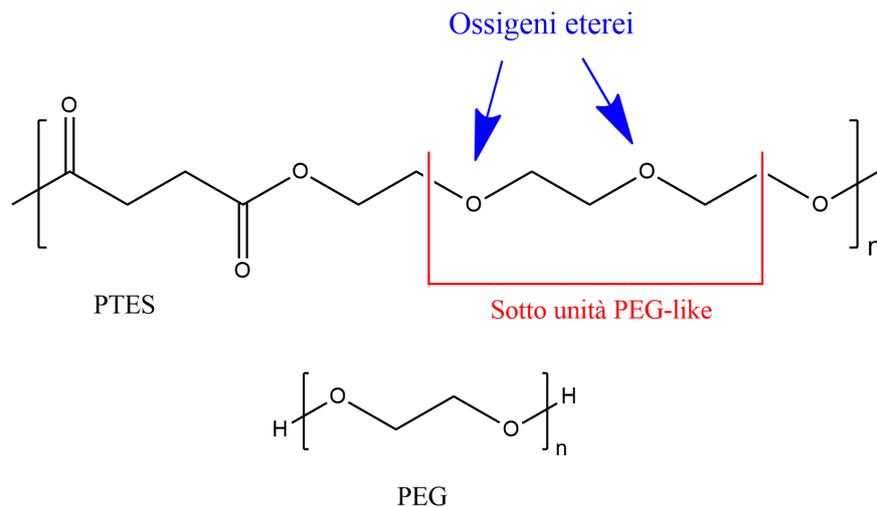


Figura 1.32 Unità di TES dove si evidenziano gli ossigeni eterei e la sotto unità PEG-like comparata alla struttura di PEG.

Tra i copolimeri precedentemente sintetizzati dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Lotti presso i laboratori LAMAC del DICAM dell'Università degli Studi di Bologna, meritano particolare attenzione i copolimeri a blocchi poli (butilene/trietilene succinato) (P(BSTES)) (Figura 1.33)<sup>(16)(25)</sup>.

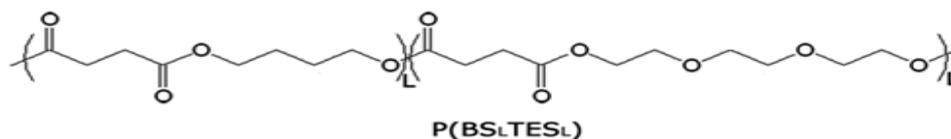


Figura 1.33 Struttura chimica del PBSPTES ("L" indica la lunghezza della sequenza (blocco) di BS e di TES).

Tali copolimeri sono stati ottenuti per miscelazione reattiva: tempi di mescolamento brevi permettono di ottenere copolimeri a blocchi, la cui lunghezza può essere facilmente modulata allungando il tempo di reazione, fino ad arrivare, per tempi sufficientemente lunghi, ad una distribuzione statistica delle unità comonomeriche (copolimero random).

I copolimeri PBSPTES risultano semicristallini, con la fase cristallina del PBS. La temperatura di transizione vetrosa risulta intorno ai -30 °C, mentre la temperatura di fusione decresce al diminuire della lunghezza dei blocchi<sup>(16)</sup>. Le proprietà meccaniche cambiano significativamente per copolimerizzazione: il PBS è il materiale più rigido, con un elevato modulo elastico ed una bassa deformazione a

rottura; l'introduzione delle sequenze PTES provoca una significativa diminuzione del modulo elastico e un parallelo significativo aumento dell'allungamento a rottura; il copolimero con le sequenze più corte (copolimero random) si comporta come un elastomero con allungamenti a rottura che arrivano al 700%. Le sequenze TES contribuiscono ad aumentare l'idrofilicità del materiale finale e l'effetto risulta più marcato per sequenze lunghe. Tale comportamento può essere spiegato assumendo una veloce riorganizzazione spaziale delle sequenze, che porta quelle TES a contatto con l'acqua. Anche la cinetica di degradazione idrolitica dei copolimeri PBSPTES risulta dipendere marcatamente dalla lunghezza dei blocchi. In particolare, la velocità di degradazione è massima per il copolimero a blocchi più lunghi<sup>(16)</sup>.

I copolimeri non sono risultati citotossici, al contrario si sono rilevati in grado di supportare l'adesione e la crescita cellulare di fibroblasti. Studi di cinetica di rilascio da film pressofusi di una molecola modello hanno mostrato risultati interessanti: innanzitutto la cinetica di rilascio dei copolimeri è significativamente diversa da quella dell'omopolimero PBS. Tenuto conto che il rilascio è controllato dalla diffusione del farmaco, l'andamento osservato può essere interpretato sulla base dell'idrofilità e mobilità delle catene polimeriche: il PBS è il materiale più idrofobo e più cristallino tra quelli studiati. E' interessante notare come il copolimero a blocchi più lunghi rilasci più lentamente degli altri copolimeri, a causa della presenza in tale campione di un maggior contenuto di fase cristallina, peraltro caratterizzata da un maggior grado di perfezione, che agisce come barriera nei confronti della diffusione del farmaco. A tempi lunghi il comportamento del copolimero a blocchi lunghi si uniforma a quello degli altri. Tale comportamento è stato attribuito ad un diverso meccanismo di rilascio: il rilascio non è più controllato dalla diffusione, bensì dalla erosione del film, la cui velocità è strettamente correlata alla velocità di degradazione idrolitica. Quest'ultima, dagli esperimenti condotti, è risultata molto maggiore per il copolimero a blocchi lunghi rispetto a quello statistico (ovvero caratterizzato da blocchi corti).

### 1.5.3 ACIDO POLILATTICO (PLA)

L'acido polilattico (PLA) appartiene alla famiglia dei poliesteri alifatici ed è un polimero termoplastico e biodegradabile di origine vegetale, che viene prodotto con processi di fermentazione e distillazione a partire da amido, principalmente di mais.

Si ottiene, principalmente, tramite la *Ring Opening Polimerizzazione* (ROP), dall'apertura dell'anello del lattide, estere ciclico dell'acido lattico; quest'ultimo, può essere ottenuto dalla fermentazione degli zuccheri (destrosio essenzialmente, ma anche glucosio e saccarosio) da farina di granturco, barbabietole da zucchero o amido di frumento (Figura 1.34).

L'acido polilattico è una molecola enantiomerica, che esiste cioè nelle due forme L (levogira) e D (destrogira); in particolare, le quantità di enantiomeri che si ottengono sono il 99,5% in forma L-isomero e per lo 0,5% in forma D-isomero. La polimerizzazione del lattide verso polimeri ricchi di L-isomero dà origine a prodotti cristallini, mentre quelli che contengono più del 15% di D-isomero risultano più amorfi. Per quanto riguarda la formazione dei polimeri, il PDLLA (in cui gli isomeri L e D coesistono con un rapporto 50:50) risulta amorfo, altamente deformabile e con tempi di degradazione relativamente brevi, mentre il PLLA, costituito esclusivamente dall'enantiomero L, è un materiale semicristallino, rigido, e con una scarsa deformazione a rottura<sup>(25)</sup>.

Lavorabile tramite stampaggio a iniezione, estrusione, soffiaggio e termoformatura, venne studiato per la prima volta come possibile materiale per il rilascio controllato di farmaci nel 1971, anche grazie alle sue eccellenti proprietà di biodegradabilità e biocompatibilità. Attualmente, oltre che nel *drug delivery*<sup>(26)</sup>, viene impiegato in vari settori della medicina, in particolare per suture riassorbibili, fissaggio ortopedico, e recentemente in ingegneria tessutale come supporto poroso temporaneo allo scopo di favorire la rigenerazione di tessuti quali ossa, cartilagini, tendini e nervi.

Rigidezza, ridotta stabilità termica ed elevati costi, limitano il suo sviluppo quale generica plastica, nonostante risulti un ottimo candidato per la sostituzione dei materiali tradizionali a base di petrolio. Notevoli sforzi della ricerca sono volti a diminuire la rigidità del PLLA: ad oggi la strategia più plausibile risulta la

sintesi di copolimeri mediante l'introduzione, nella sua catena, di componenti flessibili<sup>(27)</sup>.

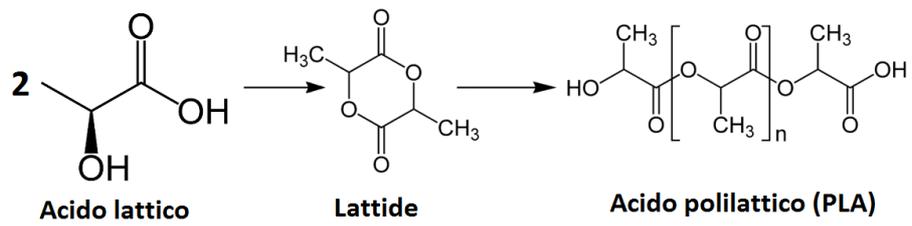


Figura 1.34 Sintesi del PLA

## CAPITOLO 2

### SCOPO

I progressi recenti in campi quali la proteomica e la genomica hanno portato all'identificazione di un gran numero di molecole specificamente associate a malattie diverse, portando quindi allo sviluppo di nuovi regimi terapeutici. Il successo di questi trattamenti dipende non solo dalla scoperta di molecole bioattive nuove, ma anche dalle formulazioni con le quali queste vengono somministrati. I metodi classici di somministrazione dei farmaci hanno problemi specifici che gli scienziati stanno tentando di risolvere. Molti farmaci presentano effetti collaterali negativi e gli effetti terapeutici di molti di essi sono limitati dalla parziale degradazione e dalla diffusione molecolare che si verificano prima che i farmaci raggiungano il punto desiderato all'interno dell'organismo. Inoltre, la somministrazione sottocutanea, endovenosa, o intra-articolare di agenti terapeutici richiede spesso concentrazioni molto più elevate di quelle fisiologiche aumentando notevolmente l'incidenza di effetti secondari negativi. L'obiettivo dei sistemi innovativi di somministrazione di farmaci, quindi, è di somministrarli inalterati in punti mirati del corpo rilasciandoli in modo controllato a seconda del regime di trattamento richiesto. L'incapsulamento all'interno di sistemi nano-dimensionati contribuisce al raggiungimento di questo obiettivo. La progettazione del nanovettore contenente il farmaco è fondamentale per ottenere la corretta localizzazione cellulare e tissutale delle molecole da somministrare ed eseguire un rilascio adeguato.

I polimeri rappresentano i materiali più studiati per la realizzazione di nanovettori per il rilascio di farmaci. Le nanoparticelle usate per l'incapsulamento del principio attivo possono essere costituite da polimeri sintetici, tra cui i poliesteri alifatici. Il farmaco viene rilasciato in modo controllato attraverso erosione superficiale o bulk, diffusione attraverso la matrice polimerica, rigonfiamento seguito da diffusione o in risposta a stimoli esterni. Tra i poliesteri alifatici, l'acido polilattico (PLA) e i suoi copolimeri con l'acido poliglicolico (PLGA) sono senza dubbio i composti più usati per il trasporto di farmaci. Tale popolarità è legata alla loro biodegradabilità, biocompatibilità e all'ottima resistenza meccanica.

Nonostante i notevoli vantaggi, PLGA e PLA non possono però essere utilizzati per tutte le applicazioni. È noto, ad esempio, che l'estrema idrofobicità del PLGA spesso risulta in basse efficienze di incapsulamento, specie per molecole idrofiliche con basso peso molecolare. Inoltre, molti sistemi a base di PLGA non rilasciano il farmaco secondo una cinetica di ordine zero, ma mostrano il caratteristico andamento in tre fasi: alto rilascio all'inizio, una fase cosiddetta lag e un terzo momento legato alla degradazione del polimero. Il PLA invece, probabilmente a causa della elevata idrofobicità e della mancanza di gruppi funzionali appropriati, mostra una bassa citocompatibilità.

Tenuto conto di quanto detto, il presente lavoro di ricerca è stato rivolto alla preparazione e alla caratterizzazione di nuovi sistemi polimerici a base di PLA potenzialmente applicabili in ambito biomedico per la veicolazione di farmaci.

Come noto, le proprietà non soddisfacenti di un polimero possono essere migliorate, senza alterare sensibilmente quelle già buone e senza incrementi significativi nei costi, per copolimerizzazione.

Il gruppo di ricerca presso il quale è stata condotta la presente Tesi ha una esperienza consolidata nella sintesi e caratterizzazione di copolimeri a diversa architettura molecolare e da quindici anni ha indirizzato le proprie ricerche verso i polimeri contenenti eteroatomi, in particolare ossigeno etero.

Dai risultati ottenuti è stato appurato che l'introduzione di tali atomi lungo la catena di un omopolimero può avere diversi effetti sulle proprietà allo stato solido del materiale, più specificamente:

- la temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) può:
  1. diminuire perché la catena polimerica diventa più flessibile;
  2. aumentare, a causa di forti interazioni intercatena.

Il primo effetto prevale se gli eteroatomi vengono introdotti lungo la catena polimerica di un polimero rigido.

- il punto di fusione e la tendenza a cristallizzare diminuiscono, a causa di una riduzione della simmetria della catena;
- l'idrofilicità superficiale aumenta, poiché la maggiore elettronegatività degli atomi di ossigeno rispetto a quelli di carbonio comporta la formazione di legami polari C-O.

Tra i vari sistemi copolimerici studiati, sono risultati particolarmente interessanti per applicazioni in ambito biomedico i copolimeri a blocchi poli(butilene/trietilene succinato) P(BSTES), che si sono rivelati biocompatibili e idroliticamente degradabili, con profilo cinetico controllabile agendo semplicemente sulla lunghezza dei blocchi.

Tenuto conto di tale scenario, il presente lavoro di ricerca si è focalizzato sulla sintesi e sulla caratterizzazione di due nuovi copoliesteri alifatici a base di PLA, caratterizzati entrambi da un'architettura triblocco **A-B-A**, dove **A**, rappresenta l'acido polilattico (PLA) e **B**, è un sistema copolimerico alifatico “*PEG-like*” ad elevata flessibilità a base di poli(butilene succinato) (PBS) biodegradabile e biocompatibile, precedentemente studiato dal gruppo di ricerca presso cui è stata condotta la Tesi. Di quest'ultimo sono stati considerati due diversi copolimeri a diversa lunghezza dei blocchi.

Dai polimeri oggetto della presente Tesi sono state realizzate nanoparticelle, all'interno delle quali incapsulato il desametasone, farmaco corticosteroide, appartenente alla classe degli antinfiammatori steroidei.

L'attività di ricerca di seguito illustrata è stata svolta presso i laboratori LAMAC del Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali (DICAM) dell'Università di Bologna e si è articolata nelle seguenti fasi:

Ricerca bibliografica su studi condotti in passato per acquisire conoscenza sull'argomento ed essere aggiornati sui vari processi di sintesi e di caratterizzazione;

- Sintesi dei due omopolimeri di riferimento mediante policondensazione in massa a due stadi da cui saranno sintetizzati i due copolimeri **B**;
- Sintesi dei due copolimeri **B** idrossil terminati tramite miscelazione reattiva;
- Sintesi dei copolimeri triblocco **A-B-A**;
- Caratterizzazione molecolare dei campioni sintetizzati, tramite risonanza magnetica nucleare (NMR) e cromatografia a permeazione su gel (GPC);

- Caratterizzazione termica mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC), analisi termogravimetrica (TGA);
- Analisi strutturale mediante diffrattometria a raggi X (WAXS);
- Realizzazione di nanoparticelle mediante tecnica oil/water vuote e contenenti il farmaco;
- Determinazione delle dimensioni medie delle particelle mediante misure di potenziale zeta;
- Analisi della cinetica di rilascio di desametasone dalle nanoparticelle;
- Analisi dei risultati ottenuti ed estrapolazione di correlazioni proprietà-struttura.

## CAPITOLO 3

### METODI E MATERIALI

Il seguente lavoro di Tesi di Laurea si è svolto presso i laboratori di Sintesi e Caratterizzazione di Materiali Macromolecolari (LAMAC) del Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali dell'Università di Bologna (DICAM).

