

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TITOLO DELL'ELABORATO

Schiume poliuretatiche nell'ingegneria tissutale

Elaborato in

Fondamenti di Chimica e Biochimica (c.i.)

Relatore:

Prof.ssa Nadia Lotti

Presentato da:

Leoni Elisa

Correlatore:

Dott.ssa Michelina Soccio

Anno Accademico 2016 - 2017

Indice

Introduzione	5
L'Ingegneria tissutale	5
1. Scaffold tridimensionali nell'ingegneria tissutale.....	8
2. Porosità e struttura tridimensionale	10
3. Biodegradabilità.....	11
4. Proprietà meccaniche	12
5. Adesione cellulare e citocompatibilità.....	13
6. Poliuretani e ingegneria tissutale	14
Scopo	17
Capitolo 1	19
1.1 Poliuretani	19
1.1.1 Reazioni per la sintesi di poliuretani	19
1.1.2 Reagenti per la sintesi di poliuretanica.....	21
1.2 Poliuretani espansi.....	25
1.2.1 Reazioni per la sintesi di poliuretani espansi.....	25
1.2.2 Reagenti per la sintesi di poliuretani espansi.....	29
1.2.3 Schiume poliuretatiche rigide	35
1.2.4 Schiume poliuretatiche flessibili.....	37
Capitolo 2	39
2.1 Poliuretani in ambito biomedicale	39
2.1.1 Composizione chimica.....	39
2.2 Espansi poliuretatici biodegradabili per l'ingegneria dei tessuti.....	42
2.2.1 Scaffold per la rigenerazione della cartilagine	42
2.2.2 Scaffold per la rigenerazione dei tessuti molli	45
2.2.3 Scaffold per la rigenerazione dei tessuti ossei.....	47

Capitolo 3	53
3.1 Degradazione dei poliuretani in ambiente fisiologico	53
3.2 Principali tecniche di caratterizzazione degli scaffold poliuretanici.....	55
3.2.1 Test di invecchiamento in vitro	56
3.2.2 Test di calcificazione in vitro	59
3.2.3 Test di citocompatibilità in vitro.....	61
3.2.4 Studi sulla biocompatibilità in vivo.....	65
Conclusioni e sviluppi futuri	73
Bibliografia	75
Ringraziamenti	81

Introduzione

L'Ingegneria tissutale

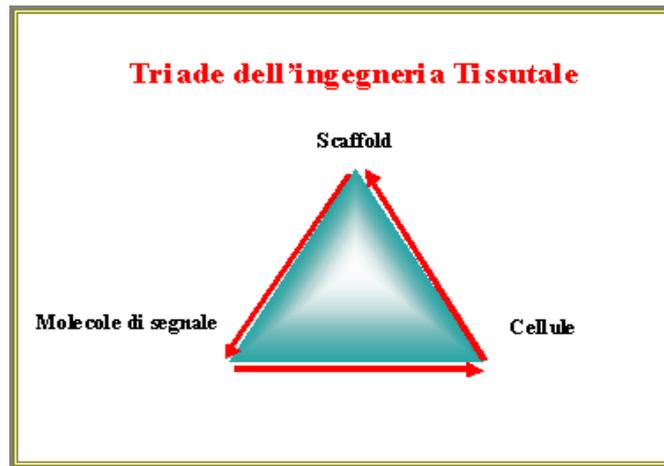
Il *Tissue Engineering* o Ingegneria dei Tessuti rappresenta il primo settore interdisciplinare che integra quasi tutti i settori della scienza, quali la biologia cellulare/molecolare, la scienza dei materiali, la chimica, la fisica, l'Ingegneria industriale e la medicina.

Tale disciplina, che rappresenta la nuova frontiera nel settore biomedicale, ha come scopo la riparazione o addirittura la sostituzione di tessuti e organi danneggiati (quali muscoli, ossa, cartilagini, ecc) da malattie, traumi o invecchiamento, restituendone l'integrità e la funzionalità.

Questo nuovissimo settore delle biotecnologie, chiamato anche medicina rigenerativa, sta rivoluzionando la medicina, aprendo la strada a nuove possibilità di cura e a una migliore qualità della vita dei pazienti.

Il termine ingegneria tissutale compare attorno agli anni settanta del secolo scorso inteso unicamente come manipolazione di tessuti e organi; in seguito il termine assume la moderna accezione, ovvero viene definito come quel campo interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze della vita al fine di sviluppare dei sostituti biologici per il mantenimento, la riparazione, la sostituzione o il potenziamento funzionale di tessuti biologici o interi organi.

Le cosiddette “armi” del Tissue Engineering sono le *cellule staminali*, i *regolatori di crescita* e gli *scaffold*.



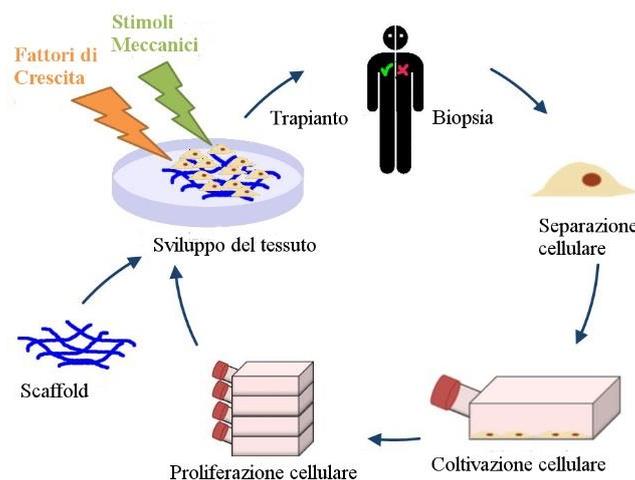
Le cellule staminali sono le cellule progenitrici di tutti gli organi e i tessuti degli esseri viventi, sono cellule indifferenziate che non hanno ancora assunto una specifica tipologia e funzione, ma che, in determinate condizioni, possono specializzarsi e svilupparsi in tessuti e organi. In particolare, opportuni *regolatori di crescita*, specifici per ciascun tipo di tessuto, possono essere selezionati tra molecole bioattive o proteine morfogeniche per promuovere ed accelerare il processo di differenziazione e proliferazione cellulare. Infine, gli *scaffold* rappresentano il supporto meccanico e funzionale, 2D o 3D, in grado di ospitare e promuovere l'accrescimento e il differenziamento delle cellule staminali; gli *scaffold* devono essere progettati con materiali, architetture e geometrie tali da promuovere la rigenerazione e la creazione del nuovo tessuto e per essere, successivamente riassorbiti e sostituiti dai nuovi tessuti. Oltre alla composizione chimica, la struttura dello *scaffold* gioca un ruolo fondamentale nel guidare lo sviluppo del tessuto. Il materiale costituente rappresenta una struttura temporanea che ospita le cellule, ne promuove la rigenerazione, la giusta direzione e l'orientamento. I requisiti per un *scaffold* sono numerosi, come la biocompatibilità e citocompatibilità, idonee proprietà meccaniche e tempi di degradazione.

Più specificamente, il procedimento dell'ingegneria tissutale prevede un iniziale isolamento di cellule specifiche del paziente (approccio autologo), ed in secondo luogo la progettazione di un supporto tridimensionale adeguato,

denominato *scaffold*, tale da promuovere la proliferazione e differenziazione delle cellule seminate su di esso. Tutto ciò si rende necessario in quanto le cellule isolate non sono in grado di organizzarsi e trasformarsi in tessuto, ma richiedono un ambiente specifico e, soprattutto, un materiale di supporto consono. Successivamente, si procede alla crescita cellulare, condotta *in vitro*, in particolari condizioni. Eventualmente può essere previsto l'utilizzo di un bioreattore che fornirà gli stimoli chimici e fisici per l'opportuna crescita del tessuto. La completa colonizzazione dello *scaffold* darà quindi origine a un costruito pseudotessutale *in vitro*, il quale potrà essere impiantato *in vivo* nel soggetto trattato. Nel caso in cui siano state utilizzate cellule autologhe, si ottiene l'eliminazione di qualsiasi reazione immunitaria da parte dell'organismo, sempre presente quando si tratta di trapianto di tessuti o organi interi.

L'impianto prevede due possibili tipi di approcci:

- Sostitutivo, il cui scopo è quello di realizzare tessuti o organi del tutto simili a quelli utilizzati per i trapianti.
- Istioconduttivi o istioinduttivi, cioè un'ottimizzazione della struttura e della composizione di materiali di origine naturale o (semi)sintetica e l'induzione della proliferazione di cellule in vivo.



Gli sviluppi attuali nel campo dell'ingegneria tissutale non sono ancora in grado di evitare l'utilizzo di protesi di supporto per ripristinare le funzionalità di tessuti od organi danneggiati, però sono state individuate alcune

applicazioni dei supporti tridimensionali che presentano risultati soddisfacenti, come ad esempio la fabbricazione di pelle, cornea o la rigenerazione ossea. È prevedibile che questa tecnica permetterà in tempi relativamente brevi di realizzare in laboratorio tessuti anche più complessi, ed in un futuro più lontano parti di organi.

I tessuti ingegnerizzati sono progettati sia per integrarsi con il paziente sia per favorire la rigenerazione del tessuto sano. A seconda dell'organismo dal quale originano è inoltre possibile distinguere tre tipi di impianti:

- *allograft*: le cellule, i tessuti o i tessuti ingegnerizzati derivano da un altro individuo della stessa specie;
- *xenograft*: cellule, tessuti o tessuti ingegnerizzati derivano da un'altra specie;
- *autograft*: cellule, tessuti o tessuti ingegnerizzati derivano dallo stesso individuo.

1. Scaffold tridimensionali nell'ingegneria tissutale

Punto focale dell'ingegneria tissutale è la realizzazione di una struttura tridimensionale, di origine naturale o artificiale, sulla quale possano essere seminate e coltivate cellule, al fine di generare un costrutto biologico funzionale. Esso guida lo sviluppo del tessuto e fornisce un supporto temporaneo che può incorrere a degradazione. Chiaramente, per ogni tipologia di tessuto deve essere realizzato uno *scaffold* appropriato in termini di struttura e proprietà meccaniche.

La realizzazione di costrutti per l'ingegneria tissutale richiede l'utilizzo di tecniche che permettano un elevato controllo dei parametri strutturali del dispositivo, in particolare in termini di distribuzione e geometria dei pori e rugosità delle superfici. A livello micrometrico occorre fornire una struttura porosa che permetta una adeguata perfusione di nutrienti, la rimozione dei prodotti di scarto del metabolismo cellulare e la possibilità di sviluppare una rete capillare, attraverso l'innescò di processi angiogenici. A tal proposito, si sono sviluppate tecniche in grado di realizzare supporti tridimensionali con pori interconnessi e dalle dimensioni controllate, che agevolino i processi di

migrazione, proliferazione e differenziamento cellulare. È altresì necessario realizzare un costrutto con morfologia compatibile con quella del tessuto trattato e con dimensioni adeguate per una corretta collocazione nel sito di impianto.

Le proprietà fondamentali che uno *scaffold* deve possedere sono:

- 1) **Biocompatibilità:** l'assenza di effetti tossici sui tessuti con cui il dispositivo viene a contatto e nella sua abilità di svolgere la funzione per la quale è stato progettato, innescando una risposta appropriata nell'ospite.
- 2) **Bioassorbibilità:** si intende la capacità di un materiale di subire il processo di dissoluzione o di rimozione, dovuto ad attività cellulare, inserito in un ambiente biologico.
- 3) Elevata porosità.
- 4) Proprietà superficiali opportune.
- 5) Proprietà meccaniche tali da essere comparabili con quelle del tessuto da sostituire.

Questa tipologia di supporto, può essere realizzata con materiali differenti a seconda delle necessità^[1]:

- **Ceramici:** si suddividono in cristallini e amorfi. I primi sono completamente costituiti di idrossiapatite, che determina un'ottima biocompatibilità con la frazione inorganica dell'osso; i secondi vengono anche definiti biovetri e sono composti principalmente da ossido di silicio (SiO₂), ossido di calcio (CaO) e ossido di sodio (Na₂O). Trovano impiego principalmente come rivestimenti.
- **Metallici:** acciaio inossidabile, titanio e sue leghe sono utilizzati come materiali di base per gli impianti per la rigenerazione ossea.
- **Polimerici:** si suddividono in naturali e sintetici. I primi possono essere, ad esempio, collagene, derivati benzil-esterei di acido ialuronico e fibrina della seta. I secondi, invece, sono ottenuti per polimerizzazione di diversi tipi di monomeri, ed i maggiormente utilizzati sono acido poliglicolico, acido polilattico,

polietilenglicole, polivinilalcol, polietilentereftalato, polipropilene fumarato e poliuretani.

- **Compositi**: si utilizzano combinazioni di diversi materiali a seconda delle proprietà desiderate. Ad esempio *scaffold* formati da collagene possono essere rivestiti con idrossiapatite per favorire la formazione di uno strato bioattivo di apatite e successivamente supportare l'attacco e la proliferazione di cellule periestali nel coniglio^[2].

2. Porosità e struttura tridimensionale

Nel campo dell'Ingegneria Tissutale, requisito fondamentale è che la struttura del sostegno sia porosa (Figura 1), con pori interconnessi e di adeguate dimensioni per permettere lo sviluppo e la formazione di tessuto biologico funzionale^[3].

La porosità è definita come il rapporto tra il volume dei vuoti e il volume totale del materiale, che costituisce anche una proprietà morfologica dipendente dai parametri fissati durante il processo di realizzazione dello *scaffold* stesso come, ad esempio, la quantità di acqua utilizzata nei processi di *gas foaming* dei poliuretani, o la quantità di agente porogeno (ad esempio Cloruro di Sodio, NaCl) utilizzato nei processi di *solvent casting-particulate leaching*^[5].

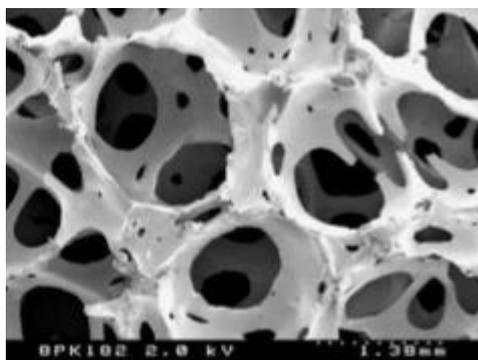


Figura 2. Esempio di *scaffold* poliuretanico poroso per la rigenerazione del tessuto osseo. Immagine ottenuta mediante microscopio elettronico a scansione (SEM) ^[4].

La porosità di un materiale può essere aperta oppure chiusa. Nel primo caso,

essa definisce il grado di interconnessione dei pori e si esprime come percentuale del volume totale dello *scaffold* penetrabile da un gas esterno; nel secondo caso invece, è espressa dalla percentuale del volume totale impenetrabile da un gas esterno.

Il grado ottimale di porosità aperta è dell'ordine del 80-90%^[6] ed è tale per cui si ha la formazione di tessuto funzionale *in vitro*. Ma occorre ricordare che tale parametro influenza le proprietà meccaniche e le caratteristiche di biodegradabilità del costruito ed è per questa ragione che il grado di porosità può variare a seconda dell'applicazione. Le proprietà meccaniche incrementano se la porosità è di tipo chiuso, tuttavia questa condizione contribuisce a pregiudicare la colonizzazione della struttura da parte delle cellule; per questo motivo è necessario trovare un compromesso ottimale tra le due tipologie di porosità. Il controllo della dimensione dei pori può essere effettuato ad esempio scegliendo la granulometria dell'agente porogeno oppure controllando il quantitativo di agente espandente in fase di sintesi.

Il vantaggio offerto da una struttura porosa aperta è quello di permettere la libera diffusione di molecole prodotte dalle cellule o presenti nel mezzo di cultura, quindi il passaggio di sostanze nutritive e la rimozione di cataboliti, oltre ad offrire un'elevata superficie di adesione cellulare in un volume ridotto.

3. Biodegradabilità

La velocità di degradazione e di riassorbimento del costruito devono essere simili a quella di ricostruzione del tessuto; inoltre, lo *scaffold* deve fornire un supporto meccanico adeguato, con proprietà meccaniche paragonabili a quelle dei tessuti presenti nel luogo d'impianto^[7].

Le proprietà di massa dei materiali utilizzati come supporti per la rigenerazione tissutale dipendono dalla natura dei legami chimici presenti all'interno del materiale (ionici, covalenti e metallici) e dalla loro capacità di subire degradazione da parte dell'organismo ospite. La cinetica di degradazione dello *scaffold* deve essere compatibile con quella di ricostruzione del tessuto, legata a sua volta alla secrezione della matrice

cellulare da parte delle cellule^[6].

I polimeri biodegradabili subiscono meccanismi di degradazione che si distinguono in:

- *Bulk erosion*, o degradazione di massa, fenomeno in cui la degradazione ha luogo all'interno del materiale con iniziale riduzione del peso molecolare delle catene polimeriche, fino alla perdita di massa in seguito alla diffusione delle catene polimeriche stesse;
- *Surface erosion*, o degradazione superficiale, fenomeno in cui la degradazione ha inizio dalla superficie del costrutto, procedendo poi verso l'interno.

Il rilascio di prodotti acidi costituisce una delle maggiori problematiche inerenti alla degradazione, in quanto sono in grado di provocare un'intensa reazione infiammatoria.

Nell'ambito della rigenerazione del tessuto osseo, ad esempio, l'introduzione in fase di sintesi di calcio-fosfati, idrossiapatite o sali basici costituisce una delle possibili soluzioni per modulare la cinetica di degradazione della matrice polimerica e per favorire l'iniziale adsorbimento di proteine, riducendo così l'idrofobicità superficiale e tamponando i prodotti acidi di degradazione.

4. Proprietà meccaniche

Le proprietà meccaniche di un supporto poroso per l'ingegneria tissutale sono determinanti nell'interazione tra biomateriale e ambiente biologico *in vivo*.

Per la rigenerazione del tessuto osseo, ad esempio, sono da ricercarsi *scaffold* con caratteristiche meccaniche adeguate per supportare i carichi fisiologici^[8], tuttavia la necessità di realizzare strutture porose in materiale polimerico riduce notevolmente le caratteristiche meccaniche, avvicinandosi solo ai valori di modulo elastico dell'osso trabecolare, meno resistente di quello compatto. Per quanto riguarda applicazioni per l'ingegnerizzazione dei tessuti molli, ad esempio i vasi ematici, sono invece necessari costrutti con ottime

proprietà di elasticità, *compliance* e resistenza a fatica per sopportare i continui cicli di carico ai quali sono sottoposti i vasi in ambiente fisiologico^[9].

5. Adesione cellulare e citocompatibilità

La corretta interazione tra il costrutto polimerico e la componente biologica costituisce un fattore indispensabile per la formazione di nuovo tessuto sano e maturo.

Lo *scaffold* deve essere biocompatibile e dovrebbe garantire l'adesione e la proliferazione cellulare, promuovendo contemporaneamente lo sviluppo dell'espressione fenotipica desiderata per la rigenerazione di un tessuto funzionale^[10].

