

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**NUOVO COPOLIESTERE ALIFATICO DEL PBS DA FONTE
RINNOVABILE BIOCOMPATIBILE E BIORIASSORBIBILE PER
IMPIEGO NELL' INGEGNERIA DEI TESSUTI MOLLI**

Elaborato in:

FONDAMENTI DI CHIMICA

Relatore:

Prof.ssa Nadia Lotti

Presentata da:

Micaela Siria Cristofori

Correlatori:

Michelina Soccio

Silvia Quattrosoldi

Anno accademico 2017/18

Sessione II

*“Niente nella vita va temuto, dev'essere solamente compreso.
Ora è tempo di comprendere di più, così possiamo temere di meno.”*
Marie Curie

INDICE

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE	1
1.1 Patologie cardiache e terapie tradizionali	1
1.1.2 Terapie e trattamenti maggiormente utilizzati	2
1.2 Ingegneria tissutale	3
1.2.1 Scaffold.....	5
1.2.2 Cellule staminali	6
1.2.3 Elettrofilatura.....	9
1.3 Biomateriali	12
1.4 Polimeri	14
1.4.1 Struttura dei polimeri	15
1.4.2 Tecniche di polimerizzazione	16
1.4.3 Proprietà dei polimeri	17
1.4.3.1 Cristallinità.....	17
1.4.3.2 Proprietà termiche.....	18
1.4.3.3 Peso molecolare	20
1.4.4 Poliesteri alifatici	22
1.4.4.1 Poliesteri alifatici per uso biomedicale.....	22
1.5 Copolimeri	25
1.5.1 Copolimeri statistici.....	26
1.6 Polibutilene succinato (PBS)	28
1.6.1 Copolimeri a base di PBS	29
1.7 Pripol	30
1.8 Biodegradazione	31
1.9 Degradazione idrolitica	32
CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI	34
CAPITOLO 3 – METODI E STRUMENTAZIONE UTILIZZATI	36
3.1 Sintesi	36
3.1.1 Realizzazione di film	38
3.1.2 Realizzazione di <i>scaffold</i>	38
3.2 Caratterizzazione molecolare	39
3.2.1 Risonanza magnetica nucleare (NMR)	39
3.2.2 Cromatografia a permeazione su gel (GPC).....	43
3.3 Caratterizzazione termica	45
3.3.1 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	45
3.3.2 Termogravimetria (TGA)	47
3.3.3 Diffrazione a raggi X	48
3.4 Caratterizzazione meccanica	49
3.4.1 Misure stress-strain a rottura e cicliche	49
3.5 Prove di degradazione idrolitica	52
3.6 Microscopico elettronico a scansione (SEM)	53
CAPITOLO 4 – RISULTATI E DISCUSSIONE	55
4.1 Sintesi e caratterizzazione molecolare	55
4.2 Preparazione e caratterizzazione morfologica	56
4.3 Caratterizzazione termica e strutturale	58
4.3.1 Analisi termogravimetrica (TGA)	58
4.3.2 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	59

4.3.3 Analisi diffrattometrica a Raggi X	62
4.4 Prove meccaniche.....	63
4.5 Prove di degradazione idrolitica.....	65
<i>CAPITOLO 5 – CONCLUSIONI.....</i>	<i>69</i>
<i>BIBLIOGRAFIA.....</i>	<i>72</i>
<i>RINGRAZIAMENTI.....</i>	<i>74</i>

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE

1.1 Patologie cardiache e terapie tradizionali

Nel corso dell'ultimo secolo, le malattie cardiovascolari (CVD) sono passate dall'essere malattie di importanza relativamente minore a una delle principali cause di mortalità in tutto il mondo. Entro il 2020 si prevede che le CVD supereranno le malattie infettive e diventeranno la principale causa di morte e disabilità al mondo. Parte dell'aumento di casi di malattie del sistema cardiocircolatorio è dovuto al miglioramento delle misure di sanità pubblica e dell'assistenza medica. Infatti, l'aumento della durata media della vita unitamente alla riduzione della mortalità per altre cause (Figura 1.1), ha determinato un incremento di decessi per CVD. Inoltre, una parte sostanziale dell'impatto globale delle malattie cardiovascolari è attribuibile anche ai cambiamenti economici, sociali e culturali che hanno portato ad un aumento dei fattori di rischio per le malattie cardiovascolari. Questi cambiamenti sono più pronunciati nei paesi in via di sviluppo, i quali risultano anche i più popolati. Dunque, le malattie cardio vascolari sono destinate a colpire un numero sempre maggiore di soggetti ⁽¹⁾.

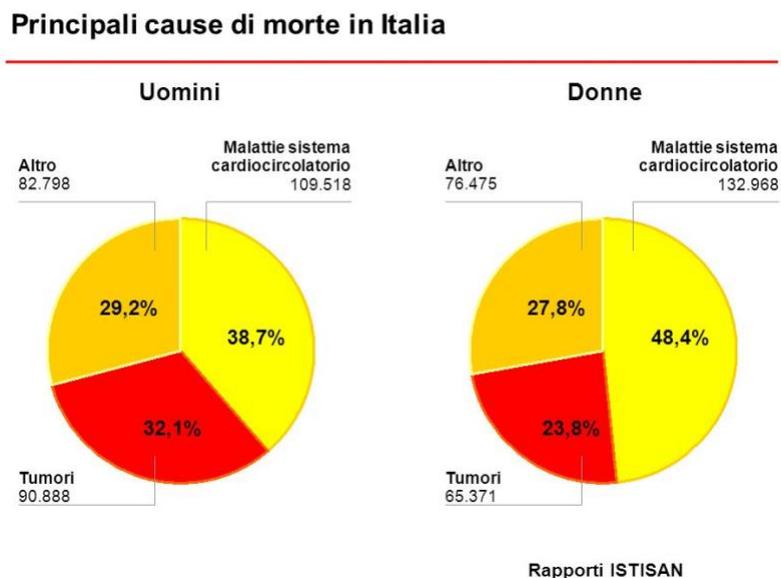


Figura 1.1 Principali cause di morte in Italia (Rapporti ISTISAN 2001)

L'American Heart Association riferisce che 635.000 americani vengono colpiti ogni anno da infarto miocardico e che il numero di decessi attribuibili allo scompenso cardiaco negli Stati Uniti nel 2009 è stato di 275.000. Inoltre, circa 61 milioni di americani (quasi un quarto della popolazione) convivono con malattie cardiovascolari, come cardiopatia coronarica, difetti cardiovascolari congeniti e insufficienza cardiaca congestizia ⁽²⁾. L'infarto miocardico si verifica a causa dell'occlusione di uno dei vasi coronarici e determina una risposta infiammatoria e un'estesa morte ischemica dei cardiomiociti nell'area colpita, ciò determina una parziale perdita della funzionalità

ventricolare. Il miocardio tenta di compensare il malfunzionamento del ventricolo attraverso il fenomeno del “rimodellamento ventricolare” (Figura 1.2) che comprende: la creazione di tessuto cicatriziale collageneo, non contrattile, l’assottigliamento della parete del miocardio e il progressivo allargamento e dilatazione del ventricolo. Tuttavia, il cuore possiede solo una limitata capacità rigenerativa, per questo motivo la diminuzione della funzionalità contrattile ventricolare può determinare una insufficienza cardiaca congestizia che impedisce al cuore di soddisfare le richieste metaboliche del corpo.

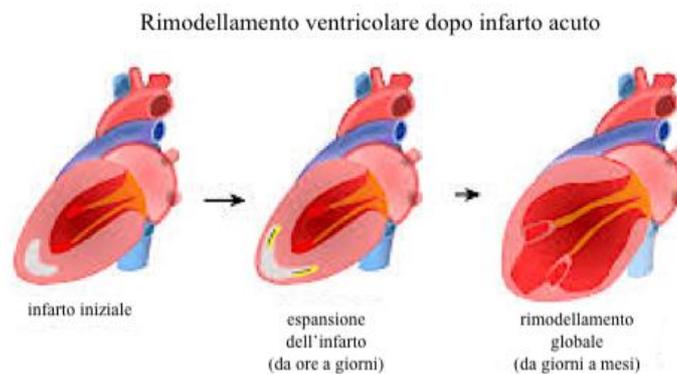


Figura 1.2 Rimodellamento ventricolare post-infartuale

1.1.2 Terapie e trattamenti maggiormente utilizzati

Gli interventi farmacologici e le procedure chirurgiche come la resezione ventricolare, che consiste in un rimodellamento o riduzione del ventricolo sinistro sovradimensionato, sono le terapie maggiormente utilizzate in caso di infarto miocardico. Lo scopo è di migliorare la capacità del cuore di pompare sangue cercando di ristabilirne la dimensione e forma iniziali. Un'altra procedura chirurgica molto diffusa è quella del *bypass* coronarico. Si tratta di una tecnica a cui si ricorre quando le arterie si restringono o si occludono a causa di aterosclerosi o altre patologie. Attraverso questo intervento si crea un ponte artificiale che permette di aggirare l'ostacolo alla circolazione; questo ponte (*bypass*) è costituito da un tratto di vaso sanguigno sano e ben funzionante, che viene prelevato dal chirurgo al momento stesso dell'operazione. I segmenti vasali vengono innestati a monte e a valle della coronaria occlusa, in modo tale da far riaffluire al cuore un apporto ottimale di sangue ed ossigeno.

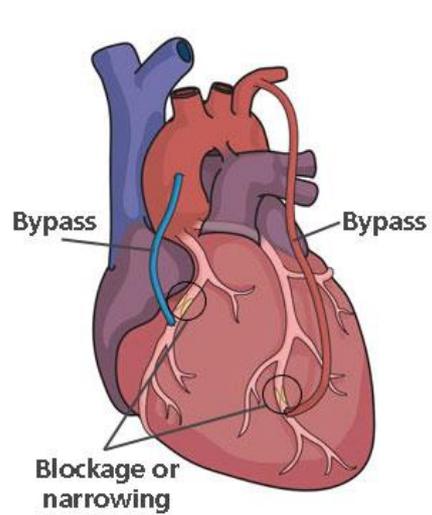


Figura 1.3 Esempio di *bypass*

Inoltre, esistono dispositivi di assistenza ventricolare sinistra, quali i *pacemaker*, che svolgono una funzione di supporto per ripristinare la funzionalità cardiaca e limitare la progressione della malattia.

1.2 Ingegneria tissutale

Ogni giorno vengono eseguite migliaia di procedure chirurgiche che hanno l'obiettivo di riparare, sostituire o rigenerare tessuti del corpo umano (quali muscoli, ossa, cartilagini, ecc) che sono stati danneggiati da malattie, lesioni o traumi. Generalmente i trattamenti sono incentrati sul trapianto di tessuti da una porzione del corpo ad un'altra dello stesso paziente (autotrapianto) o di pazienti differenti. Nonostante si tratti di procedure rivoluzionarie e salvavita, ci sono ancora innumerevoli problematiche legate alla loro applicazione ⁽³⁾. A questo proposito introduciamo un campo alternativo denominato ingegneria tissutale o medicina rigenerativa. Il termine "ingegneria tissutale" è stato coniato nel 1988 ad un evento della *National Science Foundation*, un'agenzia governativa americana che sostiene la formazione di base e la ricerca in tutti i campi non-medici della scienza e dell'ingegneria. Con questo termine si intende l'applicazione di principi e metodi dell'ingegneria e delle scienze mediche al fine di sviluppare sostituti biologici ai tessuti danneggiati ⁽³⁾. Si tratta del primo settore interdisciplinare che integra quasi tutti i campi della scienza come la biologia cellulare e molecolare, la scienza dei materiali, la chimica, la fisica, la medicina e l'ingegneria industriale, e si pone l'obiettivo di restituire ai tessuti e organi danneggiati integrità e funzionalità ⁽⁴⁾.

Se ci focalizziamo sulle malattie cardiovascolari ci rendiamo immediatamente conto che in numerose situazioni il loro trattamento è ostacolato dalla mancanza di tessuto autologo adeguato alla ricostruzione del muscolo cardiaco danneggiato o per realizzare bypass di vasi occlusi o malati. Per questo motivo viene introdotto l'utilizzo di materiale di innesto di origine sintetica. Rispetto al tessuto

nativo però, le prestazioni del materiale sintetico non sono sempre appropriate in quanto mostrano un elevato rischio di trombosi, deposizione di calcio e inoltre non possiedono la capacità di crescere e rigenerarsi. Queste sono state le ragioni che hanno reso nell'ultimo decennio l'ingegneria dei tessuti una disciplina emergente e dall'enorme potenziale.

Il settore si basa essenzialmente sull'utilizzo di cellule staminali, regolatori di crescita e *scaffold* (Figura 1.4). Le cellule staminali sono le cellule progenitrici di tutti gli organi e tessuti degli esseri viventi, sono cellule che non si sono ancora differenziate e non hanno assunto una specifica funzione ma che in determinate condizioni possono specializzarsi e svilupparsi. I regolatori di crescita sono specifici per ciascuna tipologia di tessuto e si possono selezionare tra molecole bioattive (bioreattori, ovvero dispositivi in grado di fornire un ambiente adeguato alla crescita di organismi biologici, che forniscono stimolazioni fisiche) o proteine morfogeniche che promuovono ed accelerano il processo di differenziazione e proliferazione cellulare. Infine, gli *scaffold* 2D o 3D forniscono un supporto meccanico e funzionale ⁽⁴⁾. Devono essere in grado di fornire un'ambiente appropriato alla rigenerazione di tessuti e organi. Si tratta di modelli sotto forma di strutture tridimensionali, realizzate con materiali biocompatibili e biorisorbibili in grado di favorire l'adesione e la proliferazione cellulare fino alla formazione del nuovo tessuto.

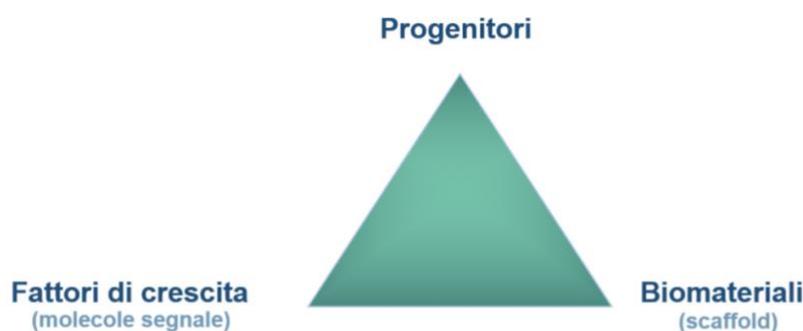


Figura 1.4 Triade dell'ingegneria tissutale che comprende cellule, segnali (chimici o fisici) e *scaffold*

La sfida proposta dalla medicina rigenerativa è quella di imitare ciò che accade in natura. Si sta tentando di ingegnerizzare in vitro praticamente tutti i tessuti e gli organi del corpo: fegato, nervi, reni, intestino, pancreas e persino muscolo cardiaco e valvole. Inoltre, la sperimentazione si sta muovendo anche nello sviluppo di tessuti duri come ossa, tendini e legamenti.

La crescita cellulare viene condotta in vitro in condizioni opportune. Lo *scaffold* contenente le cellule viene in seguito impiantato nel paziente e nel tempo subirà un processo di degradazione grazie al

quale il supporto viene riassorbito dall'organismo e sostituito con tessuto rigenerato dalle cellule sane impiantate (Figura 1.5).

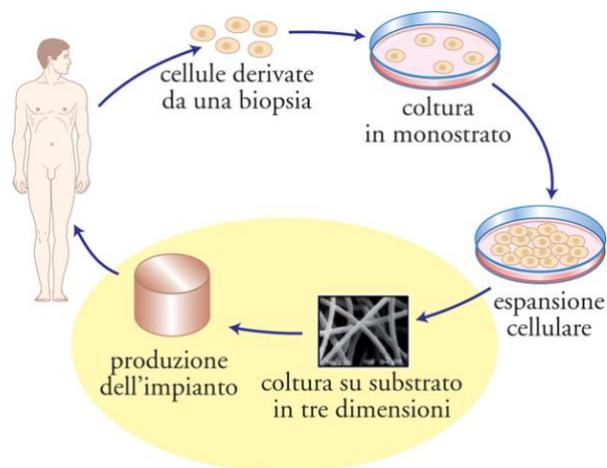


Figura 1.5 Ciclo rappresentativo dell'ingegneria tissutale

1.2.1 Scaffold

Lo *scaffold* è l'elemento che, all'interno della triade, provvede alla piattaforma strutturale con lo scopo di creare un nuovo microambiente cellulare e sta alla base della formazione di nuovi tessuti, aiutandone l'attaccamento, la migrazione, la differenziazione e l'organizzazione cellulare.

Indipendentemente dal tipo di tessuto, tratteremo una serie di considerazioni fondamentali per la progettazione o per la determinazione dell'idoneità di un'impalcatura nell'ingegneria dei tessuti.

- **Biocompatibilità:** le cellule devono aderire, migrare, attraversare e proliferare sull'impalcatura 3D, è quindi necessario che lo *scaffold* non produca reazioni immunitarie o risposte infiammatorie che potrebbero addirittura causare il rigetto da parte dell'organismo ospite ⁽³⁾.
- **Biodegradabilità:** la struttura che viene impiantata deve essere realizzata con materiali che si degradano nel tempo, solo in questo modo è possibile che le cellule riescano a produrre una propria matrice extracellulare. È inoltre necessario che i sottoprodotti della degradazione non siano tossici e si possano smaltire attraverso l'organismo senza che esso ne venga danneggiato ⁽³⁾.
- **Proprietà meccaniche:** lo *scaffold* deve resistere ai carichi imposti dall'ambiente fisiologico nel quale viene impiantato, per questo le sue proprietà meccaniche devono essere coerenti con il sito anatomico nel quale si trova. Nelle applicazioni cardiovascolari è necessario che questi presentino elevata contrattilità e flessibilità ma allo stesso tempo devono essere robusti per resistere alle elevate pressioni che si generano all'interno dei vasi.

- Architettura: gli *scaffold* devono presentare una porosità elevata e delle dimensioni adatte affinché venga assicurata la penetrazione cellulare, la diffusione dei nutrienti all'interno del costruito e l'eliminazione dei prodotti di scarto. Esiste un intervallo critico di dimensione dei pori che varia in funzione della tipologia di cellula utilizzata e del tessuto che si sta ingegnerizzando. È importante inoltre il processo di funzionalizzazione della superficie in quanto, nella realizzazione di supporti con materiali sintetici, è necessario introdurre ligandi che permettano l'interazione tra *scaffold* e cellule ⁽³⁾.
- Tecniche di produzione: un costruito ingegnerizzato è clinicamente e commercialmente realizzabile se ha un costo non eccessivo e se la produzione si può estendere su ampia scala. Un altro fattore chiave è la determinazione delle modalità con le quali un prodotto verrà consegnato e reso disponibile al clinico ⁽³⁾.

1.2.2 Cellule staminali

La terapia delle cellule staminali e l'ingegneria tissutale rappresentano un importante pilastro nella ricerca attuale nel trattamento delle malattie cardiache. Sono stati fatti progressi nelle terapie per l'insufficienza miocardica cronica e per il danno miocardico ischemico acuto, patologie altrimenti irreversibili. La scelta delle cellule con cui popolare uno *scaffold* dipende dalla funzione del nuovo innesto di tessuto e determina le connessioni con i tessuti nativi esistenti, mantiene l'omeostasi tissutale e fornisce vari supporti metabolici. Generalmente vengono scelte cellule autologhe espianate dai tessuti limitrofi o cellule staminali. Queste ultime sono al centro delle più moderne sperimentazioni di sostituzione dei tessuti, in quanto grazie alle loro proprietà vengono sfruttate per guidare nuove tecniche di rigenerazione tissutale ⁽⁵⁾.

Le cellule staminali hanno la peculiarità di potersi dividere in modo asimmetrico generando due cellule figlie diverse tra loro. La prima è la copia della madre e mantiene le caratteristiche di staminalità, la seconda rappresenta l'antecessore della discendenza cellulare destinata a differenziarsi e a dar vita a tessuti e organi. Le cellule staminali possono essere: clonogeniche (in grado di produrre duplicati identici), autorinnovanti (si dividono indefinitamente), potenti (si differenziano in multiple linee cellulari). Queste ultime possono distinguersi in base alla "potenza" di differenziamento (Figura 1.7):

- Cellule totipotenti: capaci di generare tutti i tessuti embrionali ed extraembrionali, tipiche delle cellule della morula (uno dei primi stadi di sviluppo dell'embrione) ⁽⁷⁾. Comprendono esclusivamente lo zigote (fusione ovulo e spermatozoo) e le cellule originate dalle prime divisioni dell'ovulo fecondato ⁽⁶⁾.

- Cellule pluripotenti: capaci di differenziarsi in tutti i tessuti embrionali, tipica delle cellule staminali embrionali (ES, *Embryonic Stem Cells*) che compongono la massa cellulare della blastocisti ⁽⁷⁾. Sono capaci di generare i tre strati germinali che costituiscono la matrice embrionale di tutte le cellule del corpo (endoderma, mesoderma ed ectoderma).
- Cellule multipotenti: capaci di differenziare in tutti i tipi cellulari di un foglietto germinativo ⁽⁷⁾. Hanno il compito di sostituire le cellule differenziate che vengono perse attraverso fenomeni di deplezione o a causa di danneggiamenti cellulare. Le cellule staminali adulte sono considerate multipotenti e sono presenti in diversi siti corporei dell'individuo ⁽⁶⁾.
- Cellule unipotenti: capaci di differenziarsi in un unico tipo cellulare, tipico dei progenitori ⁽⁷⁾; possiedono la caratteristica di auto-rinnovarsi, garantendo la riparazione ed il mantenimento dei tessuti sani.

Le cellule staminali embrionali sono particolarmente rilevanti per quanto concerne il tessuto cardiovascolare in quanto vengono isolate dai blastocisti (denominazione dell'embrione nelle prime fasi di sviluppo) e presentano un'elevata capacità di differenziarsi in qualsiasi tipologia cellulare: neuroni, muscolo liscio, muscolo scheletrico e cardiomiociti (Figura 1.6).