Il progetto è articolato in due parti interconnesse: la fase di sintesi degli omopolimeri e dei copolimeri oggetto di studio, e la loro successiva caratterizzazione.

### 3.1 SINTESI

#### 3.1.1 REAGENTI

Di seguito i reagenti utilizzati per le sintesi, unitamente ai catalizzatori. Sono stati impiegati tal quali, eccetto il Titaniotetrabutoossido che è stato distillato prima dell'uso.

##### 3.1.1.1 DIMETILSUCCINATO

Il dimetilsuccinato è un diestere che a temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore, la cui struttura chimica è riportata in Figura 3.1.

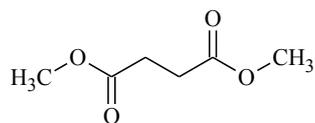


Figura 3.1 Struttura del dimetilsuccinato.

##### 3.1.1.2 TRIETILENGLICOLE

Il trietilenglicole è un diolo ottenuto dalla condensazione, con conseguente eliminazione di due molecole d'acqua, di tre glicoli etilenici, la cui struttura chimica è riportata in Figura 3.2. A temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore e inodore.

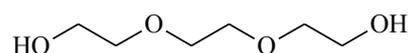


Figura 3.2 Struttura del trietilenglicole.

### 3.1.1.3 1,4-BUTANDIOLO

L'1,4-butandiolo è un diolo costituito da quattro atomi di carbonio, la cui struttura è riportata in Figura 3.3.

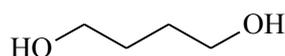


Figura 3.3 1,4-butandiolo.

### 3.1.1.4 TITANIO (IV) TETRABUTOSSIDO

Il titanio tetrabutossido (TBOT) viene impiegato come catalizzatore in fase di sintesi. A temperatura ambiente si presenta come un liquido trasparente, dal colore giallo chiaro. La sua struttura (Figura 3.4) è la seguente:

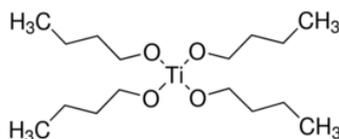


Figura 3.4 Struttura del titanio tetrabutossido.

### 3.1.1.5 STAGNO OTTANOATO

Nei processi industriali lo stagno ottanoato ( $\text{Sn}(\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_2)_2$ , Figura 3.5) è il catalizzatore più utilizzato per la polimerizzazione attraverso l'apertura d'anello, considerata la sua elevata attività e una notevole efficacia nel ridurre l'insorgenza di reazioni di transesterificazione parallele innescate dall'elevata temperatura.

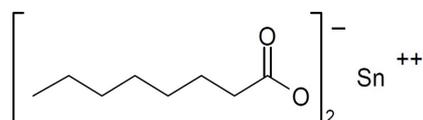


Figura 3.5 Unità strutturale dello stagno ottanoato.

## **3.1.2 DESCRIZIONE DELLA SINTESI DEI POLIMERI**

### **3.1.2.1 SINTESI DEL PBS-OH**

La sintesi è stata eseguita tramite policondensazione in massa a due stadi, utilizzando come monomeri di partenza il dimetil succinato (DMS) e l'1,4-butandiolo. Si è lavorato in condizioni di eccesso (50%) del diolo rispetto al diestere. Tutti i reagenti e il catalizzatore sono stati caricati nel reattore di polimerizzazione simultaneamente all'inizio del processo di sintesi. Il primo stadio della reazione è stato condotto alla temperatura di 185°C, sotto flusso controllato di azoto e con un'agitazione di 100 giri al minuto. In questa prima fase hanno luogo le reazioni di esterificazione diretta con successiva eliminazione di specie a basso peso molecolare, nel caso in esame molecole di metanolo, allo scopo di spostare l'equilibrio della reazione verso i prodotti. Il secondo stadio ha inizio quando almeno il 90% del metanolo teorico è raccolta nella trappola di condensazione mediante distillazione. Qui avvengono le reazioni di transesterificazione che, mantenendo i tempi di reazione non molto lunghi, portano alla formazione di polimeri a basso peso molecolare. Durante questa fase la temperatura viene aumentata di 10°C ogni 30 minuti, fino al raggiungimento di 220°C. Contemporaneamente, la pressione all'interno del reattore viene ridotta fino a 0,07 mbar grazie all'impiego di una pompa da vuoto, al fine di rimuovere, tramite distillazione, l'eccesso di diolo. Una volta raggiunti i valori desiderati di temperatura e pressione, questi vengono mantenuti costanti fino al termine della reazione.

### **3.1.2.2 SINTESI DEL PTES-OH**

Il procedimento è identico a quello descritto per il PBS ad eccezione della tipologia di glicole che viene fatto reagire con il dimetil succinato. In questo caso, infatti, è stato usato il trietilenglicole e non il butandiolo.

### **3.1.2.3 SINTESI DEL COPOLIMERO P(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>)-OH**

Il copolimero a blocchi poli(butilene/trietilene succinato) è stato ottenuto mediante miscelazione reattiva degli omopolimeri PBS e PTES (in rapporto molare 1 : 1) in un reattore di vetro da 250 mL a 225°C. Sono stati applicati un

flusso controllato di azoto, per prevenire la degradazione, e un'agitazione costante di 50 rpm. Tutti i reagenti e il catalizzatore (titanio tetrabutoossido) sono stati caricati nel reattore di polimerizzazione simultaneamente all'inizio del processo di sintesi. Il processo è durato 10 minuti.

#### **3.1.2.4 SINTESI DEL COPOLIMERO P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-OH**

Il procedimento per la sintesi del copolimero statistico è identico a quello descritto per il copolimero a blocchi ad eccezione della durata della reazione e dell'agitazione. In questo caso, infatti, è stata applicata un'agitazione di 100 rpm e il processo è durato 80 minuti.

#### **3.1.2.5 SINTESI DEL COPOLIMERO**

##### **PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>)**

Il copolimero triblocco PLLA-poli(butilene/trietilene succinato) è stato ottenuto mediante polimerizzazione ad apertura d'anello a partire dall'L-lattide e dal copolimero statistico precedentemente sintetizzato (in rapporto in peso 40:60) in un reattore di vetro da 200 mL. In un primo momento nel reattore è stato inserito solo il copolimero ed è stato applicato il vuoto, mantenendo un'agitazione costante di 100 rpm ed una temperatura di 160°. Dopo circa 30 minuti, sono stati aggiunti anche l'L-lattide ed il catalizzatore, in questo caso stagno ottanoato, in quantità pari a 100 ppm per grammo di polimero teoricamente ottenibile. La reazione è poi proseguita per circa 3 ore alla temperatura costante di 160 °C: durante questa fase, avviene la reazione di apertura ad anello *in situ* dell'L-lattide, ad opera dei gruppi terminali -OH del copolimero PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>).

#### **3.1.2.6 SINTESI DEL COPOLIMERO PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)**

Il procedimento è identico a quello descritto per il copolimero PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>).

### **3.1.3 STRUMENTAZIONE**

La strumentazione usata per la sintesi (Figura 3.6) consta di un reattore in vetro a tre colli immerso in un bagno di sali inorganici, che permettono il mantenimento

di una temperatura uniforme e costante durante tutta la reazione, un agitatore meccanico dotato di misuratore di momento torcente, una trappola per la condensazione dei prodotti di scarto ed una pompa da vuoto.

L'agitatore meccanico, che attua un'agitazione continua dei reagenti attraverso una pala, è costituito da un albero motore a cui sono applicati degli estensimetri che permettono di misurare il momento torcente necessario per mantenere la rotazione costante.

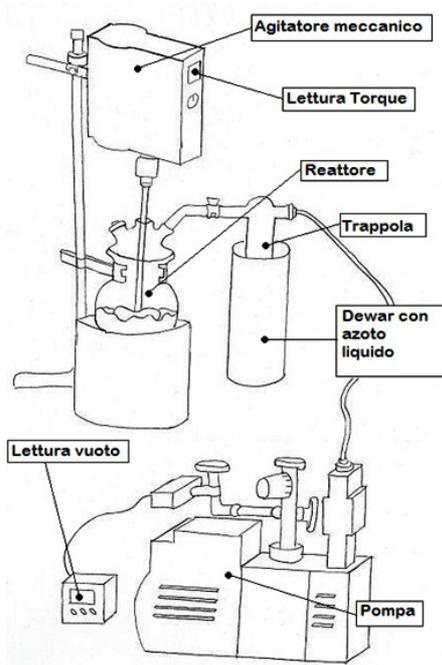


Figura 3.6. Strumentazione di sintesi.

Con il procedere della reazione a causa dell'aumento della viscosità del fluido, legato all'incremento del peso molecolare, incontrano maggiore resistenza. Temperatura e torque vengono costantemente monitorati durante la reazione.

### 3.1.4 PURIFICAZIONE DEGLI OMOPOLIMERI E DEI COPOLIMERI

Il processo di purificazione tramite precipitazione prevede tre fasi:

- 1) il polimero viene fatto sciogliere nella minima quantità di cloroformio ( $\text{CHCl}_3$ ), mantenendo la soluzione in agitazione;
- 2) una volta che il polimero risulta completamente disciolto, si versa la soluzione in un imbuto sgocciolatore (Figura 3.7), e da qui viene fatta

gocciolare all'interno di un becher contenente un largo eccesso di metanolo ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Nel becher si osserverà la formazione di un precipitato costituito dalle catene polimeriche più lunghe, mentre in soluzione rimarranno le impurezze e le catene a basso peso molecolare (oligomeri).

- 3) una volta terminato lo sgocciolamento, il metanolo viene filtrato usando carta da filtro e una beuta codata, a cui si applica il vuoto (Figura 3.8), al fine di recuperare tutto il materiale precipitato.



Figura 3.7 Imbuto sgocciolatore.



Figura 3.8 Filtrazione del precipitato.

### 3.1.5 PREPARAZIONE DELLE NANOPARTICELLE

Nella presente Tesi sono state preparate sia le nanoparticelle vuote che quelle contenenti il farmaco, il desametasone (massa molecolare 392.461 g/mol, formula bruta  $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{FO}_5$ ), farmaco corticosteroide appartenente alla classe degli antinfiammatori steroidei. Le particelle nanometriche sono state realizzate tramite miniemulsione “oil-in-water”.

Il polimero (50 mg) disciolto in  $\text{CHCl}_3$  (5 mL) è stato aggiunto ad una soluzione acquosa di sodio dodecil solfato SDS (0.3 wt%, 10 mL). L'emulsione della fase organica in quella acquosa è stata ottenuta tramite agitazione magnetica a

temperatura ambiente per 30 min. Successivamente, mantenendo sempre il sistema in agitazione, il cloroformio è stato lasciato evaporare completamente per 50 minuti ottenendo così un'emulsione di nanosfere in acqua.

L'emulsione è stata centrifugata a 1000 rpm per 3 minuti a 0 °C per separare la particelle più grandi da quelle più piccole, che rimangono sospese nel mezzo acquoso. La scelta sia del tempo di evaporazione che dei giri della centrifuga effettuata sono frutto di un'ottimizzazione del processo di preparazione. Le particelle contenenti il farmaco sono state ottenute nelle stesse condizioni appena descritte, ma usando come solvente organico una soluzione di desametasone in  $\text{CHCl}_3$  (1 wt%).

## **3.2 CARATTERIZZAZIONE**

### **3.2.1 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE**

#### **3.2.1.1 SPETTROSCOPIA DI RISONANZA**

##### **MAGNETICA NUCLEARE (NMR)**

La spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) è una particolare tecnica d'indagine grazie alla quale è possibile determinare la struttura molecolare dei materiali. Essa si basa sul principio secondo il quale i nuclei dotati di spin non intero (come  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , i quali presentano spin pari a  $\frac{1}{2}$ ), se sottoposti ad un intenso campo magnetico esterno  $B_0$ , tendono ad orientarsi secondo la direzione del campo, alla stregua di piccoli magneti. I possibili orientamenti permessi sono due, uno parallelo al campo esterno (disposizione a bassa energia), l'altro antiparallelo (ad alta energia). L'orientamento assunto non è fisso ma, al contrario, è possibile passare da una disposizione all'altra attraverso la cessione o l'assorbimento di una quantità precisa di energia (E), fornita attraverso un impulso elettromagnetico ad una determinata frequenza  $\nu$ . In corrispondenza di queste transizioni i nuclei si dicono in "risonanza" con la radiazione applicata; la frequenza necessaria per la risonanza dipende sia dall'intensità del campo magnetico esterno che dal tipo di nucleo in esame. Il segnale di output viene detto spettro NMR ed è costituito da picchi in corrispondenza di frequenze più o meno elevate proprio a seconda dell'intorno chimico dell'atomo: un atomo di idrogeno, infatti, a seconda della elettronegatività dell'atomo a cui è legato, può essere più o meno immerso nei

propri elettroni di legame, particelle cariche che, quando sono sottoposte al campo magnetico  $B_0$ , generano un piccolo campo magnetico indotto  $\beta_i$ , opposto a quello molto più forte applicato. Se l'idrogeno è legato ad atomi poco elettronegativi si trova più immerso negli elettroni di legame e sente un campo magnetico indotto  $\beta_i$  più intenso, che fa diminuire di più il campo applicato ( $B = B_0 - \beta_i$ ) e quindi subisce la transizione ad una frequenza minore. Se, invece, il protone è legato ad atomi più elettronegativi è meno schermato dagli elettroni di legame ed è investito da un campo indotto  $\beta_i$  più debole: esso sentirà quindi un campo effettivo più intenso ( $B = B_0 - \beta_i$ ) ed assorbirà a frequenze maggiori. La variazione di frequenza assorbita viene chiamata spostamento chimico; per quantificare tale spostamento è necessario individuare un idrogeno di riferimento al quale associare il valore zero della scala. Per convenzione lo zero è stato attribuito agli idrogeni del tetrametilsilano o TMS ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ), che sono tra i più fortemente schermati a causa della bassa elettronegatività del silicio, così che gli spostamenti chimici delle normali molecole organiche risultino sempre positivi.

Lo spostamento chimico assoluto è la differenza tra la frequenza (in Hz) assorbita dell'idrogeno in esame e quella dell'idrogeno del TMS (tetrametilsilano), che viene preso come riferimento:

$$\text{spostamento chimico assoluto} = \text{Hz (H in esame)} - \text{Hz (H TMS)}.$$

Lo spostamento chimico assoluto è proporzionale al campo applicato  $B_0$ , quindi strumenti che utilizzano campi magnetici diversi producono spostamenti chimici diversi. Per evitare errori si utilizza un'altra grandezza, lo spostamento chimico relativo  $\delta$  (misurato in ppm, cioè Hz/MHz), indipendente dal campo applicato, e definito come:

$$\delta = \Delta\nu/\nu_r,$$

dove  $\Delta\nu$  rappresenta la differenza tra la frequenza di risonanza  $\nu$  dell'atomo considerato e  $\nu_r$ , frequenza di risonanza dello standard. Tipicamente viene usato l' $^1\text{H}$ , e non il  $^{13}\text{C}$ , in quanto quest'ultimo, essendo un isotopo scarsamente presente in natura (solo lo 0.11% del carbonio esistente), darebbe origine a spettri dal basso rapporto segnale/rumore. Per  $^1\text{H}$ -NMR, la scala  $\delta$  si estende da 0 a 12 ppm; mentre per  $^{13}\text{C}$ -NMR è molto più grande e copre l'intervallo 0-220 ppm.

Un'altra caratteristica della spettroscopia  $^1\text{H}$ -NMR è il fatto che l'intensità del segnale è proporzionale al numero di idrogeni che generano il segnale stesso:

l'integrale dell'area dei picchi è direttamente proporzionale al numero di idrogeni che lo hanno prodotto. Valutando l'area sottesa da ogni picco (relativamente all'area totale sottesa dalla curva del segnale) è possibile determinare il rapporto tra i vari atomi di idrogeno presenti. Dividendo poi tale area per il numero di idrogeni corrispondenti, si ottengono valori confrontabili con quelli dati dalla formula chimica del polimero.