Per la valutazione della biocompatibilità dei materiali utilizzati per la realizzazione del supporto, sono stati sviluppati numerosi test *in vitro* e *in vivo*, tra cui:

- Test di citocompatibilità indiretta: valutazione dell'eventuale rilascio di prodotti tossici per le cellule da parte del materiale utilizzato per la realizzazione del costrutto; consiste nell'immersione del polimero in un terreno di coltura per un periodo di tempo prestabilito e successivamente si utilizza tale terreno per eseguire una coltura di cellule. Se il materiale ha rilasciato sostanze tossiche, esse saranno presenti nel terreno di coltura ed entreranno a contatto con le cellule; per valutare quindi il grado di tossicità di eventuali prodotti rilasciati, si utilizzano, ad esempio, tecniche di colorazione in grado di distinguere le cellule vive da quelle morte.
- Test di citocompatibilità diretta: si esegue mediante un saggio quantitativo della vitalità di cellule seminate sulla superficie del materiale, valutata in diversi istanti temporali; si effettuano poi misure successive di assorbanza o fluorescenza che stimano la riduzione chimica di un indicatore *redox* come risultato della proliferazione cellulare, permettendo così la valutazione di biocompatibilità superficiale dello *scaffold*.

- Test di biocompatibilità *in vivo*: valutazione dell'interazione con i tessuti biologici di un organismo. Le tipologie di saggi *in vivo* sono diversi ma comunque tutti regolati da rigide normative. Ad esempio, il costrutto può essere impiantato in posizione sottocutanea in animali da laboratorio, generalmente ratti o topi. Per valutare fenomeni di infiammazione è necessario che lo *scaffold* rimanga a contatto con i tessuti almeno quattro giorni per poi procedere alla valutazione istologica dei tessuti circostanti.

6. Poliuretani e ingegneria tissutale

I poliuretani (PU) sono macromolecole contenenti legami uretanici [R – NH – CO – O – R'] e a questa categoria appartengono numerosi materiali con caratteristiche anche molto differenti tra loro, utilizzabili in svariati ambiti. A seconda della loro struttura e composizione, possono essere in forma lineare (PU termoplastici, a segmenti), reticolata (PU termoindurenti) oppure espansa (schiume rigide o flessibili)^[11].

In ambito biomedico i poliuretani lineari trovano impiego nella realizzazione di dispositivi impiantabili a contatto con il sangue e con i tessuti molli, quali protesi cardiovascolari (ventricoli artificiali, protesi vascolari di piccolo calibro, valvole cardiache bimorfe, cateteri, guide di *pace-makers*), membrane, cannule, tubi endotracheali^[11]. Essi presentano tuttavia dei limiti legati alla scarsa stabilità e suscettibilità alla calcificazione *in vivo*. Infatti, i fenomeni di idrolisi e ossidazione possono compromettere il successo stesso dell'impianto. Tali limiti possono diventare vantaggi nella progettazione di materiali biodegradabili utilizzabili nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti^{[3][12]}.

Il vantaggio principale dei poliuretani rispetto ad altri materiali polimerici, per la realizzazione dello *scaffold*, risiede nella grande versatilità di questa tipologia di polimeri: attraverso un'appropriata selezione dei reagenti di base e dei loro rapporti stechiometrici, è possibile infatti ottenere materiali estremamente diversi, con differenti proprietà meccaniche, biocompatibilità e biodegradabilità^[13;14].

In fase di sintesi è quindi possibile progettare materiali *ad hoc* per la specifica applicazione richiesta, che soddisfano i requisiti di base di uno *scaffold* : elevata porosità, interconnessione dei pori, proprietà meccaniche simili a quelle dei tessuti circostanti il sito d'impianto, superficie chimicamente adeguata per adesione, crescita e proliferazione cellulare, biocompatibilità, biodegradabilità, o in alternativa, biointegrazione.

Si possono distinguere due tipologie di schiume:

- Schiume biodegradabili: realizzate con espansi poliuretani sintetizzati appositamente per subire degradazione; la scelta dei reagenti di partenza determina tale caratteristica^[17].
- Schiume biointegrabili: subiscono modifiche delle proprietà chimico-fisiche e meccaniche molto lentamente nel tempo^[15] .

Scopo

I poliuretani sono una famiglia di polimeri largamente utilizzata nell'ambito dell'ingegneria biomedica e da qualche anno sono stati proposti come materiali per la realizzazione di *scaffold* destinati all'ingegneria tissutale. Per svolgere al meglio tale compito è necessario che i dispositivi siano espansi e porosi, per permettere la proliferazione e colonizzazione cellulare, e che siano biodegradabili per agevolare il riassorbimento da parte dell'organismo ed evitare così una seconda operazione chirurgica per la rimozione.

Oggetto del presente lavoro di Tesi è l'analisi dei testi presenti in letteratura inerenti al materiale stesso, alla sua progettazione e ai relativi utilizzi possibili.

Si farà una particolare attenzione alle caratteristiche generali e specifiche, per poi analizzare il comportamento di tali materiali in diversi ambienti, sia che siano un chiaro richiamo a quelli fisiologici, sia fisiologici in sé attraverso studi effettuati *in vivo*.

Capitolo 1

1.1 Poliuretani

1.1.1 Reazioni per la sintesi di poliuretani

Il termine poliuretano (PU) indica una famiglia di polimeri derivanti dalla poliaddizione fra un poliisocianato e un poliolo con il conseguente risultato della formazione di gruppi uretano e gruppi urea. Questi materiali sono noti per la loro versatilità, per le proprietà del prodotto finito, le caratteristiche di lavorabilità, facilità di produzione e applicazione. Attraverso l'appropriata selezione di isocianato e poliolo, si ottiene una modulazione delle caratteristiche dei prodotti realizzati, spaziando dalla soffice morbidezza di espansi flessibili ad una elevata resistenza alle sollecitazioni meccaniche di sistemi poliuretanici compositi o espansi rigidi. La caratteristica che contraddistingue i poliuretani dagli altri polimeri è la presenza del gruppo uretano, che si forma durante la reazione di poliaddizione (Figura 2):

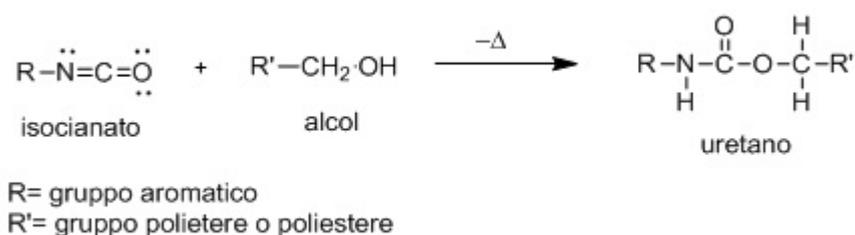


Figura 2. Formazione del legame uretanico.

Il sostituente R e R' influenzano le proprietà del polimero ottenuto.

Grande vantaggio sta nella produzione dei materiali partendo da reagenti allo stato liquido, garantendo una semplificazione e accelerazione dei processi industriali di produzione^[16].

Nella preparazione dei poliuretani è possibile seguire due differenti

procedure:

- 1) Sintesi a singolo stadio: in questo processo si effettua una reazione diretta tra isocianato, macroglicole e diolo. La reazione è fortemente esotermica.
- 2) Sintesi a due stadi: inizialmente isocianato e poliolo reagiscono portando alla formazione di un prepolimero, il quale in seguito reagisce con l'estensore di catena, portando la formazione della macromolecola finale. Il vantaggio principale è facilitare il controllo della reazione, diminuendo l'isocianato libero ed abbassando l'esotermicità della reazione. Purtroppo la sintesi del prepolimero determina un aumento dei costi globali di produzione.

Il processo di poliaddizione per la sintesi di un poliuretano possiede le seguenti caratteristiche^[16]:

- Disponibilità di un elevato numero di reagenti differenti.
- La reazione è esotermica ed in alcuni casi può avvenire a temperatura ambiente.
- La velocità di reazione può essere controllata da un'ampia gamma di catalizzatori.
- La scelta dei rapporti stechiometrici tra i reagenti influenza la massa molecolare del polimero finale e conseguentemente le sue proprietà strutturali.
- Possibilità di ottenere prodotti con diversi requisiti a seconda della composizione scelta.

La sintesi a singolo stadio ha la peculiarità di essere una reazione fortemente esotermica, con temperature che possono raggiungere i 180 C° e, a seconda del catalizzatore scelto, varia anche il tempo stesso di reazione da pochi secondi a diversi minuti^[16].

Il vantaggio di utilizzare un prepolimero è quello di agevolare il controllo della reazione, ridurre la quantità di diisocianato libero (responsabile della tossicità) e infine di ridurre l'esotermicità caratteristica della reazione. Lo svantaggio principale però, è l'aumento del costo del costo globale di

produzione a causa della sintesi del prepolimero.

1.1.2 Reagenti per la sintesi di poliuretanic

1.1.2.1 Isocianato

Il monomero isocianato [OCN – R – NCO] può avere due, tre o più gruppi (-NCO) in grado di reagire con il gruppo ossidrilico, quindi può essere bifunzionale, trifunzionale o polifunzionale.

I gruppi R possono essere di diversa natura, come anelli aromatici, gruppi alifatici o ciclo alifatici.

La reattività dell'isocianato può essere spiegata considerando le varie forme di risonanza del gruppo (-NCO) (Figura 3). La densità elettronica tenderà ad essere maggiore sull'ossigeno e minore sull'atomo di carbonio provocando una distribuzione di probabilità delle forme di risonanza.

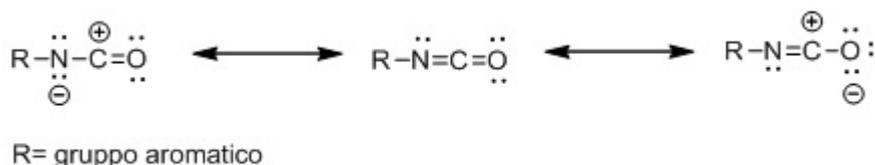


Figura 3. Forme di risonanza dell'isocianato.

Generalmente le reazioni che coinvolgono questo reagente consistono in una addizione sul doppio legame carbonio-azoto. Il centro nucleofilo di una molecola dotata di un idrogeno attivo attacca il carbonio positivo del gruppo -NCO e l'idrogeno attivo, quindi, si addiziona all'atomo di azoto. Nell'attacco all'isocianato, gruppi elettron-attrattori aumentano la reattività dell'isocianato, mentre gruppi elettron-donatori la riducono.

In generale gli isocianati aromatici sono più reattivi degli alifatici.

Tra i numerosi isocianati disponibili, l'industria chimica del poliuretano si avvale essenzialmente di due tipi di isocianati aromatici: toluene diisocianato (TDI), 1-isocianato-4-[(4-fenilisocianato) metil] benzene (MDI), nonché delle loro miscele isomeriche e polimeriche.

Con il termine TDI si indicano il 2,4-toluen diisocianato, il 2,6- toluen diisocianato ma anche miscele dei due isomeri. A livello industriale, si utilizzano miscele 80:20 degli isomeri 2,4 e 2,6 ma anche 65:35. In Figura 4 vengono riportati gli isomeri principali del TDI.

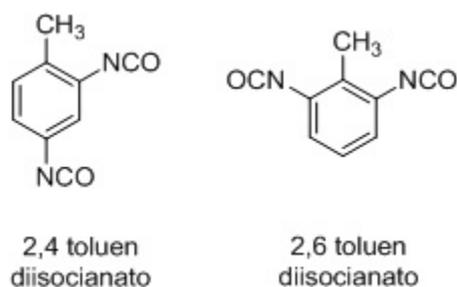


Figura 4. Principali isomeri del TDI.

Il termine MDI indica sia il monomero (MMDI) sia la forma polimerica (PMDI). Quest'ultima presenta il giusto equilibrio di viscosità, reattività e proprietà fisiche per la maggior parte delle applicazioni. L'MDI polimerico ad alta funzionalità viene utilizzato quando è necessario favorire le proprietà fisiche, mentre quello a bassa funzionalità per aumentare la resistenza a compressione. In esso sono comunque presenti frazioni con funzionalità NCO superiori a due, derivanti da ammine polimeriche formatesi in fase di condensazione. In Figura 5 sono riportati gli isomeri del MDI e la forma polimerica.

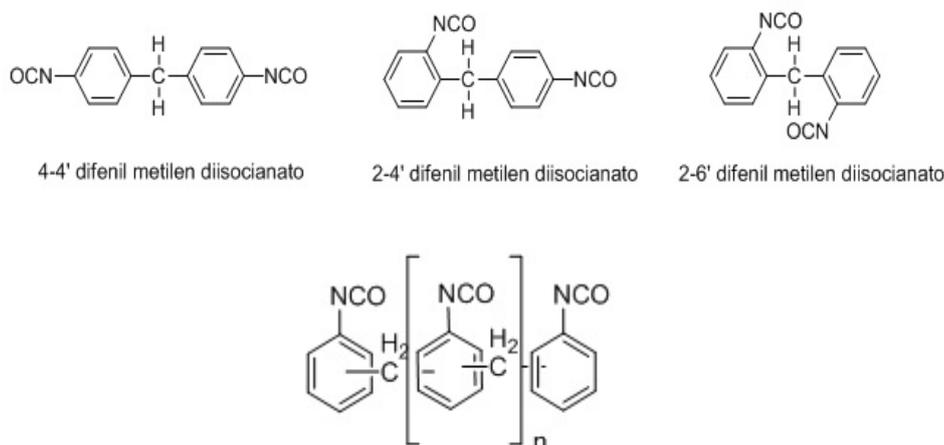


Figura 5. Isomeri del MDI e forma polimerica.

L'isocianato maggiormente impiegato in ambito biomedicale risulta essere l'MDI^[11], sia per la possibilità di utilizzo in vari ambiti e di conseguenza la possibilità di diversificazione della gamma dei prodotti finiti, sia per la minore volatilità rispetto al TDI, che ne riduce la pericolosità nel suo utilizzo. Esso è di tipo aromatico, quindi più reattivo rispetto ad un isocianato alifatico, grazie alla configurazione elettronica degli anelli benzenici presenti. Può essere utilizzato in forma pura oppure sotto forma di miscele dei suoi isomeri. Per quanto riguarda gli isocianati alifatici, quelli maggiormente utilizzati sono l'1,6-esametilene diisocianato (Figura 6) e il 4,4'-dicicloesilmetano diisocianato (Figura 7).

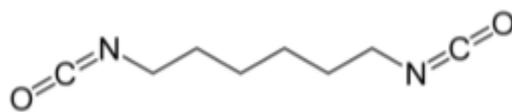


Figura 6. 1,6-esametilene diisocianato

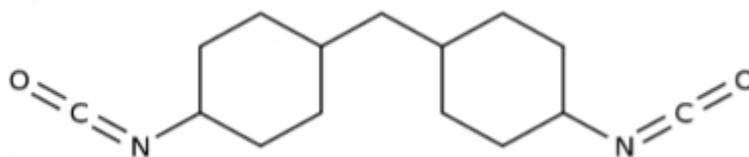


Figura 7. 4,4'-dicicloesilmetano diisocianato

1.1.2.2 Poliolo

I polioli sono i principali modulatori delle proprietà chimico-fisiche e meccaniche finali del polimero. Vengono ottenuti per reazione tra un iniziatore e un diolo. Se l'iniziatore impiegato presenta due idrogeni attivi si otterrà un diolo, se invece ne possiede tre si otterrà un triolo e così via^[18]. La lunghezza della catena del poliolo determina, come già accennato, le proprietà meccaniche del prodotto finale: maggiore è la lunghezza della catena, maggiormente flessibile sarà il poliuretano. Dioli corti e strutture reticolate danno luogo a poliuretani rigidi.

Le tipologie di polioli utilizzati sono:

- Poliesteri: impiegati per la produzione di poliuretani sia rigidi che flessibili, in forma compatta o espansa. Sono dotati di ottima resistenza chimica, resistenza fisica a flessione e abrasione e buone proprietà elastomeriche; tuttavia sono suscettibili a idrolisi.
- Polietere: utilizzati per ottenere poliuretani flessibili, sono più resistenti all'idrolisi rispetto ai poliesteri, ma subiscono ossidazione.
- Policarbonati: mostrano maggiore resistenza sia all'idrolisi che all'ossidazione e possiedono buona stabilità strutturale.

I polioli possono essere a basso peso molecolare (PM nell'ordine dei 100 g/mol) o ad alto peso molecolare (PM nell'ordine degli 8000 g/mol). Nei polioli maggiormente utilizzati il peso molecolare è compreso tra 500 e 6000 g/mol^[19]. Per quanto riguarda i dioli, quelli a basso peso molecolare hanno la funzione di estensori di catena, cioè incrementano il peso molecolare delle catene polimeriche. Invece, quelli ad alto peso molecolare vengono definiti macrodioli.

1.1.2.3 Catalizzatori^[19]

Per controllare la velocità di reazione, vengono di norma impiegati agenti con proprietà catalizzanti. Il gruppo isocianato è sensibile a molte tipologie di catalizzatori: acidi e basi di Lewis, catalizzatori metallici, sali alcalini di acidi organici e fenoli particolari.

Caratteristiche fondamentali di un catalizzatore sono:

- Essere un forte nucleofilo per riuscire ad attaccare il carbonio dell'isocianato.
- Essere capace di formare un complesso con un idrogeno attivo.
- Essere solubili in acqua e di formare legami idrogeno stabili.

La catalisi relativa alle reazioni dei poliuretani è molto complessa a causa dei numerosi fattori che la influenzano, come ad esempio l'effetto catalitico esercitato dal gruppo uretanico stesso.

Tra i catalizzatori più utilizzati e diffusi troviamo ammine alifatiche terziarie

e sali organici di stagno.

1.2 Poliuretani espansi

1.2.1 Reazioni per la sintesi di poliuretani espansi

Con il termine *espanso*, si fa riferimento a una classe di materiali caratterizzati da una struttura a celle, con spigoli e pareti solide che delimitano uno spazio contenente un gas. La formazione dei pori avviene durante la fase di espansione a causa della formazione di bolle di gas all'interno della miscela viscosa di reazione.

Esistono diverse strutture cellulari, ma quella caratteristica degli espansi poliuretanici è irregolare (Figura 8).

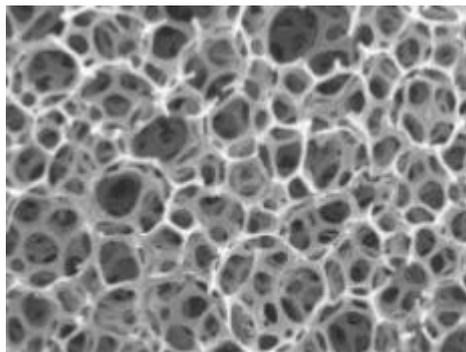


Figura 8. Espanso polimerico a celle aperte

La porosità influenza le proprietà meccaniche degli espansi polimerici e ne determina il grado di flessibilità o di rigidità della schiuma. Se le pareti dei pori sono identificabili con superfici fisiche, si dice che l'espanso è a pori chiusi perché il gas rimane confinato al loro interno. Altrimenti l'espanso è detto a pori aperti perché il gas è libero di spostarsi da un poro all'altro. Ma non sono le uniche tipologie, in quanto si presenta anche una struttura intermedia tra le due, detta a porosità semi-aperta.