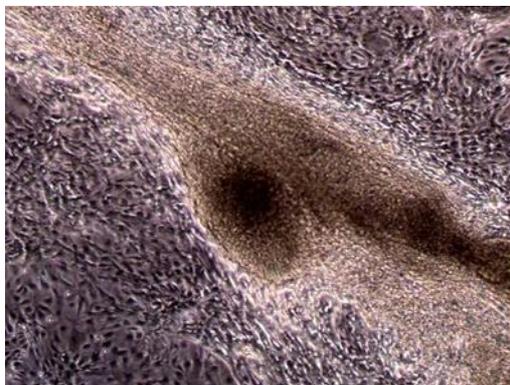


Figura 1.6 Esempio di differenziamento in vitro di cellule staminali verso cardiomiociti

Il differenziamento in cardiomiociti si può riassumere in tre stadi:

- Precoce: nel quale sono prodotte cellule con attività contrattile.
- Intermedio: vi si sviluppano cellule atriali, ventricolari e cellule del sistema di conduzione.
- Tardivo: in cui sono ben visibili miofibrille e dischi intercalari contenenti *gap junction* e desmosomi.

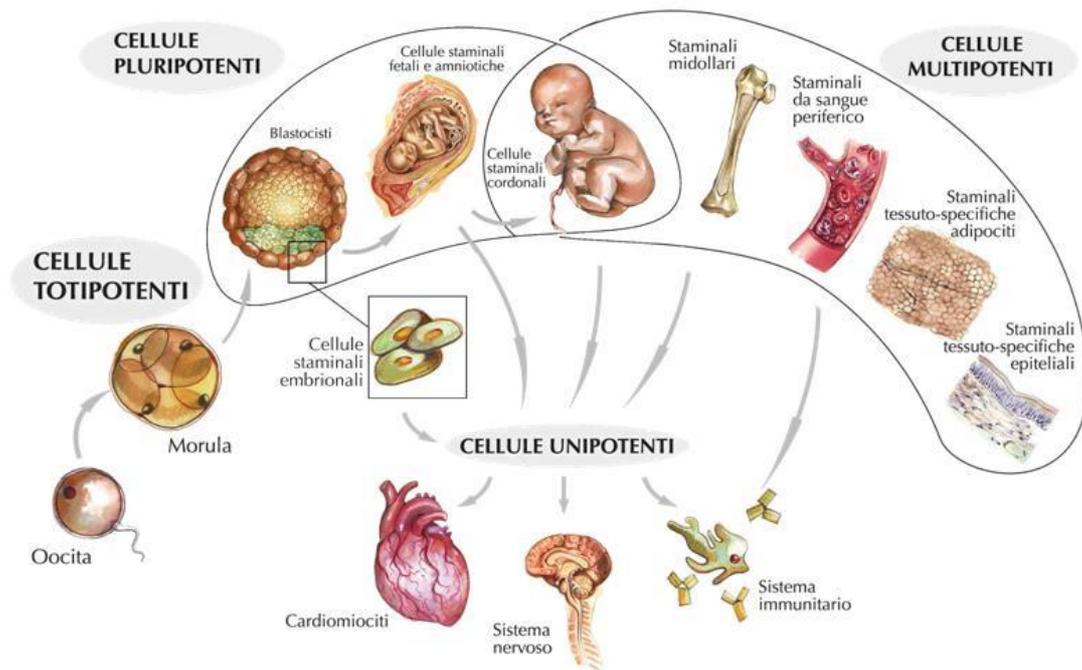


Figura 1.7 Differenziazione cellule staminali

Molti studi hanno dimostrato che è possibile ottenere cardiomiociti in vitro da cellule staminali embrionali umane con le stesse proprietà elettrofisiologiche, strutturali e contrattili dei cardiomiociti adulti e in grado di integrarsi elettromeccanicamente nel tessuto miocardico ospite. Nonostante questo, sono ancora presenti importanti limitazioni legate al loro utilizzo: le potenzialità di rigetto, gli aspetti etici, la difficoltà nell'ottenere popolazioni cellulari pure, la tumorigenicità legata alla loro elevata capacità proliferativa.

Nella vita embrionale e postnatale, l'aumento della massa cardiaca riflette il delicato equilibrio tra l'aggiunta di nuovi miociti e la morte di cellule non necessarie. Poco dopo la nascita, la crescita cardiaca si verifica con un aumento del numero e del volume dei miociti, che insieme contribuiscono allo sviluppo del fenotipo del cuore adulto. Nell'età adulta, il cuore è caratterizzato da un turnover sorprendentemente alto e rapido delle sue cellule parenchimali che è regolato da un compartimento delle cellule staminali. In condizioni fisiologiche, la riserva di crescita intrinseca del cuore è sufficiente per mantenere l'omeostasi cellulare e le prestazioni della pompa adeguate. Tuttavia, quando viene imposto un aumento di pressione e/o carico di volume sul cuore, l'ipertrofia e la proliferazione dei miociti in combinazione con apoptosi e necrosi di questi ultimi, costituiscono gli elementi del rimodellamento miocardico.

I nuovi approcci metodologici precedentemente introdotti hanno quindi messo in discussione il paradigma introdotto più di 60 anni fa che descrive il cuore come un organo postmitotico e i miociti come cellule differenziate terminalmente che partecipano alla funzione cardiaca per tutta la vita ⁽⁸⁾.

1.2.3 Elettrofilatura

L'elettrofilatura, detta anche “filatura elettrostatica” o *electrospinning*, è attualmente l'unica tecnologia che permette la produzione di fibre continue polimeriche o inorganiche con dimensioni che possono andare da decine di nanometri a qualche micron. Si tratta essenzialmente di un processo di stiro, generato da campi di forza elettrostatici ad elevato potenziale, che agisce su una soluzione polimerica ad alta viscosità o su un fuso polimerico. Le nanofibre prodotte attraverso l'elettrofilatura vengono generalmente raccolte in forma di tessuto-non-tessuto (deposizione disordinata), ottenendo strutture micro- o nanofibrose (mat) che possiedono interessanti proprietà. Questa tecnica, semplice e dai costi relativamente contenuti, sta acquisendo una sempre maggiore importanza in campo biomedicale. In particolare, nell'ingegneria dei tessuti, viene sfruttata per la produzione di *scaffold* (Figura 1.8) con struttura porosa a pori interconnessi e fibre di dimensione submicrometrica, dall'elevato rapporto superficie volume. Queste caratteristiche non sono ottenibili attraverso altre tecniche di fabbricazione.

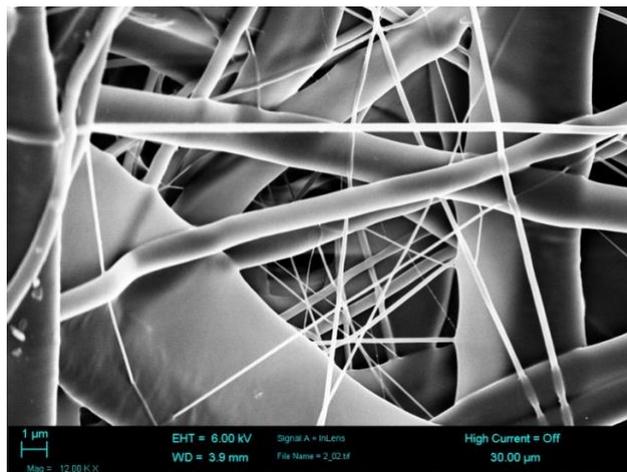


Figura 1.8 Immagine al microscopio elettronico a scansione (SEM) di nanofibre elettrofilate

La tipica apparecchiatura sperimentale per elettrofilatura è costituita principalmente da tre componenti: una siringa che contiene la soluzione polimerica da elettrofilare, collegata ad un capillare metallico; un generatore di tensione ad alto potenziale (10-50 kV) collegato all'ago della siringa mediante un elettrodo; un collettore metallico messo a massa che ha la funzione di contro elettrodo (Figura 1.9). Durante il processo, si carica elettrostaticamente la soluzione polimerica che fuoriesce in forma di goccia sospesa dal capillare. Si viene così a creare un campo elettrico ad elevato potenziale tra il capillare e il contro elettrodo messo a terra, che provoca una distorsione della goccia fino a farle assumere una forma conica (cono di Taylor). Quando la forza elettrostatica che agisce sulla goccia carica supera la tensione superficiale, cioè al di sopra di un valore ‘critico’ del potenziale elettrico, si

forma un sottile getto di fluido polimerico che viene attratto verso il collettore metallico. Il getto carico viene quindi allungato e accelerato dal campo elettrico, subendo processi di instabilità; questi, unitamente all'elevata area superficiale, provocano una veloce evaporazione del solvente e quindi la solidificazione della fibra stessa.

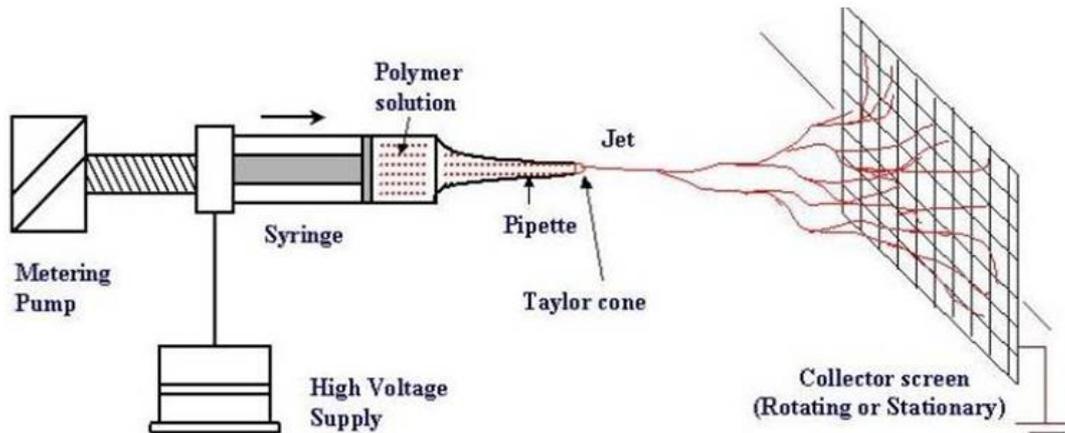


Figura 1.9 Electrospinning set-up

Il processo di elettrofilatura è influenzato da numerosi parametri, strettamente correlati tra di loro. Ogni polimero necessita quindi di una messa a punto individuale, che risulta essere spesso molto complicata.

La morfologia delle nanofibre, in termini di valore medio del diametro, distribuzione dei diametri e presenza o meno di difetti, dipende da tre parametri principali:

I. Parametri di soluzione

- **Concentrazione:** la concentrazione della soluzione originaria deve trovarsi all'interno di un intervallo specifico. Se la concentrazione è troppo bassa si ottengono un insieme di fibre e granelli; se è eccessivamente elevata, risulta impossibile mantenere un flusso costante a livello della punta dell'ago. Vi è inoltre una relazione tra la concentrazione e il diametro delle fibre (legge di potenza): all'interno dell'intervallo specifico, all'aumentare della concentrazione cresce il diametro della fibra (Figura 1.10).
- **Peso molecolare:** riflette il numero di legami tra le catene polimeriche in soluzione dunque va ad influire sulle proprietà elettriche e reologiche e morfologiche della fibra. Generalmente, al crescere del peso molecolare si riduce la formazione di granelli e aumenta il diametro finale della fibra.

- Viscosità: anch'essa deve variare in un intervallo specifico, al di sotto del quale non si riescono ad ottenere fibre continue ed oltre il quale non è più possibile estrarre il materiale.
- Tensione superficiale: dipende dal tipo di solvente, riducendo la tensione superficiale è possibile ottenere fibre prive di granuli ed operare con campi elettrici inferiori.
- Conduttività/densità superficiale di carica: i polimeri impiegati sono tipicamente conduttori, e gli ioni presenti nella soluzione polimerica incidono significativamente sulle dinamiche di formazione delle fibre e sulle dimensioni delle stesse. All'aumentare della conducibilità elettrica della soluzione si verifica un significativo aumento del diametro della fibra; al contrario, una conducibilità insufficiente comporta un altrettanto insufficiente forza elettrica, che non consente l'elongazione del getto e la formazione di una fibra uniforme, con la conseguente formazione di granuli.

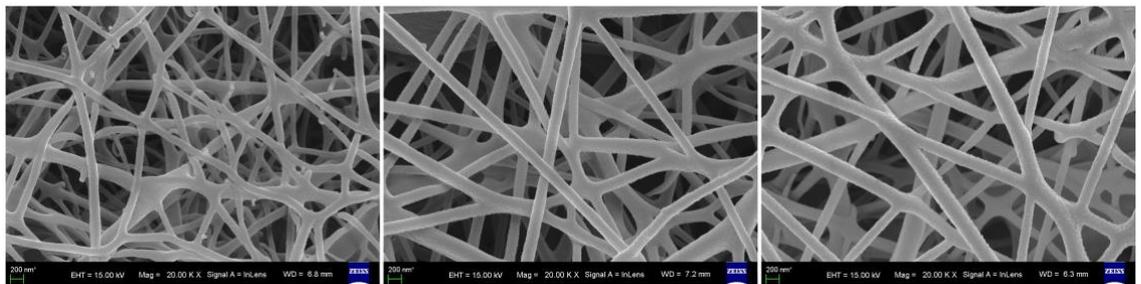


Figura 1.10 Aumento del diametro della fibra all'aumentare della concentrazione della soluzione

II. Parametri del processo

- Voltaggio applicato e forma del campo: la tensione di soglia in grado di far partire il processo deve essere in grado di indurre la polarizzazione della soluzione. Questo valore dipende sempre dalla distanza tra ago e collettore.
- *Feed/flow rate*: la velocità di alimentazione della siringa influenza la velocità del getto e di conseguenza il processo di evaporazione del solvente. Si preferiscono basse velocità di alimentazione per permettere al solvente di evaporare più facilmente; flussi troppo elevati inducono invece la formazione di fibre granulose a causa della poca evaporazione a cui viene sottoposto il liquido.
- Tipo di collettore: ha il compito di raccogliere le fibre prodotte quindi funge da substrato conduttivo. Quelli più comuni sono costituiti da piastre in alluminio, oppure

vengono impiegati fogli di carta, tessuti conduttivi, cilindri rotanti, torni, bagni liquidi di non solventi.

- Distanza tra punta dell'ago e collettore: per consentire una corretta evaporazione del solvente bisogna impostare una distanza adeguata, non troppo piccola ma nemmeno eccessiva in modo che la fibra possa raggiungere agevolmente il collettore.

III. Parametri ambientali

- Temperatura: influenza la viscosità della soluzione. Se questo parametro aumenta, la viscosità diminuisce e di conseguenza anche il diametro della fibra.
- Umidità: influenza la volatilità e dunque la velocità di evaporazione del solvente. Il processo di elettrofilatura è reso impossibile nel momento in cui l'umidità diminuisce a tal punto da rendere la velocità di evaporazione maggiore di quella di estrusione (l'ago si ostruisce). L'umidità influisce infine sulla carica e sulla tensione superficiale.

In generale, i materiali che vengono sottoposti a processi di elettrofilatura sono: i polimeri naturali, i polimeri sintetici, i compositi, i ceramici, i semiconduttori. Alla luce di queste considerazioni, risulta chiaro il ruolo di fondamentale importanza attribuito a questa tecnologia all'interno dell'ambito biomedicale.

1.3 Biomateriali

I biomateriali trovano attualmente largo impiego nella medicina rigenerativa grazie alla loro varietà e versatilità, permettendo ogni anno il miglioramento della qualità della vita di milioni di persone (Figura 1.11). Si tratta di un campo di ricerca in costante crescita, con un continuo sviluppo di nuove procedure ed applicazioni come: sistemi a rilascio controllato di farmaci, terapie cellulari, sistemi diagnostici e di *imaging* basati su nanotecnologie, dispositivi microelettronici e tutto ciò che è legato al settore dell'ingegneria dei tessuti.

La definizione di biomateriali è cambiata molto nel tempo. Nel 1982 un biomateriale fu definito come “*ogni sostanza o combinazione di sostanza, diversa da un farmaco, di origine naturale o sintetica, che può essere impiegata per un qualsiasi tempo, da sola o come parte di un sistema che tratta, aumenta o sostituisce un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo*”. Tale definizione si rivelò però troppo generica in quanto comprendeva anche organi e tessuti trapiantati, cioè sostanze viventi e quindi non assimilabili al comune concetto di materiale. Nel 1986 venne enunciata quindi l'ultima, definitiva versione, secondo la quale un biomateriale è “*una sostanza non vivente utilizzata nella fabbricazione di un dispositivo medico che ha in qualche punto un'interfaccia con un tessuto vivente*”

⁽⁹⁾.

Nella progettazione di un dispositivo medico ci sono tre principali funzionalità da perseguire:

- Funzionalità originaria (compatibilità funzionale): il dispositivo che si progetta deve replicare precisamente le funzioni dell'organo o del tessuto che sostituisce.
- Ingombro originario (compatibilità morfologica): il dispositivo che si progetta deve essere il più simile possibile in forma, volume, massa, interfacce e in ogni altra proprietà fisica all'organo o tessuto che deve sostituire.
- Biocompatibilità: il dispositivo medico deve svolgere la propria funzione nella maggior armonia possibile con l'organismo in cui è applicato, senza effetti collaterali distruttivi.

Le proprietà che influenzano la scelta di un materiale sono di tipo funzionale (effetto, uso, esercizio), tecnologico (lavorabilità, costi di lavorazione, producibilità in serie) e chimico-fisico ⁽⁹⁾. Queste ultime vengono suddivise in:

- Chimico-strutturali: tipo di legame interatomico, reticolo cristallino (ordine di reticolo, presenza relativa di difetti), composizione chimica e omogeneità, caratteristiche superficiali (tensione superficiale, capacità di assorbimento, capillarità).
- Fisico-meccaniche: risposta a sollecitazioni semplici, statiche e dinamiche, viscoelasticità, durezza, attrito superficiale, resistenza all'usura.
- Termiche: temperatura di transizione, calore di fusione, conducibilità termica, espansione termica.
- Elettriche: conducibilità, resistività, costante dielettrica, piezoelettricità.
- Elettrochimiche: facilità di corrosione elettrochimica.
- Altre: ottiche, acustiche, capacità di assorbimento raggi X, densità, porosità, capacità diffusionali.

La classificazione chimica dei biomateriali è la seguente:

- I. Metallici: caratterizzati dal legame metallico e dalla banda di conduzione piena. Hanno ottime proprietà meccaniche (soprattutto resistenza all'usura) ma sono molto rigidi e densi, poco biocompatibili e facili alla corrosione. Sono per lo più utilizzati in applicazioni protesiche di carico ⁽⁷⁾.
- II. Polimerici: hanno scarse capacità meccaniche, sono poco densi e degradabili ma particolarmente facili da lavorare e versatili nelle applicazioni ⁽⁹⁾.
- III. Ceramiche: hanno scarse capacità meccaniche (scarsa resistenza a trazione, buona a compressione), resistono alla corrosione, sono altamente inerti e biocompatibili ma poco lavorabili. Sono per lo più impiegati come rivestimento, soprattutto di parti che devono resistere all'attrito ⁽⁹⁾.

- IV. Compositi: più che una categoria di materiali rappresentano una filosofia di progetto, che consiste nel costruire dispositivi medici con più tipi di biomateriali, in modo che si compensino i difetti degli uni con i pregi degli altri. Con i compositi si pone però il problema della lavorabilità e della coesione tra strati di diverso biomateriale ⁽⁹⁾.
- V. Tessuti biologici: sono i più biocompatibili in assoluto, ma anche i più difficili da mantenere in condizioni ottimali nel tempo. Sono per lo più utilizzati per realizzare protesi vascolari ⁽⁹⁾.

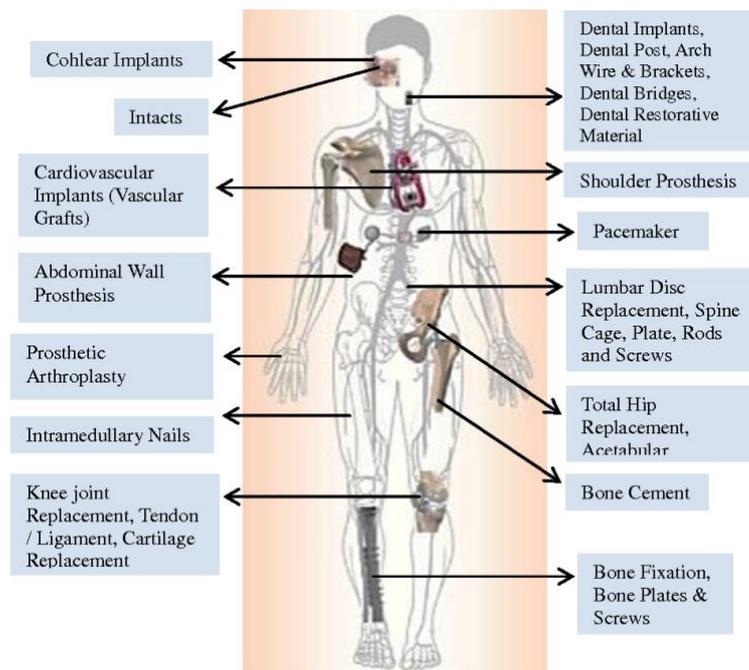


Figura 1.11 Principali applicazioni dei biomateriali in ambito biomedicale

1.4 Polimeri

I polimeri sono delle macromolecole che nascono dall'unione tramite legami chimici omopolari di piccole unità ripetitive a basso peso molecolare, dette monomeri, attraverso una reazione chiamata polimerizzazione. Sono caratterizzati da legami sia ionici sia covalenti, in ogni caso più forti del legame metallico. I materiali polimerici derivano per lo più da idrocarburi, ossia composti carbonio-idrogeno, attraverso sostituzione con specifici gruppi funzionali che li differenziano ⁽⁹⁾.

È possibile classificare i polimeri in base alla natura dei loro costituenti: gli omopolimeri sono formati da un unico tipo di unità ripetitiva, i copolimeri sono formati da monomeri di tipo diverso. In particolare, si parla di dimeri, trimeri e tetrameri se le macromolecole sono composte nell'ordine da due tre o quattro monomeri.