Gli spettri sono stati ottenuti utilizzando uno spettrometro NMR Varian XL-400 (Figura 3.9). Le soluzioni sono state preparate sciogliendo circa 10 mg di polimero in cloroformio deuterato (0.03%). L'acquisizione è avvenuta a temperatura ambiente utilizzando una concentrazione dei polimeri pari al 0,5 wt% (con tempo di rilassamento di 0 s e tempo di acquisizione di 1 s per 100 ripetizioni).



Figura 3.9 Strumentazione per l'indagine NMR.

### 3.2.1.2 CROMATOGRAFIA A PERMEAZIONE SU GEL (GPC)

La cromatografia a permeazione di gel (GPC) è una tecnica di separazione fisica che consente di determinare la distribuzione del peso molecolare di un polimero. Il cromatografo (Figura 3.10) è costituito da una pompa volumetrica, una colonna contenente particelle porose (polistirene reticolato con divinilbenzene), che fungono da setaccio chimico, e un rivelatore, generalmente a indice di rifrazione. I gel utilizzati per l'impaccamento delle colonne lavorano con il principio del "setaccio molecolare": il soluto che passa attraverso la colonna subisce un rallentamento proporzionale alle dimensioni delle particelle e alle dimensioni dei

pori. Poiché non vi è alcun tipo di legame chimico tra soluto e gel, i primi picchi in uscita saranno quelli relativi alle molecole a peso molecolare maggiore (che non passano attraverso i pori e quindi escono rapidamente); seguiranno i picchi relativi alle catene di peso inferiore le quali, permeando i percorsi creati dalla porosità del gel, impiegheranno un tempo maggiore a percorrere la colonna.

Il metodo di analisi dei campioni si basa sulla creazione di curve di taratura attraverso standard di polimeri a peso noto e su una successiva analisi per confronto.

Durante la scansione, in colonna scorre un solvente con portata volumetrica costante. I campioni da analizzare vengono sciolti nello stesso solvente che scorre in colonna, filtrati con una siringa (in modo da eliminare eventuali corpuscoli insolubili che ostruirebbero i pori), ed il filtrato viene dunque iniettato.

La soluzione uscente dalla colonna viene analizzata istante per istante da un rivelatore, che ha come output un segnale proporzionale alla concentrazione del soluto disciolto. Tale output è costituito da un grafico che riporta l'intensità del segnale in funzione del tempo. La conversione dalla scala temporale alla scala di pesi molecolari si ottiene mediante confronto con le curve di taratura.

Le misure GPC sono state effettuate a temperatura di 30°C con un cromatografo HP Series 1100 HPLC utilizzando una colonna PL gel 5 $\mu$  Mini MIX-C (rapporto lunghezza/diametro in mm interno 250/4,6). La registrazione dei cromatogrammi è avvenuta su HP Chemstation versionato A.05.04 e l'elaborazione con il GPC Calculator 7.6 della General Electric Company. Come solvente iniettato a portata costante è stato scelto il cloroformio (flusso in colonna 0.3 mL/min). La concentrazione delle soluzioni previo filtraggio era pari a 2 mg/mL. Nella costruzione delle curve di taratura (scelte del terzo ordine), sono stati utilizzati diversi standard di polistirene con peso molecolare compreso tra 2'000 e 100'000 u.m.a.

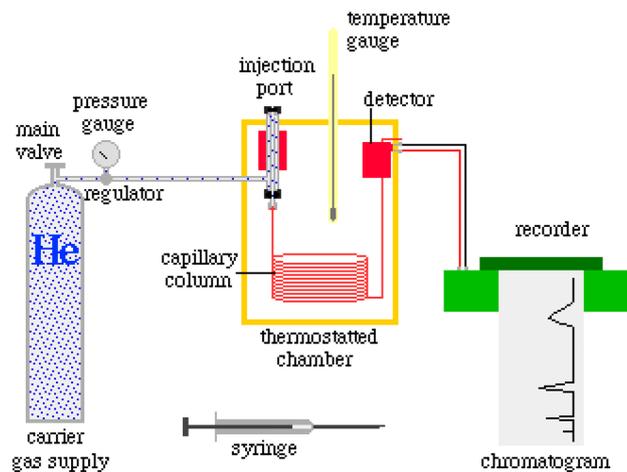


Figura 3.10 Schematizzazione del cromatografo.

## 3.2.2 CARATTERIZZAZIONE TERMICA

### 3.2.2.1 CALORIMETRIA DIFFERENZIALE A SCANSIONE (DSC)

La calorimetria differenziale a scansione è una tecnica utilizzata per studiare le transizioni termiche dei materiali e determinarne le proprietà termodinamiche, in particolare temperatura di transizione vetrosa, punto di fusione e calore di fusione. Il principio di base consiste nel ricavare informazioni sul materiale attraverso un riscaldamento (o raffreddamento) controllato, ed il confronto con un riferimento sottoposto al medesimo programma termico.

La macchina (Figura 3.11) viene predisposta mettendo sugli alloggiamenti due crogioli identici scelti in modo da resistere alle temperature di prova senza interagire con il campione in esame. Uno dei due crogioli rimarrà vuoto, in quanto servirà come riferimento per la misura differenziale. Queste due celle sono microcalorimetri che, durante l'analisi, vengono mantenuti in atmosfera di azoto inerte. Durante tutto l'arco dell'esperimento, un sistema di termocoppie raccoglie i dati di temperatura e li invia ad un elaboratore, che mediante un apposito software li elabora per generare l'output.

Durante la scansione, quando non si verificano fenomeni di transizione di fase, campione e riferimento rimangono alla stessa temperatura; in caso contrario, si verificano degli squilibri termici, che vengono misurati dalle termoresistenze. Queste sono responsabili della regolazione della potenza elettrica fornita ai

microcalorimetri: il flusso di energia che viene fornito o sottratto è finalizzato a riportare il campione ed il riferimento alla medesima temperatura.

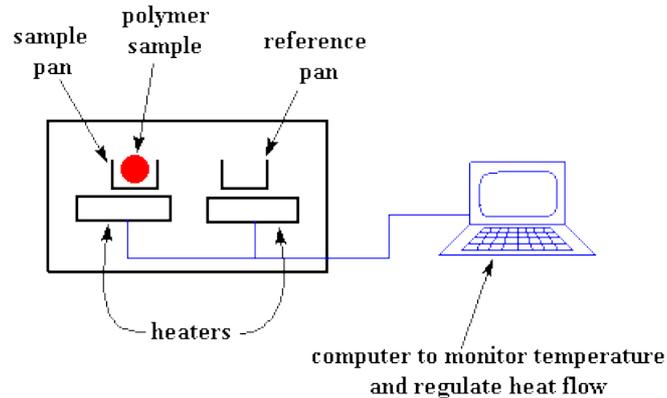


Figura 3.11 Schematizzazione apparecchiatura DSC.

Per quanto riguarda l'analisi del termogramma, di cui un esempio è riportato in Figura 3.12, è possibile operare in endo-up o in endo-down; nel caso si operi in endo-up, per la fusione (fenomeno endotermico), sul termogramma si osserverà un picco rivolto verso l'alto che corrisponde all'aumento del flusso di calore in quanto, oltre una certa temperatura, l'agitazione molecolare è tale da vincere le forze di coesione nei cristalli, i quali fondono assorbendo calore. Per la cristallizzazione (fenomeno esotermico), si osserverà invece un picco rivolto verso il basso che corrisponde alla diminuzione del flusso di calore in quanto il materiale, ricristallizzando, cede energia. L'area sottesa al picco di fusione corrisponde al calore di fusione  $\Delta H_m$  [J/g], un parametro direttamente proporzionale al grado di cristallinità del polimero. Il rapporto tra quest'ultima grandezza ed il calore di fusione del polimero completamente cristallino costituisce il grado di cristallinità del materiale.

È inoltre possibile osservare la temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ), un parametro caratteristico dei solidi polimerici, rappresentante la soglia termica oltre la quale si verifica il passaggio dallo stato vetroso a quello gommoso, in cui sono permessi i movimenti di torsione e rotazione all'interno della catena polimerica. Si manifesta come una variazione endoterma della linea di base, ed il valore di  $T_g$  è determinato in corrispondenza della metà della variazione di calore specifico associata alla transizione. L'entità della variazione di calore specifico associato alla transizione vetrosa, proporzionale alla componente amorfa presente

nel materiale, è pari alla distanza verticale tra le linee di base da cui si estrapola la  $T_g$ :

$$\Delta cp = \Delta \left( \frac{dQ}{dT} \right) = \left( \frac{dQ}{dt} \right) \left( \frac{dT}{dt} \right)^{-1},$$

dove  $(dt/dT)^{-1}$  è la velocità di scansione.

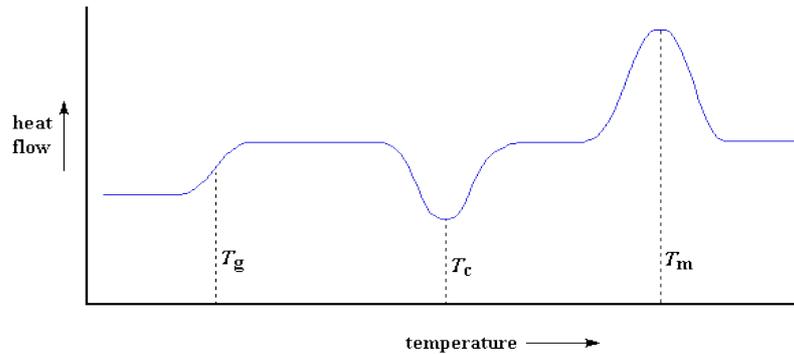


Figura 3.12 Esempio di termogramma.

Le misure DSC sono state ottenute con un DCS6 Perkin-Elmer equipaggiato di accessori per il raffreddamento a temperature minori di  $0^{\circ}\text{C}$  e calibrato con standard ad elevata purezza.

La capsula campione è stata riempita con circa 10 mg di materiale e, insieme alla capsula di riferimento lasciata vuota, è stata sottoposta ad un programma termico ben definito:

- prima scansione: isoterma della durata di 1 min a  $-70^{\circ}\text{C}$ , riscaldamento da  $-70^{\circ}\text{C}$  a  $200^{\circ}\text{C}$  con velocità di  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , raffreddamento rapido con velocità di  $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (il raffreddamento veloce impedisce la ricristallizzazione, perciò la seconda scansione verrà effettuata sullo stesso materiale ma in uno stato completamente amorfo) fino a  $-70^{\circ}\text{C}$ ;
- seconda scansione: riscaldamento in analoghe condizioni di temperatura e velocità.

### 3.2.2.2 ANALISI TERMOGRAVIMETRICA (TGA)

Mediante l'analisi termogravimetrica è possibile ottenere informazioni sia sulla cinetica del processo di decomposizione che sulla stabilità termica del materiale.

Tali informazioni sono di fondamentale importanza per definire il valore di temperatura che non deve essere oltrepassato nel trattamento del polimero, per non incorrere nella sua degradazione. Questa tecnica registra le variazioni di peso del campione quando viene sottoposto ad un graduale aumento di temperatura, in atmosfera controllata ( $N_2$ ,  $O_2$ , aria). I cambiamenti di peso sono dovuti a perdite di sostanze volatili in seguito a processi fisici o chimici che modificano la natura del composto; nel caso dei polimeri, i prodotti di decomposizione sono anidride carbonica e acqua.

La strumentazione utilizzata per la termogravimetria è composta da quattro parti:

- una bilancia termica;
- un forno;
- un sistema di gas di spurgo che assicura un ambiente inerte o reattivo a seconda del caso;
- un computer per il controllo dello strumento.

La curva termogravimetrica per un polimero ha l'andamento tipico illustrato in Figura 3.13. Tra le informazioni importanti che si possono dedurre da essa vi sono:

- $T_{5\%}$ : temperatura in corrispondenza della quale è avvenuta una perdita di peso pari al 5% del peso totale;
- $T_{max}$ : temperatura alla quale si ha la massima velocità di perdita di peso.

Le curve TGA sono state ottenute usando la bilancia termogravimetrica PerkinElmer TGA 4000, in atmosfera di azoto partendo da circa 5 mg di campione. La velocità di riscaldamento impostata è di  $+10^\circ C/min$  e la temperatura varia nell'intervallo  $[40-800^\circ C]$ .

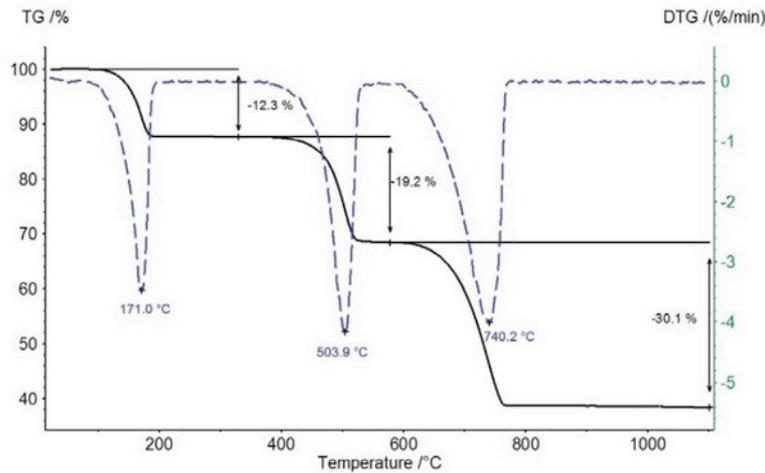


Figura 3.13 Curva termogravimetrica.

### 3.2.3 ANALISI DIFFRATTOMETRICA A RAGGI X (XRD)

La diffrazione a raggi X (XRD) è una tecnica analitica non distruttiva che permette la misura della distanza tra i piani reticolari di un materiale, parametro peculiare di ogni sostanza cristallina; tale tecnica fornisce informazioni, quindi, sulla struttura cristallina di un materiale (grado di cristallinità, parametri della cella elementare, possibili polimorfismi e isomorfismi) studiando gli effetti dell'interazione tra un fascio di raggi X e la materia.

Il diffrattometro è costituito da un tubo generatore di raggi X, alcuni filtri monocromatori (che isolano una specifica lunghezza d'onda utile  $\lambda$ ) e collimatori, per convogliare le onde elettromagnetiche prodotte in una direzione preferenziale, un piatto porta-campione che viene investito dal fascio di onde, uno specchio monocromatore secondario ed, infine, un rivelatore.

Il principio di funzionamento della diffrazione si basa sulla legge di Bragg:

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

dove  $n$  è un numero intero,  $\lambda$  è la lunghezza d'onda del raggio,  $d$  è la distanza tra i piani reticolari e  $\theta$  è l'angolo di incidenza (Figura 3.14)<sup>(15)</sup>. Questa formula descrive l'interazione tra il piano cristallino e la radiazione incidente, nelle ipotesi che i raggi incidenti siano tutti paralleli ed in fase tra loro, in modo da creare un'interferenza costruttiva, e permette di determinare la distanza di legame  $d$ , conoscendo la lunghezza d'onda selezionata e misurando l'angolo di incidenza.

I pattern di diffrazione a raggi X sono stati ottenuti utilizzando un diffrattometro PANalytical X'PertPro equipaggiato con un rivelatore allo stato solido X'Celerator, che utilizza la  $\lambda$  del rame ( $\lambda=0,15418$  nm). La frequenza in ascissa dei dati è descritta dal passo di  $0,10^\circ$  sul range  $[5-60^\circ]$  nell'intervallo  $2\theta$ .

Gli indici di cristallinità  $\chi_c$  si ricavano applicando la formula:

$$\chi_c = A_c/A_t,$$

dove  $A_c$  rappresenta l'area di diffrazione cristallina e  $A_t$  l'area totale del profilo di diffrazione.  $A_c$  è stata calcolata sottraendo all' $A_t$  la componente amorfa, modellata e approssimata come picco a campana sulla linea di base. È stato inoltre considerato lo scattering non coerente.