Gli espansi poliuretanici (detti anche schiume) sono sintetizzati a partire da una miscela composta da tre reagenti principali: isocianato, poliolo e agente espandente^[18].

La produzione degli espansi è risultato di una combinazione di processi chimici, fisici e reologici e durante la fase di sintesi è possibile aggiungere degli additivi (ad esempio stabilizzanti) e catalizzatori per aumentarne la velocità di reazione^[18].

Le due reazioni principali che hanno luogo durante la sintesi dei poliuretani espansi sono^[19]:

- Reazione di gelificazione (*gelling*) : avviene tra il monomero isocianato e il gruppo ossidrilico del poliolo, con conseguente formazione dei legami uretano responsabili dell'innalzamento del peso molecolare e della viscosità del polimero (Figura 9).
- Reazione di espansione (*blowing*) : avviene tramite l'interazione tra le molecole di acqua (utilizzata spesso per dare luogo alla formazione di gas porogeno durante la sintesi) e i gruppi isocianato in due passaggi successivi. Il primo consiste della reazione tra acqua e isocianato, producendo acido carbammico, che in breve tempo si decompone a formare un'ammina e anidride carbonica (Figura 10); il secondo passaggio corrisponde alla reazione tra l'ammina e un secondo gruppo isocianato a creare il legame urea (Figura 11). A sua volta, l'urea può reagire con l'isocianato presente in eccesso per formare il biureto (Figura 12).

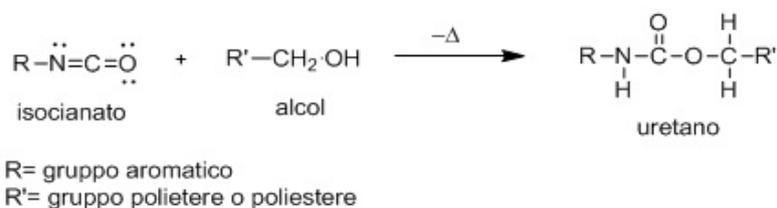


Figura 9. Formazione del legame uretanico per reazione tra isocianato e alcool.

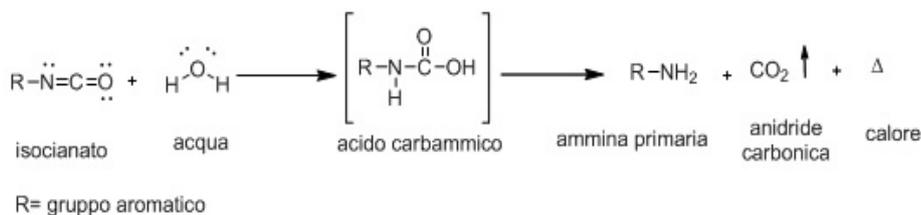


Figura 10. Reazione fra isocianato e acqua.

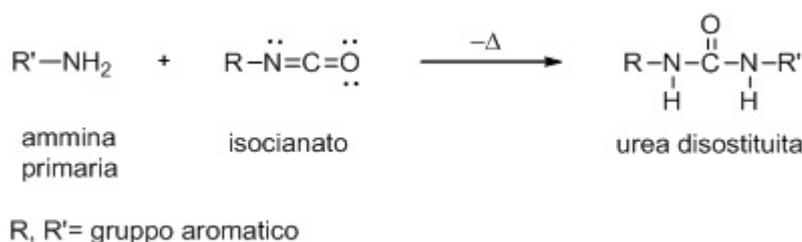


Figura 11. Reazione di formazione di un'urea disostituita.

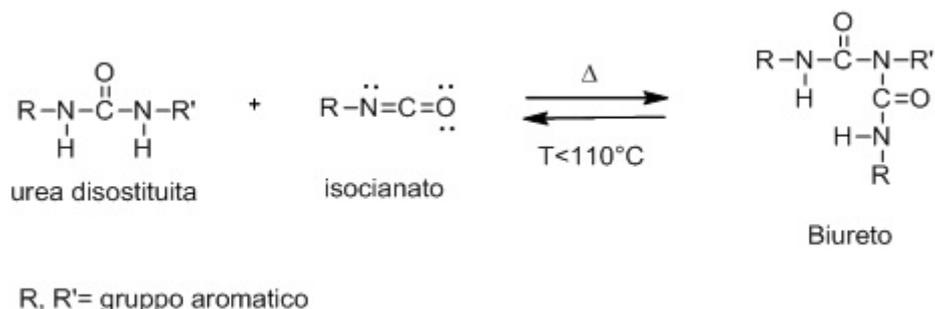


Figura 12. Reazione di formazione del biureto.

Come si osserva dalla Figura 10, il gruppo terminale dell'isocianato reagisce con l'acqua e si decompone spontaneamente in anidride carbonica (CO₂) e ammina primaria (R-NH₂). Il gruppo amminico reagisce istantaneamente con l'isocianato, formando così il gruppo urea (-NH-CO-NH-) (Figura 11). Il macromonomero risultante può a sua volta reagire nuovamente con l'acqua. L'anidride carbonica generata fungerà da agente porogeno nella fase di polimerizzazione del poliuretano.

Le reazioni precedentemente descritte avvengono contemporaneamente, ed è quindi necessario che le velocità di reazione siano il più possibile simili tra loro. In seguito all'innesco delle due reazioni di *gelling* e *blowing*, la schiuma inizia la propria espansione finché non si raggiunge il punto di gelificazione, in corrispondenza del quale si registra l'aumento della viscosità del sistema^[20].

È fondamentale che la formazione dei pori all'interno della miscela avvenga prima che sia raggiunto il punto di gelificazione in modo da realizzare un materiale stabile e che non vada incontro a collasso (detto *shrinking*)^[20].

In fase di sintesi, è importante scegliere accuratamente la quantità di isocianato da utilizzare, tenendo in considerazione che una quantità eccessiva

dello stesso, dà luogo a reazioni secondarie (ad esempio con gruppi idrogenati, inclusi i gruppi uretano e urea, ma sono fenomeni con cinetiche molto lente rispetto a *gelling* e *blowing*) che incrementano la rigidità della schiuma.

Per questa motivazione, viene introdotto l'indice isocianato (*isocyanate index*) (Figura 13), definito come il rapporto percentuale tra la quantità di gruppi isocianato e i gruppi ossidrilici presenti nella miscela^[19]. Questo indice viene utilizzato per influenzare la struttura dell'espanso, determinando il grado di reticolazione tra le molecole polimeriche, che aumenta al crescere di tale valore. Esso può essere espresso anche in termini di equivalenti, così come mostrato in Figura 13.

Un valore pari a 100 indica che nella formulazione è presente isocianato esattamente sufficiente per reagire con l'acqua e con tutti i gruppi ossidrilici, un valore di 110 indica che la schiuma è stata prodotta con il 10% di isocianato in eccesso con conseguente presenza, però, di gruppi -NCO non reagiti.

Incrementando l'indice, si ottengono schiume più rigide a causa delle reticolazioni indotte dalle interazioni tra isocianato e gruppi urea e uretano.

$$\text{Isocyanate index} = \frac{\text{Quantità di isocianato utilizzato}}{\text{Quantità di isocianato stechiometrico}} = \frac{\text{peso eq. di isocianato utilizzato}}{\text{peso eq. di poliolo} + \text{peso eq. di acqua}}$$

$$\text{Quantità di isocianato stechiometrico} = \text{peso eq. di poliolo} + \text{peso eq. di acqua}$$

Figura 13. *Isocyanate index*

La maggior parte delle schiume poliuretaniche flessibili ha un indice compreso tra 90 e 110, ma è possibile variare tale parametro a seconda delle applicazioni^[19].

Il processo di nucleazione consiste nella formazione di bolle in un liquido e può essere generato da:

- Gas disciolto in fase liquida.
- Liquidi a bassa temperatura di ebollizione introdotti nel formulato come agenti espandenti.
- Gas prodotto nell'ambiente di reazione (ad esempio CO₂).

Questo meccanismo fisico si può descrivere con due modelli:

- 1) Dispersione: la fase gas e liquida sono inizialmente separati ma fornendovi una certa quantità di lavoro, il gas viene disperso nella fase liquida in modo uniforme.
- 2) Condensazione: il gas solubile nella fase liquida si aggrega producendo bolle.

Nel campo dei poliuretani espansi ad acqua, il fenomeno dell'accrescimento delle bolle richiede energia fornita dalle reazioni esotermiche e dalla formazione di anidride carbonica. Quando due bolle di raggio diverso vengono a contatto il gas a pressione maggiore migra verso zone di pressione minore formando così una bolla di dimensioni maggiori di quella di partenza. Al termine del processo di accrescimento, durante la polimerizzazione, la frazione di volume occupata dal gas è molto alta e, in queste condizioni, comprimendosi una sull'altra, le bolle generate perdono la loro classica forma a sfera per assumerne una poliedrica. Il poliedro così formato è stato approssimato a un dodecaedro pentagonale. In Figura 14 vi è una rappresentazione di questa approssimazione.

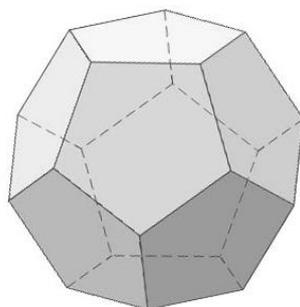


Figura 14. Approssimazione di un dodecaedro pentagonale

1.2.2 Reagenti per la sintesi di poliuretani espansi

Tra i reagenti utilizzati per la sintesi di poliuretani espansi, oltre ad isocianati e polioli, vengono utilizzati agenti espandenti, surfattanti e specifici catalizzatori che verranno descritti di seguito.

Per quanto concerne i polioli, quelli maggiormente utilizzati per la sintesi di poliuretani espansi rigidi sono poliesteri e polieteri a basso peso molecolare

(inferiore a 1000 g/mole); mentre per la produzione di poliuretani espansi flessibili sono impiegati poliesteri e polieteri ad elevato peso molecolare (tra i 2000 e gli 8000 g(mole). Tra gli isocianati più utilizzati per la produzione di espansi, sia rigidi che flessibili, troviamo il toluene diisocianato (TDI) e metilene-bis-fenilisocianato (MDI).

1.2.2.1 Agenti espandenti

Gli agenti espandenti sono responsabili della formazione della schiuma e tra i più utilizzati troviamo liquidi bassobollenti (come idrocarburi alifatici o alcoli) e gas (ad esempio aria o CO₂).

A seconda dell'azione che l'agente espandente svolge si definiscono:

- Espansione chimica: l'agente espandente è prodotto durante la reazione di sintesi; l'espandente maggiormente utilizzato è sicuramente l'acqua, in quanto sorgente di idrogeni attivi che reagendo con l'isocianato portano alla produzione di CO₂ e uree (aumentano il grado di durezza), provocando l'espansione della miscela di reazione nella fase di polimerizzazione e permette di ottenere un espanso.
- Espansione fisica: l'agente espandente agisce attraverso un fenomeno fisico (ad esempio un passaggio di stato); questi espandenti vengono utilizzati quando si vogliono raggiungere proprietà non ottenibili con la sola acqua, come ad esempio la morbidezza o la densità. I primi a essere utilizzati furono i clorofluorocarburi ma ad oggi sono stati sostituiti da idrocarburi per la loro pericolosità per lo strato di ozono atmosferico. Essi assorbono calore dalla reazione di polimerizzazione, vaporizzano ed espandono la schiuma senza interferire con la reazione di formazione del poliuretano.

Per la produzione di schiume poliuretatiche flessibili vengono generalmente fissati dei rapporti massici acqua/poliolo compresi tra 1 e 6%^[19], mentre per le schiume rigide spesso si effettua una combinazione tra acqua e liquidi bassobollenti.

1.2.2.2 Surfattanti^[19]

I surfattanti sono additivi multifunzionali essenziali per la realizzazione di poliuretani espansi. Essi fungono da stabilizzanti e ricoprono tre funzioni fondamentali:

- Ridurre la tensione superficiale all'interno della miscela di reazione, in modo tale da permettere la formazione di pori.
- Emulsionare acqua, poliolo, isocianato ed eventuali additivi per agevolare la formazione di un espanso con caratteristiche morfologiche omogenee.
- Stabilizzare, durante la fase di crescita, la creazione e rottura delle celle e pori all'interno della miscela per favorire la formazione di una struttura a celle aperte.

I surfactanti più utilizzati in ambito industriale sono copolimeri polieteri-silossanici dove la parte silossanica permette l'abbassamento della tensione superficiale e la parte polieterea garantisce la solubilizzazione nel poliolo formulato. In Figura 14 è riportata la struttura generica di un surfactante polietereo.

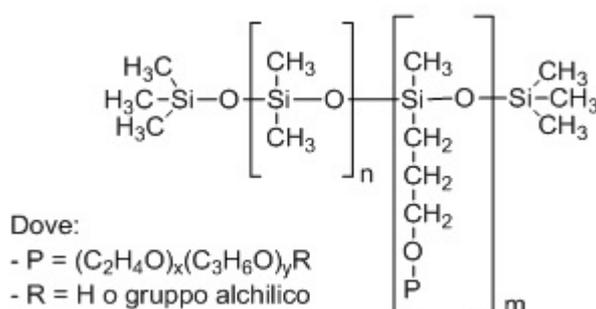


Figura 14. Struttura generica di un surfactante polietereo.

In ambito biomedicale sono utilizzati anche stabilizzanti di origine naturale come fosfolipidi, sali metallici di acidi grassi, lecitina e vitamina D₃^{[20][21][22]}.

1.2.2.3 Catalizzatori^[19]

I catalizzatori sono utilizzati per accelerare la reazione e controllare la crescita della schiuma. Ogni catalizzatore influenza una specifica reazione chimica.

Alcuni catalizzatori vengono utilizzati per accelerare la reazione tra poliolo e isocianato (*gel catalysts*), altri catalizzatori sono utilizzati per ottimizzare l'interazione tra isocianato e acqua che conduce alla formazione del gas espandente (*blow catalysts*). Molti composti organometallici possiedono proprietà catalizzanti, i più comuni sono l'octoato di stagno e il dibutiltindilaurato. Oltre a ciò, anche le tri-alchilammine sono utilizzate come catalizzatori di gelificazione.

Per accelerare la reazione di espansione sono impiegate ammine terziarie (si veda il paragrafo 1.2.2.5) con due atomi di carbonio interposti tra il gruppo ammidico catalitico e un'altra ammina terziaria o un gruppo etere. Questa struttura è in grado di formare un complesso con le molecole di acqua, aumentandone la reattività verso i gruppi isocianato^[23].

1.2.2.4 Catalizzatori organometallici

I catalizzatori metallorganici maggiormente utilizzati sono a base di stagno. Si comportano come acidi di Lewis ed interagiscono con i siti basici del poliolo e dell'isocianato. Vista però la elevata tossicità, le loro applicazioni sono state notevolmente ridotte. In Figura 15 vengono riportate due esempi di catalizzatori organometallici utilizzati.

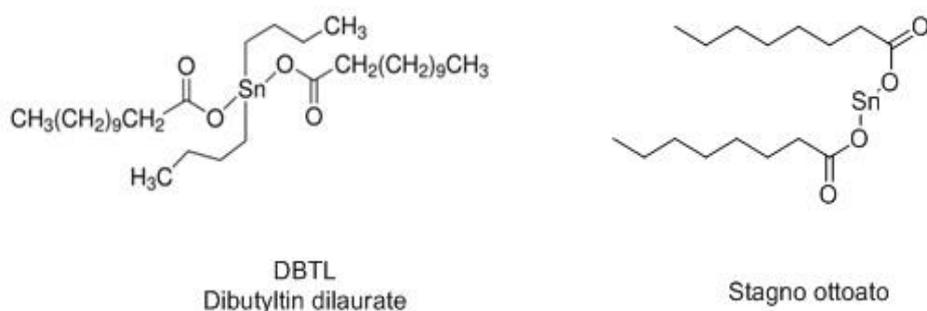


Figura 15. Esempi di catalizzatori organometallici

1.2.2.5 Catalizzatori amminici

I catalizzatori maggiormente utilizzati sono le ammine terziarie (Figura 16), in quanto la loro attività catalitica è legata alla presenza del doppietto elettronico libero sull'azoto e può essere controllata dall'ingombro sterico e dagli effetti elettronici dei vari sostituenti. Spesso si utilizzano miscele di ammine variamente sostituite per avere un giusto bilanciamento fra la reazione di espansione e la polimerizzazione.

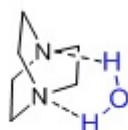


R = gruppo aromatico o alchilico

Figura 16. Generica ammina terziaria

L'alta volatilità di queste sostanze può provocare un aumento della pressione nell'ambiente di reazione, basso *flash point* e problematiche riguardanti la sicurezza dell'impianto. Una possibile soluzione è quella di fissare covalentemente il catalizzatore alla catena polimerica in accrescimento.

I catalizzatori amminici per ottenere reazione di *blowing* sono tali da avvicinare tra loro acqua e isocianato in modo che reagiscano più velocemente. Contrariamente, i catalizzatori per reazione di *gelling* sono ammine terziarie che non possiedono questa caratteristica consentendo quindi la realizzazione di una schiuma poliuretanicamente espansa con un giusto compromesso tra reazione di espansione e di gelo. Infatti, la reazione più esotermica è quella di espansione e lo sviluppo di calore generato andrà ad influenzare la reazione di gelo. In Figura 17 è mostrato un esempio di interazione tra acqua e isocianato tipici di catalizzatori amminici per reazione di *blowing*.



Esempio di complesso acqua-ammina
DABCO 33-LV (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane)

Figura 17. Complesso acqua-ammina.

Si rende necessario specificare che non esistono ammine selettive per i due processi e sarà compito dei fornitori effettuare studi sulla cinetica per evidenziare l'effetto che hanno su queste reazioni e quale potrebbe essere favorita.

Generalmente, il primo meccanismo di catalisi che avviene durante la sintesi di un poliuretano è l'attacco reversibile sul carbonio dell'isocianato da parte del doppietto elettronico libero sull'azoto amminico. Così si viene a formare un complesso attivato permettendo all'azoto dell'isocianato di reagire con un atomo di idrogeno appartenente al poliolo o all'acqua (Figura 18).

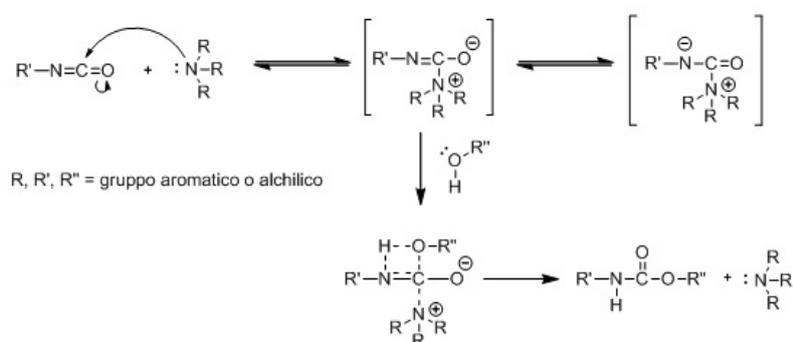


Figura 18. Meccanismo di catalisi isocianato-ammina

1.2.2.6 Apricelle

Ruolo fondamentale di queste sostanze è quello di aprire le celle per evitare che avvenga il fenomeno dello *shrinking* durante il raffreddamento. Le sostanze più utilizzate sono polioli polieterei ma anche di tipo siliconico, paraffinico e derivati di acidi grassi.