Un altro tipo di classificazione è basato sul grado di polimerizzazione, che rappresenta il numero di volte in cui il monomero si ripete in catena. I polimeri si dividono in oligomeri (macromolecole

costituite da un massimo di 1500 unità), polimeri a basso peso molecolare (costituiti da 1500 fino a 5000 unità) e polimeri ad alto peso molecolare (se vengono superate le 10000 unità).

I principali vantaggi che i polimeri presentano rispetto alle altre classi di materiali sono una maggiore biocompatibilità, la possibilità di modificarne ampiamente composizione e proprietà fisico-meccaniche, bassi coefficienti di attrito, facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture complesse, possibilità di modificarne chimicamente e/o fisicamente la superficie, possibilità di immobilizzare cellule o biomolecole al loro interno o sulla superficie. Queste proprietà sono identificative della struttura molecolare del polimero, nonché dei processi chimico-fisici cui è stato sottoposto, e pertanto caratterizzano gli attributi ultimi del dispositivo creato.

1.4.1 Struttura dei polimeri

Le proprietà di un polimero sono legate non soltanto alla sua composizione chimica, ma anche alla lunghezza e all'architettura macromolecolare.

In termini di architettura, le molecole polimeriche possono essere classificate in quattro diverse categorie (Figura 1.12):

- **Struttura lineare:** le catene sono unite tra loro agli estremi tramite legami di tipo Van Der Waals, legami a idrogeno ed interazioni dipolo-dipolo. Si creano lunghe macromolecole filiformi.
- **Struttura ramificata:** dalla catena principale (lineare) partono delle ramificazioni laterali, legate attraverso legami deboli alla struttura filiforme. Le ramificazioni limitano l'impacchettamento delle catene.
- **Struttura a legami trasversali o intermolecolari:** caratterizzata dall'unione delle catene lineari adiacenti, tramite ramificazioni che formano legami covalenti, creando così una struttura tridimensionale.
- **Struttura reticolata:** i monomeri multifunzionali formano tre o più legami covalenti attivi, creando reti tridimensionali.

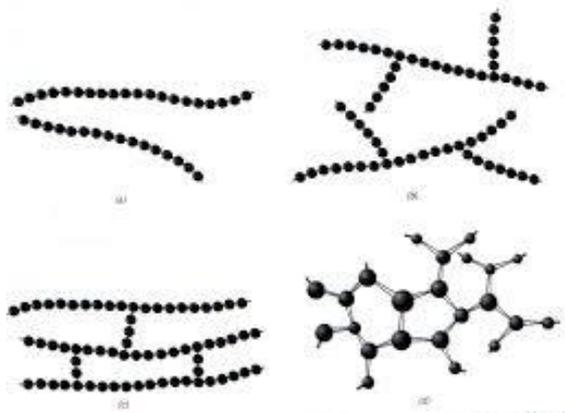


Figura 1.12 Strutture macromolecolari dei polimeri: a) lineare, b) ramificata, c) a legami incrociati e d) reticolata

I polimeri a catena lineare o ramificata se sottoposti a sollecitazioni sono soggetti allo scorrimento delle catene l'una rispetto all'altra. Tale scorrimento di tipo viscoso è responsabile del comportamento viscoelastico. Per questo motivo hanno in genere proprietà meccaniche peggiori rispetto a quelle dei polimeri reticolati, che a loro volta possiedono legami covalenti tra le catene che impediscono totalmente lo scorrimento viscoso.

I polimeri si possono classificare anche dal punto di vista termomeccanico, come termoplastici o termoindurenti. I polimeri termoplastici lineari o ramificati sono ciclabili, cioè possono essere sottoposti a cicli di riscaldamento e raffreddamento che li vedono rammollirsi e risolidificare infinite volte reversibilmente. I polimeri termoindurenti reticolati al riscaldamento invece si modificano, completando la loro polimerizzazione e modificando irreversibilmente le loro proprietà meccaniche.

1.4.2 Tecniche di polimerizzazione

La polimerizzazione è il processo di preparazione dei polimeri che avviene mediante l'unione di più molecole di monomero. Nel caso dei poliesteri alifatici si distinguono due diversi tipi di polimerizzazione:

- **Policondensazione:** è una reazione che avviene tra monomeri contenenti due gruppi funzionali reattivi, ed è accompagnata dall'eliminazione di piccole molecole come acqua, cloruro di sodio, metanolo ed acido cloridrico (Figura 1.13). Questo fa sì che la composizione del polimero finale sia diversa da quella dei monomeri di partenza. Condizione necessaria affinché tale meccanismo a stadi abbia luogo è la presenza, tra i due monomeri coinvolti nella formazione del legame, di altrettanti gruppi funzionali in grado di interagire tra loro. Questo processo di sintesi, attraverso cui si producono ad esempio poliesteri, poliammidi, poliuretani e polisilossani, presenta degli aspetti negativi in quanto risulta essere abbastanza lento, ed i materiali ottenuti raggiungono pesi molecolari non particolarmente elevati (10.000-

20.000g/mol); inoltre, durante la reazione è necessario eliminare continuamente le sostanze secondarie che si generano.

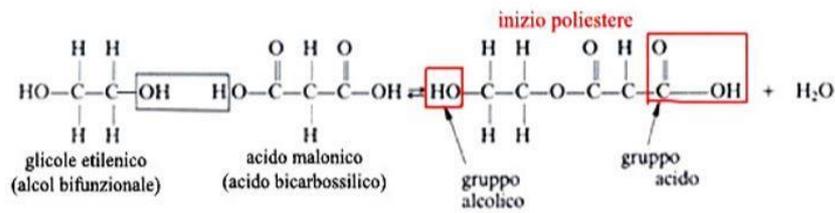


Figura 1.13 Esempio di reazione di policondensazione per la produzione di polietilentereftalato

- **Polimerizzazione ad apertura di anello (ROP):** la ROP di lattoni, diesteri ciclici ed acetali chetonici ciclici rappresenta un metodo alternativo per la sintesi di polimeri ad elevata massa molecolare, rispettando modeste condizioni di reazione. La reazione può essere condotta in presenza di limitate reazioni secondarie, in modo da agevolare il controllo di proprietà, quali il peso molecolare e la sua distribuzione, o la presenza di opportuni gruppi funzionali terminali. Il processo è sviluppato attraverso una scissione di legame delle strutture ad anello con l'obiettivo di ottenere una molecola lineare che contenga un gruppo estereo. La ROP di lattoni costituisce il metodo standard per la produzione di poliesteri biocompatibili e biodegradabili (Figura 1.14). È guidato dalla variazione negativa di entalpia e la presenza di sostituenti nell'anello causa un innalzamento del carattere esotermico della reazione.

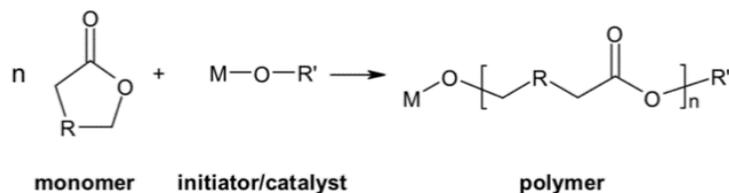


Figura 1.14 Rappresentazione schematica della ROP di un estere ciclico

1.4.3 Proprietà dei polimeri

1.4.3.1 Cristallinità

Lo stato cristallino ed il grado di cristallinità sono definiti come la disposizione geometrica ordinata degli atomi costituenti all'interno della cella elementare ed il rapporto percentuale del peso di sostanza in forma cristallina rispetto al peso totale. I poliesteri, ed i polimeri in generale, sono identificabili come strutture a due fasi, l'una amorfa e l'altra cristallina. Lo stato amorfo, che seppure in percentuali variabili (più elevate in corrispondenza di strutture ramificate e reticolate) risulta sempre presente, è indicativo del mantenimento, da parte del polimero allo stato solido, di una

struttura disordinata caratteristica dello stato fuso. La lunghezza delle molecole favorisce, infatti, una complessa distribuzione spaziale, passibile di distensioni elastiche e scorrimenti viscosi, responsabile delle proprietà viscoelastiche. La componente cristallina, di solito più frequente in presenza di catene lineari e chimicamente e spazialmente regolari, è caratterizzata da piccola estensione e coinvolgimento di un numero limitato di catene, in grado di ordinarsi e cristallizzare grazie all'elevato peso molecolare dei poliesteri.

Dal punto di vista delle proprietà i materiali cristallini sono caratterizzati da un'elevata rigidità e durezza grazie al maggior impaccamento delle catene, da più elevate resistenza meccanica e all'usura e risultano soggetti in misura minore a fenomeni viscoelastici quali rilassamento e *creep*.

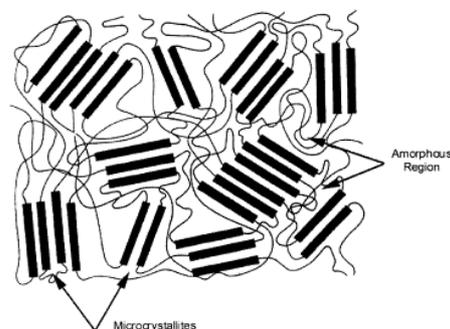


Figura 1.15 Fase amorfa e semicristallina di un polimero

1.4.3.2 Proprietà termiche

Un'ulteriore classificazione dei polimeri può essere ottenuta in base al comportamento meccanico al variare della temperatura:

- **Termoplastici:** polimeri a catena lineare o ramificata, tra le cui macromolecole si nota la sola presenza di legami secondari, aventi bassa resistenza termica e suscettibili, in seguito a graduale incremento termico, di un progressivo rammollimento privo di trasformazioni chimiche. Risultano quindi modellabili plasticamente, all'interno di opportuni intervalli di temperatura, un numero pressoché illimitato di volte.
- **Termoindurenti:** poliesteri a struttura reticolata nei quali la somministrazione di calore induce un iniziale rammollimento che consente la formatura, in seguito avremo un completamento della polimerizzazione iniziata in fase industriale. Si raggiunge una elevata reticolazione che determina un'impossibilità nel rimodellamento plastico successivo.

Per molte applicazioni è necessario che un materiale risulti stabile in determinate condizioni di temperatura. Questo può essere determinato mediante l'impiego della termogravimetria, una tecnica che consiste nella determinazione delle variazioni di peso del campione quando questo è sottoposto ad un aumento della temperatura. In particolare, vengono individuate due temperature fondamentali per la lavorazione del polimero:

- Temperatura di *onset*: temperatura alla quale prendono luogo i primi processi degradativi.
- Temperatura di degradazione: temperatura alla quale i processi degradativi raggiungono il massimo della velocità.

In base alle proprietà meccaniche richieste, è necessario conoscere lo stato del materiale alla temperatura di esercizio. Se rappresentiamo la variazione del modulo elastico in funzione della temperatura si possono individuare tre curve: la prima riferita ai polimeri reticolati, le altre due a polimeri lineari o ramificati in condizione di totale amorfismo o di parziale cristallinità (Figura 1.16).

Analizzando il grafico è possibile individuare alcune temperature caratteristiche:

- Temperatura di transizione vetrosa (T_g): a questa temperatura si verifica il passaggio da stato vetroso, fragile e scarsamente deformabile, a stato gommoso, caratterizzato da bassa rigidità ed elevata deformabilità e tenacità. La T_g risulta inferiore per materiali termoplastici rispetto ai termoindurenti.
- Temperatura di rammollimento (T_r): segna il confine tra lo stato gommoso (solido) e lo stato liquido per i polimeri amorfi (privi di struttura cristallina).
- Temperatura di fusione (T_m): punto di fusione termodinamico, in corrispondenza del quale si verifica il cedimento del reticolo.
- Temperatura limite di stabilità chimica (T_l): temperatura oltre alla quale il materiale si degrada a causa della rottura dei legami chimici.

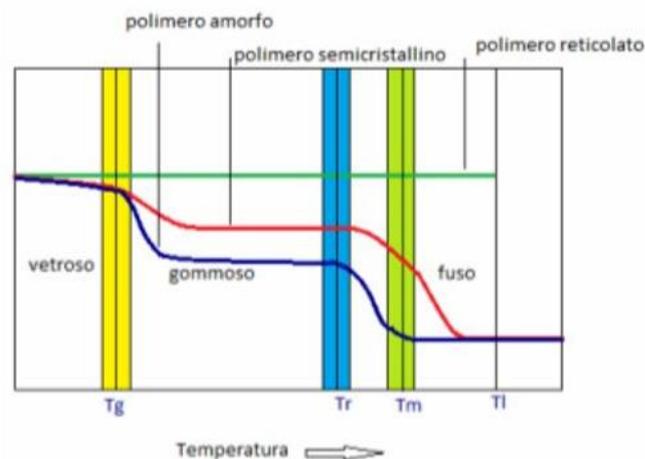


Figura 1.16 Andamento del modulo elastico in funzione della temperatura per polimeri a differente struttura

I polimeri reticolati, prima di raggiungere la degradazione della struttura, non presentano nessuna caduta di modulo elastico, per questo motivo risulta impossibile stabilire con precisione i valori di T_g e T_m . Si vede quindi come per questi materiali le proprietà meccaniche rimangono invariate all'interno dell'intervallo di stabilità. Nella curva riguardante il polimero amorfo si nota una prima caduta del modulo elastico in corrispondenza della T_g ed una seconda in corrispondenza della T_r . Il modulo elastico di un polimero semicristallino, invece, presenta una prima diminuzione in corrispondenza della T_g ed una seconda in corrispondenza della T_m , dovuta alla rottura dei legami in fase cristallina.

1.4.3.3 Peso molecolare

Il peso molecolare rappresenta un parametro molto importante nei polimeri in quanto determina le proprietà fisiche e meccaniche del materiale (Figura 1.17).

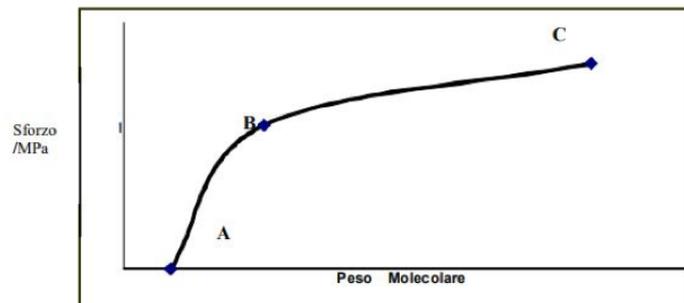


Figura 1.17: Andamento delle proprietà meccaniche in funzione del peso molecolare

Come si può notare dalla Figura 1.17, le proprietà meccaniche inizialmente aumentano linearmente all'aumentare del peso molecolare, per poi raggiungere un valore di plateau in corrispondenza di alti pesi molecolari.

La massa molecolare di un polimero è generalmente espressa ricorrendo al grado di polimerizzazione: nel caso di omopolimeri esso è calcolabile mediante rapporto tra le masse molecolari della sostanza e dell'unità strutturale, mentre nel caso di copolimeri il rapporto precedente è calcolato considerando una massa media dell'unità strutturale.

Le macromolecole che costituiscono i polimeri sono caratterizzate da lunghezza, e quindi da pesi molecolari, diversi tra loro (polidispersità). Per stimare tale peso molecolare si deve calcolare prima il grado di polimerizzazione medio, dato dal rapporto tra il numero di unità monomeriche di un certo tipo ed il numero totale di macromolecole presenti nel sistema. A questo punto possiamo ottenere il peso molecolare di una singola macromolecola moltiplicando la massa dell'unità ripetitiva per il grado di polimerizzazione. Il peso molecolare medio delle macromolecole può essere espresso mediante tre diversi valori:

- Peso molecolare medio numerale (M_n): definito come il rapporto tra il peso di una certa quantità di polimero ed il numero di macromolecole in esso presenti, esprime la media numerica dei pesi molecolari.

$$M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$$

N_i indica il numero di molecole di peso molecolare

- Peso molecolare medio ponderato (M_w): esprime la media pesata sulla massa delle macromolecole presenti.

$$M_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}$$

- Peso molecolare medio viscosimetrico (M_v): esprime la relazione tra il peso molecolare e la viscosità. Le molecole polimeriche grandi rendono la soluzione più viscosa di quanto facciano quelle piccole.

Nel caso reale di polimeri polidispersi risulta:

$$M_w > M_v > M_n,$$

in quanto M_w viene influenzato soprattutto dalle molecole di grandi dimensioni, mentre M_n da quelle più piccole. Le differenze tra i valori delle medie statistiche dipendono dall'ampiezza della distribuzione dei pesi molecolari, come mostrato in Figura 1.18.

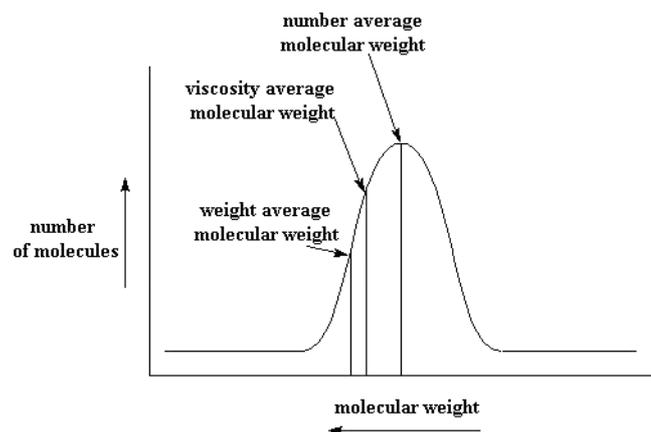


Figura 1.18 Distribuzione del peso molecolare

Si definisce infine indice di polidispersità PD il rapporto:

$$PD = M_w / M_n$$

Se $PD=1$ si parla di polimero monodisperso, ovvero costituito da molecole aventi tutte lo stesso peso molecolare. Per i polimeri sintetici, il valore di polidispersità è solitamente compreso tra 1.5 e 2.5. In campo biomedicale si richiedono polimeri ad alto peso molecolare e con un indice PD relativamente

basso, fattori che assicurano buone proprietà meccaniche e una bassa distribuzione dei pesi molecolari.

1.4.4 Poliesteri alifatici

I poliesteri, polimeri identificati dal ricorrere dell'unità funzionale esterea nella catena carboniosa, si differenziano in aromatici e alifatici (Figura 1.19) in relazione alla presenza o meno di anelli aromatici all'interno della struttura. Vengono ottenuti per policondensazione di uno a più acidi carbossilici polifunzionali con uno o più alcoli polifunzionali.

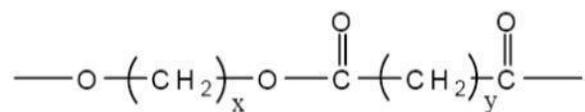


Figura 1.19 Struttura generale di un poliestere alifatico

I poliesteri alifatici rappresentano la classe di polimeri biodegradabili di maggior successo, importanza e diffusione commerciale in riferimento all'applicazione in campo biomedico, grazie alle loro caratteristiche di biocompatibilità, biodegradabilità e resistenza meccanica. È inoltre la classe più intensamente studiata in termini di meccanismi di degradazione e relazioni struttura-proprietà. Tuttavia, sono presenti ancora diverse problematiche legate alla loro processabilità, stabilità (sia durante la lavorazione che al momento dell'utilizzo) e prevedibilità in termini di velocità di degradazione. Oltre a ciò tendono a presentare moduli elastici non elevati e basse temperature di fusione, proprietà che potrebbero limitarne le applicazioni. I poliesteri alifatici vengono utilizzati per realizzare suture biorisorbibili, per dispositivi a rilascio controllato di farmaci, protesi, *stent* vascolari, protesi per legamenti e tendini, ecc. Alcuni esempi di poliesteri alifatici che si sono rivelati ottimi candidati in ambito biomedicale sono: il poli(propilene succinato) (PPS) ed il poli(butilene succinato) (PBS), entrambi biodegradabili e biocompatibili. Per migliorare le proprietà fisiche e meccaniche di questi poliesteri si è cominciato ad inserire nelle catene alcune subunità aromatiche o alifatiche differenti, in modo da ottenere nuovi materiali biocompatibili e dalle proprietà migliorate.

1.4.4.1 Poliesteri alifatici per uso biomedicale

I principali poliesteri alifatici utilizzati in campo biomedicale sono l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA), l'acido polilattico-co-glicolico (PLGA), il policaprolattone (PCL) ed il poli(butilene succinato) (PBS). Di quest'ultimo si parlerà ampiamente in seguito.

- Acido poliglicolico (PGA): sintetizzato per la prima volta nel 1893 quando, nonostante la sua elevata instabilità idrolitica, venne riconosciuto come materiale potenziale per la lavorazione in fibre, e successivamente messo in commercio nel 1970. Esso rappresenta il più semplice poliesteri lineare alifatico. Il PGA può essere ottenuto con le più comuni tecniche di fabbricazione come estrusione, iniezione e stampaggio a compressione, le quali ne influenzano anche proprietà e degradabilità. Esso risulta semicristallino (densità dei cristalli pari a $1,69 \text{ g/cm}^3$), presenta una temperatura di transizione vetrosa tra $35\text{-}40 \text{ }^\circ\text{C}$ e un punto di fusione compreso tra $224\text{-}227 \text{ }^\circ\text{C}$ ⁽¹⁰⁾. Dal punto di vista meccanico, questo materiale risulta piuttosto rigido, con modulo di Young di circa 12.5 GPa . È insolubile in qualsiasi solvente organico (acetone, diclorometano, cloroformio, acetato di etile e tetraidrofurano). Il PGA è stato prima utilizzato nella realizzazione di suture biodegradabili poi si è inserito nel settore dell'ingegneria tissutale per la preparazione di *scaffold* per la rigenerazione di ossa, cartilagini, tendini, denti, tratti intestinali, tessuto spinale e linfatico. I limiti sono legati all'elevata velocità di degradazione, che induce una perdita di proprietà meccaniche, ed al rilascio di acido glicolico, che a lungo termine provoca gravi risposte infiammatorie nell'organismo ospite.