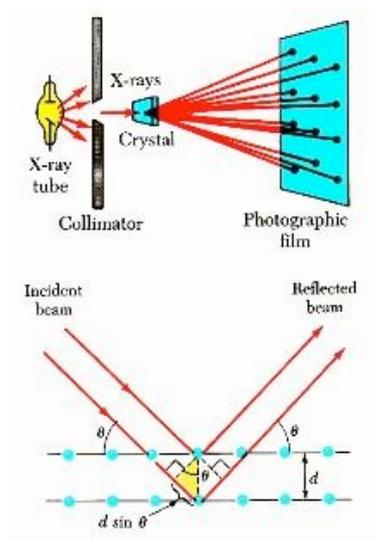


Figura 3.14 Legge di Bragg.

## 3.2.4 CARATTERIZZAZIONE DELLE NANOPARTICELLE

### 3.2.4.1 LIGHT SCATTERING DINAMICO

La dispersione della luce, o scattering, è una conseguenza dell'interazione della luce con il campo elettrico di una piccola particella o molecola. Un fotone incidente induce un dipolo oscillante nella nuvola di elettroni: con la variazione del dipolo, l'energia viene irradiata in tutte le direzioni; questa energia irradiata è chiamata "luce diffusa". La dispersione prodotta da particelle molto piccole, i cui diametri sono minori di un decimo della lunghezza d'onda del laser, è isotropa,

cioè uguale in tutte le direzioni, e l'intensità della luce prodotta da queste è proporzionale a  $d^6$ , dove  $d$  è il diametro delle particelle.

Il *dynamic light scattering* (DLS) è una tecnica non invasiva, ormai affermata, chiamata anche *Photon Correlation Spectroscopy* (PCS) o *Quasi-Elastic Light Scattering* (QELS) per la misura della dimensione di molecole, nanoparticelle o colloidali tipicamente sub-micrometrici, attraverso la rilevazione delle fluttuazioni della luce diffusa dovute al moto diffusionale di particelle sospese in un fluido (gas o soluzione).

L'interpretazione di un esperimento di DLS è basato sulle seguenti assunzioni:

- il volume di scattering contiene un elevato numero di particelle, così che l'ampiezza del campo elettrico di scattering è una variabile casuale Gaussiana complessa;
- l'intensità della luce di scattering proveniente dal solvente e piccole molecole è trascurabile rispetto allo scattering delle particelle di soluto;
- la luce incidente è polarizzata perpendicolarmente al piano di scattering e la luce diffusa ha la stessa polarizzazione;
- le particelle sono sufficientemente piccole e/o sferiche cosicché l'intensità di scattering individuale sia indipendente dal tempo.

Nelle misure DLS il campione viene illuminato da un raggio laser, e le variazioni d'intensità della luce diffusa vengono misurate in funzione del tempo. Le variazioni d'intensità misurate dal detector sono generate dal movimento browniano delle particelle (cioè il movimento casuale dovuto a collisioni causate dai bombardamenti delle molecole di solvente che le circondano), che entrano ed escono continuamente dal volume di misura, determinando oscillazioni dell'intensità, all'origine dello scattering. A parità di temperatura e di viscosità le particelle 'piccole' si muovono rapidamente, generando delle variazioni rapide dell'intensità di scattering, mentre le particelle 'grosse' si muovono più lentamente, generando delle variazioni d'intensità più lente (Figura 3.15). Grazie ad un auto correlatore, la velocità delle variazioni d'intensità viene misurata, ed il coefficiente di diffusione delle particelle ( $D$ ) calcolato dalla funzione di correlazione. L'equazione di Stokes Einstein:

$$D = k_B T / 6\eta\pi R_h,$$

con  $k_B$  = costante di Boltzmann,  $T$  = temperatura assoluta,  $\eta$  = viscosità del solvente, consente di convertire il coefficiente di diffusione in raggio idrodinamico ( $R_h$ ), che è il raggio di una sfera solida che diffonde alla stessa velocità della particella o della molecola esaminata.

La distribuzione primaria delle dimensioni viene visualizzata su un grafico dell'intensità relativa della luce diffusa dalle particelle in funzione delle varie classi dimensionali, che sono distanziate in scala logaritmica. Questa misura è sensibile alla presenza di grandi particelle, aggregati o polvere. Dalla distribuzione per intensità si possono ricavare anche le distribuzioni per volume e per numero (Figura 3.16).

Un problema nelle misurazioni DLS può essere rappresentato dalla sedimentazione delle particelle: il tasso di sedimentazione dipende dalle dimensioni e dalla densità relativa delle particelle, nonché dal mezzo di sospensione. Per una buona misura, quindi, la velocità di sedimentazione dovrebbe essere molto più bassa rispetto a quella di diffusione.

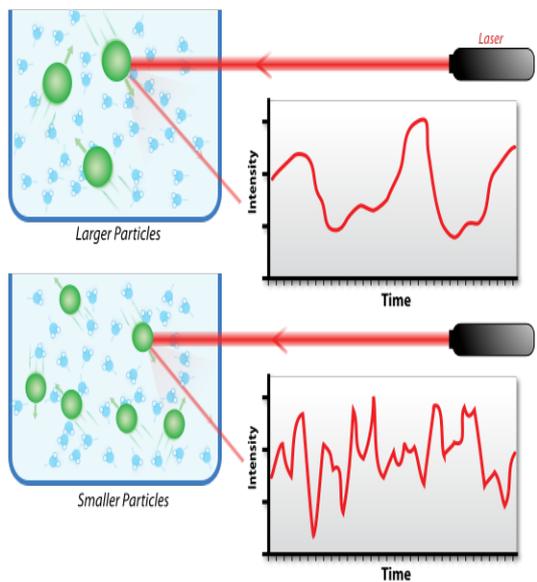


Figura 3.15 Ipotetica dispersione dinamica della luce per due campioni: le particelle più grandi sulla parte superiore e le particelle più piccole sul fondo.

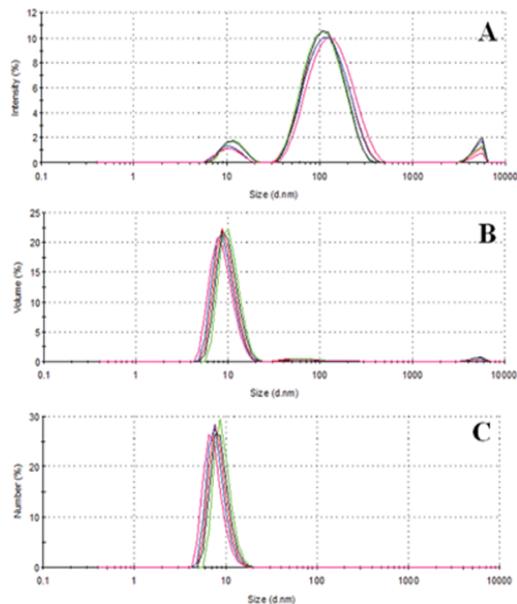


Figura 3.16 Distribuzione delle dimensioni per intensità (A), volume (B) e numero (C).

Il DLS offre notevoli vantaggi rispetto alle tecniche classiche di *'light scattering'*, che sono inadeguate per descrivere sistemi che si presentano come aggregati non sferici. Il DLS non necessita, a differenza delle altre tecniche ottiche (*laser-induced incandescence*, LII, scattering statico, misure di estinzione), della conoscenza dell'indice di rifrazione della particella esaminata per l'analisi quantitativa dei dati. Per aggregati non sferici di particelle, questa tecnica fornisce la sola informazione del diametro, senza informazioni dirette sulla morfologia.

La distribuzione dei diametri idrodinamici ( $d_H$ ) delle particelle è stata ottenuta mediante misure DLS utilizzando lo strumento Malvern Nano ZS, dotato di un diodo laser (633nm). I campioni sono stati inseriti in cuvette di polistirene monouso aventi una lunghezza del cammino ottico di 1cm. Tali cuvette sono state poi riempite di acqua. L'ampiezza della distribuzione del diametro idrodinamico è indicata dall'indice di polidispersità, o PDI; in caso di distribuzione monomodale (Gaussiana), questo valore è dato da:

$$PDI = [\sigma / Z_{AVG}]^2,$$

dove  $\sigma$  è l'ampiezza della distribuzione e  $Z_{AVG}$  il diametro medio della popolazione di particelle.

### 3.2.4.2 CINETICA DI RILASCIO DEL FARMACO

Lo studio della cinetica di rilascio di una molecola nel tempo è articolata in tre fasi:

- mantenimento del polimero in ambiente controllato;
- prelievo di campioni di soluzione a intervalli di tempo ben definiti (la frequenza di prelievo è maggiore nelle prime ore di esame);
- determinazione dell'assorbanza delle soluzioni.

Durante la prima fase, la sospensione in mezzo acquoso delle nanoparticelle trattate con desametasone è stata inserita in una membrana per dialisi, precedentemente lavata in acqua distillata, immersa in 400ml di soluzione tampone (pH 7.4) e incubata in agitatore termico impostato alla temperatura di 37°C e frequenza di 70 giri/min. A cadenza regolare sono stati prelevati 1,5 mL di soluzione, la quale è stata poi rimpiazzata con la medesima quantità di buffer puro. Le aliquote prelevate sono state analizzate allo spettrofotometro Cary 1E

(Figura 3.17), a lunghezza d'onda di 197/198 nm (analisi di assorbanza). Attraverso una curva di calibrazione, costituisce stato possibile risalire ai valori di concentrazione di desametasone rilasciato dalle nanoparticelle.

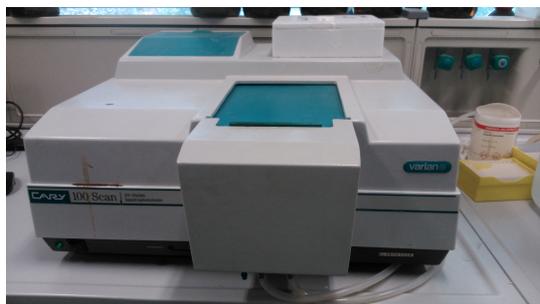


Figura 3.17 Spettrofotometro Cary 1E.

### 3.2.4.2.1 SPETTROFOTOMETRO A DOPPIO RAGGIO

Le tecniche spettroscopiche sono basate sullo scambio di energia che si verifica fra l'energia radiante e la materia. In particolare, la spettrofotometria di assorbimento è interessata ai fenomeni di assorbimento delle radiazioni luminose della regione dello spettro elettromagnetico appartenenti al campo del visibile (350 – 700 nm) e del vicino ultravioletto (200 – 350 nm).

Per quanto riguarda gli spettrofotometri UV-visibile, i tipi più comuni sono quelli a “monoraggio” e a “doppio raggio”: i sistemi monoraggio vengono impiegati per le analisi qualitative, mentre gli spettrofotometri a doppio raggio, più complessi e costosi, consentono di effettuare anche analisi quantitative.

In generale, uno spettrofotometro è costituito da 5 componenti principali:

1. sorgente di luce;
2. selettore di lunghezza d'onda;
3. portacampione;
4. rivelatore;
5. sistema di elaborazione dei dati.

Per quanto riguarda la sorgente, si fa uso di raggi policromatici a spettro continuo, poi separati tramite monocromatori nelle varie componenti (radiazioni monocromatiche). Il campione viene inserito in una cuvetta di quarzo e collocato nel portacampione. Negli spettrofotometri a doppio raggio (Figura 3.18) si fa uso di due raggi, identici per frequenza e intensità, uno che attraversa il campione,

l'altro che attraversa il “bianco”: in questo modo si ha un confronto continuo tra l'assorbanza dei due campioni.

Se una soluzione a concentrazione incognita è attraversata da una radiazione monocromatica (ad una determinata  $\lambda$ ) di intensità  $I_0$ , al rivelatore arriverà una radiazione di intensità  $I$ , che sarà minore di  $I_0$  se una parte della radiazione è stata assorbita, o uguale ad  $I_0$  se invece non si è verificato alcun assorbimento.

La frazione di luce trasmessa, rispetto a quella incidente, si definisce trasmittanza (T), ed è data da:

$$T=I/I_0.$$

Questa grandezza esprime la frazione di luce incidente che ha attraversato il campione senza essere assorbita, e può assumere valori compresi tra 0 e 1; tale rapporto è tanto più piccolo quanto maggiore è stato l'assorbimento. L'entità della radiazione assorbita è detta invece assorbanza (A), ed è pari all'opposto del logaritmo della trasmittanza:

$$A = -\ln T.$$

Riportando i valori registrati in un grafico lunghezza d'onda-assorbimento, si ottiene lo spettro di assorbimento della sostanza esaminata.

L'assorbimento è anche funzione della concentrazione: quando una radiazione attraversa una soluzione, essa viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione più o meno elevata della soluzione stessa; in funzione di questo principio è possibile effettuare anche analisi quantitative.

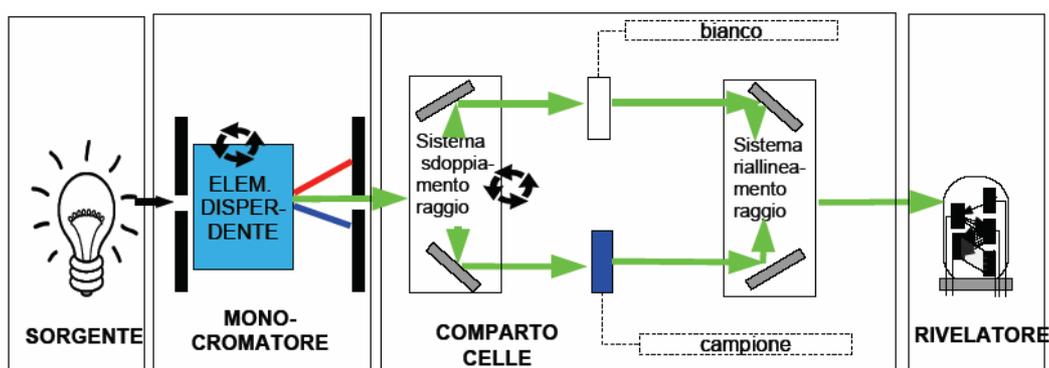


Figura 3.18 Spettrofotometro a doppio raggio.

# CAPITOLO 4

## RISULTATI E DISCUSSIONI

### 4.1 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE

#### MOLECOLARE

A temperatura ambiente tutti i campioni oggetto della presente Tesi si presentano come solidi semicristallini di colore bianco, ad eccezione di PTES-OH che è una gomma di colore giallo chiaro. Tutti i materiali risultano caratterizzati da una buona solubilità nei più comuni solventi organici, quali cloroformio, diclorometano e tetracloroetano. Nella Tabella 4.1 sono riportati i dati della caratterizzazione molecolare dei campioni idrossil-terminati.

Tabella 4.1 Caratterizzazione molecolare di PBS-OH, PTES-OH, P(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>)-OH e P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-OH: dati ottenuti da analisi NMR.

Polimeri	M <sub>n</sub>	BS (mol%)	TES (mol%)	b	L <sub>BS</sub>	L <sub>TES</sub>
PBS-OH	4900	100	-	-	-	-
PTES-OH	14100	-	100	-	-	-
P(BS <sub>13</sub> TES <sub>12</sub> )-OH	15900	53	47	0.16	13	12
P(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> )-OH	16700	53	47	1	2	2

La struttura chimica, la composizione, il peso molecolare e la distribuzione delle sequenze, sono stati determinati tramite spettroscopia <sup>1</sup>H-NMR. In Figura 4.1 e 4.2 sono riportati gli spettri dei due omopolimeri insieme alla formula molecolare corrispondente e all'attribuzione dei picchi. Gli spettri ottenuti sono risultati coerenti con la struttura prevista, permettendo di escludere la presenza di reazioni secondarie durante la polimerizzazione.