L'apertura delle celle dipende da numerosi fattori incluso la formazione di vapore, zone di differente pressione, formazione di urea, bilanciamento della catalisi e presenza di surfattanti. Il ritiro della schiuma è causato dalla presenza di celle a finestre chiuse. Con il raffreddamento accadono due eventi principali: la pressione interna del gas cala e l'anidride carbonica diffonde verso l'esterno del materiale molto più velocemente rispetto all'ingresso dell'aria. Ciò che si ottiene è una bassa pressione all'interno della schiuma e

il suo restringimento. Quindi punto critico è il bilanciamento tra viscosità e pressione intercellulare.

La stabilità delle bolle durante l'accrescimento è influenzata da numerosi fattori:

- Il surfattante.
- La velocità di formazione del gas.
- La viscosità.
- La pressione.

Durante la fase liquida si pone fra gli interstizi delle celle, le pareti delle celle si assottigliano sempre di più in corrispondenza delle zone a più alta pressione, mentre si formano dei plateau nelle zone a pressione minore. Le prime sono più soggette a rottura rispetto ai plateau.

1.2.3 Schiume poliuretatiche rigide

Questa tipologia di schiuma è stata introdotta per applicazioni prettamente industriali a partire dagli anni '50^[24]. Essi si possono ottenere mediante processi a singolo o doppio stadio, utilizzando toluene diisocianato (TDI) oppure metilene-bis-fenilisocianato (MDI)^[24].

Sono caratterizzate da una porosità di tipo chiuso e di fatto gli agenti espandenti non vengono solamente utilizzati come tali, ma intervengono sulle proprietà meccaniche del materiale stesso, in quanto rimane incluso nelle celle. La scelta dell'agente espandente dipende dall'applicazione finale del materiale e spesso si utilizza in combinazione con un agente fisico (ad esempio un gas) e un agente chimico (solitamente CO₂ derivante dalla reazione tra isocianato e acqua)^[18].

Le schiume poliuretatiche rigide possono essere distinte in:

- Schiume poliuretatiche prodotte dalla reazione tra isocianati con polioli a basso peso molecolare;
- Poliisocianurati (PIR, *foams*)^[24] sintetizzati a partire da quantitativi di isocianato più elevati rispetto ai rapporti stechiometrici ed in presenza di particolari catalizzatori a base di sali metallici. In

questo caso, si ha la formazione di gruppi isocianurati trimerici ciclici dovuti alla reazione dell'isocianato con sè stesso. Essi quindi contengono sia gruppi isocianurati sia uretano che aumentano la stabilità termica del materiale.

Il progressivo aumento nell'ambito industriale del loro utilizzo è da attribuire alla loro stabilità e resistenza all'acqua, oltre alla bassa conducibilità termica. I primi espansi rigidi introdotti a livello industriale presentavano una struttura a celle aperte, caratteristica che abbassava le proprietà isolanti di tali materiali. La soluzione si è trovata introducendo materiali con una struttura a celle chiuse, con conseguente impermeabilità all'acqua e riduzione di conducibilità termica, anche grazie all'agente espandente utilizzato in fase di sintesi^[24].

Per quanto concerne la densità, quella standard è compresa tra 25 e 60 Kg/m³, ma si possono raggiungere anche valori tre o quattro volte superiori^[19]. All'aumentare della densità^[19], aumentano le proprietà meccaniche quali resistenza a trazione, resistenza a compressione e modulo elastico che divengono fondamentali per quelle applicazioni che richiedono il supporto di carichi (Figura 19).

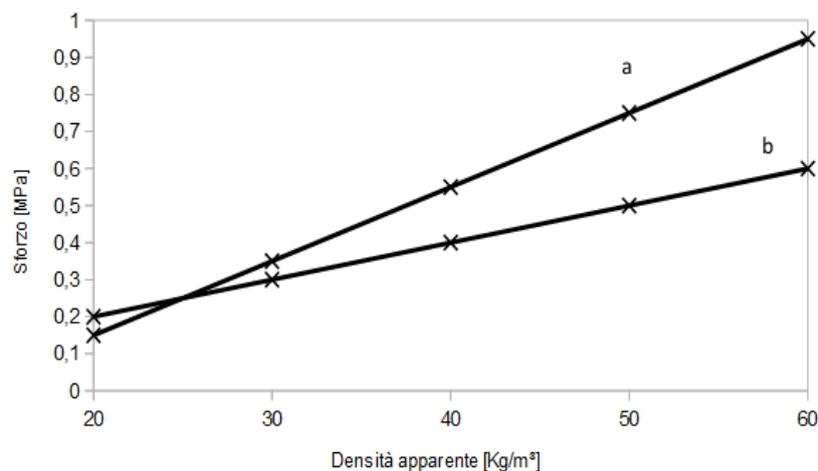


Figura 19. Relazione sforzo-densità apparente di una schiuma poliuretanic rigida:
a) sforzo di trazione; b) sforzo di compressione

1.2.4 Schiume poliuretaniche flessibili

Questa tipologia di schiume è caratterizzata da una morfologia a celle aperte e interconnesse, il cui volume è occupato per il 99% di aria^[20].

I polioli comunemente utilizzati sono ad elevato peso molecolare con una funzionalità compresa tra 2 e 6, mentre l'isocianato più utilizzato è il toluen diisocianato (TDI)^[18].

La scelta dei reagenti è fondamentale perchè essi influenzano le proprietà meccaniche finale del materiale, oltre alla formulazione e alla densità scelta.

La densità standard si aggira tra i 20 e 40 Kg/m³, anche se, per specifiche applicazioni, si possono realizzare materiali ultraleggeri o ultrapesanti (da 16 a 160 Kg/m³).

Si può effettuare anche un controllo sulla durezza variando i rapporti stechiometrici tra i reagenti. Oltre ad essa, altre proprietà caratteristiche delle schiume flessibili le si possono evincere dal ciclo di isteresi della curva sforzo-deformazione: la pendenza della curva di carico e l'area sottesa tra le curve di carico e scarico (isteresi) sono misure dell'elasticità e dell'energia assorbita (Figura 20).

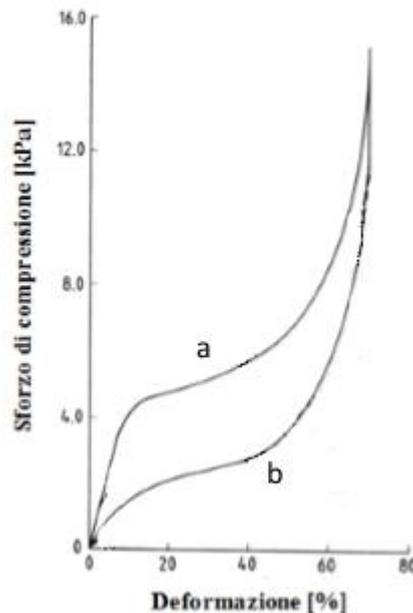


Figura 20. Esempio di ciclo di isteresi di una schiuma poliuretaniche flessibile
a) Curva di carico; b) Curva di scarico.^[18]

La conoscenza di questi parametri si rende fondamentale nella produzione di

schiume con proprietà adatte alla specifica applicazione.

Per un espanso con proprietà elastiche, la curva di carico approssima quella di scarico; al contrario, un'ampia area di isteresi indica dissipazione di energia^[19].

Capitolo 2

2.1 Poliuretani in ambito biomedicale

I poliuretani lineari sono i materiali polimerici più bio- ed emocompatibili conosciuti attualmente. Oltre a ciò, presentano capacità peculiari in ambito di resistenza a fatica e *compliance* e vedono un aumento significativo del loro utilizzo mediante metodi di modifica superficiale (ad esempio l'introduzione di ligandi o agenti anti coagulanti)^[25]. Perciò sono particolarmente adatti per impianti *in vivo* e a lungo termine.

Tra le applicazioni principali troviamo dispositivi cardiovascolari (ad esempio ventricoli artificiali, protesi vascolari di piccolo calibro o cateteri), membrane, tubi endotracheali e sacche per il sangue^[11].

Per quanto riguarda i biomateriali impiegati per la produzione di *scaffold* per l'ingegneria dei tessuti, essi sono progettati per andare incontro a biodegradazione con l'obiettivo di rigenerare un tessuto sano e funzionale. Negli ultimi anni l'attenzione si è spostata verso poliuretani espansi biodegradabili per la realizzazione di *scaffold* e sistemi per *drug-delivery*.

2.1.1 Composizione chimica

I poliisocianati maggiormente utilizzati per sintetizzare biomateriali uretanici biodegradabili impiegati per la produzione di *scaffold* sono elencati in Tabella 1.

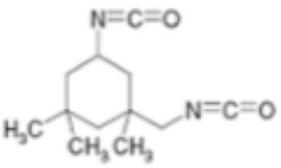
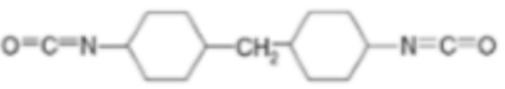
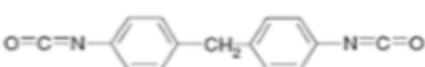
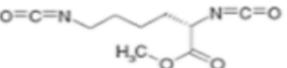
I più importanti isocianati alifatici includono dicitloesilmetano diisocianato (H₁₂MDI), esamtildiisocianato (HDI) e 1,4-butandiisocianato (BDI) mentre l'MDI (4,4'-difenilmetano diisocianato) è una molecola aromatica.

In aggiunta a questi monomeri tradizionali, sono state studiate nuove

molecole derivate dall'amminoacido lisina, come il lisina-metil-estere diisocianato (LDI)^{[7][20]}.

I poliuretani sintetizzati con poliisocianati alifatici danno luogo, come si evince da studi precedenti, *in vitro* e *in vivo* a prodotti di degradazione non citotossici; per quanto riguarda la citotossicità dei prodotti di degradazione derivanti da isocianati aromatici, ancora è in fase di dibattito in quanto l'idrolisi dei gruppi uretano ed urea possono dare luogo ad ammine aromatiche potenzialmente tossiche.

Tabella 1. Poliisocianati utilizzati per la sintesi di poliuretani biodegradabili^[17].

Nomenclatura Chimica	Struttura
1,6 Diisocianato esano (HDI)	
1,4 Butandiisocianato (BDI)	
Isoforone diisocianato (IPDI)	
Dicicloesilmetano diisocianato (H12MDI)	
4,4' Difenil diisocianato (MDI)	
Lisina-metil-estere Diisocianato	

Per quanto riguarda i polioli, la maggior parte dei poliuretani biodegradabili per la produzione di *scaffold* è realizzata con l'impiego di poliesteri e polieteri. Di seguito sono riportati i polioli maggiormente utilizzati, con un peso

molecolare compreso tra 400 e 5000 g/mole (Tabella 2).

I polioli a base di poliesteri, ottenuti mediante polimerizzazione di ϵ -caprolattone, glicolide e D,L-lattide, sono quelli più studiati per la loro nota proprietà di riassorbimento *in vivo*. Miscelando accuratamente questi poliesteri idrofobici con molecole idrofiliche (ad esempio il polietilenoossido, PEO) sono stati realizzati poliuretani con cinetiche di degradazione più rapide e proprietà superficiali favorevoli per l'adesione cellulare.

Sono oggetto di studio anche reagenti innovativi come il 1,4:3,6-dianidro-d-sorbitolo (Isosorbide)^[13], i cui componenti e derivati sono farmacologicamente attivi, soprattutto come vasodilatatori e agenti promotori della formazione ossea, per la sintesi di espansi poliuretani per la produzione di *scaffold* per la rigenerazione del tessuto osseo.

Tabella 2. Polioli utilizzati per la sintesi di poliuretani biodegradabili^[17]

Nomenclatura Chimica	Struttura
Poli(etilenoossido) (PEO)	$\text{HO}-\left[\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O} \right]_n-\text{H}$
Poli(propilene ossido) (PPO)	$\text{HO}-\left[\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O} \right]_n-\text{H}$
Poli(ϵ -caprolattone) (PCL)	$\text{HO}-\left[\left(\text{CH}_2 \right)_5 \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \right]_n-\text{O}-\left(\text{CH}_2 \right)_4-\text{O}-\left[\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C}-\left(\text{CH}_2 \right)_5 \right]_m-\text{OH}$
Poli(D,L-lattide)	$\text{HO}-\left[\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C}-\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \right]_m-\text{O}-\left(\text{CH}_2 \right)_4-\text{O}-\left[\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} \right]_m-\text{OH}$
Poli(glicolide)	$\text{HO}-\left[\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \right]_m-\text{O}-\left(\text{CH}_2 \right)_4-\text{O}-\left[\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C}-\text{CH}_2 \right]_m-\text{OH}$

2.2 Espansi poliuretanic biodegradabili per l'ingegneria dei tessuti

L'utilizzo di *scaffold* poliuretanic è stato studiato nell'ambito dell'ingegneria del tessuto cartilagineo^{[26][27]}, dei tessuti molli (ad esempio vasi ematici^{[28][29]} e fibre nervose^{[30][31]}) e per la rigenerazione del tessuto osseo in maniera preponderante^{[7][13][20][32][33]}.

2.2.1 Scaffold per la rigenerazione della cartilagine

Il tessuto cartilagineo è un tessuto connettivo di sostegno specializzato. È costituito da cellule dette condrociti, immerse in un'abbondante sostanza amorfa intercellulare, da essi stessi sintetizzata, formata da fibre collagene e da una matrice amorfa gelatinosa.

Le principali caratteristiche di questo tessuto sono la solidità, la flessibilità e la capacità di deformarsi limitatamente. La cartilagine forma la base per la maggior parte delle ossa dello scheletro umano, nonché nelle metafisi durante l'accrescimento corporeo (cartilagine di coniugazione), le quali successivamente verranno mineralizzate e sostituite da tessuto osseo. Nell'adulto la cartilagine permane in corrispondenza delle superfici articolari, nei dischi intervertebrali, nello scheletro del padiglione dell'orecchio esterno, a livello della sinfisi pubica e nei menischi articolari. Inoltre costituisce parte dello scheletro di sostegno delle vie aeree superiori e inferiori.

Si forma inoltre in seguito a fratture in qualsiasi fase della vita. In tutte le zone in cui è localizzata, fatta eccezione per le superfici articolari, la cartilagine è rivestita da un involucro costituito da tessuto connettivo denso fibroso detto pericondrio. La cartilagine non è vascolarizzata e non è innervata, la diffusione avviene invece attraverso la matrice. Le cartilagini vengono classificate in base alla quantità e alla costituzione della sostanza amorfa e in base alle fibre in essa presenti:

- Cartilagine ialina: è la varietà più diffusa di cartilagine e a fresco ha l'aspetto di una sostanza molto viscosa di colore bianco, traslucido e opalescente che permette il passaggio dei metaboliti,

i quali a loro volta nutrono i condrociti. È una cartilagine piuttosto elastica e con grande resistenza alla compressione. Permane a rivestire le superfici articolari e in alcune regioni come coste e anelli tracheali. Le sue cellule sono i condroblasti, i condrociti e i condroclasti, che sono collocati in cavità della sostanza amorfa dette lacune, le quali si originano per l'attività secernente dei condroblasti, infatti queste cellule secernendo i componenti della matrice circostante ne restano inglobati (Figura 20).

- Cartilagine fibrosa: può essere considerata una forma intermedia tra un tessuto connettivo denso e la cartilagine ialina, con il primo tipo di tessuto ha in comune la presenza di spessi fasci di fibre collagene di tipo I, con il secondo la matrice cartilaginea, che tuttavia risulta piuttosto scarsa. Essa non possiede pericondrio. Poiché possiede tratti comuni sia al tessuto connettivo che alla cartilagine, non si tratta quasi mai di un tessuto "a sé stante", ma continuo con entrambi. La cartilagine fibrosa è la costituente dell'anello fibroso dei dischi intervertebrali, della sinfisi pubica, delle zone di inserzione tra tendini e osso, dei menischi (Figura 21).
- Cartilagine elastica: ha un colore giallastro, dovuto alla presenza delle fibre elastiche (che sono anche definite fibre gialle) ed è opaca a differenza della cartilagine ialina. È la tipologia di cartilagine più elastica e flessibile, ciò è dovuto a una prevalenza della componente fibrosa rispetto a quella della matrice cartilaginea. Le fibre hanno struttura simile al tessuto connettivo denso elastico, per cui si ramificano in molte direzioni, non si aggregano in fasci, ma sono talmente dense da rendere invisibile la sostanza amorfa sottostante. Essa possiede pericondrio e forma il padiglione auricolare, la tuba uditiva e l'epiglottide (Figura 22).

A causa dell'assenza di vascolarizzazione, le aree danneggiate del tessuto cartilagineo mostrano scarse capacità autorigenerative. Una strategia alternativa al trapianto autologo di condrociti consiste nella realizzazione di

un dispositivo, formato da cellule seminate e coltivate su un espanso poliuretano, da impiantare nella porzione di tessuto interessata da lesione, in modo da consentire l'integrazione e la crescita con la cartilagine circostante. Il supporto per l'adesione e proliferazione dei condrociti potrebbe essere garantito dall'impiego di *scaffold* poliuretani porosi, inseriti appositamente nel sito d'impianto.

Ad esempio, sono state sintetizzate delle membrane poliuretaniche microporose a base di esametildiisocianato, policaprolattone e isosorbide diolo in tre diverse tipologie di costrutti (differente porosità) e sono stati utilizzati come substrati per la coltura in vitro di condrociti bovini; il tutto è servito per dimostrare che non vi è stata una rilevante differenza in termini di proliferazione cellulare e, di conseguenza, che l'utilizzo di poliuretani biodegradabili conduce a risultati comparabili con quelli ottenuti utilizzando materiali polimerici biodegradabili tradizionali^[34].

Quindi risulta evidente come il potenziale di questa classe di materiali biodegradabili come sostituti delle porzioni di periostio impiegate nel trapianto autologo di condrociti sia elevato e materia di studi futuri.

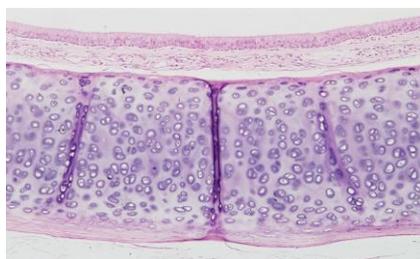


Figura 20. Cartilagine ialina della trachea



Figura 21. Cartilagine fibrosa

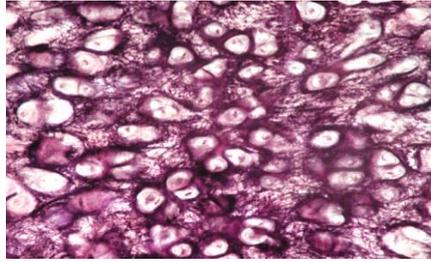


Figura 22. Cartilagine Elastica

2.2.2 Scaffold per la rigenerazione dei tessuti molli

Per tessuti molli si intendono tutte le tipologie di tessuti che non sia quello osseo, quindi si fa riferimento al tessuto epiteliale, connettivo, muscolare e nervoso.