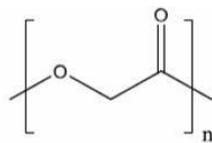


Figura 1.20 Struttura dell'acido poliglicolico

- Acido polilattico (PLA): si tratta di un poliesteri alifatico biodegradabile. Questo viene ottenuto dalla polimerizzazione di acido lattico, mediante due diverse strategie sintetiche (Figura 1.21):
 - condensazione dell'acido lattico
 - apertura dell'anello del dimero dell'acido lattico, il lattide, che viene purificato e polimerizzato ad acido polilattico senza utilizzo di solventi.

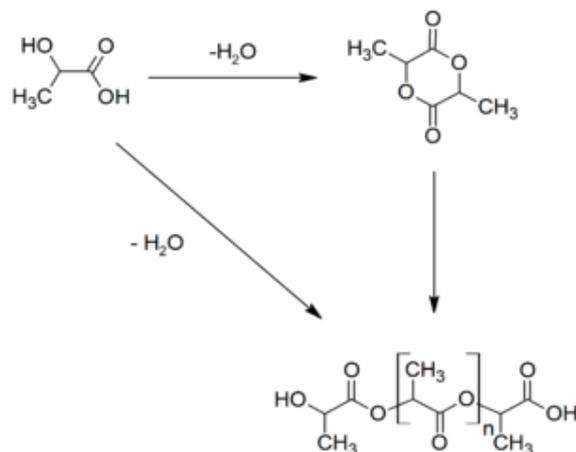


Figura 1.21 Strategie sintetiche per la sintesi di PLA

L'acido lattico è una molecola chirale che esiste sotto forma di due isomeri L e D. Si possono quindi individuare quattro diverse forme polimeriche: acido poli-L-lattico (PLLA), acido poli-D-lattico (PDLA) e poli-D, L-lattico (PDLLA, copolimero dei primi due) e l'acido mesopolilattico (Figura 1.22). Quelli che vengono maggiormente studiati in ambito biomedico sono il PLLA e il PDLLA. In particolare, il PLLA ha riscontrato un notevole successo grazie alle sue caratteristiche meccaniche e di biocompatibilità: caratterizzato da una cristallinità del 37% con un punto di fusione di circa 173-178°C e una temperatura di transizione vetrosa di circa 60-65°C, possiede un'elevata resistenza a trazione e modulo elastico, adatto dunque a reggere carichi importanti. Il PDLLA è un polimero amorfo (disposizione casuale dei suoi due monomeri isomerici) con T_g intorno ai 55-60°C e che possiede, rispetto al PLLA, una resistenza a trazione minore, un allungamento a rottura maggiore e tempi di degradazione più rapidi. Le proprietà che caratterizzano questo poliestere ne hanno sancito l'utilizzo in sistemi a rilascio controllato di farmaci, in ingegneria tissutale, come materiale per suture, fissaggio ortopedico e fabbricazione di *scaffold* (per la rigenerazione di ossa, cartilagini, tendini, nervi e vasi sanguigni).

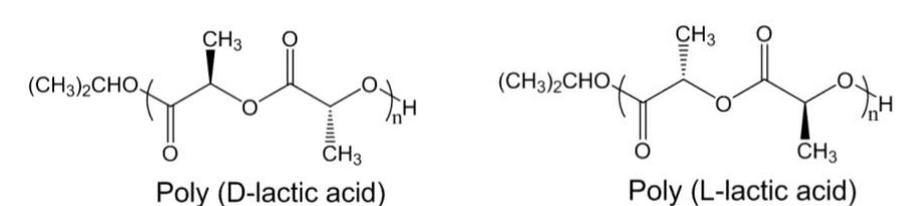


Figura 1.22 Strutture chimiche del PLLA PDLA

- Acido polilattico-co-glicolico (PLGA): si tratta di un copolimero statistico ottenuto mediante copolimerizzazione dei dimeri ciclici dell'acido glicolico e lattico con il proposito di modulare le

proprietà dei due omopolimeri (Figura 1.23). I due omopolimeri presentano caratteristiche molto diverse tra loro in questo modo, a seconda della quantità relativa che ne viene utilizzata, si otterranno PLGA con proprietà molto diversi, quindi adatti a molteplici applicazioni. Se aumentiamo la quantità di acido lattico aumenta il tempo di degradazione e migliorano le proprietà meccaniche. Viene utilizzato sia per la fabbricazione di suture e impianti, sia per la realizzazione di nano e microparticelle biodegradabili per il rilascio controllato di sostanze, sia come supporto per la rigenerazione di tessuto osseo, cartilagineo, tendineo, pelle, fegato e tessuto nervoso.

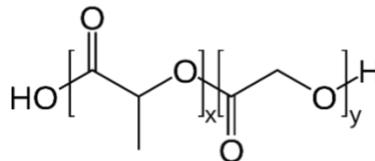


Figura 1.23 Struttura dell'acido polilattico-co-glicolico

- Policaprolattone (PCL): si tratta di un poliesteri alifatico semicristallino che si ottiene tramite la rottura dell'anello del monomero ciclico ϵ -caprolattone. Presenta un punto di fusione di 55-69°C e una temperatura di transizione vetrosa di circa -60°C. Il PCL è un biomateriale altamente elastico: presenta un modulo elastico di circa 23 MPa e un allungamento a rottura del 4700%. Queste caratteristiche lo rendono adatto per la realizzazione di *scaffold* per la rigenerazione di ossa, legamenti, cartilagine, pelle, tessuto nervoso e vascolare ⁽¹¹⁾.

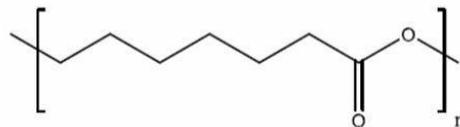


Figura 1.24 Struttura del policaprolattone

1.5 Copolimeri

I copolimeri sono molecole polimeriche contenenti due o più unità monometriche differenti e, così come i copoliesteri, sono composti che hanno la possibilità di modulare le proprie caratteristiche fisiche in base all'applicazione: la disposizione del primo monomero rispetto al secondo, la concentrazione relativa, l'influenza sul processo di sintesi e sulla struttura polimerica che ne deriva. Una prima classificazione dei copolimeri si può effettuare in base alla disposizione dei diversi monomeri all'interno della catena polimerica:

- a. Copolimeri statistici (o random): le unità monomeriche assumono collocazioni casuali nella catena principale.

ABAABABBBABBA

- b. Copolimeri alternati: i monomeri sono regolarmente alternati nella catena.

ABABABABABA

- c. Copolimeri a segmenti (o blocchi): è evidenziabile una distribuzione regolarmente alternata dei comonomeri.

AAAABBBBAABBA

- d. Copolimeri ad innesto: un solo tipo di monomero costituisce la catena principale dalla quale si dipartono ramificazioni formate da altre unità.

B

B

AAAAAAAAAAAAA

B

B

1.5.1 Copolimeri statistici

Le unità comonomeriche sono disposte in maniera casuale e indipendente dalla natura delle unità adiacenti. I copolimeri sono ottenuti mediante processi di poliaddizione radicalica, ionica o di coordinazione. Nota la composizione iniziale dei monomeri utilizzati, risulta problematico determinare la composizione del copolimero a causa del fatto che la reattività dei monomeri varia durante la reazione e quindi la composizione del copolimero evolve nel tempo rispetto a quella del mezzo di reazione. In relazione ad una certa miscela di alimentazione la composizione è dunque istantanea e definibile come l'esito di conversioni infinitesime di monomeri ⁽¹²⁾.

Anche per i copolimeri, la fusione della fase cristallina e la transizione vetrosa della componente amorfa (T_m e T_g rispettivamente) sono transazioni termiche cruciali.

Differentemente da quanto affermato per gli omopolimeri, la possibile presenza di molteplici fasi amorfe e cristalline determina l'individuazione di altrettanti processi, quindi temperature, di transizione vetrosa e fusione. La transizione vetrosa, caratteristica della fase amorfa e variabile in maniera monotona con la composizione, si palesa ad una temperatura intermedia a quelle dei due omopolimeri, T_{gA} e T_{gB} . L'andamento di T_g in funzione della composizione polimerica può essere formulato analiticamente ricorrendo all'equazione di Fox:

$$\frac{1}{T_g} = \frac{w_A}{T_{gA}} + \frac{w_B}{T_{gB}}$$

in cui W_A e W_B rappresentano le frazioni in peso dei rispettivi monomeri. È stata sviluppata anche un'equazione più recente, equazione di Couchman, adottata anche nel caso di andamenti regolari di T_g :

$$\ln T_g = \frac{\ln T_{gA} + (k \cdot w_B/w_A) \cdot \ln T_{gB}}{1 + (k \cdot w_B/w_A)}$$

in cui k rappresenta il rapporto tra gli incrementi di calore specifico alla transizione vetrosa degli omopolimeri. Queste equazioni sono valide per descrivere andamenti della temperatura di transizione vetrosa monotoni rispetto alla composizione. Ma per alcuni copolimeri si osserva invece un minimo o un massimo di T_g a composizioni intermedie. Per tenere conto di queste deviazioni, si è corretta l'equazione di Fox:

$$\frac{1}{T_g} = \frac{w_{AA}}{T_{gAA}} + \frac{w_{BB}}{T_{gBB}} + \frac{w_{AB}}{T_{gAB}}$$

ove T_{gAB} rappresenta la T_g del copolimero ad unità A e B alternate, T_{gAA} e T_{gBB} le T_g degli omopolimeri e w_{AA} , w_{AB} e w_{BB} le frazioni in peso delle rispettive diadi. In questo modo è stato possibile ottenere un andamento teorico in linea con gli andamenti sperimentali.

Un altro elemento da considerare è la presenza di più fasi cristalline. Infatti un copolimero statistico, composto ad esempio da due unità comonomeriche distinte, A e B, può cristallizzare in due situazioni differenti: può formarsi un sistema a due fasi in cui la fase cristallina è composta interamente da A ed è in equilibrio con una fase amorfa di A e B non cristallizzabili (esclusione di comonomero), oppure le unità del comonomero B possono entrare a far parte del reticolo cristallino, sia in forma di difetti, sia in condizioni di equilibrio (inclusione di comonomero)⁽¹³⁾ (Figura 1.25). Anche per queste casistiche sono state introdotte delle equazioni che permettono di predire con sufficiente precisione la temperatura di fusione del copolimero.

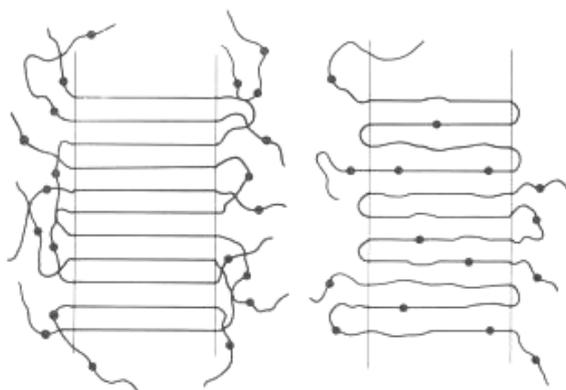


Figura 1.25 Rappresentazioni del modello di esclusione (a sinistra) e del modello di inclusione (destra)

1.6 Polibutilene succinato (PBS)

Il polibutilene succinato (PBS) è un poliestere caratterizzato da alto peso molecolare ed elevata cristallinità ($X_c = 35-45\%$). Possiede caratteristiche interessanti come il moderato costo di produzione, un semplice processo di sintesi (consolidato a livello industriale) e la possibilità di ottenerlo a partire da fonti rinnovabili. Si somma a questi aspetti anche la recente approvazione da parte della *Food and Drug Administration* (FDA), che ne ha aumentato l'appeal come biopolimero. La temperatura di fusione è di circa $110-115^\circ\text{C}$, quella di transizione vetrosa è al di sotto della temperatura ambiente (intorno a -30°C), pertanto il PBS possiede un ampio intervallo di lavorabilità, e lo si può lavorare mediante estrusione, stampaggio a iniezione e termoformatura. Dal punto di vista meccanico, questo materiale mostra un comportamento fragile, con allungamenti a rottura estremamente ridotti (circa 5-20%). A rendere particolarmente interessante questo polimero non sono solo le proprietà sopracitate ma anche la sua comprovata biodegradabilità e biocompatibilità. Queste caratteristiche sono di fondamentale importanza per applicazioni in ambito biomedicale. Per quanto riguarda questo ultimo punto, sono stati effettuati diversi studi, in vitro e in vivo. Nel primo caso, cellule animali e umane (cellule staminali, fibroblasti, osteoblasti, condrociti, splenociti, cardiomiociti) sono state poste in contatto diretto e indiretto con la base polimerica. Dagli studi di citotossicità è stata confermata la biocompatibilità da contatto indiretto. Anche gli studi di immunoistochimica, tecnica grazie alla quale è possibile determinare il grado di mutazione cellulare indotta dal film polimerico, hanno dato esito negativo. Negli studi in vivo, strutture omo- o co-polimeriche a base di PBS sono state impiantate in piccole cavie. A seguito della pratica chirurgica, si è osservato un primo stadio di risposta infiammatoria e una successiva stabilizzazione della zona di impianto, confermando anche la biocompatibilità in vivo ⁽¹⁴⁾.

Il PBS viene prodotto e commercializzato dal 1993 con il nome Bionolle™ dalla Showa-Denko e con il nome di GS Pla™ dalla Mitsubishi Chemical Corporation. I principali impieghi del PBS riguardano applicazioni ambientali, come pellicole per pacciamatura, sacchetti compostabili, fogli in tessuto non tessuto, prodotti per la ristorazione, schiume, componenti a basso peso nell'industria automobilistica. Nell'ambito biomedicale sono attualmente commercializzati *stents*, involucri compatibili con la sterilizzazione a vapore e componenti per la diagnostica delle immagini.

Nella sintesi del PBS sono comunemente impiegati monomeri ottenuti da risorse fossili e facilmente reperibili sul mercato quali: acido succinico (SA) o dimetil succinato (DMS) e 1,4-butandiolo (BD) (Figura 1.26). Un aspetto non sottovalutabile nella sintesi del PBS, è che sia l'acido succinico che l'1,4-butandiolo possono essere ottenuti anche da fonti rinnovabili, ad esempio attraverso la

fermentazione di zuccheri ⁽¹⁹⁾. Questo permette quindi di annoverare il PBS tra i polimeri completamente *bio-based*.

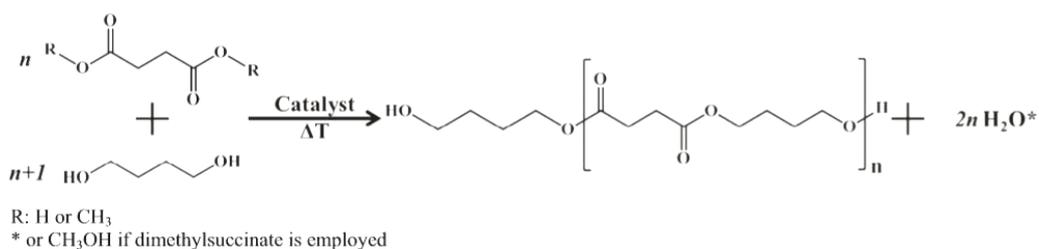


Figura 1.26 Schema di reazione che mostra la polimerizzazione del PBS

Il PBS viene sintetizzato per policondensazione in massa a due stadi: nel primo avviene una reazione di esterificazione (o transesterificazione se il monomero di partenza è il dimetil succinato, DMS) con rimozione di acqua (o metanolo). Il secondo stadio viene condotto a temperatura più elevata e pressione ridotta, in modo da facilitare la rimozione del glicole in eccesso (10-20% ca) ⁽¹⁴⁾. La reazione viene condotta in presenza di un catalizzatore, solitamente a base di titanio, come ad esempio il titanio (IV) butossido (TBT).

1.6.1 Copolimeri a base di PBS

La copolimerizzazione è una delle strategie più utilizzate per migliorare le proprietà dell'omopolimero di riferimento, a seconda della specifica applicazione del materiale. La stessa strategia è stata ampiamente sviluppata, sintetizzando copolimeri a base di PBS: questi sono stati realizzati con lo scopo di diminuire la cristallinità, aumentare la flessibilità e il tasso di biodegradabilità. L'applicazione più studiata dei copolimeri a base di PBS in campo biomedicale è l'ingegneria tessutale, in cui questi materiali sono stati impiegati sotto forma di film e di *scaffold*, ma anche micro e nanosfere come sistemi di rilascio controllato di farmaci.

Negli ultimi anni sono state condotte molteplici attività di ricerca in tutto il mondo (Figura 1.27), in cui si sono esplorate le principali strategie sintetiche di copolimerizzazione, quali la policondensazione, la miscelazione reattiva e la *chain extension*. Si sono ottenuti buoni risultati nella sintesi di copolimeri statistici a diversa composizione, copolimeri multiblocco con blocchi a diversa lunghezza e copoliesteri-uretani multiblocco ad alto peso molecolare ⁽¹⁴⁾. L'intensa attività di ricerca non ha solo coinvolto le strategie di sintesi ma anche la natura della seconda unità monomerica impiegata. Il PBS è stato copolimerizzato con altri poliesteri alifatici contenenti legami eteri e tio-eteri, con subunità derivanti dal glucosio, quali mannitolo e sorbitolo e sono stati realizzati e caratterizzati ionomeri contenenti PBS. Inoltre, sono stati realizzati diversi composti ottenuti miscelando il PBS con materiali organici, come chitosano e collagene, o inorganici, come fosfato di

calcio, idrossiapatite e fluoroapatite. Chitosano e idrossiapatite rappresentano i composti più utilizzati: l'idrossiapatite è un materiale ceramico contenente fosfato di calcio ed è il principale componente delle ossa e dei denti, tale materiale è bioattivo e mostra un'eccellente biocompatibilità con i tessuti duri, in più è in grado di promuovere la crescita delle ossa; il chitosano, invece, è il secondo polisaccaride più abbondante sulla terra e trova applicazione in campo biomedicale grazie alla sua biodegradabilità e biocompatibilità (19, 20-25).

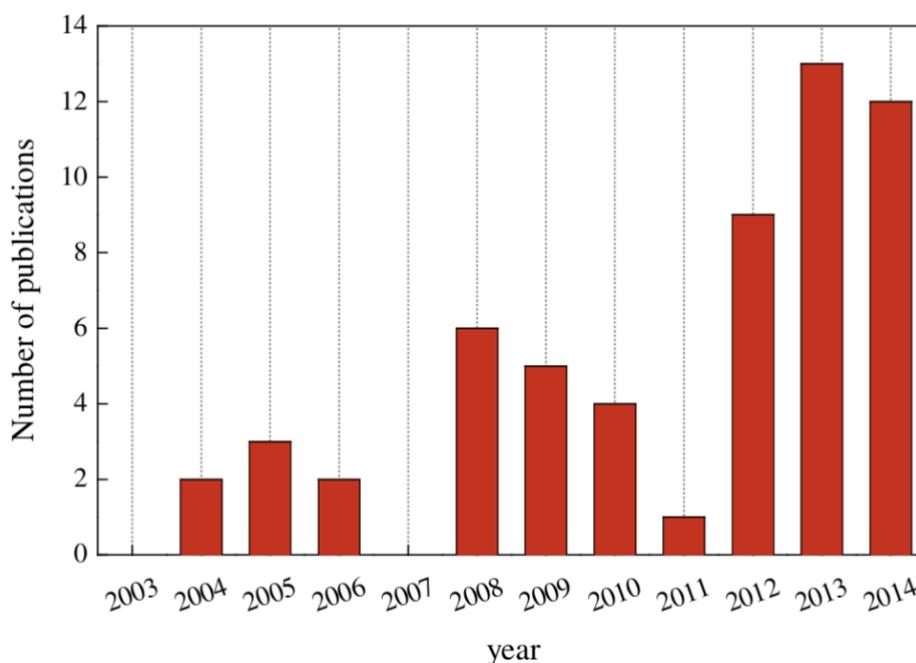


Figura 1.27 Numero di ricerche pubblicate sul PBS e suoi copolimeri nell'ambito delle applicazioni biomediche (14)

1.7 Pripol

Pripol 1009 è un diacido completamente *bio-based* a catena lunga, prodotto dalla dimerizzazione di acidi grassi e commercializzato da CRODA. Una possibile struttura è riportata in Figura 1.28

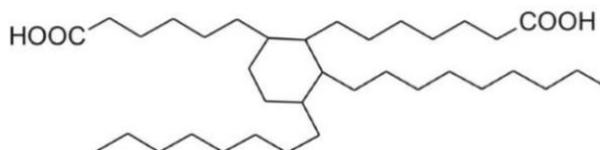


Figura 1.28 Struttura dell'acido grasso dimero di olio vegetale Pripol 1009

I polimeri a base di Pripol sono caratterizzati da una elevata stabilità termica, che consente l'esposizione ad elevate temperature, sono idrofobici ed idrorepellenti (resistono all'umidità), flessibili e deformabili, anche a basse temperature (grazie alla bassa T_g). Viene infatti

commercializzato per la produzione di *coating* adesivi a basso impatto ambientale, anche in combinazione con altri substrati flessibili, e sigillanti e per la produzione di elastomeri e plastiche ingegnerizzate ⁽¹⁵⁾. Si tratta di un materiale altamente versatile, è stato utilizzato anche in combinazione con l'olio di lino epossidato per produrre pellicole termoindurenti di natura *green*. In ambito biomedicale, le possibili applicazioni del Pripol 1009 sono legate alla sua copolimerizzazione con il PBS al fine di realizzare sistemi copolimerici altamente flessibili, biodegradabili e biocompatibili per applicazioni biomedicali, quali il rilascio controllato di farmaci e l'ingegneria tissutale ⁽¹⁶⁻¹⁷⁾.