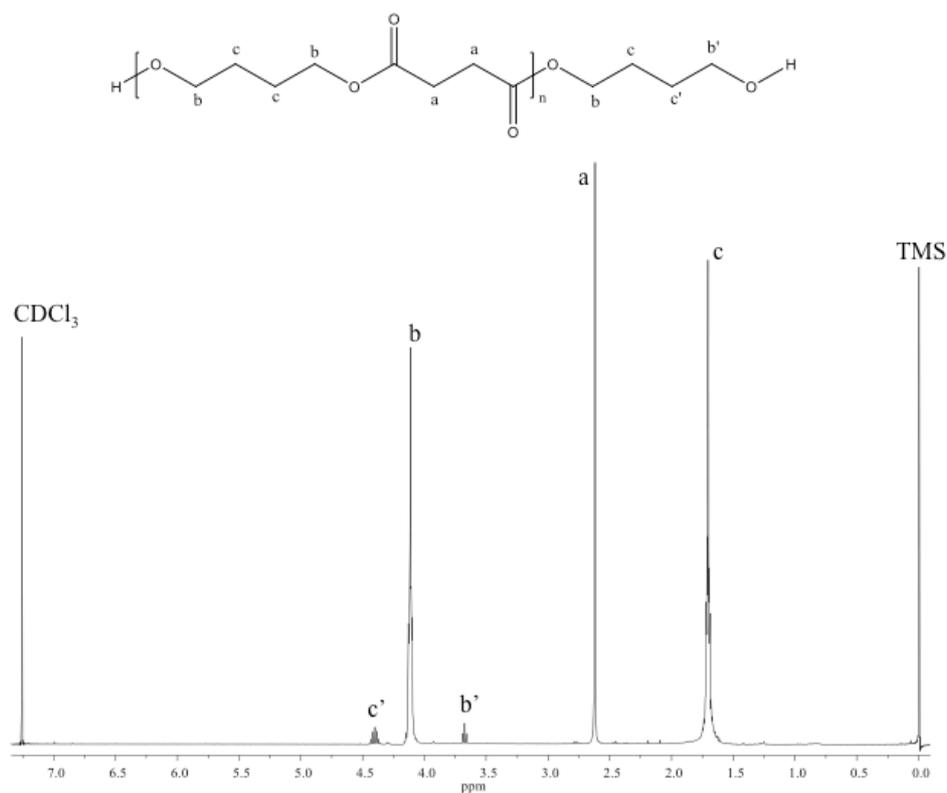


Figura 4.1 Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del PBS-OH con attribuzione dei picchi.

Lo spettro in Figura 4.1 mostra i segnali caratteristici del PBS-OH. A  $\delta$  4.19 ppm e a  $\delta$  1.70 ppm sono registrati i segnali dei protoni metilenici della subunità glicolica,  $b$  e  $c$  rispettivamente, mentre a  $\delta$  2.61 ppm si trova il singoletto ascrivibile agli idrogeni della subunità acida,  $a$ . Oltre ai segnali sopracitati, che sono relativi alle unità ripetitive interne, nello spettro è anche possibile distinguere la presenza di altri due picchi,  $b'$  e  $c'$ , dovuti ai protoni metilenici delle subunità glicoliche esterne.

Dall'analisi NMR è stato inoltre possibile calcolare il peso molecolare medio delle catene polimeriche ( $M_n$ ), utilizzando la formula:

$$M_n = DP \cdot W_{ur} + W_{glicole}$$

dove  $W_{ur}$  e  $W_{glicole}$  sono rispettivamente il peso molecolare dell'unità ripetitiva e del glicole, e DP corrisponde a:

$$DP = \left[ \frac{I_b/2}{I_{b'}} \cdot 2 \right] + 1$$

in cui  $I_{b'}$  è l'area sottesa dai segnali dei protoni delle unità glicoliche esterne  $b'$ , mentre  $I_b$  è l'area dei segnali metilenici delle stesse unità interne  $b$ .

Il peso molecolare medio per il PBS-OH, determinato tramite  $^1\text{H-NMR}$ , è risultato pari a 4900 g/mol (vedi Tabella 4.1).

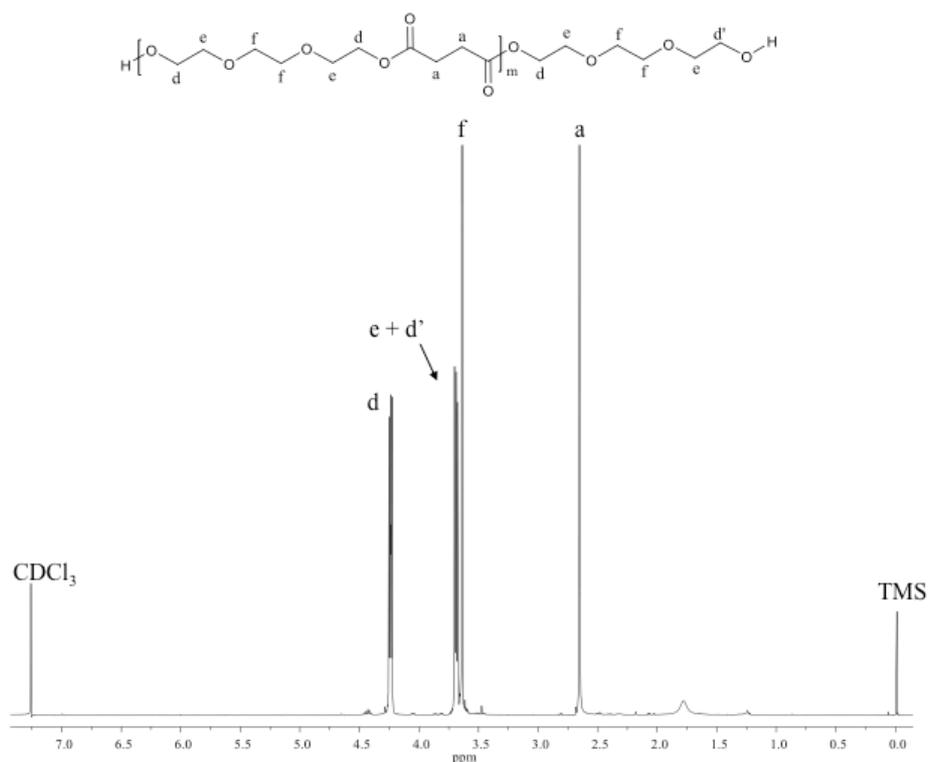


Figura 4.2 Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del PTES-OH con attribuzione dei picchi.

Lo spettro in Figura 4.2 mostra i segnali caratteristici del PTES-OH. A  $\delta$  4.25 ppm, a  $\delta$  3.70 ppm e a  $\delta$  3.64 ppm sono registrati i segnali dei protoni metilenici della subunità glicolica, rispettivamente *d*, *e* ed *f*, mentre a  $\delta$  2.65 ppm si trova il singoletto ascrivibile agli idrogeni della subunità acida, *a*. Oltre ai segnali sopracitati, che sono relativi alle unità ripetitive interne, nello spettro è presente anche il contributo *d'*, dovuto ai protoni metilenici delle subunità glicoliche esterne, che cadono nella stessa zona dei protoni *e*.

Anche per il PTES-OH è stato possibile calcolare il peso molecolare medio delle catene polimeriche ( $M_n$ ) dall'analisi NMR, secondo la formula:

$$M_n = DP * W_{ur} + W_{glicole},$$

dove  $W_{ur}$  e  $W_{glicole}$  sono rispettivamente il peso molecolare dell'unità ripetitiva e del glicole, e DP corrisponde a:

$$DP = \left[ \frac{I_d/2}{I_{d'}} \right] + 1$$

in cui  $I_{d'}$  è l'area sottesa ai segnali dei protoni delle unità glicoliche esterne  $d'$ , mentre  $I_d$  è l'area dei segnali metilenici delle stesse unità interne  $d$ . Per determinare il contributo di  $d'$  si è sottratta all'area del picco totale  $e+d'$ , l'area del picco  $d$  in quanto quest'ultima è uguale all'area del segnale dei soli protoni  $e$ .

Il peso molecolare medio per il PTES-OH, determinato tramite  $^1\text{H-NMR}$ , è risultato pari a 14100 g/mol (vedi Tabella 4.1).

Come descritto nella Parte Sperimentale, i due omopolimeri idrossil-terminati sono stati copolimerizzati tramite miscelazione reattiva per ottenere due copolimeri con la stessa composizione equimolare ma con diversa lunghezza dei blocchi. In Figura 4.3 è riportato lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  del copolimero  $\text{P}(\text{BS}_{13}\text{TES}_{12})\text{-OH}$ . Nell'inserito della stessa figura è riportata la zona relativa ai protoni  $a$  sia del copolimero  $\text{P}(\text{BS}_{13}\text{TES}_{12})\text{-OH}$  che del copolimero  $\text{P}(\text{BS}_2\text{TES}_2)\text{-OH}$ .

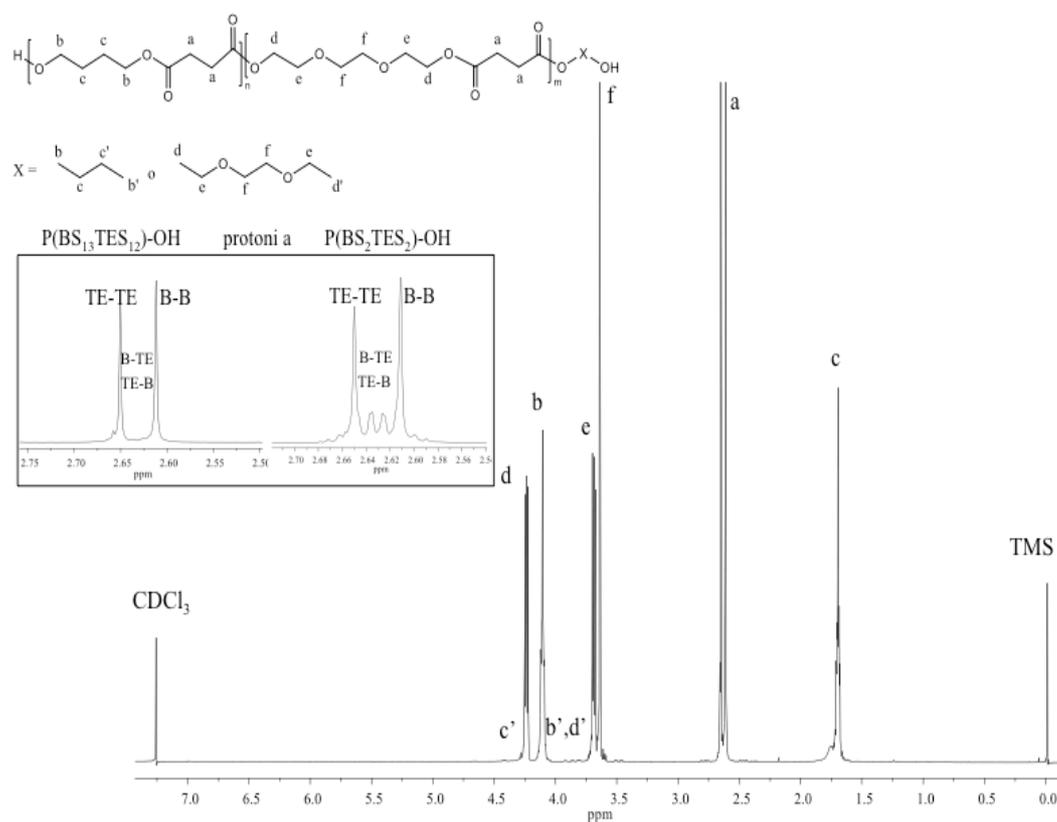


Figura 4.3 Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del  $\text{P}(\text{BS}_{13}\text{TES}_{12})\text{-OH}$  con attribuzione dei picchi. Nell'inserito è evidenziata la zona dei protoni  $a$  sia del  $\text{P}(\text{BS}_{13}\text{TES}_{12})\text{-OH}$  che del  $\text{P}(\text{BS}_2\text{TES}_2)\text{-OH}$ .

Dallo spettro è possibile notare la presenza dei segnali corrispondenti sia alle unità butilene succinato (BS) che alle unità trietilene succinato (TES). L'analisi

NMR ha permesso di determinare la composizione dei due copolimeri dall'area dei picchi dei protoni *b* della subunità butandiolo a  $\delta$  4.19 ppm e dall'area del segnale dei metileni *d* della subunità trietileneglicole a  $\delta$  4.25 ppm.

La composizione molare per entrambi i copolimeri, riportata in Tabella 4.1, risulta molto vicina a quella di alimentazione (BS: 53mol%; TES: 47mol%).

I due copolimeri differiscono però nella lunghezza dei blocchi BS e TES, come si può notare dalla zona tra 2.65 e 2.61 ppm corrispondente ai metileni *a* dell'unità succinica (vedi inserto Figura 4.3). I picchi dei protoni *a* dell'unità acida dei segmenti BS sono rilevabili a 2.61 ppm, mentre quelli dei segmenti TES a 2.65 ppm. Oltre al segnale dei suddetti protoni, è possibile evidenziare anche la presenza di picchi nella zona intermedia tra 2.65 e 2.61 ppm, dovuti alla risonanza dei protoni *a* delle forme miste (in cui l'unità succinica è legata al butandiolo da una parte e al trietilene glicole dall'altra), la cui intensità aumenta con il tempo di miscelazione.

La microstruttura del copolimero è stata dedotta dal grado di staticità **b**. È ben noto che **b** è uguale a 1 per i copolimeri random, 2 per i copolimeri alternati e compreso tra 0 e 1 per i copolimeri a blocchi, in funzione della loro lunghezza. Il calcolo di **b**, per il quale si è fatto riferimento ai picchi di risonanza degli idrogeni della subunità succinica, può essere espresso come:

$$\mathbf{b} = P_{TE-B} + P_{B-TE},$$

dove  $P_{TE-B}$  e  $P_{B-TE}$  corrispondono rispettivamente alla probabilità di trovare un'unità trietilene accanto ad una butilene e alla probabilità di trovare un'unità butilene accanto ad una trietilene. Tali probabilità possono essere espresse nella forma:

$$P_{TE-B} = [(I_{TE-B} + I_{B-TE})/2] / [(I_{TE-B} + I_{B-TE})/2 + I_{TE-TE}],$$

$$P_{B-TE} = [(I_{TE-B} + I_{B-TE})/2] / [(I_{TE-B} + I_{B-TE})/2 + I_{B-B}],$$

dove  $I_{TE-B}$ ,  $I_{B-TE}$ ,  $I_{TE-TE}$ ,  $I_{B-B}$  sono le intensità integrate dei picchi di risonanza dei protoni *a* relativi rispettivamente alle sequenze TE-B, B-TE, TE-TE e B-B. La lunghezza dei blocchi è definita come:

$$L_{TES} = 1/P_{TE-B},$$

$$L_{BS} = 1/P_{B-TE}.$$

I valori di lunghezza dei blocchi BS ( $L_{BS}$ ) e TES ( $L_{TES}$ ) e del grado di statisticità **b** nei due copolimeri preparati sono riportati in Tabella 4.1. Dai risultati si può

notare come la lunghezza media del blocco diminuisca all'aumentare del tempo di miscelazione; il grado di statisticità, al contrario aumenta con il tempo di mescolamento, a riprova di un avanzamento delle reazioni di transesterificazione. Anche per i copolimeri P(BSTES)-OH è stato possibile calcolare il peso molecolare medio delle catene polimeriche ( $M_n$ ) dall'analisi NMR, secondo la formula:

$$M_n = DP * W_{ur} + W_{glicole},$$

dove  $W_{ur}$  e  $W_{glicole}$  sono rispettivamente il peso molecolare dell'unità ripetitiva e del glicole, e DP corrisponde a:

$$DP = \left[ \frac{(I_b)/2 + (I_d)/2}{I_b I_d} * 2 \right] + 1$$

in cui  $I_{b'}$  e  $I_{d'}$  sono l'area sottesa dai segnali dei protoni delle unità glicoliche esterne  $b'$  e  $d'$ , mentre  $I_b$  e  $I_d$  rappresentano l'area dei segnali metilenici delle stesse unità interne  $b$  e  $d$ . Per determinare il contributo di  $d'$  si è sottratta all'area del picco totale  $e+d'$ , l'area del picco  $d$  in quanto quest'ultima è uguale all'area del segnale dei soli protoni  $e$ .