I poliuretani espansi microporosi trovano applicazione come *scaffold* nell'ambito dell'ingegneria tissutale dei tessuti molli per il ripristino, ad esempio, di lesioni a vasi ematici o fibre nervose.

I vasi ematici sono i condotti sanguigni del sistema circolatorio adibiti al trasporto del sangue attraverso il corpo. Le tipologie più importanti sono le arterie, le vene, e i capillari che portano, rispettivamente, il sangue dal cuore al resto dell'organismo e viceversa.

I vasi sanguigni hanno la stessa struttura di base cioè una parete interna, che è detta endotelio ed è circondata da un tessuto connettivo subendoteliale. Attorno a questo si trova uno strato di muscolo vascolare liscio, che è particolarmente sviluppato nelle arterie. Infine, vi è un ulteriore strato di tessuto connettivo noto come l'avventizia, che contiene i nervi che servono lo strato muscolare, e i capillari per il trasporto dei nutrienti nei vasi più grandi. I vasi sanguigni non intervengono attivamente nel trasporto di sangue (non hanno una peristalsi apprezzabile), ma le arterie - e le vene in un certo modo - possono regolare il loro diametro interno mediante la contrazione dello strato muscolare. Questo cambia l'irrorazione del sangue agli organi, ed è determinato dal sistema nervoso autonomo. La vasocostrizione e la vasodilatazione sono anche usati antagonisticamente come metodi

di termoregolazione.

Nel settore vascolare, sono necessari costrutti con ottime proprietà elastiche e di resistenza meccanica per sopportare i continui cicli di carico ai quali sono sottoposti in ambiente fisiologico, oltre a profili di degradazione controllabili per permettere una corretta rigenerazione del tessuto *in vivo*.

Ad esempio, sono stati sintetizzati, mediante processo di separazione di fase termicamente indotta, *patches* cardiovascolari a base di butandiisocianato, policaprolattone e putrescina, con una porosità superiore all' 80%.

Gli *scaffold* sono stati utilizzati per colmare difetti trasmurali, realizzati chirurgicamente, a livello del tratto d'uscita del ventricolo destro su primo gruppo di animali, e protesi in politetrafluoroetilene (PTFE) sono state impiantate come controllo in un secondo gruppo^[35].

Successivamente, si è proceduto con la loro espianazione a intervalli di tempo regolari e ciò che è emerso, sui *patches*, è un aumento della proliferazione cellulare all'aumentare della permanenza della protesi all'interno dell'organismo. Quindi si può evincere come gli *scaffold* poliuretanicici abbiano fornito un supporto per la colonizzazione cellulare e siano apparsi quasi completamente riassorbiti dopo un lasso di tempo non troppo prolungato, dimostrandosi adeguati per la cura di traumi o lesioni del sistema cardiovascolare.

Per quanto riguarda le fibre nervose, sono strutture che costituiscono i nervi del sistema nervoso periferico formati da fasci di assoni (provenienti da un gruppo di neuroni) che trasportano informazioni da o verso il sistema nervoso centrale. Il nervo contiene, inoltre, vasi sanguigni utili al rifornimento di ossigeno e nutrienti. In esse sono presenti guaine di tessuto connettivo che si fanno via via più piccole, ricoprendo prima l'intero nervo poi fasci e fascetti di assoni (epinervio, perinervio ed endonervio). Il loro colore può variare dal bianco al grigio, a seconda della prevalenza di fibre mieliniche o amieliniche. I nervi possono essere efferenti ossia motorie (quando trasmettono impulsi dal sistema nervoso centrale alla periferia) oppure afferenti ovvero sensitive (quando trasmettono gli stimoli sensoriali dagli organi periferici al sistema nervoso centrale) ma possono contenere fibre efferenti, afferenti o entrambe

(in caso di nervi misti).

Esistono due tipi principali di nervi: encefalospinali e del sistema autonomo. I nervi encefalospinali (o somatici) partono dal sistema nervoso centrale e si distribuiscono ai distretti superficiali e scheletrici del corpo. I nervi del sistema nervoso autonomo (o nervi viscerali) si distribuiscono, invece, nella muscolatura liscia, nei visceri, nei vasi, nelle ghiandole e nel cuore.

E' noto come il sistema nervoso periferico abbia capacità autorigenerativa e gli assoni siano in grado di rigenerarsi, prendendo in riferimento una lesione ridotta. In presenza, invece, di traumi di natura più ampia, risulta necessaria l'applicazione di guide tubulari per la rigenerazione guidata del tessuto, al fine di assicurare una corretta riconnessione tra i prolungamenti citoplasmatici assonici.

Nello studio condotto da Hsu S. *et. al*^[45], sono stati selezionati poliuretani biodegradabili per ottenere la giusta flessibilità, resistenza e grado di degradazione adatte per la ricrescita delle fibre nervose. La loro realizzazione è avvenuta per mezzo di una dispersione acquosa, nella quale la parte solida può essere controllata per ottenere diverse porosità a seconda degli utilizzi. In questo caso, si ha optato per una porosità asimmetrica che ha permesso di avere un'alta permeabilità delle cellule presenti. Di fatto, la porosità gioca un ruolo essenziale, in quanto deve permettere la mielinizzazione degli assoni e pori troppo piccoli possono ostacolare il processo, riducendo al minimo il loro grado di interconnessione. Le proprietà meccaniche misurate su tali campioni però sono molto inferiori rispetto a quelle dei dispositivi utilizzati abitualmente per la ricostruzione guidata del tessuto nervoso mediate nanotubi.

2.2.3 Scaffold per la rigenerazione dei tessuti ossei

Il tessuto osseo è un tessuto biologico costituito da cellule disperse in un'abbondante matrice extracellulare. Esso è formato da fibre, da una sostanza amorfa di natura glicoproteica e da sostanze minerali.

La sua particolare struttura e la composizione chimica lo rendono un tessuto

biologico con elevate proprietà meccaniche.

Nell'osso si possono distinguere due parti: una più esterna compatta (Figura 23 a) e una seconda più interna spugnosa (Figura 23 b), leggera ma in grado di resistere a tensioni molto elevate. La parte fibrosa è formata da fibre di collagene intrecciate tra loro in modo più o meno ordinato che prendono il nome di lamelle. A seconda dell'organizzazione strutturale di queste ultime, il tessuto osseo è classificabile in:

- Ossa non lamellari: tipologia ossea riscontrabile nel feto o presente temporaneamente a seguito di una frattura. In esse, le cellule di collagene non si organizzano in lamelle stratificate ma si posizionano in spessi fasci intrecciati. All'interno di essi saranno presenti anche delle lacune disperse in modo irregolare nella matrice. (Figura 23 c)
- Ossa lamellari: tipologia riscontrabile nell'adulto. È costituito da strati di lamelle parallele sovrapposte le une sulle altre. In ogni strato il collagene è orientato nella stessa direzione delle lamelle vicine. (Figura 23 d).

A livello macroscopico, le ossa possono essere classificate in tre tipologie:

- Ossa lunghe: caratterizzate da una dimensione più sviluppata rispetto alle altre due, come ad esempio il femore o l'omero. Queste tipologie di ossa sono costituite da una parte centrale, detta Diafisi, e da due estremità dette Epifisi (Figura 23 e).
- Ossa piatte: caratterizzate da due dimensioni più sviluppate rispetto alla terza, come ad esempio la scapola o la calotta cranica (Figura 23 f).
- Ossa corte: sono piccole e tozze con tutte e tre le dimensioni dello stesso ordine di grandezza come ad esempio le vertebre o le ossa del carpo (Figura 23 g).



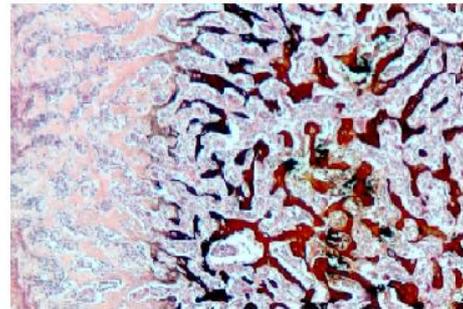
a) Tessuto Osseo Compatto



b) Tessuto Osseo Spugnoso



c) Osso lamellare



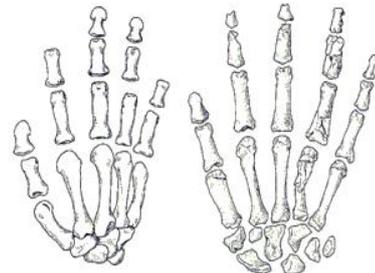
d) Osso non lamellare



e) Osso lungo



f) Ossa piatte



g) Ossa corte

Figura 23. Tipologie di ossa

In un individuo adulto, la componente minerale costituisce circa il 65% del peso secco del tessuto osseo. Tale componente minerale è costituita principalmente da calcio, combinato con ossigeno, fosforo e idrogeno, a formare una molecola cristallina detta idrossiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), un composto minerale che forma sottili cristalli a forma di prismi. È importante notare come le diverse componenti della matrice, quella organica e quella minerale, conferiscano proprietà diverse ed interdipendenti al tessuto: la frazione calcificata è responsabile della durezza dell'osso, mentre quella

fibrillare è responsabile della flessibilità e, dunque, della robustezza e della resistenza alla trazione del tessuto.

Il tessuto osseo è composto da cellule di diversa tipologia e dalla matrice. Le cellule fondamentali del tessuto osseo sono:

- Osteoblasti: cioè cellule di forma tondeggianti che derivano dalla differenziazione delle cellule osteoprogenitrici, ossia cellule staminali determinate che rappresentano una prima differenziazione delle cellule mesenchimali. Essi sono caratterizzati da un reticolo endoplasmatico rugoso e di un apparato di Golgi molto esteso e responsabili della loro basofilia citoplasmatica. Sono costantemente impegnati nella sintesi dei componenti molecolari che andranno a costruire sia le fibre sia le glicoproteine della matrice. Tali sostanze poi vengono espulse dagli Osteoblasti mediante esocitosi e quindi poi verranno assemblati nella loro forma definitiva all'esterno della cellula. Una volta completata la sintesi della matrice, e dopo calcificazione, gli Osteoblasti si sistemano in cavità non mineralizzate della matrice stessa. In questa fase prendono nome di Osteociti ed entrano quindi in una fase di quiescenza.
- Osteoclasti: tipologia di cellule dedite alla produzione di enzimi che andranno poi a degradare la matrice calcificata permettendo così il riassorbimento dell'osso. Si rendono quindi fondamentali sia nel processo di crescita dell'osso, sia per permettere una successiva rimodellazione dell'osso stesso. Nel primo caso, infatti, è necessaria la sostituzione del tessuto osseo immaturo (non lamellare) in tessuto osseo maturo (lamellare).

Per quanto riguarda la matrice, essa è di natura proteica prodotta da cellule presenti nel tessuto stesso; presenta una porzione di natura organica, tipico dei tessuti connettivi, e da una parte minerale calcificata.

La frazione organica della matrice ossea è formata da una componente fibrillare (fasci di fibre intrecciati) e da una componente amorfa di natura proteoglicanica. Ciò che realmente prevale nella matrice è il collagene di tipo

I, formando appunto le fibre.

Altri componenti della matrice sono le glicoproteine con il ruolo di proteine di adesione; di particolare interesse possono essere l'osteocalcina, coinvolta nella sintesi del tessuto osseo, e l'osteonectina, che promuove la mineralizzazione della matrice stessa.

La presenza di traumi, degenerazioni patologiche, osteoporosi, perdita di potenzialità rigenerativa e deformazioni congenite richiedono applicazioni cliniche per il riparo o la sostituzione del tessuto osseo. Le terapie cliniche, attualmente, si basano sull'impiego di sostituti artificiali come ceramiche, oppure innesti di tessuto osseo provenienti dallo stesso paziente (*autograft*), da tessuti prelevati da cadaveri (*allograft*) o da una specie di animale diversa da quella umana (*eterograft*)^[36].

Nonostante il trapianto autologo sia la soluzione più impiegata grazie all'elevato potenziale osteoinduttivo, spesso esso non è realizzabile a causa di una patologia estesa ai potenziali siti donatori o per la scarsità di tessuto disponibile al prelievo.

L'obiettivo principale degli *scaffold* per tessuto osseo è quello di colmare le lacune ossee attraverso l'utilizzo di cellule autologhe (staminali mesenchimali o osteoblasti, coltivati ed espansi *in vitro* ad esempio) seminate al suo interno, oppure indurre la migrazione dei tessuti circostanti nella fase successiva all'impianto, per guidare la rigenerazione di un tessuto funzionale^[36].

Ovviamente, anche i poliuretani trovano impiego in questo ambito, rappresentando quindi dei validi sostituti ai *graft* per la rigenerazione del tessuto osseo.

Capitolo 3

3.1 Degradazione dei poliuretani in ambiente fisiologico

La cinetica di degradazione del materiale è responsabile della produzione di prodotti di degradazione potenzialmente dannosi che potrebbero generare una reazione indesiderata da parte dell'organismo.

L'analisi dei fenomeni di degradazione dei poliuretani in ambiente fisiologico risulta molto complessa, perchè esistono numerose cause che influenzano questi meccanismi, come ad esempio un attacco chimico, enzimatico, batterico e azioni meccaniche che possono condurre a degradazione di tipo ossidativo o idrolitico^[37].

Il meccanismo di degradazione dei poliuretani non dipende solamente dalla struttura chimica del PU stesso, ma anche dall'ambiente in cui esso si trova, ad esempio in presenza di acqua, condizioni alcaline, acide o ossidative, o anche in presenza di enzimi.

La degradazione accelerata è di largo utilizzo per determinare la stabilità dei poliuretani non degradabili e per determinare il comportamento di quei materiali definiti riassorbibili dall'organismo.

Le principali tecniche di valutazione della degradazione dei biomateriali può essere divisa in:

- **Analisi superficiali:** utile per l'osservazione delle modifiche che si verificano nella prima parte della degradazione. Un esempio è la spettroscopia infrarossa o la misura dell'angolo di contatto
- **Analisi strutturali:** adatte alla caratterizzazione del campione negli stadi finali di degradazione. Un esempio sono la determinazione della variazione del peso molecolare, le proprietà meccaniche e la temperatura di transizione.

Come si evince da alcuni studi precedenti, tramite la composizione dei poliesteri di partenza è possibile controllare la cinetica di degradazione *in vitro*, e si è anche osservato come il poliuretani con segmenti *soft* amorfi si degradino più rapidamente rispetto a quelli semi-cristallini^[17]. In maniera analoga, i poliuretani realizzati con macrodioli idrofilici^{[12][22]} mostrino elevati valori di *water uptake* (assorbimento di acqua), responsabili dell'incremento della velocità di riassorbimento.

Quindi risulta molto evidente come a seconda dei reagenti utilizzati, i prodotti di degradazione possano essere differenti tra loro.

Altrettanto ovvia è la possibilità di progettare dei materiali *ad hoc* in modo che possano subire una tipologia di degradazione piuttosto che un'altra. L'esempio è la realizzazione di poliuretani lineari biodegradabili partendo da butandiisocianato, da un poliolo copolimero a blocchi e da un peptide utilizzato come estensore di catena. I segmenti *hard* del polimero sono stati appositamente realizzati per incorrere in degradazione enzimatica, sfruttando quindi la specificità di un particolare enzima per la rottura di alcuni legami^[38]. In queste condizioni, si è verificata una cinetica di degradazione *in vitro* molto più rapida rispetto a quella registrata in solo ambiente acquoso, con conseguente verifica dell'assenza di citotossicità dei prodotti di degradazione. Analizzando ora gli espansi poliuretanicici, le proprietà chimiche di idrofilicità e le proprietà morfologiche come la dimensione media dei pori e l'interconnessione tra essi, determinano la quantità di solvente assorbito e di conseguenza la cinetica di degradazione in sé. Il fenomeno di degradazione risulta influenzato anche dal rapporto tra i componenti idrofilici e idrofobici che costituiscono il materiale, quindi in maniera diretta dipende dalla scelta dei reagenti di partenza. In aggiunta, una porosità aperta consente al solvente di entrare in contatto con una superficie maggiore del supporto, incrementando così le zone soggette a idrolisi.

I poliuretani possono anche incorrere a fenomeni di ossidazione (in particolare i poliuretani a base di poliuretano-uretani) e sono stati identificati fenomeni di auto-ossidazione (AO, *Auto Oxidation*) e fenomeni di ossidazione indotta da ioni metallici presenti nel luogo di impianto (MIO, *Metal Ion Oxidation*)^[37]. Nell'auto-ossidazione è evidente come questa

tipologia di degradazione porti all'adesione e attivazione di cellule fagocitiche (macrofagi), richiamati nel sito d'impianto durante la reazione infiammatoria da corpo estraneo nel sito d'impianto.

Entrambi i meccanismi inducono quindi alla formazione di microfessurazioni, in particolare in *AO* si presentano delle lesioni superficiali, mentre in *MIO* si hanno delle cricche profonde a carico dell'intera struttura polimerica.

Se invece il materiale subisce stress meccanici (da processi di lavorazione e di trasformazione dei materiali) è possibile che il fenomeno di auto-ossidazione si trasformi in *enviromental stress cracking* (ESC – si intende la trasformazione delle piccole fessure generate da auto-ossidazione in cricche profonde che interessano non solo la superficie), con estensione delle fessurazioni superficiali fino al danneggiamento completo del materiale.

Per il controllo della cinetica stessa di degradazione sono state elaborate numerose tecniche, tra cui l'utilizzo di agenti chimici antiossidanti sintetici, anche se negli ultimi anni sono stati sostituiti da composti naturali vista la possibilità di avere prodotti di degradazione tossici per le cellule.

3.2 Principali tecniche di caratterizzazione degli *scaffold* poliuretanic

Durante la fase sperimentale per la realizzazione di supporti con lo scopo di intervenire nella ricrescita di un tessuto, è necessario che il campione venga completamente caratterizzato, quindi che venga sottoposto a varie tipologie di test per verificarne il comportamento nelle situazioni che potrebbero verificarsi una volta impiantato *in vivo*.

I principali test effettuati sui campioni sono:

- Test di invecchiamento *in vitro*.
- Test di calcificazione *in vitro*.
- Test di citocompatibilità *in vitro*.
- Studi sulla biocompatibilità *in vivo*.

3.2.1 Test di invecchiamento in vitro

Lo studio delle proprietà di biodegradabilità dei materiali polimerici è normalmente condotto attraverso prove di invecchiamento in vitro, in cui risulta importante l'utilizzo di soluzioni acquose a base di PBS (*phosphate buffered saline*) che simulano le condizioni fisiologiche a cui dovranno essere sottoposti i materiali una volta impiantati.