1.8 Biodegradazione

La biodegradazione è quel fenomeno di alterazione chimica e fisica che un materiale subisce in un ambiente biologico. Questo fenomeno può riguardare materiali di scarto operata dai microrganismi nelle discariche ma anche le modificazioni che i biomateriali, utilizzati per costruire gli impianti medicali, subiscono *in vivo*. La biodegradazione interessa tutti i materiali impiantati nell'organismo e di conseguenza anche i biomateriali di natura polimerica. Nel loro caso può essere voluta, come nel caso dei polimeri utilizzati per il rilascio controllato dei farmaci e per le protesi riassorbibili, oppure indesiderata, come nel caso di protesi realizzate per essere durature nel tempo. A seguito della biodegradazione, i materiali possono solubilizzarsi, sbriciolarsi o assumere indesiderate caratteristiche di deformabilità o fragilità. Il processo può essere indotto artificialmente in un momento specifico deciso dal clinico con la possibilità di fornire ai prodotti di degradazione azioni farmacologiche specifiche, oppure scatenarsi in maniera completamente inaspettata e generare prodotti di degradazione tossici per l'organismo. La degradazione di membrane polimeriche viene controllata da sistemi che permettono il rilascio di reagenti o molecole bioattive posizionati all'esterno dell'organismo. Un esempio rappresentativo di questa tecnologia è dato da quei sistemi che permettono la determinazione quantitativa della glicemia ed il rilascio controllato di insulina *in situ*.

I fenomeni degradativi sono anche favoriti dalle condizioni intrinseche dell'ambiente biologico: valori di pH intorno alla neutralità, temperature blande e basse concentrazioni saline, sono proprietà che lo rendono particolarmente ostile tanto da indurre un degrado più o meno rapido. I principali fenomeni che possono portare al deterioramento di protesi impiantabili possono essere di natura chimica, fisica o meccanica. Le modificazioni chimiche sono innescate da processi di termolisi, fotolisi, radiolisi o possono essere dovuti ad ossidazione. Per quanto riguarda le modificazioni di carattere più propriamente fisico si passa dall'assorbimento, al rigonfiamento, al rammollimento, alla solubilizzazione, alla mineralizzazione, alla cristallizzazione. Dal punto di vista delle modificazioni

meccaniche invece possiamo avere: rotture causate da sollecitazioni meccaniche (*test cracking*), fratture riconducibili a fatica del materiale o causate da impatti, tensioni dovute a carichi costanti o ciclici, oltre ad abrasioni e fratture superficiali che costituiscono ottimi punti di attacco per reazioni chimiche e biochimiche. In generale, la degradazione del biomateriale è dovuta ad una combinazione di più meccanismi. I casi più critici sono rappresentati da quegli impianti che utilizzano biomateriali considerati estranei dall'organismo ricevente. Di conseguenza, si innescano reazioni che, nei casi meno favorevoli, portano a danni irreversibili con conseguente compromissione della funzionalità e della durata dell'impianto. Al fine di garantire la funzionalità e la durata dell'impianto è necessario sottoporre i materiali a delle sperimentazioni precliniche come ad esempio l'accelerazione artificiale dei processi di invecchiamento, le prove su animali e le proiezioni statistiche. Tutte operazioni che però, non sono in grado di prevedere la totalità delle variabili che possono portare ad un prematuro calo delle prestazioni. Per questa ragione è spesso necessario un monitoraggio nel tempo delle condizioni e delle prestazioni delle protesi *in vivo*.

I principali tipi di biodegradazione che presentano i materiali polimerici sono:

- Biodegradazione chimica e biochimica
- Biodegradazione idrolitica
- Processi idrolitici indotti dall'organismo ospite
- Biodegradazione ossidativa
- Ossidazione diretta da parte dell'organismo
- Ossidazione indotta da ioni metallici
- Ossidazione mediata dall'ambiente esterno
- Rottura per sollecitazione meccanica
- Sterilizzazione

1.9 Degradazione idrolitica

Il processo di idrolisi determina la scissione delle molecole in due o più parti per effetto dell'acqua. La predisposizione più o meno marcata di un polimero all'idrolisi è dovuta alla sua natura chimica, alla struttura, alle dimensioni e all'ambiente in cui si trova. I fattori che tendono a far crescere il processo di idrolisi sono: la bassa cristallinità, lo scarso numero (se non mancanza) di legami trasversali, la sollecitazione meccanica e la presenza di strutture porose. Al contrario, la presenza nel polimero di zone idrofobiche, la reticolazione, una elevata cristallinità, bassi valori di sollecitazione meccanica e forme compatte sono fattori che tendono a far ridurre l'idrolisi.

In condizioni fisiologiche, il corpo umano tende a mantenere un equilibrio controllato attraverso l'omeostasi, dunque i parametri ambientali saranno mantenuti isotermi (37°C), neutri (pH 7.4) ed

asettici. Tuttavia, la situazione in vivo, nonostante sia considerata blanda rispetto ai normali standard utilizzati in vitro, è complicata e resa drastica dalle complesse interazioni con attivatori, recettori, inibitori e con altre sostanze contenute nei fluidi biologici o presenti come componenti cellulari. Tutto ciò provoca risposte aggressive che si manifestano attraverso processi di adesione, liberazione e trasporto di biomolecole particolarmente attive. La degradazione può essere monitorata attraverso misurazione delle variazioni di peso molecolare, derivanti dalla scissione dei legami, o di perdita di peso, imputabile al passaggio in soluzione di molecole a basso peso molecolare. La degradazione si concretizza in modifiche morfologiche e topologiche, rilevabili al SEM, formazione di prodotti di degradazione ed alterazione delle proprietà meccaniche.

Fattori	Metodi di controllo
Struttura chimica della catena principale e dei gruppi laterali	Selezione di legami chimici e gruppi funzionali
Stato di aggregazione	Trattamento, copolimerizzazione
Stato cristallino	Miscela polimerica
Bilancio idrofilico-idrofobico	Copolimerizzazione, introduzione di gruppi funzionali
Area superficiale	Micropori
Forma e morfologia	Fibre, film e compositi

Figura 1.29 Fattori strutturali e metodi di controllo della degradazione

CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI

L'enorme progresso delle conoscenze nel campo della biologia cellulare e delle biotecnologie ha consentito negli ultimi anni lo sviluppo di tecnologie mirate alla coltivazione ed alla ricostruzione *in vitro* di tessuti o organi, definendo una nuova branca di scienze biomediche conosciuta con il termine di "ingegneria dei tessuti". Questa tecnologia permette di poter espandere cellule autologhe *ex vivo* e riutilizzarle nella riparazione e rigenerazione di tessuti mediante coltura in matrici polimeriche biocompatibili tridimensionali. Modulando opportunamente le caratteristiche chimiche, meccaniche e fisiche di tali matrici è possibile teoricamente rigenerare *in vitro* tipi diversi di tessuti.

L'impiego di componenti cellulari, supportati da *scaffolds* o *carriers* adeguati, potrebbe condurre a risultati positivi nella riparazione tissutale consentendo un miglioramento della tecnica chirurgica.

L'impiego di *scaffolds* consente infatti di migliorare l'attecchimento e la riproduzione cellulare, di trattenere "fisicamente" le cellule nella zona da riparare e di dirigere l'orientamento spaziale dei componenti della matrice. Tali supporti tridimensionali devono avere le caratteristiche di essere biocompatibili, biodegradabili e devono consentire la moltiplicazione cellulare e la produzione della matrice, assicurandone contestualmente la nutrizione.

Tra le numerose applicazioni dell'ingegneria tissutale, la riparazione del tessuto cardiaco infartuato rappresenta sicuramente un'importante obiettivo, considerando che le malattie cardiovascolari sono tuttora la prima causa di morte in Europa, rappresentando il 45% della mortalità generale nell'Unione europea.

Tra i polimeri di origine sintetica sperimentati per questo tipo di applicazione, il polibutilene succinato (PBS) rappresenta sicuramente un ottimo candidato.

Nonostante i promettenti risultati già ottenuti dal punto di vista di biodegradabilità e biocompatibilità, il PBS presenta però proprietà meccaniche poco adatte all'impiego qui descritto, proprio perché l'applicazione miocardica richiede particolari caratteristiche di modulo di Young (E) e un ritorno elastico comparabile con quello del miocardio naturale.

In tale contesto si inserisce il seguente lavoro di Tesi volto alla sintesi e alla caratterizzazione di un nuovo copolimero statistico a base di polibutilene succinato che presenti però proprietà meccaniche funzionali all'MTE (Myocardial Tissue Engineering).

Allo scopo, si è pensato di inserire all'interno della catena polimerica, mediante copolimerizzazione, il Pripol 1009, approvato già per il contatto con i cibi, che dovrebbe portare a miglioramenti nelle proprietà meccaniche, andando ad aumentare significativamente la flessibilità, nella stabilità termo-ossidativa e resistenza chimica.

Il lavoro è stato quindi strutturato nelle seguenti fasi:

1. Preliminare accurata ricerca bibliografica che ha permesso di conoscere i più recenti sviluppi dell'argomento trattato.
2. Sintesi del copolimero statistico a base di PBS e contenente Pripol 1009 mediante l'usuale procedura di policondensazione in massa a due stadi.
3. Caratterizzazione molecolare del copolimero sintetizzato tramite spettroscopia NMR al protone e cromatografia di permeazione su gel.
4. Preparazione del film per pressofusione
5. Preparazione per elettrofilatura dello *scaffold*, previa ottimizzazione delle condizioni di processo
6. Caratterizzazione termica e diffrattometrica del film e dello *scaffold*
7. Caratterizzazione meccanica attraverso prove di trazione a rottura e cicliche del film e dello *scaffold*
8. Studi di degradazione idrolitica in condizioni fisiologiche condotti sia sul film che sullo *scaffold*
9. Analisi dei risultati ottenuti ed estrapolazione di relazioni proprietà-struttura: in particolare confronto tra film e *scaffold* e comparazione con l'omopolimero di riferimento PBS precedentemente studiato dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Lotti.

Il lavoro svolto, qui presentato in maniera schematica, sarà trattato in modo approfondito nella sezione di questo elaborato dedicata alla parte sperimentale.

CAPITOLO 3 – METODI E STRUMENTAZIONE UTILIZZATI

3.1 Sintesi

Il presente lavoro di Tesi è stato svolto presso i laboratori del Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali dell'Università di Bologna (laboratori LAMAC) e presso il laboratorio di Electrosinching Gene-Assembler del CNR di Bologna.

Il polimero oggetto del presente elaborato è stato ottenuto tramite la usuale procedura di policondensazione in massa a due stadi, utilizzando un catalizzatore organometallico.

Come mostrato in Figura 3.1, l'apparecchiatura impiegata è costituita da un pallone di vetro a tre colli da 250 mL con un sistema di refrigerazione che lascia ricadere i sottoprodotti della reazione in una trappola di raccolta. Il pallone è immerso in un bagno di sali termostatati inorganici (nitrati e nitriti di potassio e sodio) ed il sistema è tenuto in agitazione mediante un agitatore meccanico formato da un albero motore su cui sono posti degli estensimetri per la misura del momento torcente, necessario a mantenere costante la rotazione delle pale. Queste, infatti, a causa dell'aumento della viscosità del fluido, legato all'incremento del peso molecolare, incontrano maggiore resistenza al procedere della polimerizzazione. Temperatura e torque vengono costantemente monitorati durante la reazione. L'impiego di una pompa da vuoto facilita l'eliminazione delle specie a basso peso molecolare.

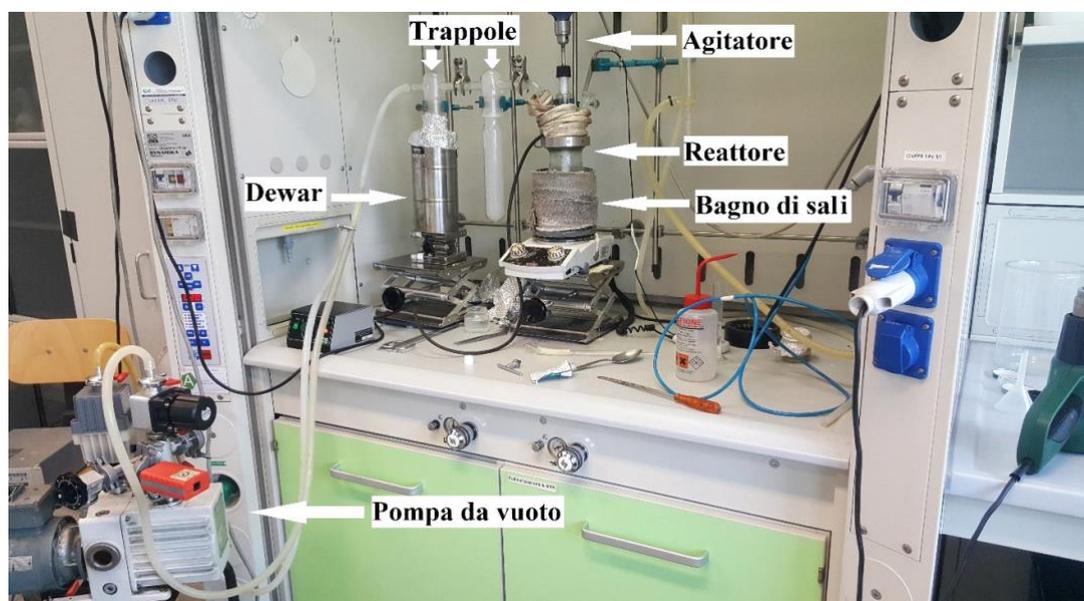


Figura 3.1 Schema dell'apparecchiatura per la polimerizzazione

Il copolimero statistico PBSP(BSPripol) è stato ottenuto tramite policondensazione in massa a due stadi, utilizzando come reagenti di partenza dimetil succinato (DMS) e Pripol, in un determinato rapporto molare, e 1,4-butandiolo (BD) 1009. In questo caso si è lavorato con un eccesso del 30% di

BD, per assicurare la formazione preferenziale dei terminali idrossilici. Entrambi i reagenti, le cui strutture chimiche sono riportate in Figura 3.2, si presentano in forma di liquido incolore.

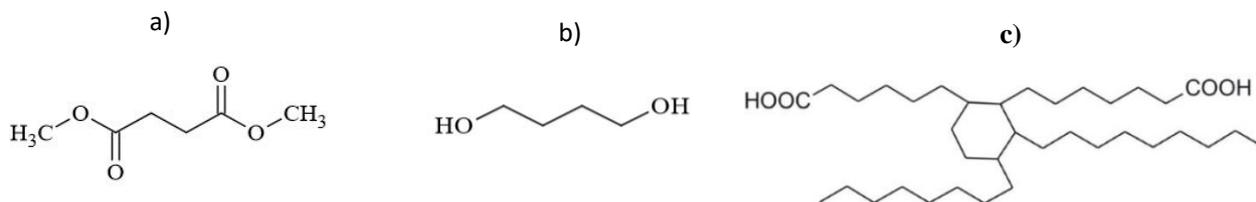


Figura 3.2 Struttura chimica del dimetil succinato (a), dell'1,4-butandiolo (b) e del Pripol 1009 (c)

In aggiunta ai reagenti, si è utilizzato come catalizzatore il titanio(IV)tetrabutossido (Ti(OBu)₄, TBT), in quantità pari a 400 ppm/grammo di polimero teoricamente ottenibile. Tutti i reagenti e il catalizzatore sono stati caricati nel reattore di polimerizzazione simultaneamente all'inizio del processo di sintesi.

Il primo stadio della reazione è stato condotto alla temperatura di 190°C, sotto flusso controllato di azoto e con un'agitazione di 100 giri al minuto. In questa prima fase hanno luogo le reazioni di transesterificazione diretta con successiva eliminazione di specie a basso peso molecolare, nel caso in esame molecole di metanolo.

Il secondo stadio ha inizio quando almeno il 90% del metanolo teorico è raccolto nella trappola di condensazione mediante distillazione. In questa fase avvengono ulteriori reazioni di transesterificazione tra gli oligomeri ottenuti precedentemente; dopo tempi di reazione non molto lunghi, si giunge alla formazione di polimeri a basso peso molecolare. Durante questo stadio la temperatura viene aumentata di 10°C ogni 30 minuti, fino al raggiungimento di 230°C. Contemporaneamente, la pressione all'interno del reattore viene ridotta fino a 0,09 mbar con una pompa da vuoto, al fine di rimuovere, tramite distillazione, l'eccesso di diolo e spostare l'equilibrio di reazione verso i prodotti. Raggiunti i valori desiderati di temperatura e pressione, questi vengono mantenuti costanti fino al termine della reazione. Il processo ha avuto una durata totale di circa 5 ore. La reazione è stata eseguita in un reattore da 200 mL, all'interno del quale sono stati caricati 8,18 g di DMS, 9,37 g di BD, 13,68 g di Pripol 1009 e 0,2 g/kg polimero di TBT. Il copolimero è stato sintetizzato in un rapporto molare 70:30 PBS:PB Pripol. Il copolimero P(BSBPripol) è risultato essere un materiale trasparente ed elastico.

3.1.1 Realizzazione di film

La preparazione di film sottili è stata effettuata tramite pressofusione, utilizzando una pressa con piastre in alluminio (Figura 3.3). Per avere un film delle dimensioni di 10x10 cm sono stati utilizzati circa 2 grammi di materiale, posto tra due strati di teflon per garantire film dallo spessore uniforme (0,1-0,2 mm). Per ciascuna prova la temperatura della pressa è stata impostata ad un valore superiore di 40°C rispetto alla temperatura di fusione del polimero, al fine di permetterne la completa fusione; successivamente è stata applicata una pressione costante del valore di $20 \cdot 10^3$ N per due minuti. Infine, le piastre sono state raffreddate in pressione, in modo da garantire la solidificazione del campione nella nuova forma.

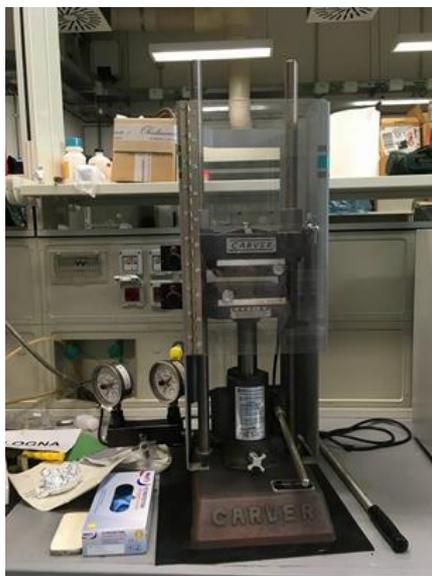


Figura 3.3 Pressa utilizzata per la preparazione di film sottili

3.1.2 Realizzazione di *scaffold*

La preparazione di *scaffold* tridimensionali costituiti da fibre nanometriche è stata effettuata mediante elettrofilatura. Lo strumento è costituito da un generatore di tensione ad alto voltaggio (± 30 kV, 5 mA) (SVH150, Alintel Power Electronics, Italia), una siringa, dotata di ago di diametro ristretto (0,2-1,5 mm), contenente la soluzione polimerica, una pompa per infusione (KDS200, KD Scientific Inc., USA) che spinge lo stantuffo della siringa ad una velocità costante. Infine, vi è un collettore metallico in acciaio inossidabile, collegato a terra (Figura 3.4).



Figura 3.4 Strumentazione per elettrofilatura

La preparazione di ciascuno scaffold elettrofilato è avvenuta seguendo la procedura sotto riportata:

- 600 mg di polimero sono stati disciolti in 4 mL di esafluoro-isopropanolo, al fine di ottenere una soluzione al 15% w/v; la soluzione viene solitamente mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per una notte, per permettere il completo scioglimento del polimero.
- La soluzione è stata caricata all'interno di una siringa in vetro, alla cui estremità è stato inserito un ago del diametro di 0,8 mm. La siringa è stata poi posta sul portacampione.
- Si aziona la pompa, in maniera tale da avere un flusso costante di 0,05 mL/min e contemporaneamente si applica un campo elettrico di intensità pari a 20 kV. La distanza tra ago e collettore è stata fissata a 15 cm.
- Al termine dell'infusione, che ha una durata di circa 45 minuti, sono stati ottenuti tappetini fibrosi dalle dimensioni di circa 7x7 cm.

3.2 Caratterizzazione molecolare

3.2.1 Risonanza magnetica nucleare (NMR)

La risonanza magnetica nucleare è una tecnica utilizzata per determinare la struttura chimica dei materiali. Il principio che sta alla base di questo processo sfrutta la capacità che hanno i nuclei di alcuni atomi di creare un campo magnetico elementare in seguito alla rotazione intorno al proprio asse, se sottoposti ad un campo magnetico esterno. Tale rotazione viene definita come spin (I), o momento angolare intrinseco; le proprietà di spin dei protoni e dei neutroni si combinano per definire lo spin totale dei nuclei, da cui deriva il loro eventuale momento magnetico. Infatti, non tutti i nuclei

atomici possiedono proprietà magnetiche, ma solo quelli con numero quantico di spin non intero, ovvero quelli con numero atomico dispari ($I = n/2$, dove n è il numero atomico). Gli atomi usati tipicamente sono ^1H e ^{13}C (spin $1/2$). Quando un nucleo dotato di spin viene immerso in un campo magnetico, esso, come l'ago di una bussola, è sottoposto ad una coppia di forze che lo fanno ruotare al fine di allinearlo col campo esterno. Per un nucleo con spin $1/2$, sono due gli orientamenti permessi: uno parallelo al campo (bassa energia) e uno antiparallelo (alta energia) (Figura 3.5).

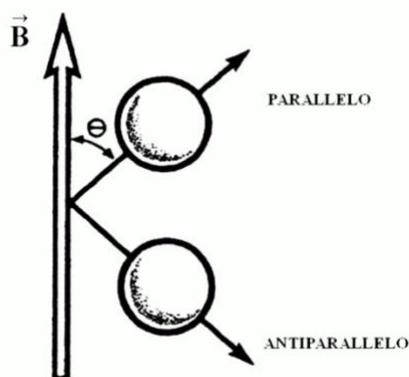


Figura 3.5 In presenza di un campo magnetico esterno B , gli spin adottano una delle due possibili orientazioni, denominate parallela e antiparallela

Il momento magnetico nucleare μ , in seguito all'allineamento del nucleo, non rimane fermo, ma continua ad oscillare attorno alla direzione di B , compiendo un moto di precessione simile a quello di una trottola. Il moto di precessione dei momenti magnetici nucleari avviene con una frequenza proporzionale alla differenza di energia tra i due livelli, detta frequenza di Larmor (ν), data dalla formula:

$$\nu = \gamma \cdot \frac{B_0}{2\pi}$$

dove γ è il rapporto giromagnetico.