Il peso molecolare medio per il copolimero a blocchi P( $BS_{13}TES_{12}$ )-OH, è risultato pari a 15900 g/mol, mentre quello del copolimero statistico P( $BS_2TES_2$ )-OH a 16700 g/mol.

Oltre alla presenza dei segnali del solvente  $CHCl_3$  e del riferimento TMS, sono presenti i picchi di risonanza dell'unità ripetitiva dell'acido polilattico: il quadrupletto a  $\delta$  5.21 ppm corrispondente all'idrogeno  $g$  e il doppietto a  $\delta$  1.59 ppm relativo al gruppo metilico  $h$ . Inoltre, è possibile evidenziare la presenza dei picchi  $b$  e  $c$ , ascrivibili all'iniziatore (butandiolo).

Come descritto nella Parte Sperimentale, i copolimeri P(BSTES)-OH sono stati copolimerizzati, tramite reazione di apertura d'anello, con l'L-lattide. Tale strategia sintetica ha permesso di ottenere due copolimeri triblocco di tipo **A-B-A** in cui il blocco **A** è formato da unità di acido poli-L-lattico e il blocco **B** è formato alternativamente dai due copolimeri, a blocchi o statistico, P(BSTES)-OH. I materiali ottenuti sono stati indicati come PLLAP( $BS_L TES_L$ ), dove  $L=13,12$  nel caso del copolimero a blocchi,  $L=2$  nel caso del copolimero statistico.

Si è provveduto a sintetizzare anche l'omopolimero di riferimento, l'acido poli-L-lattico (PLLA).

Lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  del PLLA è riportato in Figura 4.4 insieme all'attribuzione dei segnali.

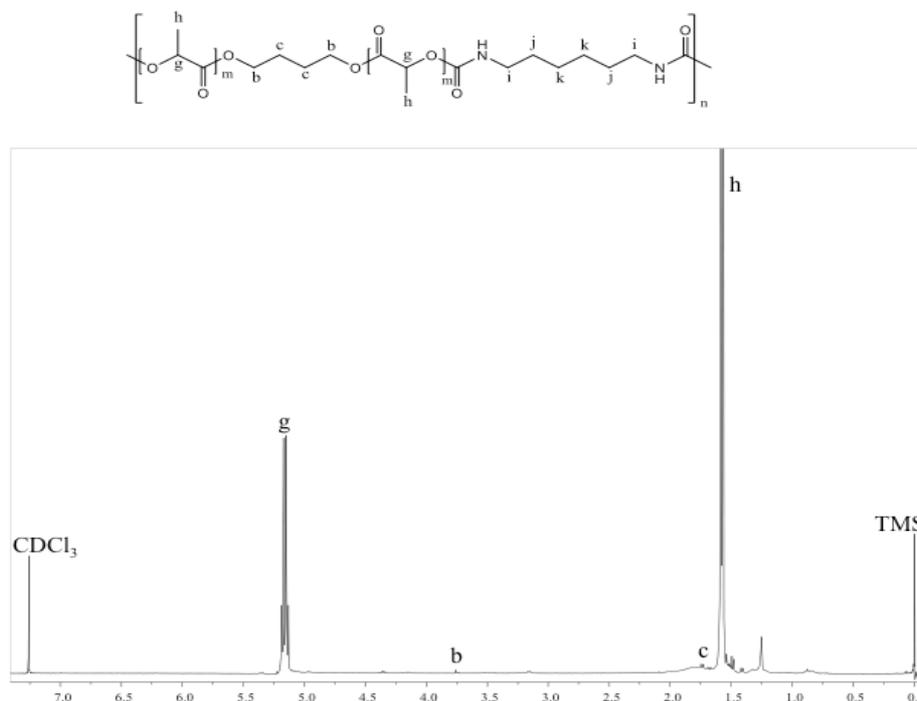


Figura 4.4 Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del PLLA con attribuzione dei picchi.

Oltre alla presenza dei segnali del solvente  $\text{CHCl}_3$  e del riferimento TMS, sono presenti i picchi di risonanza dell'unità ripetitiva dell'acido polilattico: il quadrupletto a  $\delta$  5.21 ppm corrispondente all'idrogeno *g* e il doppietto a  $\delta$  1.59 ppm relativo al gruppo metilico *h*. Inoltre, è possibile evidenziare la presenza dei picchi *b* e *c*, ascrivibili all'iniziatore (butandiolo).

La Figura 4.5 riporta lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  del copolimero triblocco PLLAP( $\text{BS}_2\text{TES}_2$ ). Si possono osservare, oltre ai picchi *a*, *b*, *c*, *d*, *e* ed *f* relativi ai segmenti del copolimero statistico P( $\text{BS}_2\text{TES}_2$ )-OH, anche i segnali *g* e *h* corrispondenti agli idrogeni presenti nella subunità lattica.

La percentuale in peso dei segmenti di acido polilattico PLLA rispetto alla componente copolimérica P(BSTES) è stata calcolata facendo riferimento all'area del picco *g* per il PLLA e all'intensità del picco *a* per il blocco centrale P(BSTES). I risultati sono riportati in Tabella 4.2.

La composizione per entrambi i copolimeri risulta molto simile a quella di alimentazione.

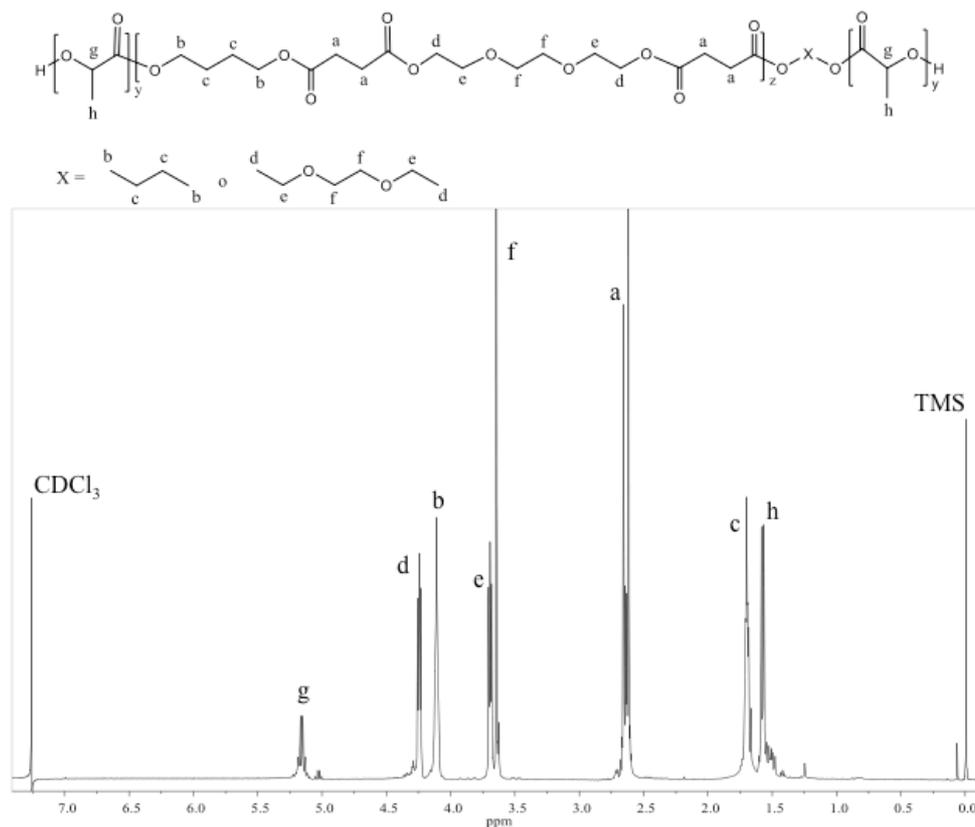


Figura 4.5 Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del copolimero triblocco PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>) con relativa attribuzione dei picchi.

Tabella 4.2 Dati di caratterizzazione molecolare dell'omopolimero PLLA e dei copolimeri triblocco: \*dati ottenuti da analisi GPC e \*\*dati ottenuti da analisi NMR.

Polimeri	$M_n^*$	$D^*$	PLLA (wt%)**	P(BSTES) (wt%)**
PLLA	19300	1.2	100	-
PLLAP(BS <sub>13</sub> TES <sub>12</sub> )	16600	1.4	30	70
PLLAP(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> )	17500	1.4	33	67

In Tabella 4.2 sono riportati i pesi molecolari dei polimeri sintetizzati, ottenuti da misure GPC: i campioni sono caratterizzati da pesi molecolari confrontabili tra loro e da una bassa polidispersità.

## 4.2 CARATTERIZZAZIONE TERMICA E DIFFRATTOMETRICA

La caratterizzazione dei copolimeri è proseguita sottoponendoli alle seguenti analisi:

- analisi termogravimetrica (TGA);
- analisi calorimetrica (DSC);
- analisi diffrattometrica ai raggi X (WAXS).

Le curve TGA dei polimeri studiati sono riportate in Figura 4.6: si osserva come i campioni PBS-OH, PTES-OH, P(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>)-OH e P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-OH siano caratterizzati da simile stabilità termica, nettamente superiore a quella del PLLA. Per tutti questi polimeri, la perdita di peso avviene in un unico stadio ed è praticamente del 100%, eccezion fatta per il PTES, che presenta un residuo di circa l'8%. Le curve TGA dei due copolimeri triblocco si collocano tra quella del PLLA e quelle dei polimeri a base PBS e PTES e presentano una perdita di peso a due step, la cui altezza è legata alla composizione dei copolimeri. Il primo stadio è ascrivibile alla degradazione del PLLA (l'intensità dello step che si manifesta a temperatura più bassa aumenta all'aumentare del contenuto di PLLA presente nel copolimero), mentre il secondo al copolimero PBSPTES. Il PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) risulta termicamente più stabile del PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>). Il diverso comportamento dei due copolimeri triblocco al momento non è stato spiegato.

La copolimerizzazione del PLLA con PBSPTES indiscutibilmente migliora in modo significativo la stabilità termica del PLLA.

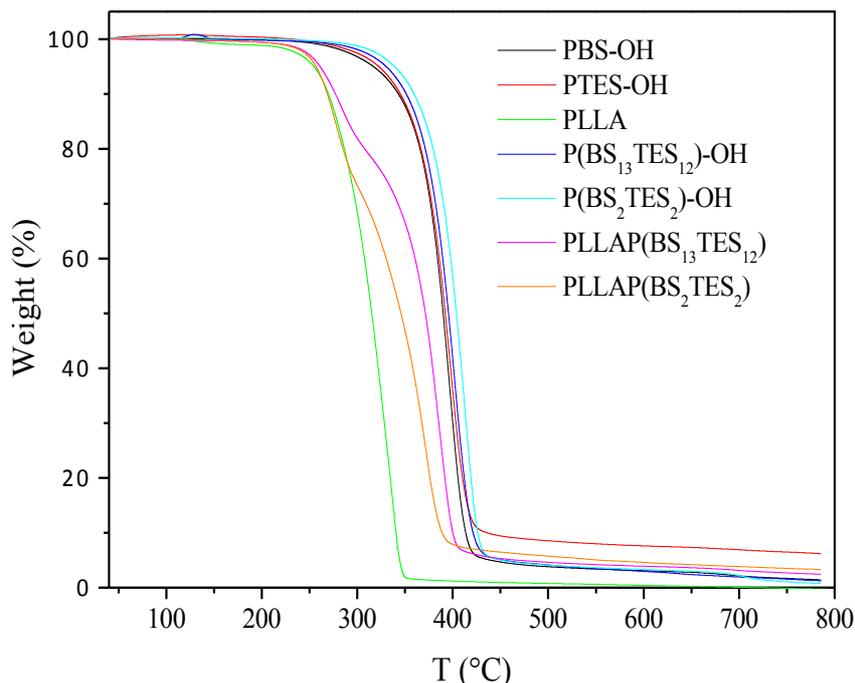


Figura 4.6 Curve TGA in atmosfera di N<sub>2</sub>.

Successivamente i campioni sono stati sottoposti ad analisi calorimetrica. I dati relativi alle curve calorimetriche di prima e seconda scansione sono riportati in Tabella 4.3, mentre le corrispondenti curve DSC sono mostrate in Figura 4.7.

Polimeri	I scan				II scan						
	T <sub>g</sub> (°C)	Δc <sub>p</sub> (J/g°C)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J/g)	T <sub>g</sub> (°C)	Δc <sub>p</sub> (J/g°C)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J/g)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH <sub>c</sub> (J/g)	X <sub>c</sub> (%)
PBS-OH	-22	0.275	115	82	-23	0.254	115	63	-	-	41
PTES-OH	-33	0.914	-	-	-33	0.853	-	-	-	-	-
P(BS <sub>13</sub> TES <sub>12</sub> )-OH	-30	0.473	113	42	-27	0.448	113	37	-	-	25
P(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> )-OH	-32	0.832	61	39	-31	0.568	-	-	-	-	24
PLLA	40	0.277	165	56	20	0.489	121	40	68	39	50
PLLAP(BS <sub>13</sub> TES <sub>12</sub> )	-18	0.357	106	30	-16	0.462	105	24	29	10	28
	40	0.132	132	3			132	3			
PLLAP(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> )	-28	0.458	55 144	9 13	-19	0.508	142	13	82	2	24

Tabella 4.3 Dati di caratterizzazione termica e diffrattometrica dei materiali sintetizzati.

Tutti i campioni oggetto della presente Tesi, ad eccezione del PTES-OH puro, risultano semicristallini, come evidenziato dalla presenza di processi endotermici di fusione nella traccia DSC. Tenuto conto della natura amorfa dell'omopolimero

PTES il processo endotermico osservato nei copolimeri può certamente essere ricondotto alla fusione della fase cristallina di PBS.

Nei copolimeri P(BSTES)-OH, la posizione e l'intensità del picco di fusione dipendono dalla lunghezza dei blocchi BS e TES: la  $T_m$ , così come l'area sottesa, si abbassano al diminuire della lunghezza dei segmenti. Inoltre, l'endoterma di fusione appare più larga rispetto all'omopolimero di riferimento e questo suggerisce la presenza di cristalliti con un'ampia distribuzione di gradi di perfezione. La traccia DSC del copolimero a blocchi P(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>)-OH è caratterizzata da un picco di fusione che, seppure meno intenso, presenta un valore di  $T_m$  molto vicino a quello dell'omopolimero: 115°C per il PBS-OH e 113°C per il P(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>)-OH. Questo risultato suggerisce che la lunghezza dei segmenti BS è sufficientemente lunga da non essere inficiata in modo significativo dalla presenza delle sequenze TES. La curva calorimetrica del copolimero statistico P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-OH presenta endoterme multiple ascrivibili a processi di fusione e ricristallizzazione che avvengono durante la scansione e che sono tipici dei poliesteri.

I copolimeri triblocco PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) e PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>), presentano più picchi endotermici di fusione che si manifestano in regioni molto diverse di temperatura: a temperatura più bassa si osserva l'endoterma di fusione della fase cristallina dei segmenti di PBS, mentre a temperatura più alta fondono i cristalli dei blocchi di PLLA. Come si può notare dai dati riportati in Tabella 4.3, le temperatura di fusione dei due copolimeri triblocco non si discostano moltissimo da quelle dei polimeri di riferimento, benchè il calore di fusione diminuisca significativamente. Questo risultato conferma il buon controllo del processo di polimerizzazione ROP, nel quale si ha essenzialmente l'apertura dell'anello del L-lattide senza che intervengano reazioni di transesterificazione sia tra le unità BS e TES che con le unità di acido poli-L-lattico che si formano.