Tali esperimenti però possono fornire risultati differenti rispetto a quelli ottenibili con prova *in vivo*, nelle quali la cinetica di degradazione del materiale risulta più rapida a causa della presenza di fluidi biologici circolanti e di cellule metabolicamente attive^{[7][32]}.

Questi test possono essere condotti sia in modalità pseudodinamica, sia in maniera statica. Nel primo caso la soluzione *buffer* viene sostituita dopo un lasso di tempo prestabilito, mentre nel secondo il mezzo non viene sostituito fino a fine esperimento in modo da poter monitorare il comportamento stesso del materiale a tale condizioni.

3.2.1.1 Effetto della temperatura sulla cinetica di degradazione^[38]

Lo studio della degradazione termica dei poliuretani è usata nell'ambito biomedicale soprattutto per analizzare la composizione e la stabilità del materiale rimanente dopo l'idrolisi e ossidazione del supporto oltre che a determinare il rapporto tra segmenti *soft* e *hard*. La motivazione logica è che il materiale impiantato non sarà mai soggetto ad alte temperature.

Ma questa tipologia di caratterizzazione trova la sua importanza nella realizzazione stessa del materiale, in quanto conoscendo tali informazioni è possibile ottenere materiali altamente performanti che saranno quindi stabili e vedranno una significativa riduzione di composti di degradazione potenzialmente tossici. Infatti, se non sono realizzati nel modo corretto, il poliuretano può generare prodotti tossici per l'organismo.

È noto come tale tipologia di polimero non sia stabile alle alte temperature e la degradazione del legame uretano dipenda dal tipo di isocianato utilizzato, oltre che dal diolo.

Generalmente la degradazione termica avviene a causa di tre diversi meccanismi:

- 1) Dissociazione del legame uretanico nei componenti iniziali (isocianato e alcol)
- 2) Rottura del legame uretanico con formazione di ammina primaria, anidride carbonica e olefine;
- 3) Rottura del legame uretanico e trasformazione in ammina secondaria e anidride carbonica^[38].

3.2.1.2 Comportamento a idrolisi^[38]

La degradazione dei segmenti poliuretanicici mediante idrolisi non dipende soltanto dalla composizione chimica dei segmenti *soft*, ma anche dalla chimica di quelli *hard*. Condizione necessaria affinché vi sia degradazione idrolitica è l'assorbimento di acqua, infatti il tipico test di degradazione idrolitica consiste nella quantità di acqua assorbita in relazione alla perdita di peso. Un abbassamento del peso può comportare una perdita delle proprietà meccaniche e quindi dell'efficienza dello *scaffold* stesso.

Ad esempio, sono stati condotti dei test su varie tipologie di poliuretani in commercio utilizzati nell'ambito cardiovascolare. La degradazione è stata condotta in acqua o un buffer alcalino (pH 10) a diverse temperature e diverse tempistiche. Dopo l'idrolisi si è riscontrata una diminuzione del peso molecolare senza però andare a modificare la caratteristica in trazione del campione stesso.

Particolare importanza la assume l'estensore di catena, soprattutto nella degradazione e nella cinetica stessa. Di fatto può essere scelto *ad hoc* per andare a neutralizzare il pH degli ambienti in cui sono situati. Ad esempio, l'utilizzo di un *chain extender* alcalino può neutralizzare l'acidità, l'idrofilicità e la sensibilità idrolitica dei legami chimici presenti così da rallentare, almeno in parte, la degradazione.

3.2.1.3 Comportamento a Ossidazione

Alcune tipologie di poliuretani, in particolare i polieteri-uretani, incorrono a degradazione dovuta a processi di ossidazione, verificabili in particolari condizioni ambientali in cui potrebbero potenzialmente trovarsi.

Prendendo come riferimento lo studio effettuato da Weems A.C *et al.*^[43], i composti poliuretanicici utilizzati sono stati sottoposti a degradazione ossidativa indotta, mediante il trattamento dei campioni con due tipologie di soluzioni: NaOH 0,1 M (soluzione idrofila) e H₂O₂ al 3% (soluzione ossidativa), alle quali è stato aggiunto CoCl₂ (Cloruro di cobalto) come catalizzatore del processo.

I campioni sono stato ottenuti a partire da: Esametilen diisocianato (HDI), Trimetil esametilen diioscianato (TMHDI) e Isoforone diisocianato (IPDI).

Mediante l'esposizione dei campioni alle soluzioni, si è potuto constatare una significativa perdita di massa da parte dei supporti a contatto con la soluzione ossidativa (H₂O₂), ma i primi dati apprezzabili sono stati riscontrati solo dopo qualche giorno dall'inizio dello studio. La completa perdita di massa si è ottenuta con una soluzione ossidativa catalizzata in meno di un mese e si è potuto dimostrare come all'aumentare della densità di *cross-linking* all'interno dello *scaffold* possa incrementare la stabilità in ossidazione, con conseguente aumento del tempo necessario affinché avvenga il danneggiamento; infatti, HDI è degradato in 9 giorni, TMHDI in 20 e IPDI in circa 28 giorni. Analizzando le evidenze al SEM (Figura 24), è evidente come il materiale incorra in un collasso e le superfici siano completamente distrutte o comunque fortemente danneggiate.

In riferimento alla porosità, i campioni che hanno mostrato una degradazione più lenta sono stati quelli con pori larghi, a differenza di quelli a porosità più ristretta in accordo con la quantità di superficie che è entrata in contatto con la soluzione. Questo comportamento è dovuto alla presenza di pareti molto sottili (membrane), che possono consentire la formazione di gradienti di concentrazione prima della relativa perforazione e successiva rimozione di esse. Allo stesso tempo, i radicali idrossilici delle soluzioni di degradazione danneggiano anche la struttura interna che, alla fine, comporta il crollo completo del materiale.

Analizzando poi i prodotti di degradazione, si ha la formazione di gruppi carbonili liberi in presenza di legami uretano ed urea che si trasformano in ammine. Il tempo per la formazione di ossidi di ammina, che vengono poi consumati durante la rottura, identifica il lasso di tempo iniziale nel quale vi è una totale assenza di perdita di massa. Quest'ultima comincia quando le ammine terziarie sono state completamente consumate e vi è una progressiva formazione di ammine secondarie e primarie.

Solo dopo che le ammine residue si ossidano, comincia la scissione della catena polimerica e quindi il successivo decremento del peso del campione. La maggior parte delle ossidazioni che hanno luogo in questo contesto generano prodotti di degradazione formati da piccole molecole.

Tra le molecole generate in degradazione vi sono le aldeidi che aumentano drasticamente l'adesione del supporto al tessuto.

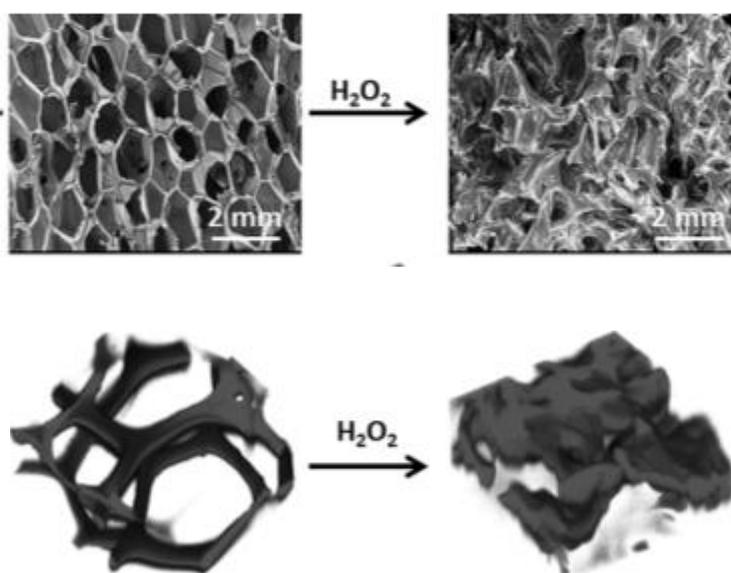


Figura 24. In alto immagine al SEM dell'effetto di H₂O₂ sulla struttura polimerica. In basso vi è una ricostruzione in rendering in 3D di tale processo

3.2.2 Test di calcificazione in vitro

È noto come i poliuretani possano incorrere a calcificazione *in vivo* e, benché siano fenomeni da evitarsi per dispositivi a contatto col sangue, essa può divenire invece fondamentale per quanto concerne la ricrescita del tessuto

osseo.

Il supporto ideale per la rigenerazione del tessuto osseo deve necessariamente promuovere la calcificazione di tessuto nuovo su di esso. L'abilità di supportare e permettere ai cristalli di fosfato di calcio di potersi depositare ed aggregare su di esso è una qualità unica per i poliuretani, il che li contraddistingue da tutti gli altri materiali polimerici.

Il meccanismo esatto su come possa avvenire questo processo è ad oggi sconosciuto, ma si può ipotizzare che sia scatenato dall'interazione del poliuretano con gli ioni calcio e fosforo contenuti nel sangue o in altri fluidi corporei. Ciò che determina quindi il processo di calcificazione include fattori riguardanti il metabolismo dell'organismo, il tempo di impianto, la struttura e la chimica dello *scaffold*.

La formazione di Calcio Fosfato cambia nel tempo; inizialmente si creano dei sali amorfi di Fosfato di Calcio che poi si trasformano in prodotti intermedi fino a giungere all'idrossiapatite, sostanza costitutiva del sistema osseo^[39].

Un ruolo importante nella calcificazione *in vitro* lo assume l'idrofilicità del materiale e la presenza di *ether oxygen*. Infatti nel caso di poliesteri-uretani idrofobici, la calcificazione avviene solamente sulla superficie che è a diretto contatto con i fluidi corporei. Nel caso, invece, di polieteri-uretani idrofilici, il processo interessa non solo la superficie, ma il polimero nella sua interezza^[39].

Sono stati condotti numerosi studi in merito alla correlazione tra idrofilicità e calcificazione ed in uno di essi è stato dimostrato come il tessuto osseo appena formato su un supporto poliuretano, con un elevato contenuto di componenti idrofilici, presenti una più alta concentrazione di minerali costituenti le ossa stesse rispetto a un supporto con un più basso contenuto di prodotti idrofilici^[40].

Prendendo come riferimento una struttura porosa, è stato dimostrato come l'alto grado di porosità e la struttura a celle aperte faciliti la penetrazione di una soluzione con lo scopo di simulare i fluidi corporei, rendendo quindi la distribuzione dell'apatite regolare. Il depositarsi di fosfati è notevolmente dipendente dall'estensione della superficie dello *scaffold* utilizzato e ogni fessura stimola la nucleazione dell'apatite.

Quindi *scaffold* con una dimensione dei pori elevata incorrono a calcificazione mentre quelli con porosità ridotta mostrano una scarsa propensione a tale fenomeno^[39].

Vi sono numerose tecniche per promuovere il fenomeno della calcificazione e numerosi studi trattano tecniche diverse ma con uno scopo comune: la realizzazione di tessuto osseo funzionale su uno *scaffold* o su un supporto estraneo all'organismo.

Un metodo è quello di trattare il supporto con il PEG (polietilen glicole) che fornisce gruppi eteri ed aumenta l'idrofilicità del poliuretano trattato. Il PEG è stato incorporato nella catena polimerica del PU (quindi ottenendo un PHB-HDI), con conseguente aumento di idrofilicità superficiale e interna che ha incentivato il deposito di Fosfato di Calcio senza che fossero necessari altri trattamenti^[41] (Figura 24).

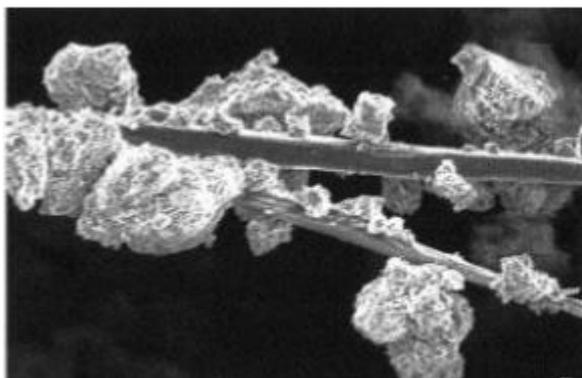


Figura 25. Immagine al SEM di calcio fosfati presenti sulla superficie di poliuretani con un elevato contenuto di segmenti idrofilici.

3.2.3 Test di citocompatibilità *in vitro*

I test di citocompatibilità *in vitro* sono fondamentali per valutare la risposta cellulare nei confronti degli *scaffold* poliuretanicici impiantabili ed eventualmente biodegradabili sintetizzati. Particolare attenzione la assumono, ovviamente, i prodotti di degradazione e la reazione delle cellule alla loro esposizione.

Prendendo come esempio gli *scaffold* per la ricrescita del tessuto osseo, è necessario siano non tossici e biocompatibili. Tali proprietà non dipendono

solamente dalle sostanze di partenza con le quali si è realizzato il supporto, ma anche dal catalizzatore il quale, per l'utilizzo medico, è materia di discussioni. Da una parte, un catalizzatore incrementa la velocità di sintesi del prodotto finale, aumentando anche la massa molecolare e le proprietà meccaniche. Dall'altra si ha la potenziale tossicità di tali sostanze, con conseguente effetto negativo sulle cellule impiantate nello *scaffold* stesso.

Sono stati inoltre presi in considerazione poliuretani biodegradabili e si è proceduto con una valutazione sulla citocompatibilità *in vitro* con diverse linee cellulari di derivazione umana.

Si è potuto quindi osservare come le cellule siano penetrate per circa 5 mm all'interno dello *scaffold* dopo circa 21 giorni^[21] e che quindi la porosità abbia giocato un ruolo chiave in tale processo.

Considerando invece *scaffold* per la ricrescita o sviluppo di tessuto muscolare, nello studio condotto da Vannozzi L. *et al.*^[42] è stata utilizzata un'immagine di fluorescenza per osservare la differente adesione cellulare su ogni tipologia di campione analizzato. La concentrazione di mioblasti nei pori dello *scaffold* cresce all'aumentare della porosità, della larghezza dei pori, rugosità e rigidità. Mediante immagini SEM è stato possibile osservare l'interazione cellule-superficie che si traduce in una diversa morfologia cellulare. Le cellule sono risultate ben diffuse e appiattite in campioni con una superficie irregolare, mentre la loro forma era tendente a una forma globulare all'aumentare del grado di *cross-linking* del materiale.

Le differenze nella morfologia delle cellule permettono di valutare qualitativamente il grado di adesione delle cellule, poiché la maggior parte delle cellule a forma globulare sono presenti laddove si presentino ambienti non aderenti.

La citotossicità dei campioni utilizzati è stata valutata mediante la concentrazione di LDH (*lactate dehydrogenase*) contenuto nel supernatante in ognuno di essi. Tutti i materiali hanno dimostrato un indice di citotossicità molto basso rispetto al campione di controllo, nel quale la citotossicità è stata indotta e considerata del 100%. Se fosse stato superiore al 10%, sarebbe probabilmente dovuto alla presenza di prodotti di degradazione tossici.

La letteratura riporta come le cellule del muscolo scheletrico siano stimulate

nella crescita da superfici micro-rugose che ne permettono l'adesione e la differenziazione, sottolineando l'effetto positivo del controllo dell'irregolarità della superficie del materiale per il loro sviluppo.

Da queste trattazioni si evince come a seconda della linea cellulare utilizzata e quindi, in maniera diretta, a seconda dello scopo di utilizzo del supporto poliuretano, vi sia una stretta correlazione con la morfologia stessa del campione, che dovrà essere quindi realizzato *ad hoc* per permettere una proliferazione cellulare, garantendo quindi una bassa citotossicità.

Prendendo come riferimento lo studio condotto da Weems A.C. *et al.*^[43], dal processo di degradazione *in vitro* si sono potuti determinare, attraverso analisi specifiche, quali possano essere i prodotti di degradazione ossidativa subita dai campioni. Si ha una rapida formazione di Acidi Carbossilici con la compresenza di aldeidi. Queste ultime incrementano l'adesione del materiale al tessuto ed in quel caso particolare, si ha che l'ossidazione del materiale produce aldeidi e ammine di piccole dimensioni. L'aumento di adesione, abbinata a una elevata porosità, dimostra come vi sia una elevata compatibilità del materiale considerato, sebbene comunque non vi sia la certezza completa e che tutti i prodotti di degradazione siano tollerati.

Nello studio condotto da Gerges I. *et al.*^[45], sono state effettuate delle prove di citocompatibilità *in vitro* utilizzando delle linee cellulari di MG63 (linea cellulare derivante da osteosarcoma umano – simili alle cellule umane) e BMSC (linea cellulare derivate da midollo osseo umano). Entrambe le linee cellulari sono state impiantate sui vari *scaffold* poliuretano presi in considerazione nello studio, entrambe con l'obiettivo di raggiungere una densità cellulare ben precisa.

Gli studi preliminari sono stati eseguiti con MG63, cioè cellule simili a quelle delle ossa umane, per valutare la capacità degli *scaffold* di promuovere l'adesione, proliferazione e determinare un protocollo da seguire per la linea cellulare BMSC. Dopo un giorno, le cellule sono distribuite in maniera omogenea, adese correttamente, vive e caratterizzate da una forma circolare con filamenti allungati che si diramavano nello spazio circostante.

Al decimo giorno vi era una vera e propria proliferazione cellulare, tanto da coprire tutta la superficie disponibile con uno strato unico e una prevalenza sostanziale di cellule vive rispetto a quelle morte. Oltre a ciò, la forma delle cellule ha subito una progressiva modifica, cioè da cellule a forma circolare si è passati lentamente ad avere delle cellule appiattite con una morfologia simile a quella dei fibroblasti. Con un'immagine ad alta risoluzione, concentrata sui bordi dei pori, si è potuto constatare come ci fosse un elevato grado di interconnessione tra cellule vicine, permettendo quindi l'interazione e la comunicazione tra di esse.

Successivamente si è passati all'analisi della linea cellulare BMSC. Il primo giorno si è potuto osservare come si siano distribuite uniformemente e fossero ben diffuse sulla superficie dello *scaffold*.

Infatti, si è potuto osservare come le cellule abbiano ricoperto il supporto e abbiano iniziato a colonizzare la parte più interna dei pori e a penetrarvi all'interno.

Dopo 14 giorni, la vitalità delle cellule è rimasta pressoché invariata, a significare come vi sia una presenza di cellule vive maggiore rispetto a quelle morte. Si è verificata una modifica della morfologia delle cellule, iniziata con una forma circolare al primo giorno e terminata con una forma allungata ad indicare la forte adesione sul supporto. Anche in questo caso, l'interconnessione tra cellule adiacenti risulta essere molto alta. Il tutto a dimostrare che quella tipologia di supporto ha permesso alle cellule di aderirvi, proliferare e iniziare quindi la progressiva realizzazione di tessuto *ex-novo*.

Sono state sviluppate numerose tecniche per incentivare la bioattività dei poliuretani, ad esempio l'introduzione all'interno della catena di biomolecole^[39], con lo scopo di aumentare l'attività biologica. L'utilizzo di 1,4:3,6-dianidro-D-sorbitolo (SB), dimostrato essere farmacologicamente attivo, promuove la formazione di tessuto osseo^[42].