Il valore di ν è positivo se momento magnetico e momento angolare sono paralleli, negativo se sono antiparalleli. All'aumentare dell'intensità del campo magnetico applicato B , aumenta la differenza di energia tra i due livelli (Figura 3.6). Nonostante la differenza sia molto piccola, da questo esiguo numero di nuclei è possibile estrarre il segnale NMR. Arrivati a questo punto, la risultante di tutti i momenti magnetici nucleari risulta diversa da zero, ed è esprimibile mediante un vettore debole intensità allineato con il campo magnetico primario B .

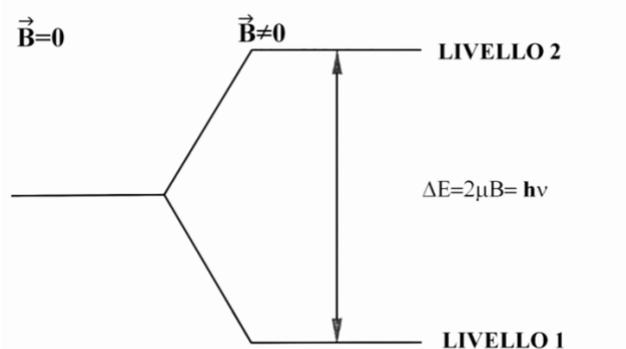


Figura 3.6 Energia ed orientamento dei nuclei con o senza campo magnetico esterno

L'assorbimento di un fotone da parte del campione è in grado di indurre una transizione tra i due stati energetici di una particella facendola passare dallo stato di bassa energia allo stato a più alta energia (Figura 3.7). Ovviamente il contenuto energetico di questo fotone deve essere esattamente pari alla differenza di energia tra i due stati, e quindi la radiazione elettromagnetica deve essere di frequenza uguale alla frequenza di Larmor dei nuclei in esame. Quando si verifica questa transizione, si dice che i nuclei sono in risonanza con la radiazione applicata: da qui il nome di risonanza magnetica nucleare. Il passaggio di un nucleo da una possibile orientazione all'altra è possibile tramite l'assorbimento (o l'emissione) di una quantità di energia pari a:

$$E = h\nu = 2\mu B$$

dove h è la costante di Planck e ν è la frequenza della radiazione elettromagnetica assorbita.

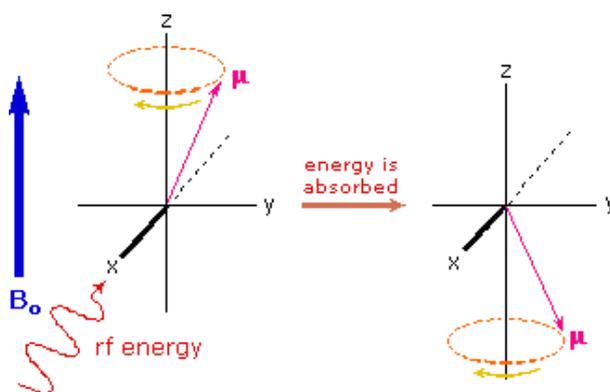


Figura 3.7 Transizione tra due stati di uno spin nucleare

Nei moderni strumenti, il segnale viene generato con il metodo ad impulso; in questo modo tutti i nuclei di una specie vengono eccitati contemporaneamente da un impulso che contiene tutto l'intervallo di frequenze necessario e i dati vengono poi elaborati al computer con la tecnica della trasformata di Fourier. Il segnale ottenuto sarebbe un segnale oscillante con frequenza ν (la frequenza di Larmor) che si smorza nel tempo e che viene definito FID (*Free Induction Decay*) (Figura 3.8);

questo accade perché quando si interrompe l'impulso di radiofrequenza i nuclei eccitati continuano ad emettere per qualche istante un debole segnale di radiofrequenza che si spegne nel tempo, come un'eco del segnale assorbito. Il segnale registrato rappresenta una misura dell'intensità dell'energia trasmessa in funzione del tempo. Per ottenere lo spettro NMR, costituito da diversi picchi più o meno elevati in base alla maggiore o minore presenza del corrispondente costituente, è necessario riportare il segnale in funzione della frequenza.

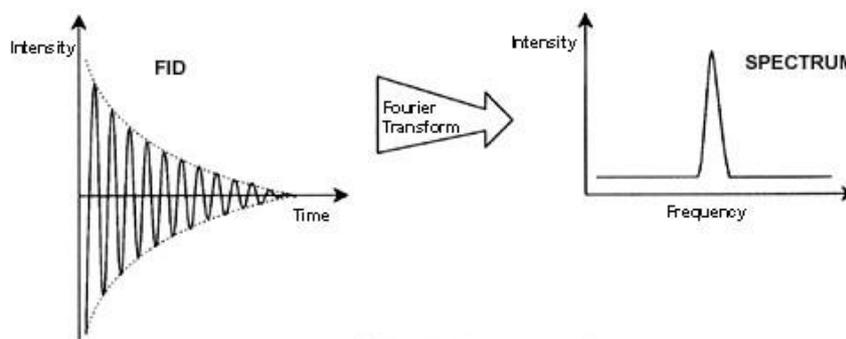


Figura 3.8 La sequenza FID e il relativo spettro NMR

I diversi picchi si ritrovano ad occupare posizioni a frequenze più o meno elevate proprio a seconda dell'intorno chimico che circonda l'atomo tracciante, in base ad un fenomeno di schermatura dovuto alla carica negativa delle particelle elettroniche. Ciò accade perché gli elettroni, essendo particelle cariche, se immersi in un campo magnetico B_0 si muovono generando, in opposizione ad esso, un piccolo campo magnetico opposto e secondario. Tale campo scherma il nucleo dal campo B_0 ; in particolare, quanto più grande è la densità elettronica, tanto maggiore sarà la schermatura: i nuclei che si trovano in un intorno ricco di elettroni sentiranno un campo magnetico più basso, e quindi subiranno la transizione ad una frequenza applicata più bassa rispetto ai nuclei situati in intorni poveri di elettroni. Lo spostamento risultante nel segnale NMR per un dato nucleo viene detto spostamento chimico δ ; in generale, protoni o carboni adiacenti ad atomi elettronegativi risultano deschermati, di conseguenza avvertono un campo magnetico applicato più intenso, subiscono transizione a frequenze maggiori e, nello spettro, vengono individuati in corrispondenza di uno spostamento chimico più alto. Dal momento che lo spostamento chimico assoluto risulta direttamente proporzionale al campo applicato, strumenti diversi fornirebbero spostamenti chimici assoluti diversi; al fine di superare tale limitazione, si utilizza lo spostamento chimico relativo δ , misurato in ppm [Hz/MHz], e definito dall'equazione:

$$\delta = \frac{\Delta\nu}{\nu_r}$$

dove ν_r è la frequenza di risonanza del tetrametilestano (TMS), il nucleo di riferimento, e ν è la frequenza di risonanza del campione considerato. Tipicamente, per il nucleo dell'atomo ^1H e per

molte molecole organiche, δ è compreso nell'intervallo tra 0 e 10 ppm, mentre per ^{13}C -NMR δ si estende all'interno dell'intervallo 0-220 ppm. In uno spettro ^1H -NMR, ad atomi di idrogeno con intorni chimici diversi corrispondono picchi diversi; considerando l'area sottesa da ogni picco, valutata in termini relativi (le misure in termini assoluti risultano prive di valore, in quanto variabili a seconda della concentrazione della soluzione), è possibile determinare il rapporto tra i vari tipi di atomi di idrogeno presenti. Dividendo poi l'area di ogni picco per il numero di idrogeni a cui corrisponde, si ottengono valori perfettamente confrontabili con quelli dati dalla formula chimica del polimero analizzato. Gli spettri sono stati ottenuti usando uno spettrometro NMR Varian XL-400. Le soluzioni sono state preparate sciogliendo circa 10 mg di polimero in cloroformio deuterato (0.03%); come standard interno è stato utilizzato il tetrametilsilano. Gli spettri della spettroscopia ^1H -NMR sono stati acquisiti a temperatura ambiente con concentrazione dei polimeri pari al 0.5 wt% (con tempo di rilassamento pari a 0 secondi, tempo di acquisizione di 1 secondo per 100 ripetizioni).

3.2.2 Cromatografia a permeazione su gel (GPC)

La cromatografia di permeazione su gel (GPC) è una tecnica di separazione fisica che consente di determinare la distribuzione di peso molecolare in un polimero. Il metodo di analisi dei campioni si basa sulla creazione di curve di taratura attraverso standard di polimeri a peso molecolare noto e ad una successiva analisi per il confronto. Lo strumento è costituito da una pompa volumetrica, una colonna costituita da una resina porosa (polistirene reticolato con divinilbenzene) ed un rivelatore (Figura 3.9).

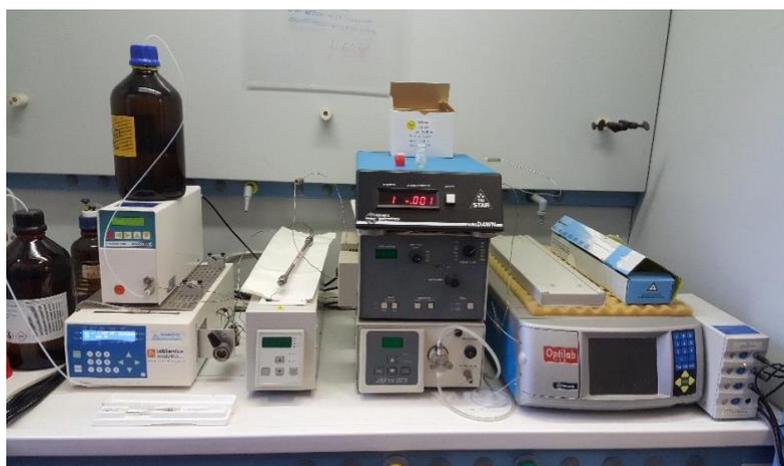


Figura 3.9 Strumentazione GPC

La separazione dei diversi pesi molecolari è dovuta al fatto che le molecole più grandi non penetrano nei pori, limitandosi ad aggirare i corpi di riempimento, le molecole più piccole invece riescono ad entrare nei suddetti pori, dove il liquido scorre più lentamente; di conseguenza le molecole ad alto

peso molecolare usciranno in tempi brevi, quelle a basso peso molecolare impiegheranno invece più tempo. Durante la scansione in colonna viene fatto circolare un solvente con portata volumetrica costante. I campioni da analizzare vengono sciolti nello stesso solvente circolante in colonna, filtrati (attraverso l'utilizzo di un'apposita siringa al fine di eliminare eventuali particelle non solubili che potrebbero ostruire i pori) (Figura 3.10) e quindi iniettati.

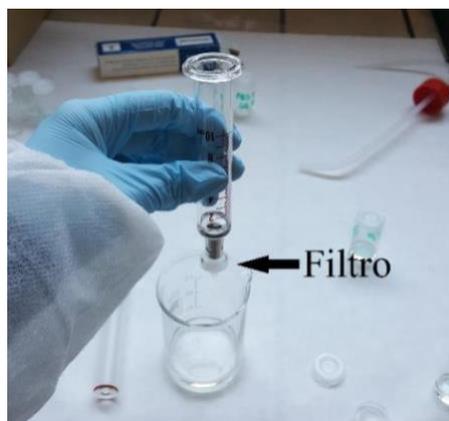


Figura 3.10 Filtrazione dei campioni disciolti nel solvente

La soluzione in uscita dalla colonna viene analizzata da un sensore che fornisce, istante per istante, un segnale la cui intensità è proporzionale alla concentrazione del soluto. Il risultato dell'analisi è un grafico che riporta l'andamento dell'intensità del segnale in funzione del tempo; per convertire i tempi in pesi molecolari è necessario fare riferimento alle curve di taratura, ottenute analizzando campioni standard di polistirene (PS) a peso molecolare noto. Le misure di GPC sono state ottenute a 30 °C con un cromatografo HP Series 1100 HPLC per mezzo di una colonna PL gel 5 μ m MiniMIX-C (rapporto lunghezza/diametro in mm interno 250/4.6). I cromatogrammi sono stati registrati con HP Chemstation versione A.05.04 ed elaborati con GPC Calculator 7.6 software sviluppato dalla General Electric Company. Come eluente è stato utilizzato cloroformio, con flusso in colonna pari a 0.3 mL/min, precedentemente filtrato e fatto fluire attraverso un degasatore, al fine di rimuovere le particelle gassose che, analogamente a quelle non solubili, potrebbero ostruire i pori del gel. Tutte le soluzioni utilizzate contenevano una concentrazione di polimero pari a 2 mg/ml. Per costruire la curva di taratura sono stati impiegati vari standard di polistirene con peso molecolare variabile tra 2000 Da e 100000 Da, per mezzo di una curva del terzo ordine. Il software associato al cromatografo calcola automaticamente, in base alla distribuzione ottenuta, il peso molecolare medio numerico (M_n) e l'indice di polidispersità del campione (PD).

3.3 Caratterizzazione termica

3.3.1 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

La calorimetria differenziale a scansione (DSC) è una tecnica utilizzata per studiare le proprietà termiche di varie sostanze, tra le quali troviamo i polimeri. È possibile rilevare le trasformazioni chimico-fisiche che avvengono e che comportano una variazione di entalpia o di capacità termica; inoltre è possibile ottenere informazioni quali la temperatura ed il flusso di calore associati alla transizione vetrosa, alla fusione ed alla cristallizzazione. Per ricavare informazioni sul materiale in analisi, questo viene riscaldato e raffreddato in maniera controllata, misurando la differenza di flusso termico tra il campione in esame e quello di riferimento (solitamente si utilizza una capsula in alluminio vuota) mentre i due sono vincolati ad una temperatura variabile definita da un programma prestabilito (Figura 3.11).

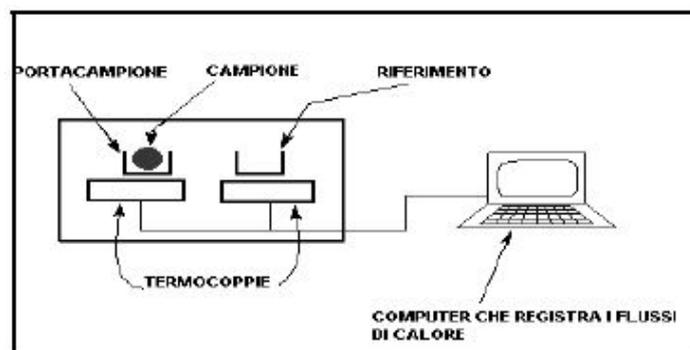


Figura 3.11 Schema di funzionamento della DSC

Un calorimetro a scansione differenziale risulta costituito da alcune parti fondamentali:

1. Una cella calorimetrica mantenuta in atmosfera inerte, che contiene la capsula con il campione e la capsula di riferimento. Queste vengono sottoposte allo stesso programma termico. Quando però la sostanza in esame subisce una transizione di fase, si crea una differenza di temperatura tra il campione e il riferimento. Lo strumento opera in modo da mantenere il ΔT tra i due uguale a zero, quindi viene fornita sufficiente energia per raggiungere questa situazione. Il flusso di calore necessario viene registrato e riportato come output.
2. Un computer interfacciato con il calorimetro mediante il quale si imposta la procedura di analisi e si elaborano i dati sperimentali. Il diagramma in uscita riporta il flusso di calore, ΔQ , in funzione della temperatura. Le transizioni del primo ordine, come la fusione e la cristallizzazione, si manifestano con dei picchi, rispettivamente endotermici ed esotermici, mentre la transizione vetrosa provoca una variazione endoterma “a scalino” della linea di base.

La temperatura di transizione vetrosa (T_g) indica il passaggio da uno stato solido vetroso ad uno gommoso, i legami C-C cominciano a ruotare e si manifesta come una variazione endoterma della linea di base. L'entità della variazione di calore specifico associato alla transizione vetrosa (ΔC_p), proporzionale alla componente amorfa presente nel materiale, è pari alla distanza verticale tra le linee di base estrapolate alla T_g :

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

dove dT/dt è la velocità di scansione.

La temperatura di fusione (T_m) rappresenta il passaggio dallo stato solido a quello fuso, momento in cui si rompono le strutture dei cristalli. Nel tracciato DSC essa si presenta come un picco endotermico (Figura 3.12). L'area sottesa al picco corrisponde al calore di fusione ΔH_m (J/g), proporzionale alla cristallinità del polimero; il rapporto tra quest'ultima grandezza e il calore di fusione del polimero completamente cristallino costituisce il grado di cristallinità del materiale.

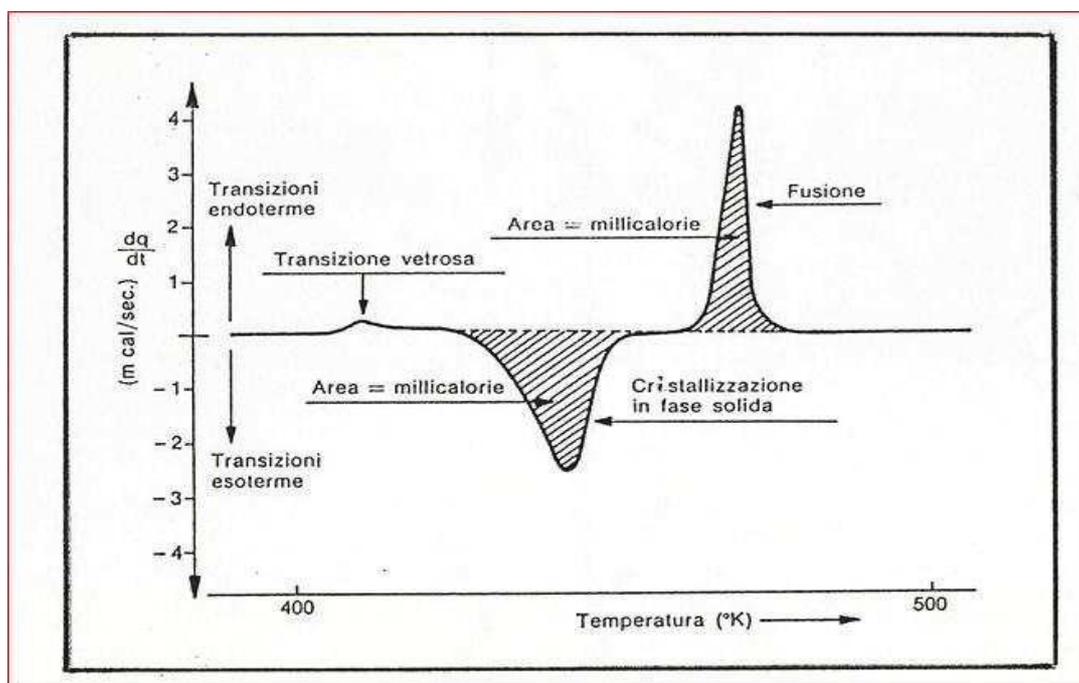


Figura 3.12 Esempio di curva DSC

Le misure DSC sono state ottenute con un DCS6 Perkin-Elmer equipaggiato di accessori per il raffreddamento a temperature minori di 0°C e calibrato con standard ad elevata purezza. La capsula

contenente il campione è stata riempita con circa 6-8 mg di materiale e, insieme alla capsula di riferimento lasciata vuota, è stata sottoposta ad un programma termico ben definito:

- prima scansione: riscaldamento da -70°C a 180°C a velocità di $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, mantenimento a 180°C per 4 minuti;
- raffreddamento rapido (velocità di $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$) fino a -70°C ;
- seconda scansione: riscaldamento in condizioni di temperatura e velocità analoghe alla prima scansione.

3.3.2 Termogravimetria (TGA)

La termogravimetria è una tecnica che misura la variazione di peso di una sostanza soggetta ad un riscaldamento controllato in atmosfera controllata (aria, O_2 , N_2). In questa maniera è possibile ottenere informazioni sia sulla stabilità termica di un materiale che sulla sua cinetica di decomposizione. Questa tecnica di analisi risulta fondamentale per definire i limiti di temperatura entro i quali il polimero può essere lavorato per evitare di incorrere nella sua degradazione.

Lo strumento utilizzato è la termobilancia PerkinElmer TGA 4000: all'interno di una fornace termostata e ad atmosfera controllata, vi è un piattello su cui viene posto una quantità di campione compresa tra 5-10 mg. Lo strumento è collegato ad un calcolatore sul quale viene impostato l'intervallo di temperature di lavoro e la velocità di scansione. Il termogramma in uscita riporta la variazione percentuale di peso in funzione della temperatura (Figura 3.13). La procedura utilizzata per l'analisi dei polimeri sintetizzati, prevede una scansione da 40°C a 800°C ad una velocità di $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ in flusso di azoto.

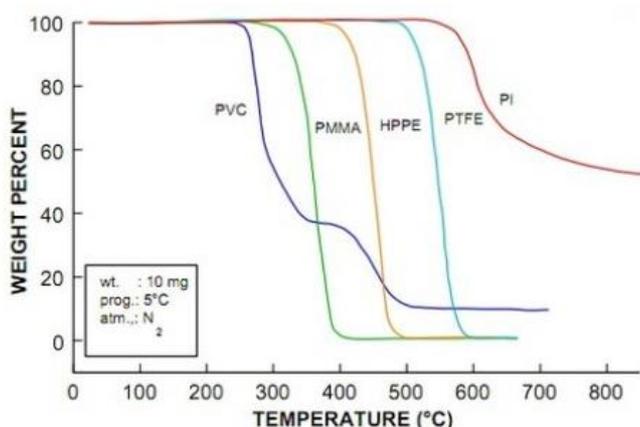


Figura 3.13 Curve termogravimetriche di polimeri

Nel presente lavoro di tesi sono state prese in considerazione la temperatura di inizio decomposizione (T_{onset}) e la temperatura corrispondente alla massima velocità di perdita di peso (T_{max}).