Il fenomeno di transizione vetrosa verrà discusso in seguito.

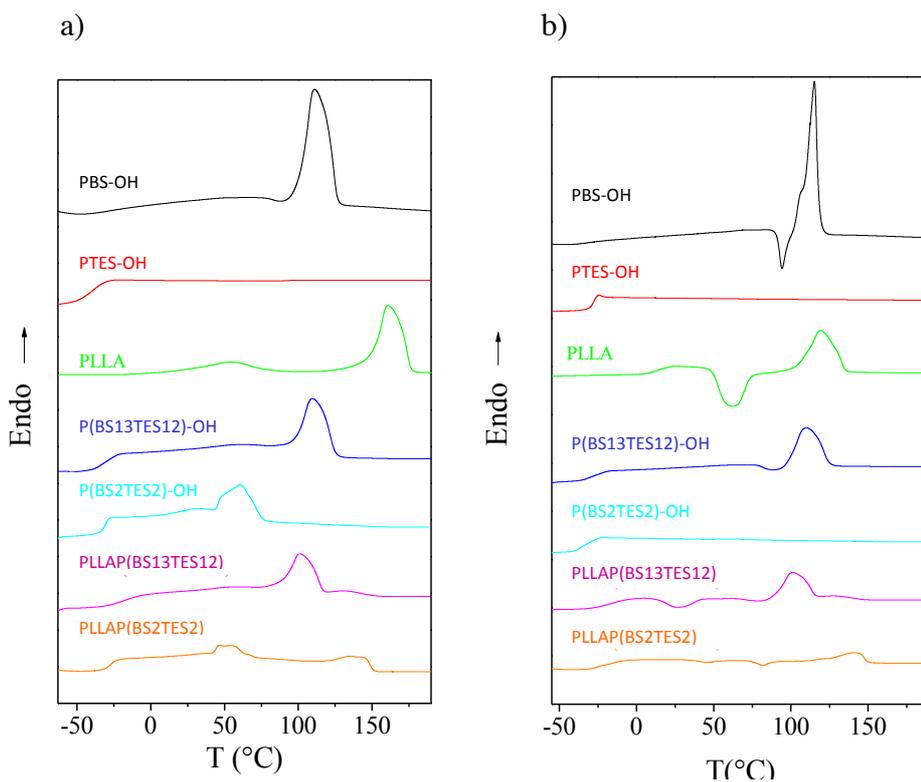


Figura 4.7 Curve DSC dei campioni in esame: a) I scan (20°C/min); b) II scan (20°C/min) dopo rapido raffreddamento dal fuso.

Al fine di analizzare la natura della fase cristallina presente nei copolimeri analizzati e determinare il loro grado di cristallinità è stata eseguita l'analisi a raggi X. I diagrammi di diffrazione dei polimeri in esame sono riportati in Figura 4.8, mentre il grado di cristallinità  $X_c$  è riportato in Tabella 4.3.

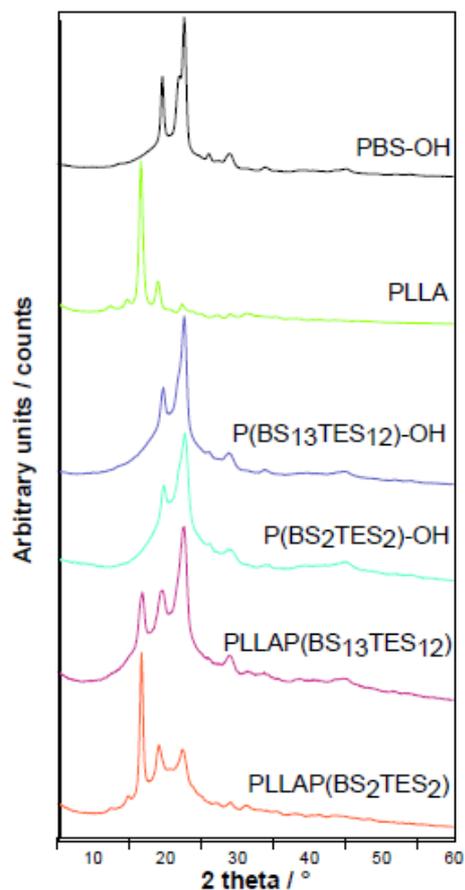


Figura 4.8 Curve diffrattometriche dei campioni in esame.

Il diffrattogramma di tutti i campioni analizzati è tipico dei materiali semicristallini: i profili mostrano alcuni riflessi ben evidenti dovuti alla componente ordinata del materiale, sovrapposti ad una linea di base a campana dovuta alla porzione di materiale amorfo. Il profilo di diffrazione dei copolimeri,  $P(BS_{13}TES_{12})-OH$  e  $P(BS_2TES_2)-OH$ , è molto simile a quello del PBS a riprova del fatto che in questi copolimeri è presente la sola fase cristallina del PBS. La presenza della co-unità TES determina un aumento della larghezza complessiva dei picchi che allo stesso tempo diventano meno intensi: in effetti si osserva una diminuzione del grado di cristallinità  $X_c$  (vedi Tabella 4.3). In entrambi i casi, la posizione dei riflessi rimane uguale a quella che si osserva nello spettro del PBS, ad indicare la completa esclusione della co-unità amorfa TES dal reticolo cristallino del PBS.

Per quanto riguarda i copolimeri triblocco **A-B-A**,  $PLLAP(BS_{13}TES_{12})$  e  $PLLAP(BS_2TES_2)$ , nei corrispondenti profili di diffrazione si osservano sia picchi

caratteristici del PLLA che quelli tipici del PBS. Ciò indica che in tali campioni è presente sia la fase cristallina del PLLA che quella del PBS. Tuttavia, l'intensità relativa dei picchi delle due fasi cristalline cambia: nel copolimero triblocco PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) i riflessi dovuti al PBS sono più intensi di quelli dovuti al PLLA; nel PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>) invece, la situazione risulta invertita. Tale risultato è in linea con i risultati calorimetrici riportati in Tabella 4.3. Entrambe le tecniche indicano che per il copolimero PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) la fase cristallina prevalente è quella del PBS, mentre per il PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>) i cristalli sono costituiti principalmente da PLLA. Come già notato in precedenza per i copolimeri P(BSTES)-OH, gli spettri dei triblocchi mostrano un allargamento dei riflessi dovuto alla difficoltà di rigettare la co-unità amorfa dalla fase cristallina, che si traduce in un aumento delle distanze interplanari. Il grado di cristallinità  $X_c$  dei due copolimeri triblocco risulta comunque più basso dei due omopolimeri di riferimento (vedi Tabella 4.3), essendo pari al 28% per il PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) e 24% per il PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>).

I campioni sono stati anche sottoposti a una seconda scansione calorimetrica dopo rapido raffreddamento “quenching” dal fuso. Questo trattamento ha come obiettivo l'ottenimento di un materiale amorfo in seconda scansione. Dalle curve DSC corrispondenti si evidenzia una diversa cinetica di cristallizzazione dei materiali in esame. In particolare, il PBS-OH e il P(BS<sub>13</sub>TES<sub>13</sub>)-OH presentano, anche dopo tempra, una curva tipica di un polimero semicristallino: questo indica che la velocità di raffreddamento dello strumento è inferiore alla velocità di cristallizzazione dei segmenti BS in questi due materiali. Il copolimero statistico P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-OH al contrario presenta in seconda scansione una curva tipica di un materiale amorfo (nella curva DSC è infatti solo presente una variazione endotermica della linea di base legata alla transizione vetrosa), ad indicare che il processo di raffreddamento veloce in questo caso ha permesso di bloccare le catene in una conformazione disordinata.

Il processo di quenching risulta efficace anche per l'omopolimero PLLA. In questo caso però le catene polimeriche una volta superata la temperatura di transizione vetrosa  $T_g$ , acquisiscono sufficiente energia e mobilità per cristallizzare in scansione.

I copolimeri triblocco hanno un comportamento analogo al PLLA nel secondo scan, ma, essendo  $\Delta H_m > \Delta H_c$ , risultano semicristallini e quindi non vetrificati in uno stato completamente amorfo per raffreddamento veloce dal fuso.

Per quanto riguarda il fenomeno di transizione vetrosa, caratteristico della porzione amorfa del materiale, nelle curve DSC di tutti i campioni è rilevabile una variazione endotermica della linea di base associata al fenomeno stesso. Gli omopolimeri PBS-OH e PTES-OH presentano un valore di  $T_g$  sotto temperatura ambiente, a riprova dell'alta mobilità della fase amorfa, diversamente dal PLLA, che essendo caratterizzato da una  $T_g$  pari a 40°C, a temperatura ambiente è caratterizzato da una fase amorfa vetrosa rigida. I copolimeri P(BSTES)-OH sono caratterizzati da una  $T_g$  simile a quella dei due omopolimeri di riferimento. Ciò non sorprende considerato che i due omopolimeri di riferimento PBS e PTES hanno  $T_g$  molto simili<sup>(16)</sup>.

Per quanto concerne i copolimeri triblocco, ed in particolare il copolimero PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>), sono state evidenziate due  $T_g$  a diversa temperatura, ad indicare la presenza in questo campione di due fasi amorfe a diversa mobilità. La  $T_g$  che si manifesta a più alta temperatura corrisponde in valore a quella del puro PLLA e dunque è relativa ad una fase amorfa pura di PLLA. La  $T_g$  a più bassa temperatura si manifesta ad una temperatura decisamente superiore (-18°C) rispetto a quella del blocco centrale P(BSTES) ( $\approx$  -30°C) ad indicare una fase parzialmente miscibile ricca in P(BSTES). Una situazione analoga dovrebbe caratterizzare anche il copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>): in questo caso, la  $T_g$  ad alta temperatura non è visibile in quanto celata dal picco di fusione a più bassa temperatura. In seconda scansione dopo tempra, in entrambi i casi, si osserva un unico fenomeno di transizione vetrosa a temperatura intermedia, ad indicare la totale miscibilità nella fase amorfa.

## **4.3 REALIZZAZIONE DI NANOPARTICELLE**

### **VUOTE E CONTENENTI DESAMETASONE**

La tecnica della miniemulsione Oil in Water è il metodo impiegato in questo lavoro di Tesi per la sintesi delle nanoparticelle polimeriche. Questa tecnica ha il vantaggio di essere estremamente rapida (la sospensione si forma in meno di due

minuti), ma generalmente le nano/micro particelle ottenute hanno un indice di polidispersità (PDI) superiore rispetto a quelle ottenute per precipitazione.

Sono state preparate sia nanoparticelle vuote che contenenti desametasone. Il farmaco, essendo idrofobo, viene incapsulato facilmente.

In Figura 4.9, sono riportati gli istogrammi che rappresentano la distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle di PLLA e dei copolimeri triblocco, determinati tramite *dynamic light scattering*: i risultati relativi alle nanoparticelle vuote sono mostrati nel pannello superiore, mentre quelli relativi alle nanoparticelle caricate con desametasone nel pannello inferiore.

Il diametro medio delle nanoparticelle risulta simile per tutti i materiali in esame ed è dell'ordine dei 200 nm (vedi Tabella 4.4).

Polimeri	Diametro (nm)
PLLA	223 ± 35 nm
PLLA-d	227 ± 47 nm
PLLAP(BS <sub>13</sub> TES <sub>12</sub> )	220 ± 27 nm
PLLAP(BS <sub>13</sub> TES <sub>12</sub> )-d	258 ± 37 nm
PLLAP(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> )	216 ± 24 nm
PLLAP(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> )-d	210 ± 27 nm

Tabella 4.4 Diametro medio delle nanoparticelle vuote e caricate con desametasone.

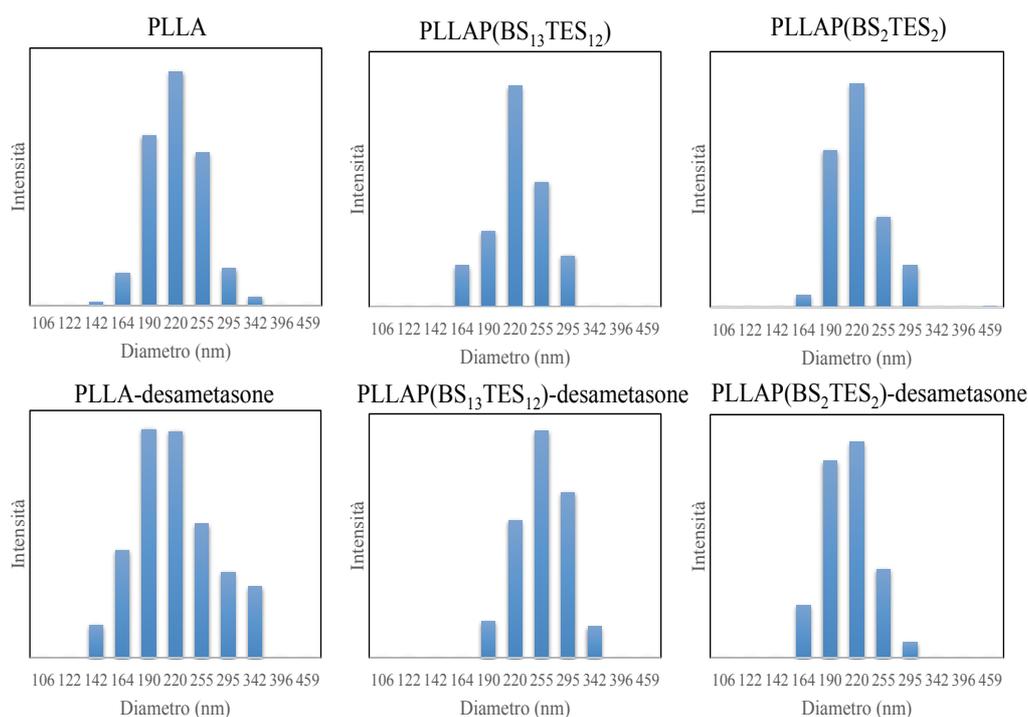


Figura 4.9 Distribuzione del diametro delle nanoparticelle di PLLA e dei copolimeri triblocco: pannello superiore, particelle vuote; pannello inferiore particelle caricate con desametasone.

### 4.3.1 STUDI DI CINETICA DI RILASCIO DEL FARMACO

Nella presente Tesi, per valutare l'effetto della diversa architettura della matrice polimerica sul rilascio prolungato di farmaci in ambiente fisiologico, si è utilizzato il desametasone (solubilità in acqua <0.1mg/ml), farmaco corticosteroide. Come precisato nella parte sperimentale della presente Tesi, la quantità di farmaco rilasciata è stata determinata da misure di assorbanza, previa calibrazione dello strumento: in particolare si è misurata l'assorbanza di soluzioni a concentrazione nota di desametasone (vedi Figura 4.10 a)). La figura 4.10 b) riporta l'andamento del rilascio cumulativo del desametasone, in funzione del tempo, per l'omopolimero di riferimento PLLA e per i due copolimeri triblocco PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) e PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>). E' subito evidente come la cinetica di rilascio sia significativamente diversa per i materiali studiati. Nella fase iniziale, normalmente cinematicamente controllata dalla diffusione (vedi inserto in Figura 4.10 b)), è possibile notare come il PLLA presenti un periodo di induzione di

circa 30 minuti in cui non si ha alcun rilascio del farmaco, mentre per il copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>) si osserva un rilascio di desametasone in soluzione già dai primi minuti di incubazione in condizioni fisiologiche.