L'introduzione di acido ascorbico (AA) nella catena polimerica può essere responsabile della stimolazione della secrezione di cellule di collagene di tipo I da parte di cellule OPC (*cellule* precursori di oligodendrociti) di topo o

dell'incremento della proliferazione di osteoblasti con conseguente creazione di tessuto osseo.

Per quanto concerne le modifiche superficiali, esse sono largamente utilizzate per incrementare la compatibilità cellulare e promuoverne la proliferazione sugli *scaffold* poliuretanic. Questo effetto può essere ottenuto trattando la superficie con peptidi *cell-binding* come collagene, fibronectina o laminina.

3.2.3.1 Comportamento all'azione enzimatica

Particolare importanza l'assume la reazione degli *scaffold* impiantabili all'azione enzimatica, mirata alla creazione delle condizioni ambientali il più simile possibile a quelle fisiologiche all'interno del corpo umano.

Sono stati effettuati numerosi studi al riguardo, con altrettanti materiali diversi che hanno mostrato comportamenti più o meno simili.

Nello studio condotto da Hafeman *et al.*^[44], sono state condotte delle indagini su *scaffold* poliuretanic realizzati con una reazione di polimerizzazione a singolo stadio a partire da Esametilen diisocianato (HDIIt – trimero) e lisina triisocianato (LTI). Gli enzimi utilizzati sono: *cholesterol esterase* (CE), *carboxyl esterase* (CXE), lipasi (L) e sono stati confrontati ai risultati ottenuti con quelli derivanti dal contatto dei campioni con una soluzione ossidativa. Ciò che è emerso è che il contatto con la soluzione ossidativa ha avuto una maggiore influenza sul grado di degradazione del campione a base di LTI; i rimanenti invece sono risultati più suscettibili alla presenza di CE e CXE, dimostrando quindi come essi possano essere sensibili alle sostanze con le quali potrebbero entrare in contatto all'interno dell'organismo.

3.2.4 Studi sulla biocompatibilità *in vivo*

Lo studio della biocompatibilità *in vivo* ha come scopo l'indagine della risposta dei tessuti circostanti il costruito e la reazione dell'ospite all'impianto del materiale estraneo.

La biodegradazione preliminare *in vivo* e il FBR (Foreign Body Response – Reazione da corpo estraneo) sono spesso valutate mediante impianto

subcutaneo di un supporto PU (poroso o non poroso). Mentre il modello *cage implant* è stato spesso utilizzato per studiare la biodegradazione e il FBR perchè si possono verificare delle perturbazioni al sito di impianto a seguito della rimozione dell'oggetto di studio, delle cellule circostanti / tessuti e degli essudati^{[46][47][48]}. Un impianto sottocutaneo *cage* permette il contatto diretto con le cellule ospitanti e, in caso di strutture porose, permette l'infiltrazione delle cellule, avvicinandosi notevolmente allo scopo finale dell'utilizzo di tali supporti per la *Tissue Engineering*.

Recenti studi hanno dimostrato che D-PHI (*degradable polar hydrophobic ionic* PU) abbia perso solamente il 20% della sua massa originale dopo 100 giorni di impianto in un modello di ratto, mostrando un tasso di degradazione relativamente lento e controllato^[49]. Nel topo, è stato riscontrato che dopo 14 giorni di esposizione a D-PHI, è emersa una buona infiltrazione cellulare e una deposizione di matrici così come un profilo di citochine di guarigione^[50]. Entrambi gli studi hanno dimostrato come D-PHI sia un buon supporto per la *Tissue Engineering* in quanto ha permesso lo sviluppo dei tessuti pur mantenendo il supporto strutturale.

Utilizzando un impianto sottocutaneo di 14 giorni, Da Silva *et al.*^[51], composto da PCL, PEG, isoforone diisocinato (IPDI) e idrazina (HZ), il numero di cellule che penetrano all'interno della struttura è diminuito dal giorno 1 al giorno 14, evidenziando come nel giorno 14 l'FBR fosse stato completamente risolto.

In uno studio condotto da Zhang *et al.*^[7], hanno impiantato provini di espansi poliuretanic, a base di lisina diisocianato e glucosio, nella regione addominale sottocutanea dei ratti.

Sono state effettuate analisi istologiche, dopo un breve lasso di tempo (circa due settimane), dove è stata rilevata la formazione di tessuto di granulazione e di una esigua capsula fibrotica attorno alla matrice polimerica, con presenza di vascolarizzazione nei tessuti circostanti e nessun segno di necrosi. Nei mesi successivi si è riscontrata la progressiva degradazione dei campioni in esame e un'analisi specifica del siero prelevato dalle cavie ha escluso la presenza di anticorpi in reazione all'impianto presente, dimostrando quindi come il costruito non sia immunogenico *in vivo*.

3.2.4.1 Studi sulla biocompatibilità in vivo per Soft Tissue Engineering

Gli *scaffold* destinati ai tessuti molli sono supporti temporanei che vengono gradualmente degradati e sostituiti dalle cellule e dal tessuto dell'organismo ospitante. Nuovi metodi di analisi *in vivo* forniscono una strategia innovativa e interessante per determinare i cambiamenti strutturali e meccanici negli *scaffold* PU senza avere reazioni indesiderate che possano poi portare a sacrificare l'animale. Ciò consente di monitorare a lungo termine la compatibilità dello *scaffold* e l'integrazione dei tessuti dell'organismo.

Park *et al.*^[52] ha impiegato l'*imaging* multimodale per confrontare i tassi di degradazione degli *scaffold* in PEUU rispetto a quelli in polidixanone. Hanno trovato che le valutazioni meccaniche ed istologiche dei campioni erano in completo accordo con l'*imaging* utilizzato^[52].

I biomateriali cardiaci in PU per *Tissue Engineering* sono stati una grande area di ricerca per anni. Sono state sviluppate molte tipologie di valvole cardiache, ma la maggior parte non hanno portato a risultati soddisfacenti a causa della calcificazione.

Più di recente, Thomas e Jayabalan hanno sviluppato una urea poliuretanicca ad alta flessibilità e resistente alla calcificazione con lo scopo di essere utilizzata come valvola tricuspide^[53]. Il test di biodiversità *in vivo* a lungo termine (impianto sottocutaneo in coniglio) ha mostrato un piccolo FBR con assenza di PMN (*polymorphonuclear neutrophils*) e MDM (*monocyte-derived macrophage*) dopo 3 mesi e per 6 mesi non è stata modificata la variazione di peso, colore o superficie; vi sono state minime variazioni delle proprietà meccaniche suggerendo come l'impianto non fosse degradato^[53].

Stachelek *et al.* hanno valutato un PU modificato con colesterolo destinata ad essere una delle cuspidi di una valvola con la possibilità di promuovere l'adesione delle ECs (*endothelial cells* – cellule endoteliali)^[54]. Hanno scoperto che le BOECs (*bovine blood outgrowth ECs*) possono aderire alle cuspidi della valvola in poliuretano e che le valvole seminate e impiantate in ovini apparivano traslucide senza alcuna anomalia rispetto alle valvole non seminate, che apparivano opache con trombi visibili^[55].

Le *patch* cardiache per la riparazione del tessuto cardiaco possono essere fatte anch'esse in poliuretano. Fujimoto *et al.* ha usato uno *scaffold* in PEUU (poliestere uretano urea) per sostituire un difetto chirurgico nel tratto di deflusso del ventricolo destro di un cuore di un topo^[55]. Dopo 12 settimane, il supporto ha mostrato una crescita del tessuto del sito di impianto.

In uno studio condotto da Moradi L. *et al.*^[56], sugli *scaffold* da impiantare al posto del menisco di alcuni conigli, sono state innestate cellule ASC (cellule staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo) e AC (cartilagine articolare) con conseguente valutazione dei rispettivi andamenti.

A livello macroscopico, non sono state evidenziate significative infezioni o infiammazioni croniche e vi è stata la formazione del tessuto del menisco *ex-novo*. In particolare, il campione con cellule di tipo AC hanno mostrato caratteristiche molto simili al tessuto del menisco nativo. Le altre tipologie invece hanno mostrato una irregolarità nello sviluppo tissutale.

Si evince però che le cartilagini dei condili femorali e del *plateau* tibiale abbiano subito dei danneggiamenti e sono più evidenti negli *scaffold* con ASC. Infatti in questi ultimi, la superficie della cartilagine è irregolare con fessure orizzontali e verticali e il numero dei condrociti nativi è notevolmente diminuito (Figura 26 c e Figura 26 d)

Nel gruppo AC-ASC, i danni non sono stati così gravi come nel caso precedente, ma risulta esserci solamente un episodio degenerativo nella cartilagine tibiale, dove le cellule e la matrice dello strato subcondrale sono comunque intatte e non presenta fessure o episodi di ipocellularità (Figura 26 e e Figura 26 f).

Per quanto riguarda il gruppo AC, essi non hanno mostrato alcuna alterazione e la cartilagine è stata preservata (Figura 26 a e Figura 26 b)

Ad un'analisi istologica, tutti i campioni composti da AC o AC-ASC hanno permesso la formazione di un tessuto omogeneo simile a quello del menisco, con una tipica struttura tipica del tessuto considerato e un deposito di matrice cellulare simile a quello nativo. In essi, erano presenti cellule allungate simili ai fibroblasti nella regione vascolare del neo-tessuto e una grande quantità di cellule a forma circolare simili a condrociti nella regione non vascolarizzata. Oltre a ciò, il tessuto rigenerato mediante queste due tipologie di campioni

mostra un mantenimento del deposito di glicosamminoglicani (GAG – importanti nella stimolazione della condrogenesi) all’interno della regione non vascolarizzata. In termini di fibre di collagene I e II, le prime risultano ben organizzate in *pattern* paralleli simili a quelli appartenenti al menisco nativo, mentre le seconde sono allineate.

Invece, i campioni con ASC hanno permesso la formazione di un tessuto *ex-novo*, ma con proprietà e caratteristiche inferiori ai precedenti. Vi è una maggior quantità di fibroblasti a forma affusolata e una minore quantità di cellule simili a condrociti. In termini di fibre collagene I e II, le prime non sono allineate e presentano un *pattern* irregolare e discontinuo, mentre le seconde non mostrano una particolare organizzazione.

Il comportamento complessivo può essere spiegato dalla presenza di gruppi -CH che favoriscono la proliferazione cellulare, creano dei siti attivi per l’adesione cellulare e promuovono le interazioni cellula-cellula o cellula-matrice. Oltre a ciò, la presenza di gruppi -CH degradabili incentiva le cellule a secernere sostanza per l’accrescimento. Il tutto sta a indicare come queste tipologie di materiali siano degli ottimi candidati per la ricrescita di tessuto molle, in particolare di quello cartilagineo.

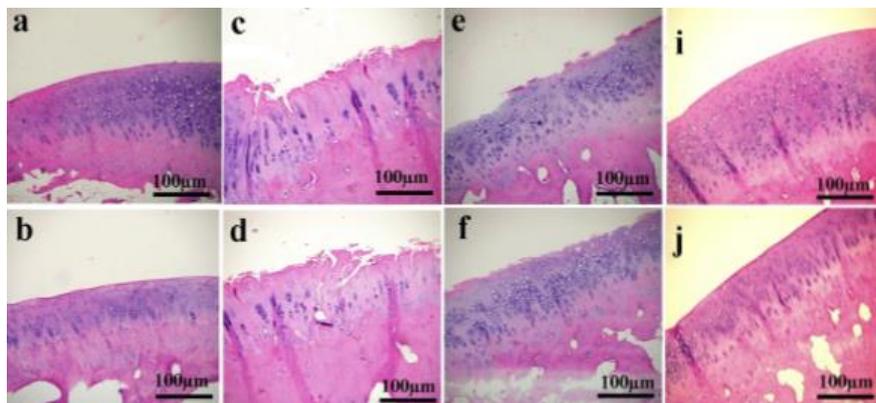


Figura 26. Cartilagine di condilo femorale e plateau tibiale. a) Cartilagine tibiale con AC/Scaffold; b) Cartilagine femorale con AC/Scaffold; c) Cartilagine tibiale con ASC/Scaffold; d) Cartilagine femorale con ASC/Scaffold; e) Cartilagine tibiale con AC-ASC/Scaffold; f) Cartilagine femorale con AC-ASC/Scaffold; i) Cartilagine tibiale nativa; j) Cartilagine femorale nativa.

3.2.4.1 Studi sulla biocompatibilità in vivo per Bone Tissue Engineering

I PU progettati per le applicazioni di sostituzione dell'osso devono essere sottoposte a studi *in vivo* attraverso l'applicazione di pesi per poter verificare che resistano ai carichi a cui le ossa sono sottoposte. Altra necessità è quella della biodegradabilità del supporto, in quanto in caso contrario sarebbe necessaria un'operazione aggiuntiva per la sua rimozione, che in caso di *scaffold* porosi può rappresentare una notevole complicazione.

Ad esempio, Dumas *et al.* ha utilizzato un sistema a peso-cuscinetto per un difetto unicorticale in un coniglio con lo scopo di valutare un *allograft* composto da un osso e un PU biodegradabile a due componenti^[57]. Entro 6 settimane vi era un'estesa infiltrazione cellulare nell'innesto e della nuova formazione di tessuto osseo^[57].

Altri PU biodegradabili per la ricrescita del tessuto osseo hanno incorporato farmaci per migliorare la guarigione e la rigenerazione delle ossa e prevenire la contaminazione batterica. Ad esempio, un gruppo ha preparato un PU biodegradabile con lovastatina per promuovere l'espressione BMP-2 (*biodegradable temporizing matrix*) per stimolare la formazione dell'osso^[58]. È stato realizzato un difetto nei femori di un ratto di circa 3mm e il materiale, a forma cilindrica, è stato impiantato. I femori sono stati poi analizzati a 2 e 4 settimane per la valutazione di microtomografia a raggi X^[58]. Nelle prime 4 settimane vi è stato un incremento nella rigenerazione ossea mediante l'uso di lovastatina/PU, non evidente nelle prime due^[58].

In un altro studio, condotto da Gogolewski *et al.*^[59], sono stati impiantati *scaffold* porosi poliuretanicici in difetti ossei appositamente realizzati nelle creste iliache di 8 pecore, che poi sono state suddivise in due gruppi in base al rapporto tra componente idrofilica e idrofobica contenuta nel supporto. Tutti i difetti hanno comunque mostrato una neoformazione di tessuto osseo all'interno dei pori dei supporti, in quantità simile per tutti i materiali presi in esame. All'interno dei materiali con una concentrazione più alta di componente idrofilica, si è riscontrata una più alta presenza di minerali, dovuti alla deposizione di calcio-fosfati in reazione alla natura stessa dello *scaffold*.

Altri test sulla biocompatibilità in vivo sono stati condotti da Gerges, I. *et al.*^[45], nei quali sono stati impiantati campioni poliuretanicici in topi per 21 e 42 giorni.

I campioni impiantati hanno suscitato una reazione da parte dell'ospite da lieve a moderata e una crescita del tessuto all'interno dei pori. L'incapsulamento fibroso era parziale, assenza di necrosi e le cellule infiammatorie infiltrate erano maggiormente composte da macrofagi e cellule multinucleate grandi, entrambi aderenti alla superficie e penetrate nella matrice dello *scaffold* stesso.

La risposta a corpo estraneo (FBR) è stata associata a fagocitazione e frammentazione del supporto impiantato, infatti mentre lo *scaffold* si degradava e frammentava per l'azione dei macrofagi, si è verificata una progressiva infiltrazione cellulare nella matrice del campione. Oltre a ciò, vi erano aggregati di granulociti a ridosso delle punte periferiche del materiale che comprimevano il tessuto ospite circostante.

Per quanto concerne la crescita del tessuto, al giorno 21 i pori erano colonizzati da un tessuto vascolarizzato fibroso composto da cellule a forma di fuso o stella all'interno della matrice extracellulare, mentre al giorno 42 i pori erano completamente riempiti da tessuto adiposo o fibroso, presente soprattutto nella parte periferica dello *scaffold*, cioè dove il materiale era a contatto con le microfibre scheletriche. In aggiunta, i macrofagi e le cellule multinucleate derivanti dalla risposta a corpo estraneo, erano prevalentemente di natura infiammatoria e risultavano aderenti alla superficie del campione. In aggiunta alla fagocitosi, è stata osservata una frammentazione dello *scaffold*, che indica come la degradazione del materiale abbia scatenato l'attività dei macrofagi. Questa frammentazione era più evidente nelle zone con presenza di aggregati di granulociti, vale a dire dove le pareti dello *scaffold* comprimevano il tessuto in loco.

Si può evincere quindi che la degradazione del campione sia stata causata sia dai fagociti, sia dai radicali liberi derivanti dall'ossigeno rilasciati dai macrofagi e granulociti.

A fine test, il campione era parzialmente incapsulato e la capsula fibrosa interessava solamente le superfici superiori e inferiori dello *scaffold* a contatto

con le miofibre scheletriche e il muscolo scheletrico nel topo (due siti di impianto). La parte rimanente del supporto era per la maggior parte colonizzato da tessuto adiposo.

Alla luce di quanto è emerso, queste tipologie di materiali possono essere dei validi candidati nell'ambito della *Tissue Engineering*, in quanto presentano buona biocompatibilità e biodegradabilità, permettendo anche la colonizzazione e quindi il passaggio al loro interno delle cellule adibite alla rigenerazione del tessuto *ex-novo*.

Conclusioni e sviluppi futuri

Negli ultimi anni, l'utilizzo e l'interesse verso i poliuretani è notevolmente aumentato, soprattutto per quanto concerne l'ingegneria dei tessuti.

I dati presentati in questo elaborato dimostrano come in un futuro essi si possano sostituire ai materiali impiegati per la realizzazione di *scaffold*, in quanto i test di biocompatibilità *in vitro* e *in vivo* forniscono responsi ottimali per lo scopo per il quale sono stati considerati.

Il grande vantaggio offerto da questa tipologia di materiali risiede nella loro versatilità perché in fase di sintesi è possibile effettuare un controllo diretto su proprietà meccaniche, caratteristiche di biocompatibilità e biodegradabilità semplicemente scegliendo le opportune sostanze di partenza.

È possibile infatti realizzare un materiale con caratteristiche specifiche all'applicazione, che possieda anche una cinetica di degradazione modulabili e con l'obiettivo finale di promuovere la ricrescita del tessuto *ex-novo*.

Altro vantaggio è la possibilità di effettuare le sintesi a partire da miscele liquide, il che li rende potenzialmente utili come materiali iniettabili *in situ*, per terapie non invasive, ad esempio per il riempimento di difetti ossei o per il rilascio controllato di farmaci.

Da quanto emerge dalla analisi dei testi in letteratura, i risultati ottenuti nella progettazione di tali supporti, sia in termini di proprietà meccaniche che di biocompatibilità e biodegradabilità, sono un chiaro segno di come la ricerca sia orientata all'individuazione di materiali innovativi con performances sempre più ottimizzate e che minimizzino gli impatti negativi sull'organismo umano.