3.3.3 Diffrazione a raggi X

La diffrazione a raggi X è la principale tecnica utilizzata per determinare la struttura ed il grado di cristallinità dei materiali. Si tratta di un'analisi non distruttiva che consente di determinare la struttura del materiale in esame. Permette inoltre di comprendere: la dinamica in stato solido, il tipo di legame chimico (semplice o multiplo) e la distanza di legame, le transizioni di fase, il polimorfismo e i possibili arrangiamenti spaziali, studiando gli effetti dell'interazione tra un fascio di raggi X e la materia cristallina. L'analisi viene condotta con l'ausilio di un diffrattometro, che emette una radiazione indirizzata verso il cristallo, dove si diffonde in tutte le direzioni grazie al contributo degli elettroni. Lo strumento è composto da:

- un tubo generatore di raggi X;
- alcuni filtri monocromatori, che isolano una specifica lunghezza d'onda λ , e collimatori, che convogliano il fascio in una direzione preferenziale;
- piatto porta-campione, su cui viene posizionato il materiale da analizzare;
- un filtro collimatore secondario, che viene investito dalla radiazione diffratta dal materiale;
- rivelatore detector finale che traduce l'onda elettromagnetica diffratta nell'output XRD.

Il principio di funzionamento di tale tecnica si basa sulla Legge di Bragg:

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

che descrive l'interazione tra la radiazione incidente ed il cristallo permettendo, sotto le ipotesi di raggi paralleli e in fase, di ricavare la distanza di legame d imponendo la lunghezza d'onda λ e misurando l'angolo di incidenza θ (Figura 3.14).

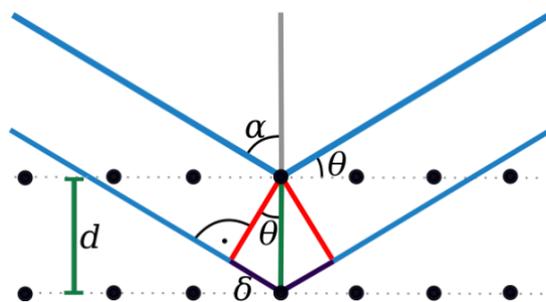


Figura 3.14 Diffrazione di raggi paralleli secondo Bragg

I pattern di diffrazione a Raggi X dei film polimerici sono stati ottenuti per mezzo di un diffrattometro X'PertPro PANalytical che utilizza la lunghezza d'onda del rame ($\lambda = 0.15418$ nm), equipaggiato con un rivelatore allo stato solido X'Celerator. I dati sono stati acquisiti nell'intervallo 2θ da 5 a 60° con

passo di 1°, e tempo di conteggio pari a 100 secondi per punto. Gli indici di cristallinità χ_c sono stati calcolati in base ai diagrammi di diffrazione (Figura 3.15), effettuando il rapporto tra l'area di diffrazione cristallina, ovvero l'area data dalla frazione di materiale cristallino (A_C), e l'area totale del profilo di diffrazione (A_T), tenendo conto della radiazione diffusa e secondo l'equazione:

$$\chi_c = A_C / A_T$$

L'area di diffrazione cristallina è stata ottenuta sottraendo all'area totale la curva dovuta alla diffusione del materiale amorfo, modellata come picco a campana sulla linea di base.

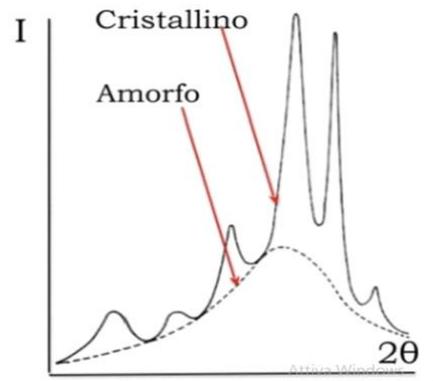


Figura 3.15 Esempio di diffrattogramma di un polimero semicristallino

3.4 Caratterizzazione meccanica

3.4.1 Misure stress-strain a rottura e cicliche

La caratterizzazione meccanica permette di studiare il comportamento dei materiali polimerici in presenza di sollecitazioni meccaniche di diverso tipo. Nelle prove tensili lo sforzo σ (stress) viene definito dal rapporto tra il carico applicato N e l'area A della sezione del provino prima del test:

$$\sigma = \frac{N}{A}$$

e la deformazione ε (strain) corrisponde all'allungamento (Δl) relativo alla lunghezza iniziale l del provino:

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l}$$

La strumentazione con cui si effettuano queste prove è costituita da un dinamometro schematizzabile in alcuni sottocomponenti (Figura 3.16):

- una base rigida con aggancio rigido;
- due aste laterali di sostegno;

- una traversa orizzontale con aggancio superiore che può spostarsi verticalmente lungo le barre laterali;
- un attuatore meccanico che controlla il moto della struttura superiore;
- un pannello di controllo;
- un visualizzatore a video.

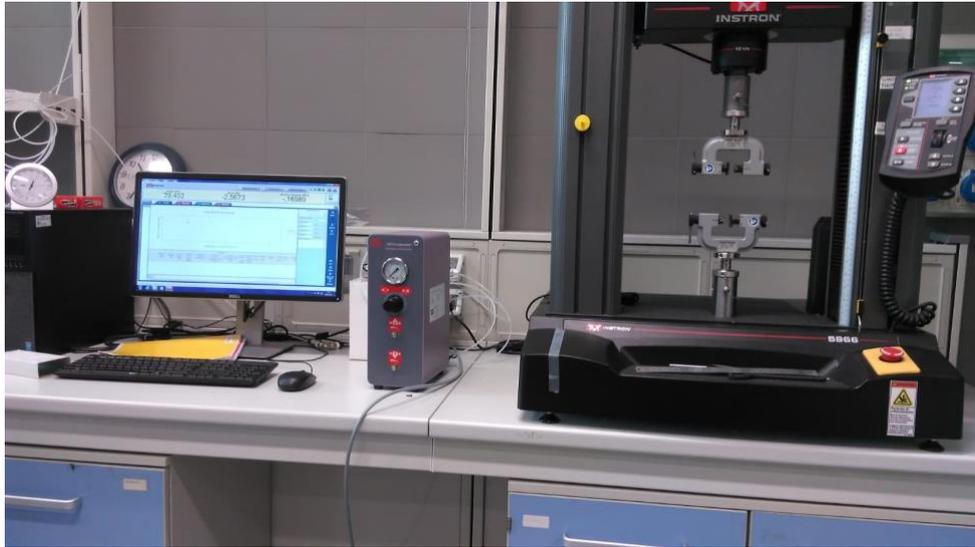


Figura 3.16 Strumentazione per prove meccaniche

Durante la prova si misura il valore del carico al variare della lunghezza del provino e in tal modo si ottengono dei diagrammi sforzo-deformazione, che presenta in ascissa ϵ ed in ordinata σ (Figura 3.17).

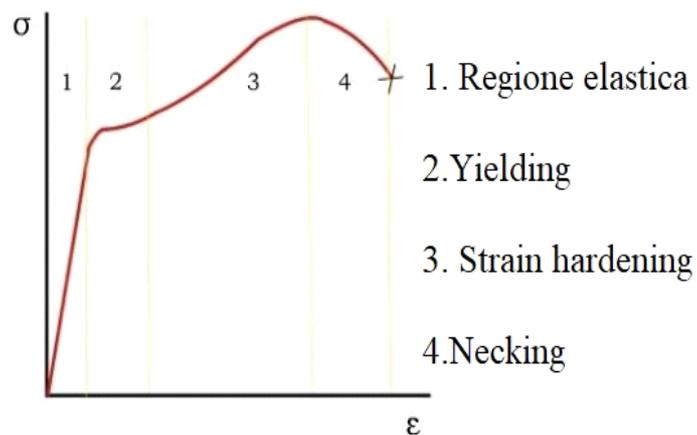


Figura 3.17 Esempio di curva sforzo-deformazione per materiali duttili

Questo grafico è costituito da quattro diverse zone: regione elastica, di *yielding*, di *strain hardening* e infine di *necking*. Nel primo tratto, detto campo elastico, la curva risulta essere lineare poiché il materiale segue, fino al raggiungimento di un punto detto limite elastico, la legge di Hooke:

$$\sigma = E \cdot \varepsilon$$

La costante di proporzionalità E indica il modulo elastico di Young, il cui valore corrisponde, per definizione, alla pendenza del tratto iniziale rettilineo della curva sforzo-deformazione. All'aumentare della deformazione si arriva ad un punto, detto di snervamento, in cui la deformazione permane anche in piccola parte quando il carico viene eliminato. Il materiale ha, quindi, subito una deformazione permanente e si è entrati nel campo plastico. Dall'area sottesa alla curva è possibile inoltre valutare la tenacità, che è una misura dell'energia necessaria per rompere il materiale. I dati ottenuti dalle prove meccaniche non dipendono solamente dal tipo di polimero (struttura chimica, cristallinità, peso molecolare), ma risentono, oltre che della temperatura, anche delle condizioni di prova, quali la velocità di allungamento, la forma e le dimensioni del provino. È quindi necessario operare in condizioni sperimentali strettamente controllate per poter confrontare il comportamento meccanico dei diversi materiali e porlo in relazione con le caratteristiche strutturali. Le prove meccaniche sono state condotte utilizzando un dinamometro Instron 5966 con cella di carico di 100 N. Lo strumento è costituito da una struttura rigida di base e una traversa mobile posta nella parte superiore. Dai film polimerici e dagli scaffold sono state ottenute striscioline rettangolari dalle dimensioni di 5x40 mm, il cui spessore è stato misurato in tre punti diversi per mezzo di un micrometro: lo spessore utilizzato per l'analisi è stato ottenuto calcolando una media sulle tre misure. I provini sono stati fissati per mezzo di agganci (Figura 3.18), in maniera tale da avere un tratto utile di 20 mm e l'applicazione del carico è avvenuta tramite il movimento verso l'alto della traversa superiore. Il valore della forza impressa è stato misurato dalla cella di carico, mentre l'allungamento è stato determinato sulla base della distanza percorsa dalla traversa mobile. Le prove a rottura sono state condotte a temperatura ambiente, su 6 provini diversi, con velocità pari a 10 mm/min. Il modulo elastico riportato è stato calcolato come valore medio \pm deviazione standard delle 6 prove.

Per quanto riguarda le prove cicliche, condotte anch'esse su 6 provini, per ciascuno dei 20 cicli effettuati, ogni campione è stato prima portato ad una deformazione del 50%, e poi riportato alla condizione iniziale (0,001 MPa) ad una velocità di 50 mm/min.



Figura 3.18 *Scaffold* sottoposto a trazione

3.5 Prove di degradazione idrolitica

Questo test viene effettuato allo scopo di misurare la velocità di degradazione di un materiale in condizioni che simulano l'ambiente corporeo. Gli esperimenti sono stati condotti su campioni di film e *scaffold* di circa 40 mg che sono stati posti in condizioni fisiologiche di temperatura e pH (37°C e pH 7,4). A tale scopo si è preparato una soluzione di tampone fosfato in modo da mantenere il pH al valore desiderato. I campioni sono stati posti in *vial* in vetro contenenti 5 mL di soluzione acquosa tamponata. Questi sono stati mantenuti in agitazione ad una temperatura costante di 37°C per periodi di tempo variabili, all'interno di un bagno termostatico con scuotitore azionato alla frequenza di 60 giri/minuto.

La soluzione tampone è stata preparata nel seguente modo: in 800 mL di acqua distillata sono stati disciolti 8 g di NaCl, 0,2 g di KCl, 1,44 g di Na₂HPO₄ e 0,24 g di KH₂PO₄; il pH della soluzione è stato aggiustato al valore di 7,4 per aggiunta di HCl e il volume finale portato ad 1 litro.

Nel presente lavoro di Tesi sono stati preparati e mantenuti in incubazione 14 provini del copolimero. Sono stati effettuati 7 prelievi, uno ogni 21 giorni, in duplicato, al fine di analizzare le conseguenze legate al processo degradativo. Al momento del prelievo, i campioni sono stati rimossi dalla soluzione, lavati con acqua distillata per eliminare i sali della soluzione tampone, asciugati con carta

assorbente. I materiali prelevati vengono essiccati a temperatura ambiente, fino alla completa eliminazione dell'acqua residua e al raggiungimento di un peso costante. Al termine di questa procedura, i campioni parzialmente degradati sono stati pesati e analizzati mediante cromatografia a permeazione su gel (GPC), per poter valutare, oltre alla perdita di peso gravimetrica, anche variazioni relative al peso molecolare. Inoltre, sono state condotte anche analisi $^1\text{H-NMR}$, DSC e diffrattometrica a raggi X.

3.6 Microscopico elettronico a scansione (SEM)

La microscopia elettronica a scansione (SEM) è una tecnica analitica che permette di esaminare la morfologia superficiale di un campione. Questa tecnica ha una risoluzione spaziale medio-alta (circa 1 micron, anche mille volte più della microscopia ottica) e la sua innovazione consiste nell'utilizzo dell'elettrone al posto del fotone, che possiede una lunghezza d'onda molto minore (frequenza più alta) ed è quindi capace di provocare risposte in corpi molto più piccoli. Con il SEM si è capaci di fare sia *imaging* sia spettroscopia grazie alle diverse risposte fisiche che si hanno quando il campione è investito dagli elettroni primari (gli elettroni scaturiti dal cannone elettronico all'apice del microscopio) lanciati contro di lui. Da essi si generano tre risposte:

- Elettroni secondari: quando un elettrone primario si scontra con la nube elettronica di un atomo sulla superficie del campione viene rifratto indietro perdendo molta energia e viene identificato da un detector apposito.
- Elettroni retrodiffusi: quando un elettrone primario si scontra con il nucleo di atomo del campione viene rifratto indietro con un urto quasi elastico, che non influisce di molto con l'energia cinetica dell'elettrone. Un detector parallelo al primo capta questi elettroni dall'energia cinetica maggiore come retrodiffusi. A seconda del numero atomico dell'atomo colpito avrà una densità maggiore di retrodiffusi dove ci sono numeri atomici maggiori.
- Raggi X: un elettrone primario potrebbe anche urtare con gli elettroni interni (non quelli di valenza) e in alcuni casi anche strapparli via. L'atomo in questione si ionizza ed emette un raggio X per tornare stabile. I segnali associati ai raggi X vengono analizzati in frequenza e forniscono informazioni sulla composizione chimica del campione, poiché la loro analisi si basa sull'energia di ogni singola radiazione X, corrispondente ad un salto quantico atomico. Sapendo che ogni elemento chimico ha uno schema caratteristico di salti quantici si può perciò risalire alla chimica superficiale del campione.

La struttura del SEM (Figura 3.19) comprende due sistemi elettronici: il microscopio e un tubo a raggi catodici. Entrambi hanno un apparato per il lancio elettronico, lenti per l'indirizzamento del raggio di elettroni, placchette comandate in tensione da un segnale a dente di sega per la modulazione

in x e y e camere sottovuoto, per la propagazione libera degli elettroni. Il campione è posto sul fondo della camera apposita nel microscopio, sotto al quale vi è solo una pompa che assicura il vuoto dopo ogni estrazione o inserimento. Subito accanto al campione vi sono i tre detector, che acquisiscono le tre informazioni utili e le mandano al display. Il segnale in uscita dai detector viene manipolato per modulare l'intensità di ogni elemento della matrice visualizzata: a seconda della quota calcolata, viene assegnato un valore in toni di grigio.

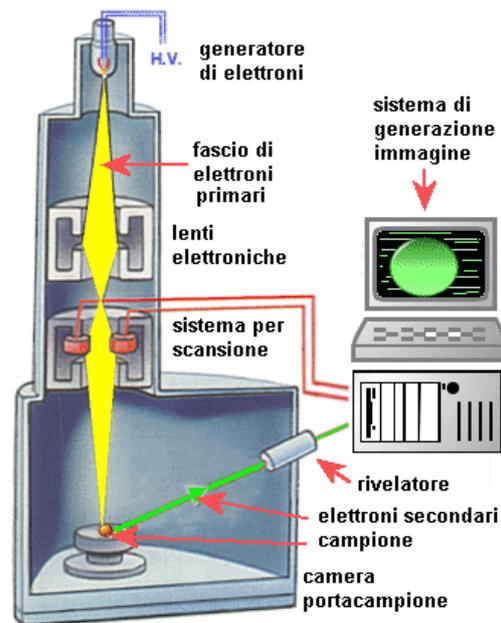


Figura 3.19 Struttura del SEM

La procedura generale per la preparazione dei campioni è la seguente: il campione viene montato su un apposito supporto (*stub*) di materiale conduttore (alluminio) e incollato con un materiale adesivo (pasta di argento o nastro biadesivo di grafite) che sia un buon conduttore di elettroni dallo *stub* al campione. Nel caso di materiali non conduttori, essi vengono sottoposti ad un processo di metallizzazione, che consiste nella stesura di un sottile strato di materiale conduttore direttamente sul campione. Lo strumento utilizzato per l'analisi è un microscopio EVO LS LaB6. Le immagini SEM sono state acquisite utilizzando un voltaggio di 5 kV ed una distanza di lavoro di 5 mm, su campioni metallizzati con oro. L'analisi d'immagine è stata effettuata con GIMP 2.8, un software di acquisizione e analisi di immagine (EDAX Genesis); la distribuzione dei diametri delle fibre elettrofilate è stata calcolata come valor medio delle misure dei diametri di 150 fibre.

CAPITOLO 4 – RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Sintesi e caratterizzazione molecolare

La struttura chimica e la composizione, sia molare che in peso, sono stati calcolati tramite spettroscopia di risonanza magnetica nucleare ($^1\text{H-NMR}$), mentre il peso molecolare (M_n) e l'indice di polidispersità (D) sono stati determinati tramite cromatografia di permeazione su gel (GPC).

Nella Tabella 4.1 sono riportati i dati della caratterizzazione molecolare dell'omopolimero PBS e del copolimero statistico PBSP(BPripol).

Polimero	BS (mol%)	BS (wt%)	M_n (g/mol)	D
PBS	100	100	41300	2
PBSP(BPripol)	58	28	39000	2,4

Tabella 4.1 Caratterizzazione molecolare di PBSP(BPripol)

In Figura 4.1 è riportato lo spettro del copolimero insieme alla formula molecolare corrispondente e all'attribuzione dei picchi. Gli spettri ottenuti sono risultati coerenti con la struttura prevista, permettendo di escludere reazioni secondarie durante la polimerizzazione.

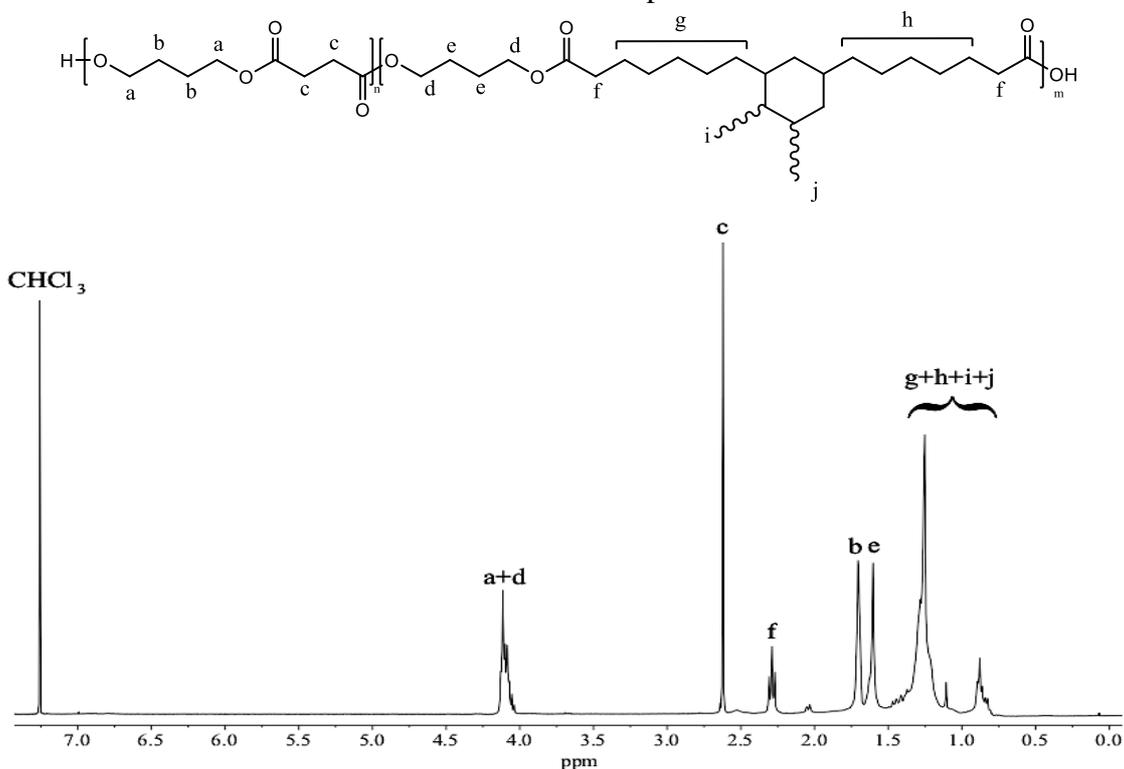


Figura 4.1 Spettro $^1\text{H-NMR}$ del PBSP(BPripol), con attribuzione dei picchi

Lo spettro mostra chiaramente i segnali ascrivibili ai segmenti BS: a δ 4,19 e 1,70 ppm sono evidenti i segnali dei protoni metilenici della subunità glicolica, rispettivamente a e b, mentre a δ 2,61 ppm

risuonano gli idrogeni della subunità succinica, *c*. I restanti segnali sono invece imputabili ai segmenti BPripol: a δ 4,18 e 1,62 ppm troviamo i picchi dei protoni metilenici della subunità glicolica, rispettivamente *d* e *e*; a δ 2,29 ppm si trova il tripletto (*f*) ascrivibile agli idrogeni in α al carbonile della subunità acida Pripol. A campi più alti ($1,5 \text{ ppm} < \delta < 0,7 \text{ ppm}$) si evidenziano i picchi dovuti alle catene alchiliche e alla struttura cicloesamica del Pripol.