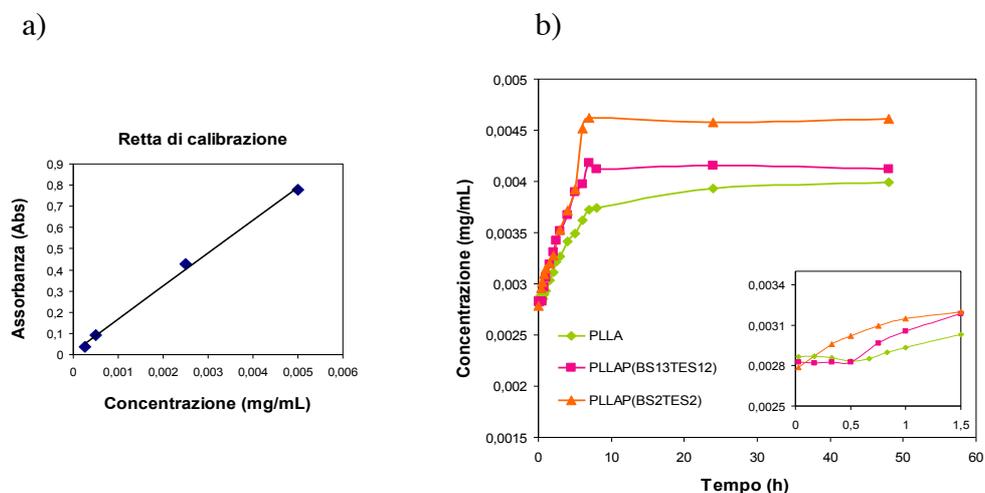


Figura 4.10 a) assorbanza in funzione della concentrazione in soluzione di desametasone espressa in mg/mL; b) rilascio cumulativo di desametasone in funzione del tempo per PLLA e i due copolimeri triblocco.

Per spiegare questo andamento occorre, ricordare che da letteratura il PLLA risulta più idrofobo dei copolimeri P(BSTES)<sup>(16)(28)</sup>. Alla luce di ciò, unitamente alla maggiore mobilità della fase amorfa e al minore contenuto di fase cristallina nel caso del PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>) rispetto al PLLA, il risultato non deve sorprendere. Infatti, l'accesso delle molecole di acqua all'interno della matrice polimerica, che facilitano il rilascio del farmaco, risulta decisamente favorito nel caso del copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>). Nella fase iniziale, il copolimero PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) ha un comportamento simile al PLLA, probabilmente spiegabile sia sulla base del maggiore grado di cristallinità che sulla base della maggiore perfezione della fase cristallina rispetto al copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>). La cinetica di rilascio del copolimero PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) cambia drasticamente nel tempo: dopo 90 minuti, i due copolimeri triblocco sono caratterizzati dalla stessa velocità di rilascio. Come noto, a tempi più lunghi, il processo di rilascio è controllato dalla erosione superficiale del polimero, che, dipende dal grado di cristallinità e dalla idrofilicità. Studi precedentemente effettuati dal gruppo di ricerca presso cui è stata condotta la presente Tesi su copolimeri a blocchi P(BSPTES), hanno mostrato come la velocità di

degradazione idrolitica sia tanto maggiore quanto più lunghe le sequenze idrofile TES presenti nel polimero. In quest'ottica, si spiega perché in questa fase successiva i due copolimeri rilascino il farmaco con la stessa velocità (le due curve di rilascio risultano infatti praticamente sovrapposte)<sup>(16)</sup>: il copolimero PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) caratterizzato da sequenze TES più lunghe si idrolizza più velocemente del copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>), che ha sequenze molto corte.

Entrambi i copolimeri rilasciano il farmaco più velocemente rispetto al PLLA e ciò può essere spiegato sulla base della loro minore cristallinità e maggiore idrofilicità.

Dopo 8 ore di incubazione in tampone fosfato a 37°C, entrambi i copolimeri triblocco raggiungono un valore di plateau, mentre il PLLA, seppure con una velocità molto più bassa, continua a rilasciare il farmaco fino alle 24 ore. Questo risultato è riconducibile alla più alta velocità di degradazione idrolitica dei copolimeri triblocco rispetto al PLLA.

Infine, l'efficienza di incapsulamento del desametasone risulta migliorata dalla copolimerizzazione. Questo risultato è particolarmente evidente nel caso del copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>). Tale andamento può essere correlato al contenuto di fase cristallina presente nei materiali. Durante la formazione delle lamelle infatti, possiamo immaginare un effetto di espulsione delle componenti extra-cristalline dalla cella cristallina, con conseguente esclusione del farmaco d.

## CAPITOLO 5

### CONCLUSIONI

Le Nanoscienze e le Nanotecnologie costituiscono un nuovo approccio scientifico che si basa sulla comprensione e la conoscenza approfondita delle proprietà della materia su scala nanometrica. Le nanoscienze operano in un ambito di investigazione multidisciplinare coinvolgendo molteplici indirizzi di ricerca, tra cui: biologia molecolare, chimica, scienza dei materiali, fisica, ingegneria meccanica ed elettronica e per tale motivo sono considerate scienze “orizzontali”. Le applicazioni delle Nanotecnologie in medicina sono particolarmente promettenti e si sono già registrati significativi risultati nel campo della diagnostica precoce di numerose patologie, nel campo del rilascio modificato di farmaci, nell’area dell’imaging, consentendo anche il monitoraggio del traffico cellulare. A testimonianza del forte impulso dell’industria biotecnologica e farmaceutica per le nanotecnologie, è interessante notare che i brevetti depositati per anno nel settore Nanobiotecnologie e Nanobiomateriali sono in costante crescita. L’analisi dei dati suggerisce, inoltre, che questi nei prossimi anni potranno considerarsi i principali settori di investimento all’interno del mondo delle Nanotecnologie.

La maggior parte degli strumenti utilizzati in nanomedicina come “*carriers*” di altre molecole sono chiamati nanovettori. L’uso di nanovettori quali trasportatori di farmaci è oggi l’epicentro delle moderne strategie di *drug delivery*. I polimeri sono tra le sostanze più utilizzate per il *drug delivery* in quanto possiedono proprietà molto vantaggiose, come biocompatibilità, biodegradabilità e la possibilità di effettuare modificazioni e funzionalizzazioni superficiali, permettendo il controllo della farmaco-cinetica del farmaco incorporato all’interno delle Nanoparticelle. Tra questi, il PLA, il PGA, ed i loro copolimeri (PLGA), sono sicuramente tra i più utilizzati per la preparazione di nanoparticelle applicate al *drug delivery*, avendo ottenuto l’approvazione della *Food and Drug Administration*, in quanto biocompatibili e per l’atossicità dei loro prodotti di degradazione. Il PLA, in particolare, ha un periodo di degradazione poco

flessibile, di circa 12 mesi, per cui è utilizzato preferibilmente per applicazioni che richiedono stabilità nel tempo.

In questo contesto, si inserisce la presente Tesi, avente come obiettivo la sintesi e caratterizzazione di nuovi copolimeri triblocco A-B-A a base di PLLA, con una struttura chimica architettata *ad hoc* da utilizzarsi per la preparazione di nanoparticelle per il rilascio di farmaci, con profilo cinetico di rilascio modulabile in modo controllato.

Il blocco A di tali nuovi materiali è costituito da PLLA, mentre il blocco B è un sistema copolimerico a base di PBS precedentemente sintetizzato e studiato dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Lotti, relatrice della presente Tesi. Trattasi di copolimeri a blocchi poli(butilene/trietilene succinato), caratterizzati da composizione fissa (equimolare) e da diversa lunghezza delle sequenze. La diversa architettura molecolare si è rivelata strumento efficace nel modulare l'idrofilicità, il grado di cristallinità e la cinetica di degradazione idrolitica del materiale.

Tenuto conto dei risultati precedentemente ottenuti dal gruppo di ricerca, si è optato per considerare il copolimero a blocchi molto lunghi e quello statistico, caratterizzato da sequenze molto corte.

La scelta si è rivelata vincente poiché gli obiettivi della Tesi sono stati raggiunti pienamente: infatti, le nanoparticelle realizzate con i copolimeri triblocco sintetizzati nella presente Tesi hanno una cinetica di rilascio più veloce del PLLA, ed una maggiore efficienza di incapsulamento nei confronti del desametasone, antiinfiammatorio steroideo. Agendo sulla lunghezza delle sequenze del copolimero che rappresenta il blocco centrale del copolimero triblocco A-B-A, è possibile modulare la cinetica di rilascio ed anche la quantità di farmaco rilasciata: in particolare, il copolimero statistico, ovvero quello con sequenze corte delle due unità comonomeriche, è caratterizzato nel complesso dalla velocità più alta di rilascio e dalla massima efficienza di incapsulamento.

I risultati, seppure incoraggianti, sono preliminari. In particolare, ci si ripropone di andare a considerare il parametro legato alle dimensioni delle particelle, nonché studiare in dettaglio la morfologia di tali nanosistemi.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Lakshmi S. Nair, Cato T. Laurencin, “Biodegradable polymers as biomaterials”, *Progress in Polymer Science* 32 (2007) 762-798.
- 2) Gisha E. Luckachan. C. K. S. Pillai, “Biodegradable Polymers: A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives”, *J Polym Environ* 19 (2011) 637-676.
- 3) Ranieri Cancedda, Riccardo Pietrabissa, “Ingegneria dei tessuti biologici”, Bologna Patron, 2002.
- 4) Stridsberg K.M., Ryner M., Albertsson A.C., “Controlled ring-opening polymerization: Polymers with designed macromolecular architecture”, *Adv. Polym. Sci.*, 157, 2001, 41-65.
- 5) Bourissou D., Martin-Vaca B., Dumitrescu A., Graullier M., LacombeF., “Controlled Cationic Polymerization of Lactide”, *Macromolecules*, 38, 9993–9998, 2005.
- 6) Garlotta D., “A literature review of polylactic acid”, *J. Polym. Environ.*, 9 (2), 63– 84, 2002.
- 7) Baker W. E., Scott C. E., Hu G., “Reactive polymer blending”, Hanser Gardner Publications, 2001.
- 8) Tesi di dottorato di Soccio Michelina, Sintesi, “Caratterizzazione e correlazioni proprietà- struttura di poliesteri innovativi per usi speciali”, 2008.
- 9) A.K. Bajpai, Sandeep K. Shukla, Smitha Bhanu, Sanjana Kankane, “Responsive polymers in controlled drug delivery”, *Progress in Polymer Science* 33 (2008) 1088–1118.

- 10) J. Siepmann, N. Faisant, J. Akiki, J. Richard, J. P. Benoit, "Effect of the size of biodegradable microparticles on drug release: experiment and theory", *Journal of Controlled Release* 96 (2004) 123-134.
- 11) Allan S. Hoffman, "Hydrogels for biomedical applications", *Advanced Drug Delivery Reviews* 43 (2002) 3-12.
- 12) Mary Caldorera-Moore, Nicholas A. Peppas, "Micro and nanotechnologies for intelligent and responsive biomaterial-based medical systems", *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2009) 1391-1401.
- 13) Lisa Brannon-Peppas, "Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery", *International Journal of Pharmaceutics* 116 (1995) 1-9.
- 14) Kamaly N., Xiao Z., Valencia P.M., Radovic-Moreno A. F., and Farokhzad O. C., "Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation", *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 2971–3010.
- 15) Jérôme C., "Macromolecular engineering and stimulus response in the design of advanced drug delivery systems", *MRS Bulletin*, 2010, 35, 665-672.
- 16) Gualandi C., Soccio M., Saino E., Focarete M. L., Lotti N., Munari A., Moroni L., Visai L., "Easily synthesized novel biodegradable copolyesters with adjustable properties for biomedical applications", *Soft Matter*, 2012, 8, 5466–5476.
- 17) Gigli M., Fabbri M., Lotti N., Gamberini R., Rimini B., Munari A., "Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review", *European Polymer Journal*, 2016, 75, 431–460.

- 18) Gigli M., Negroni A., Soccio M., Zancaroli G., Lotti N., Fava F., Munari A., "Enzymatic hydrolysis studies on novel eco-friendly aliphatic thiocopolyesters", *Polymer Degradation and Stability*, 2013, 98, 934-942.
- 19) Gigli M., Negroni A., Soccio M., Zancaroli G., Lotti N., Fava F., Munari A., "Influence of chemical and architectural modifications on the enzymatic hydrolysis of poly(butylene succinate)", *Green Chem.*, 2012, 14: 2885.
- 20) Gigli M., Lotti N., Gazzano M., Finelli L., Munari A., "Novel eco-friendly random copolyesters of poly(butylene succinate) containing ether-linkages", *Reactive & Functional Polymers*, 2012, 72, 303-310.
- 21) Soccio M., Lotti N., Gazzano M., Govoni M., Giordano E., Munari A., "Molecular architecture and solid-state properties of novel biocompatible PBS-based copolyesters containing sulphur atoms", *React. Funct. Polym.*, 2012, 72-856.
- 22) Fabbri M., Soccio M., Gigli M., Guidotti G., Gamberini R., Gazzano M., Siracusa V., Rimini B., Lotti N., Munari A., "Design of fully aliphatic multiblock poly(ester urethane)s displaying thermoplastic elastomeric properties", *Polymer*, 2016, 83, 154-161.
- 23) Gigli M., Lotti N., Gazzano M., Finelli L., Munari A., "Synthesis and characterization of novel poly(butylene succinate)-based copolyesters designed as potential candidates for soft tissue engineering", *Polymer Engineering & Science*, 2013, 53, 491-501.
- 24) Gualandi C., Soccio M., Govoni M., Valente S., Lotti N., Munari A., Giordano E., Pasquinelli G., Focarete M.L., "Poly(butylene/diethylene glycol succinate) multiblock copolyester ad a candidate biomaterial for soft tissue engineering: solid-state properties, degradability, and biocompatibility", *J. Bioact. Compat. Pol.*, 2012, 27-244.

- 25) Soccio M., Lotti N., Gigli M., Finelli L., Gazzano M., Munari A., "Reactive blending of poly(butylene succinate) and poly(triethylene succinate): characterization of the copolymers obtained", *Polym Int* 61 (2012) 1163-1169.
- 26) Li C., Zhigang X., Junli H., Xuesi C., Xiabin J., "Enantiomeric PLA-PEG block copolymers and their stereocomplex micelles used as rifampin delivery", *Journal of Nanoparticle Research*, 2007, 9, 777-785.
- 27) Fabbri M., Soccio M., Costa M., Lotti N., Gazzano M., Siracusa V., Gamberini R., Rimini B., Munari A., Garcia-Fernandez L., Vazquez-Lasa B., "New fully bio-based PLLA triblock copoly(ester urethane)s as potential candidates for soft tissue engineering". *Polymer Degradation and Stability*, 2016, 132, 169-180.
- 28) Sun H., Wang Y., Zhang K., Zhong Y., Lin L., Zhou H., Chen L., Zhang Y., "Hydrophilic and hydrophobic poly(L-lactic acid) films by building porous topological surfaces", *Journal of Applied Polymer Science*, 2016, DOI: 10.1002/app.44572.

## **RINGRAZIAMENTI**

Vorrei ringraziare la mia relatrice, Prof.ssa Nadia Lotti, per la sua gentilezza, la disponibilità e per avermi dato la possibilità di partecipare ad un'esperienza di laboratorio entusiasmante a cui gli studenti, in particolare dei corsi di laurea triennale, difficilmente hanno modo di accedere. Un grazie alla mia correlatrice Michelina Soccio, per avermi seguita con dedizione, passo dopo passo in tutti questi mesi, avermi aiutata e rassicurata più volte, soprattutto negli ultimi giorni!

Grazie anche a Nicola, che ha condiviso con me questa esperienza e che mi è stato di grande aiuto, e a tutti quelli del Dipartimento DICAM che mi hanno fatta sentire a mio agio sin da subito e mi hanno aiutata, Giulia e Laura soprattutto. È stato un vero piacere poter lavorare con tutti voi.

Un grazie speciale ai miei genitori, a mia sorella e ai miei amici, per l'entusiasmo, la carica e la sicurezza che ogni giorno riescono a darmi, perchè anche se non ci vediamo sempre, so che posso contare su di loro.

Un grande grazie anche al mio moroso che per il momento non esiste! So che ci sei e mi dai forza!

Ringrazio tutti, sia quelli presenti che quelli assenti, ma vicini col pensiero. Condividere con voi questa giornata, sarà una delle esperienze migliori di sempre.