Particolare attenzione è rivolta alla scelta dei reagenti, al fine di ridurre drasticamente le componenti tossiche in fase di degradazione e quindi, in

maniera diretta, rendere i prodotti di degradazione non nocivi per le cellule del sito di impianto.

A prova di ciò, i numerosi test condotti sia *in vivo* che *in vitro* confermano gli enormi progressi fatti.

Punto focale è la porosità degli *scaffold* impiantabili, in quanto è grazie ad essa che i fluidi fisiologici possono circolare liberamente e permettere alle cellule di iniziare la colonizzazione e quindi a iniziare a ricostruire il tessuto danneggiato.

Ed è proprio per questo motivo che negli ultimi anni la tendenza è quella di realizzare *scaffold* poliuretanic biodegradabili con prodotti di degradazione utili alla proliferazione cellulare, con lo scopo quindi di favorire l'adesione, proliferazione e trasformazione delle cellule in tessuto.

Rimane da ottimizzare il processo di sintesi, sia in termini di semplicità del processo, tempi di realizzazione e riproducibilità.

Ciò implica una ricerca dei migliori catalizzatori, surfattanti, agenti espandenti e tutte quelle sostanze che intercorrono nel processo di sintesi e intervengono in momenti diversi per ottenere poi il composto finale.

Successivi test di invecchiamento *in vitro*, calcificazione *in vitro* e biocompatibilità saranno altresì necessari per approfondire lo studio della cinetica di degradazione e dei relativi prodotti, per poi determinarne gli effetti che hanno sia sulla struttura stessa, che sul sito di impianto dell'organismo o sulla cultura cellulare in essi impiantata.

Bibliografia

- [1] Karageorgiu , K. Porosity of 3D biomaterial *scaffolds* and osteogenesis. *Biomaterials* 26 (2005); 5474-5491.
- [2] Lickorish D, Ramshaw JA, Werkmeister JA, Glattauer V, Howlett CR. Collagen-hydroxyapatite composite prepared by biomimetic process. *J Biomed Mater Res A* 2004;68(1):19-27.
- [3] Gorna, Kaplan; Gogolewsky, S.; Biodegradable porous polyurethane *scaffolds* for tissue repair and regeneration. *Journal of Biomedical Material Research*, 2006; 79A: 128 – 138 .
- [4] Gogolewski, S.; Gorna, K.; Turner, A. S.; Regeneration of bicortical defects in the iliac crest of estrogen-deficient sheep, using new iodegradable polyurethane bone graft substitutes. *Journal of Biomedical Material Research*, 2006; 77(4): 802 – 810 .
- [5] Tanzi, M. C.; Fondamenti di Bioingegneria Chimica: non solo Biomateriali. Pitagora Editrice Bologna, 2006; 215 – 221 .
- [6] Mantero, S.; Remuzzi, A.; Raimondi, M. T.; Ahluwalia, A.; Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa; 2009; 67 – 110 .
- [7] Zhang, J. Y.; Beckman, E. J.; Hu, J.; Yuang, G. G.; Agarwal, S.; Hollinger, J. O.; Synthesis, biodegradability and biocompatibility of lysine diisocyanate-glucosse polymers. *Tissue Engineering*, 2002; 8(5) : 771 – 785 .
- [8] Gorna, K.; Gogolewski, S.; Preparation, degradation and calcification of biodegradable polyurethane foams for bone graft substitutes. *Journal of Biomedical Material Research*, 2003; 67A : 813 – 827 .
- [9] Sharifpoor, S.; Labow, R. S.; Santerre, J.P.; Synthesis and characterization of degradable polar hydrophobic ionic polyurethane *scaffolds* for vascular tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 2009; 10 : 2729 – 2739 .
- [10] Armentano, I.; Dottori, M.; Fortunati, E.; Mattioli, S.; Kenny, J. M.; Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. *Polymer Degradation and Stability*, 2010; 95 : 2126 – 2146 .
- [11] Tanzi, M. C.; Fondamenti di Bioingegneria Chimica: non solo Biomateriali. Pitagora Editrice Bologna, 2006; 94 – 98 .
- [12] Gorna, K.; Gogolewski, S.; Biodegradable polyurethanes for implants. II. In vitro degradation and calcification of materials from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide) diols and various chain extenders. *Journal of Biomedical Material Research*, 2002; 60: 592 – 606 .
- [13] Gorna, K.; Gogolewski, S.; Biodegradable porous polyurethane *scaffolds* for tissue repair ad regeneration. *Journal of Biomedical Material Research*, 2006; 79A: 128 – 138.
- [14] Anderson, J. M.; Hiltner, A.; Wiggins, M. J.; Schubert, M. A.; Collier, T. O.; Kao, W. J.; Mathur, A. B.; Recent advances in biomedical polyurethane biostability and biodegradation. *Polymer International*, 1998; 46: 163 - 171

- [15] Tanzi, M. C.; Farè, S.; Petrini, P.; Tanini, A.; Piscitelli, E.; Zecchi-Orlanidini, S.; Brandi, M. L.; Cytocompatibility of polyurethane foams as biointegrable matrices for the preparation of *scaffolds* for bone reconstruction. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*, 2003; 1: 58 – 66 .
- [16] Zanetta, M.; Quirici, N.; Demarosi, F.; Tanzi, M. C.; Rimondini, L.; Farè, S.; Ability of polyurethane foams to support cell proliferation and the differentiation of MSCs into osteoblasts. *Acta Biomaterialia*, 2009; 5: 1126 – 1136 .
- [17] Guelcher, S. A.; Biodegradable polyurethanes: synthesis and application in regenerative medicine. *Tissue Engineering*, 2008; 14B (1): 3 – 17.
- [18] Adam, N.; Avar, G.; Blankenheim, H.; Friederichs, W.; Giersig, M.; Weigand, E.; Halfmann, M.; Wittbecker, F. W.; Larimer, D. R.; Maier, U.; Meyer-Ahrens, S.; Noble, K. L.; Wussow, H. G.; Polyurethanes. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; 2005.
- [19] Eaves, D.; *Handbook of Polymer Foams*, Rapra Technology Limited, 2004; Capitolo 5.
- [20] Guelcher, S. A.; Patel, V.; Gallagher, K. M.; Connolly, S.; Didier, J. E.; Doctor, J. S.; Hollinger, J. O.; Synthesis and *in vitro* biocompatibility of injectable polyurethane foam *scaffolds*. *Tissue Engineering*, 2006; 12 (5): 1247 – 1259.
- [21] Guelcher, S. A.; Srinivasan, A.; Hafeman, A. E.; Gallagher, K. M.; Doctor, J. S.; Khetan, S.; Mc Bride, S. B.; Holliger, J. O.; Synthesis, *in vitro* degradation, and mechanical properties of two-component poly(ester urethane)urea *scaffolds*: effect of water and polyol composition. *Tissue Engineering*, 2007; 13 (9): 2321 – 2333.
- [22] Gorna, K.; Gogolewski, S.; Preparation, degradation and calcification of biodegradable polyurethane foams for bone graft substitutes. *Journal of Biomedical Material Research*, 2003; 67A: 813 – 827.
- [23] Listemann, M. L.; Wressel, A. L.; Lassila, K. R.; Klotz, H. C.; Johnson, G. L.; Savoca, A. C; Proceeding of the SPI Polyurethanes World Congress, Vancouver, Canada, 1993; 595.
- [24] Eaves, D.; *Handbook of Polymer Foams*, Rapra Technology Limited, 2004; Capitolo 4.
- [25] Zdrahala, R. J.; Zdrahala, I. J.; Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future. *Journal of Biomaterials Applications*, 1999; 14 (1): 67 – 90.
- [26] Bonakdar, S.; Emami, S. H.; Shokrgozar, M. A.; Farhadi, A.; Ahmadi, S. A.; Amanzadeh, A.; Preparation and characterization of polyvinyl alcohol hydrogels crosslinked by biodegradable polyurethane for tissue engineering of cartilage. *Material Science and Engineering C*, 2010; 30 (4): 636 – 643.
- [27] Laschke, M. W.; Strohe, A.; Scheuer, C.; Eglin, D.; Verrier, S.; Alini, M.; Pohlemann, T.; Menger, M. D.; *In vivo* biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane *scaffolds* for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 2009; 5: 1991 – 2001.
- [28] Grenier, S.; Sandig, M.; Mequanint, K.; Polyurethane biomaterials for fabricating 3D porous *scaffolds* and supporting vascular cells. *Journal of Biomedical Material Research*, 2007; 82 (4): 802 – 809.
- [29] Sharifpoor, S.; Labow, R. S.; Santerre, J. P.; Synthesis and characterization of degradable

polar hydrophobic ionic polyurethane *scaffolds* for vascular tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 2009; 10: 2729 – 2739.

[30] Borkenhagen, M.; Stoll, R. C.; Neuenschwander, P.; Suter, U. W.; Aebischer, P.; In vivo performance of a new biodegradable polyester urethane system used as a nerve guidance channel. *Biomaterials*, 1998; 19: 2155 – 2165.

[31] Zhang, N.; Zhang, C.; Wen, X.; Fabrication of semipermeable hollow fibers membranes with highly aligned texture for nerve guidance. *Journal of Biomedical Material Research*, 2005; 75 (4): 941 – 949.

[32] Zhang, J. Y.; Beckman, E. J.; Piesco, N. P.; Agarwal, S.; A new peptide-based urethane polymer: synthesis, biodegradation, and potential to support cell growth in vitro. *Biomaterials*, 2000; 12: 1247 – 1258.

[33] Guelcher, S. A.; Srinivasan, A.; Dumas, J. E.; Didier, J. E.; McBride, S.; Hollinger, J. O.; Synthesis, mechanical properties, biocompatibility, and biodegradation of polyurethane networks from lysine polyisocyanates. *Biomaterials*, 2008; 29: 1762 – 1775.

[34] Chia, S. L.; Gorna, K.; Gogolewski, S.; Alini, M.; Biodegradable elastomeric polyurethane membranes as chondrocyte carriers for cartilage repair. *Tissue Engineering*, 2006; 12 (7): 1945 – 1953.

[35] Fujimoto, K. L.; Guan, J.; Oshima, H.; Sakai, T.; Wagner, W. R.; In vivo evaluation of a porous, elastic, biodegradable patch for reconstructive cardiac procedures. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2007; 83 (2): 648 – 654.

[36] Bschetti, F.; Tomei, A. A.; Turri, S.; Swartz, M. A.; Levi, M.; Design, fabrication, and characterisation of a composite *scaffold* for bone tissue engineering. *The International Journal of Artificial Organs*, 2008; 31: 697 – 707.

[37] Tanzi, M. C.; *Fondamenti di Bioingegneria Chimica: non solo Biomateriali*. Pitagora Editrice Bologna, 2006; 123 – 131.

[38] Cauich-Rodríguez, J. V.; Chan-Chan, L. H.; Hernandez-Sanchez, F.; Cervantes-Uc, J. M.; Degradation of Polyurethanes for Cardiovascular Applications. *Biomaterials*, 2013; 70 – 71.

[39] Marzec, M.; Kucińska-Lipka, J.; Kalaszczyńska, I.; Janik, H.; Development of polyurethanes for bone repair. *Elsevier*, 2017; C80: 736 – 747.

[40] Gorna, K.; Gogolewski, S.; Biodegradable polyurethane cancellous bone graft substitutes in the treatment of iliac crest defects. *Biomed. Mater. Res*, 2007; 80A: 94 – 111.

[41] Liu, K.L.; Choo, E.S.; Wong, S.Y.; Li, X.; He, C.B.; Wang, J.; Li, J.; Designing poly[(R)-3-hydroxybutyrate]-based polyurethane block copolymers for electrospun nanofiber scaffolds with improved mechanical properties and enhanced mineralization capability. *Phys. Chem.*, 2010; B 114 (22): 7489 – 7498.

[42] Jamal, S. A.; Cummings, S. R.; Hawker, G. A.; Isosorbide mononitrate increases bone formation and decreases bone resorption in postmenopausal women: a randomized trial. *Bone Miner.* 2004; 19 : 1512–1517.

[43] Weems, A. C.; Wacker, K. T.; Carrow, J. K.; Boyle, A. J.; Maitland, D. J.; Shape memory

polyurethanes with oxidation-induced degradation: In vivo and in vitro correlations for endovascular material applications. *Acta Biomaterialia*, 2017; 59: 33 – 44 .

[44] Hafman, A. E.; Zienkiewicz, K. J.; Zachman, A. L.; Sung, H.; Nanney, L. B.; Davidson, J. M.; Guelcher, S. A.; Characterization of the degradation mechanisms of lysine-derived aliphatic poly(ester urethane) *scaffolds*. *Biomaterials*, 2011; 32 (2): 419 – 429.

[45] Gerges, I.; Tamplenizza, M.; Lopa, S.; Recordati, C.; Martello, F.; Tocchio, A.; Ricotti, L.; Arrigoni, C.; Milani, P.; Moretti, M.; Lenardi, C.; Creep-resistant dextran-based polyurethane foam as a candidate *scaffold* for bone tissue engineering; Synthesis, chimico-physical characterization, and *in vitro* and *in vivo* biocompatibility. *International journal of polymeric materials and polymeric biomaterials*, 2016; 65(14):729-740.

[46] Rodriguez A.; Macewan, S. R.; Meyerson, H.; Kirk, J. T.; Anderson, J.M.; The foreign body reaction in T-cell-deficient mice. *Biomed Mater*, 2009; 90(1):106 – 13.

[47] Rodriguez, A.; Voskerician, G.; Meyerson, H.; MacEwan, S. R.; Anderson, J.M.; T cell subset distributions following primary and secondary implantation at subcutaneous biomaterial implant sites. *Biomed Mater*, 2008; 85(2): 556 – 65.

[48] Christenson, E. M.; Anderson JM, Hiltner A. Antioxidant inhibition of poly(carbonate urethane) in vivo biodegradation. *J Biomed Mater Res A* March 1, 2006;76(3):480–90.

[49] McBane JE, Sharifpoor S, Cai K, Labow RS, Santerre JP. Biodegradation and in vivo biocompatibility of a degradable, polar/hydrophobic/ionic polyurethane for tissue engineering applications. *Biomaterials* September 2011;32(26):6034–44.

[50] McDonald SM, Matheson LA, McBane JE, Kuraitis D, Suuronen E, Santerre JP, *et al*. Use of monocyte/endothelial cell co-cultures (in vitro) and a subcutaneous implant mouse model (in vivo) to evaluate a degradable polar hydrophobic ionic polyurethane. *J Cell Biochem* December 2011;112(12):3762–72.

[51] Da Silva GR, Ayres E, Orefice RL, Moura SA, Cara DC, Cunha Ada Jr S. Controlled release of dexamethasone acetate from biodegradable and biocompatible polyurethane and polyurethane nanocomposite. *J Drug Target* June 2009;17(5):374–83

[52] Park, D. W.; Ye, S. H.; Jiang, H. B.; Dutta D.; Nonaka, K.; Wagner, W. R.; *et al*. In vivo monitoring of structural and mechanical changes of tissue *scaffolds* by multi-modality imaging. *Bio- materials*, 2014; 35(27):7851 – 7859.

[53] Thomas, V.; Jayabalan, M.; A new generation of high flex life polyurethane urea for polymer heart valve–studies on in vivo biocompatibility and biodurability. *Biomed Mater*, 2009; 89(1):192 –205.

[54] Stachelek, S. J.; Alferiev, I.; Connolly, J. M.; Sacks M.; Hebbel, R. P.; Bianco, R.; *et al*. Cholesterol-modified polyurethane valve cusps demonstrate blood outgrowth endothelial cell adhesion post-seeding in vitro and in vivo. *Ann Thorac Surg*, 2006; 81(1):47 – 55.

[55] Fujimoto, K. L.; Guan, J.; Oshima, H.; Sakai, T.; Wagner, W.R.; In vivo evaluation of a porous, elastic, biodegradable patch for reconstructive cardiac procedures. *Ann Thorac Surg*, 2007; 83(2):648–54.

[56] Moradi, L.; Vasei, Mohammed.; Dehghan, M. M.; Majidi, M.; Mohajeri, S. F.;

- BOnakdar, S.; Regeneration of meniscus tissue using adipose mesenchymal stem cells-chondrocytes co-culture on a hybrid *scaffold*: *in vivo* study. *Biomaterials*, 2017; 126: 18-30.
- [57] Dumas JE, Davis T, Holt GE, Yoshii T, Perrien DS, Nyman JS, *et al.* Synthesis, characterization, and remodeling of weight-bearing allograft bone/polyurethane composites in the rabbit. *Acta Biomaterialia*, 2010; 6(7):2394–406.
- [58] Yoshii, T.; Hafeman, A. E.; Nyman, J.S.; Esparza, J.M.; Shinomiya, K.; Spengler, D.M.; *et al.* A sustained release of lovastatin from biodegradable, elastomeric polyurethane *scaffolds* for enhanced bone regeneration. *Tissue Eng Part A*, 2010; 16(7):2369–2379.
- [59] Gogolewski, S.; Gorna, K.; Biodegradable polyurethane cancellous bone graft substitutes in the treatment of iliac crest defects. *Journal of Biomedical Material Research*, 2007; 80A: 94 – 101.

Ringraziamenti

Innanzitutto voglio ringraziare la Prof.ssa Nadia Lotti, che in questi anni ha mostrato comprensione e pazienza nei miei confronti come mai nessuno aveva mai fatto. Grazie per avermi sempre sostenuto e appoggiato, per la cortesia e disponibilità mostratami, per avermi aiutato nella stesura di questo elaborato.

Un ringraziamento speciale va alla mia famiglia, che ha saputo motivarmi nei momenti difficili e gioire nelle conquiste effettuate in tutti questi anni di studio intenso e faticoso. Grazie a loro sono riuscita a tagliare un traguardo davvero importante della mia vita e senza il loro aiuto e sostegno forse non ce l'avrei fatta.

Un enorme grazie a tutti gli amici, vecchi e nuovi, che hanno contribuito a rendere speciali questi anni di università. Sebbene le nostre strade abbiano intrapreso percorsi differenti, vi è sempre stato il tempo di incontrarci e ridere assieme.

Grazie ai compagni di corso, per le giornate passate ad ascoltare i professori ma sempre col sorriso di chi cerca di trovare sempre il lato divertente e leggero di una lezione universitaria. Ma Denise, Giulia, Andrea e Chiara meritano dei ringraziamenti personali, per tutto quello che abbiamo passato insieme, per le risate e i deliri che solo ingegneria può dare. Grazie davvero anche per il sostegno che avete mostrato nei miei confronti, non potevo immaginare di trovare compagni di corso tali da diventare amici veri.

Un ringraziamento speciale va a colui che mi ha accompagnato in questo percorso da fuori, sopportando i miei deliri prima di un esame, i miei pianti per i fallimenti conseguiti e le mie risate quando qualcosa andava per il verso giusto. Grazie Luca per essere parte della mia vita, grazie per aver creduto sempre in me e per avermelo dimostrato più e più volte. Che questo sia il primo passo per cominciare *davvero* la nostra vita insieme.