L'analisi $^1\text{H-NMR}$ ha permesso inoltre di determinare la composizione del copolimero statistico valutando l'area sottesa ai segnali di interesse. A tale scopo, si è considerata l'area del segnale *f* a δ 2,3 ppm, della subunità Pripol, e l'area del picco *c* a δ 2,6 ppm della subunità succinica. La composizione è stata quindi calcolata come:

$$\text{mol}\%BS = \frac{I_c (2,61 \text{ ppm})}{I_c (2,61 \text{ ppm}) + I_f (2,29 \text{ ppm})} \cdot 100$$

La percentuale di BS presente nel copolimero così calcolata è risultata del 58%.

In Tabella 4.1 sono inoltre riportati i valori di peso molecolare medio numerico (M_n) per i polimeri oggetto della presente Tesi che risultano alti e confrontabili tra loro a conferma del buon controllo del processo di policondensazione.

4.2 Preparazione e caratterizzazione morfologica

Nella parte introduttiva di questo lavoro di Tesi è stato descritto il processo di *electrospinning* o elettrofilatura, una tecnica che permette di produrre, a partire da una soluzione polimerica, fibre di dimensioni nanometriche o micrometriche, in funzione delle condizioni sperimentali. Numerosi parametri tra loro correlati controllano il processo, in particolare in questa Tesi si è scelto di ottimizzare le condizioni sperimentali per l'elettrofilatura dei polimeri ad elevato peso molecolare, eseguendo diverse prove che prevedevano la variazione dei seguenti parametri uno per volta:

1. concentrazione della soluzione
2. potenziale
3. distanza ago-collettore
4. velocità di flusso della soluzione.

La scelta del solvente è molto importante in quanto determina la possibilità di ottenere delle fibre e, nel caso in cui siano presenti, di determinarne la morfologia. Inoltre, non sempre un solvente in grado di solubilizzare completamente un determinato polimero, possiede anche le caratteristiche adatte per

essere utilizzato in un processo di elettrofilatura. La costante dielettrica del solvente, che è una misura della polarità delle molecole del solvente, costituisce uno dei parametri principali da considerare nella scelta del sistema polimero/solvente. Il requisito fondamentale affinché la soluzione possa essere elettrofilata è che la carica elettrica superi la tensione superficiale. L'utilizzo quindi di un solvente con un valore elevato di costante dielettrica favorisce la formazione di una notevole densità di carica nella soluzione e quindi facilita la formazione di fibre. Nella maggior parte dei casi si è osservato che, se il solvente ha un'alta costante dielettrica, le fibre polimeriche mostrano un diametro inferiore. L'ottimizzazione del processo ha due diverse finalità:

- Ottenere fibre dell'ordine delle centinaia di nanometri.
- Perdere meno materiale elettrofilato possibile tentando di rendere minima la quantità di sostanza che si deposita all'esterno della piastra di raccolta durante il processo.

Nella Figura 4.2 si riporta l'immagine SEM (con ingrandimento) dello *scaffold* elettrofilato. L'assenza di *beads* indica la buona messa a punto del processo. Lo sviluppo della fase cristallina durante l'evaporazione del solvente permette di evitare la formazione di agglomerati, conferendo alle fibre solidità strutturale. La membrana è un intreccio di filamenti di dimensioni piuttosto diverse e questo è probabilmente dovuto a fenomeni di *jet-splitting*, che partono dal getto primario e causano getti secondari di dimensioni inferiori.

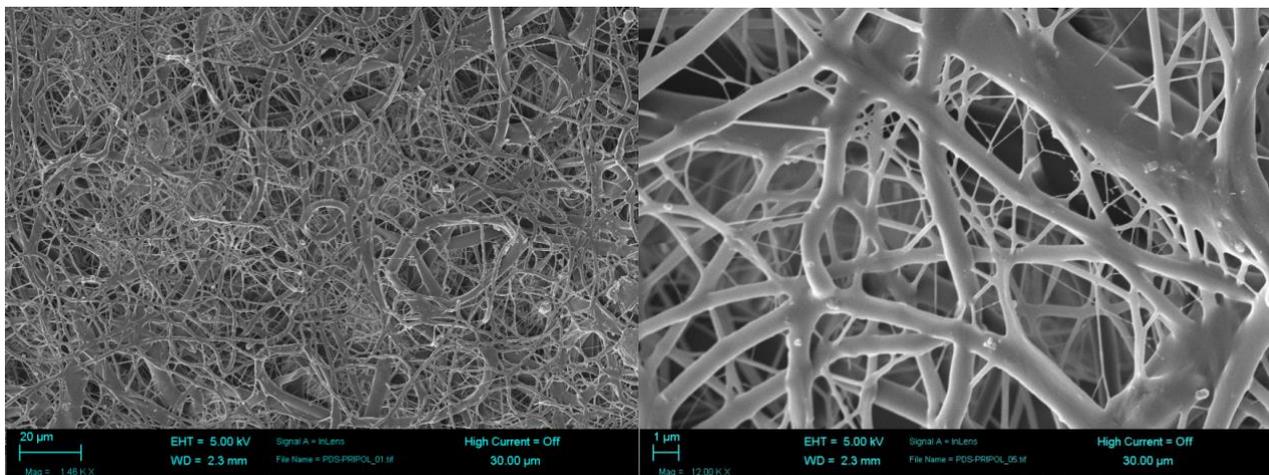


Figura 4.2 Immagini SEM (con ingrandimento) dello *scaffold* di PBSP(BPripol)

La distribuzione dimensionale non Gaussiana delle fibre è dovuta probabilmente al fenomeno del *jet splitting*. La maggior parte delle nanofibre è compresa tra 100 e 400 nm di diametro, mentre le microfibre hanno un diametro di circa 1 µm (Figura 4.3).

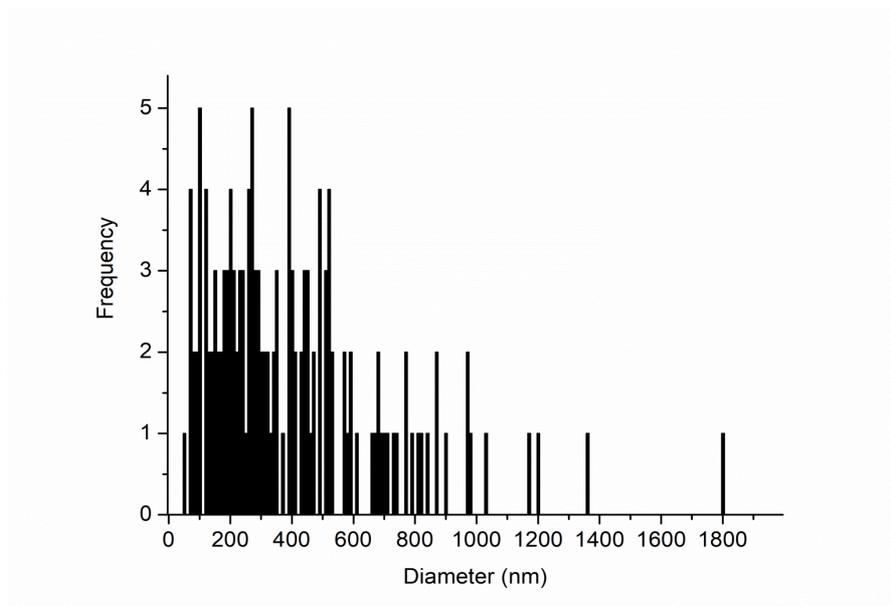


Figura 4.3 Distribuzione dimensionale del diametro delle fibre del PBSP(BPripol) elettrofilato

4.3 Caratterizzazione termica e strutturale

4.3.1 Analisi termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica (TGA) ha permesso di valutare la stabilità termica dei campioni in esame. Conoscere la temperatura di degradazione risulta di fondamentale importanza dal punto di vista tecnologico, dal momento che permette di lavorare sul materiale senza incorrere in problemi legati a processi di decomposizione termica.

La TGA è stata effettuata come descritto nella parte di “Materiali e Metodi”, eseguendo una rampa di temperatura da 40°C a 800 °C a 10 °C/min in atmosfera controllata di azoto.

Le curve TGA del PBS e del PBSP(BPripol) sono riportate in Figura 4.4 mentre i dati ottenuti dall'analisi sono riassunti in Tabella 4.3.

Dal grafico del peso residuo vs. temperatura è possibile individuare le due temperature che caratterizzano la stabilità termica del polimero:

- T_{deg} : è la temperatura di massima velocità di degradazione e si ottiene dal valore corrispondente al massimo del picco di derivata della curva TGA.

- T_{onset} : è la temperatura che rappresenta l'inizio della degradazione, si ottiene dall'intersezione di due tangenti alla curva: la prima retta è tangente alla parte iniziale della curva, mentre la seconda ha origine nel punto di T_{deg} .

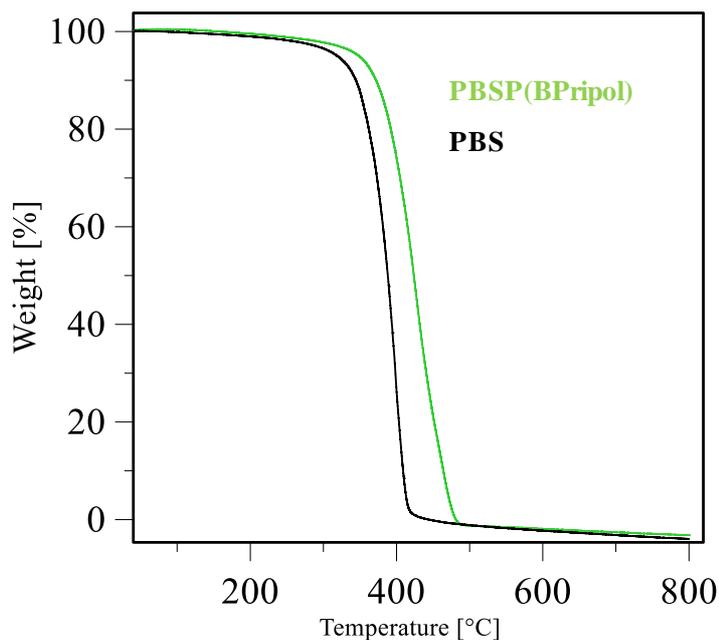


Figura 4.4 Grafico dell'analisi termogravimetrica

Polimero	T_{deg} [°C]	T_{onset} [°C]
PBS	409	376
PBSP(BPripol)	426	381

Tabella 4.3 T_{deg} e T_{onset} derivati dall'analisi termogravimetrica

L'analisi termogravimetrica dimostra un'ottima stabilità termica di entrambi i polimeri e, inoltre, evidenzia come l'introduzione lungo la catena polimerica del PBS di cunità Pripol determini un miglioramento della stabilità del copolimero. Infatti, non solo la sua degradazione inizia a temperatura superiore, ma anche il raggiungimento della massima velocità di tale processo, avviene ad una temperatura di circa 20 gradi maggiore rispetto all'omopolimero PBS. La maggiore stabilità è probabilmente dovuta alla diminuzione, nel copolimero, della densità di gruppi esterei per unità di lunghezza di catena.

4.3.2 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

Nel caso del copolimero PBSP(BPripol) in forma di film e di *scaffold*, l'analisi calorimetrica è stata eseguita dopo tre settimane di permanenza a temperatura ambiente. In questo modo, i fenomeni di cristallizzazione che coinvolgono i segmenti BS, che potrebbero avvenire con cinetiche più lente rispetto all'omopolimero, riescono ad avere luogo permettendo il raggiungimento dell'equilibrio termodinamico del sistema (Tabella 4.4).

Campione	I SCAN			
	T _g (°C)	ΔC _p (J/g · °C)	T _m (°C)	ΔH _m (J/g)
PBS FILM	-29	0,155	119	67
PBSP(BPripol) FILM	-50	0,194	42 ; 65	20
PBSP(BPripol) SCAFFOLD	-51	0,192	47 ; 64	23

Tabella 4.4 Dati di caratterizzazione termica del copolimero

In Figura 4.5 sono riportate le curve calorimetriche di prima scansione del PBS film e del PBSP(BPripol), quest'ultimo sotto forma sia di film che di *scaffold*. Il tracciato DSC dell'omopolimero di riferimento PBS mostra, come atteso, un comportamento assimilabile a quello di un materiale semicristallino, con una variazione endotermica della linea di base intorno a -30°C, associata al fenomeno della transizione vetrosa (T_g), seguita da un intenso picco di fusione (T_m) a temperatura più alta (119°C).

Le curve del copolimero PBSP(BPripol) sia sotto forma di film che di *scaffold*, mostrano delle variazioni rispetto a quella del PBS.

In particolare, per quanto riguarda il fenomeno della transizione vetrosa è possibile notare una diminuzione della T_g (da -29 °C nel PBS a -50 °C nel PBSP(BPripol)) accompagnato da un aumento di ΔC_p (da 0.155 J/g °C nel PBS a 0.194 J/g °C nel PBSP(BPripol)). Tali effetti sono da imputare alla maggiore flessibilità della catena polimerica impartita dai gruppi metilenici nel segmento principale e dai pendagli laterali della subunità acida Pripol, e alla diminuzione della porzione cristallina conseguente alla ridotta capacità a cristallizzare del copolimero. La cunità Pripol, infatti, a causa della diversa struttura chimica, del maggiore ingombro sterico e della presenza di pendagli laterali, ostacola il processo di cristallizzazione dei segmenti BS. Di conseguenza nel copolimero si evidenzia un processo di fusione molto meno intenso (il valore di ΔH_m è tre volte più basso rispetto all'omopolimero) e a temperatura sensibilmente inferiore (65°C nel copolimero rispetto a 119° nell'omopolimero). Dunque, i dati sperimentali raccolti mostrano la presenza di un minore contenuto di fase cristallina (ΔH_m minore), quest'ultima caratterizzata inoltre da più difetti (T_m inferiore).

Per quanto riguarda il confronto tra film e *scaffold*, si nota come i due tracciati DSC siano molto simili, nonostante la lavorazione e l'aspetto dei materiali siano differenti. In particolare, le curve calorimetriche di entrambi mostrano due picchi endotermici ravvicinati, condizione che può essere attribuita a diversi fattori: i) processo di fusione/ricristallizzazione/fusione di cristalli con basso grado di ordine; ii) presenza di due popolazioni distinte di cristalli che, a causa della loro differente natura,

sono caratterizzate da differenti temperature di fusione. Non è possibile definire con certezza la natura di questi due picchi se non tramite analisi diffrattometrica. Infine, confrontando i valori calorimetrici dei copolimeri, si nota che lo *scaffold* non solo presenta un inizio di fusione ad una temperatura di 5 °C maggiore rispetto al film, ma che l'intervallo di temperature in cui avviene risulta minore ($\Delta T_{m, scaffold} = 17^\circ\text{C}$; $\Delta T_{m, film} = 23^\circ\text{C}$). Questo può essere attribuito ad una popolazione di cristalli più omogenea. Ovviamente queste differenze sono da ricondursi al metodo di lavorazione con cui è stato ottenuto il manufatto finale (film o *scaffold*). Nel processo di elettrofilatura, le catene macromolecolari vengono indotte ad organizzarsi in strutture cristalline dall'evaporazione del solvente. È intuitivo che il fenomeno si verifichi in maniera istantanea, quindi le catene si dispongono in fasi cristalline in un tempo estremamente limitato, guidate da un'unica forza predominante che è quella di evaporazione. In questa situazione, variabili esterne o altri fattori che potrebbero entrare in gioco per favorire una differente popolazione di cristalli non hanno il tempo di agire, o non sono sufficientemente forti da influire più del fenomeno di evaporazione. Ben diversa è la situazione per quanto riguarda il film, ottenuto per raffreddamento del fuso a temperatura ambiente: in questo caso, le catene hanno tempi più lunghi per organizzarsi. Inoltre, non risentendo di un fenomeno davvero dominante per la loro organizzazione, giocano un ruolo fondamentale variabili e fattori esterni che favoriscono l'eterogeneità della popolazione cristallina. Considerando anche il maggiore valore di ΔH_m registrato per lo *scaffold* è possibile ipotizzare che il processo di elettrofilatura non solo aiuti le catene nell'organizzarsi in strutture cristalline più omogenee, ma favorisca anche un leggero sovrasviluppo della fase cristallina rispetto al film.

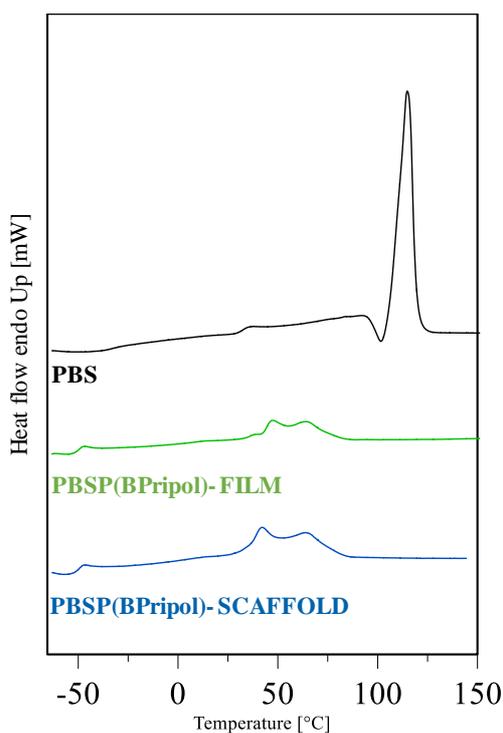


Figura 4.5 Curve DSC dell'omopolimero PBS e del copolimero PBSP(BPripol) sotto forma di film o *scaffold*

4.3.3 Analisi diffrattometrica a Raggi X

L'analisi diffrattometrica a raggi X è stata effettuata al fine di determinare la natura della fase cristallina presente nel copolimero statistico (sia filmato che elettrofilato) e calcolarne il grado di cristallinità. I diffrattogrammi, infatti, presentano alcuni riflessi dovuti alla componente cristallina del materiale, sovrapposti ad una linea di base a campana dovuta alla sua porzione amorfa.

I materiali analizzati, sia sotto forma di film che di *scaffold*, presentano il profilo di diffrazione caratteristico della fase α del PBS ⁽²⁷⁾ (Figura 4.6) Non si osservano ulteriori riflessi, dunque è presente un'unica fase cristallina, costituita appunto dal PBS. La posizione dei riflessi nel caso del copolimero non varia rispetto a quella osservata per l'omopolimero. Questa evidenza porta ad ipotizzare la completa esclusione della co-unità Pripol dalla cella cristallina del PBS.

Il grado di cristallinità X_C è riportato in Tabella 4.5.

Campione	X_C , film (%)	X_C , <i>scaffold</i> (%)
PBS ²⁶	46	/
PBSP(BPripol)	14	19

Tabella 4.5 Dati di caratterizzazione diffrattometrica

L'omopolimero PBS presenta una cristallinità molto più marcata rispetto al copolimero, sia in forma di film che *scaffold*. Questo risultato è innanzitutto attribuibile ad una marcata riduzione della regolarità costituzionale lunga la catena polimerica, primo e più importante requisito per la cristallizzabilità di un polimero. La struttura chimica del Pripol, caratterizzata sia da lunghe catene metileniche principali che laterali, è infatti molto diversa da quella del PBS. La presenza dei segmenti BPripol lungo la catena polimerica ostacola il processo di ripiegamento, limitando la formazione di cristalli, e in più determina una distorsione della cella cristallina deducibile dalla maggiore ampiezza dei riflessi nel copolimero. Questo aspetto viene messo in luce dal rapporto tra i due picchi principali a 19 e 23 2θ , che varia nei diversi campioni studiati. Se nell'omopolimero il riflesso a 23 2θ è più intenso di quello a 19 2θ , per il PBSP(BPripol) film l'altezza dei due è simile. Nello *scaffold*, invece, il segnale a 23 2θ è quasi completamente soppresso, dunque il riflesso a 19 2θ diviene il picco predominante. Si può quindi ipotizzare che nel copolimero statistico a base di Pripol vi sia una parziale distorsione del reticolo cristallino, che determina una perdita del grado di ordine in una determinata direzione.

Da ultimo, è importante sottolineare come i risultati dell'analisi diffrattometrica confermino le evidenze sperimentali ottenute tramite calorimetria a scansione differenziale.

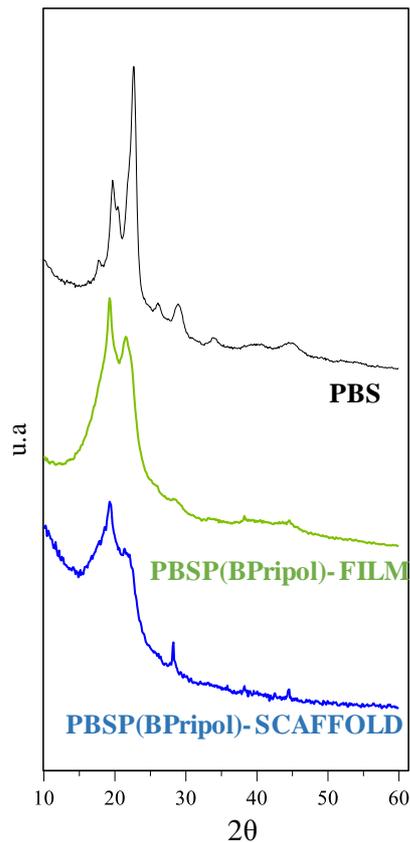


Figura 4.6 Diagrammi di diffrazione dei materiali: confronto tra PBS e PBSP(BPripol) film e PBSP(BPripol) *scaffold*

4.4 Prove meccaniche

Le misure meccaniche, a rottura e cicliche, sono state eseguite su campioni di forma rettangolare (film 50 x 5 x 0.3 mm e *scaffold* 50 x 5 x 0.05 mm). Nelle misure di trazione, il provino è stato allungato a velocità costante misurando la variazione dello sforzo, che viene poi riportata in grafico in funzione della deformazione.

Nelle prove cicliche il campione è stato sottoposto a 20 cicli di carico-scarico per un allungamento del 50%. Anche in questo caso si registra lo sforzo applicato durante la deformazione. Per ogni campione le misure sono state effettuate su 5 provini diversi, riportando il risultato come valore medio delle 5 prove \pm deviazione standard.

In Figura 4.7 sono riportate le curve *stress-strain* ottenute per il PBS e per il copolimero sia in forma di film che di *scaffold*. In Tabella 4.6 sono raccolti i valori di modulo elastico (E), di sforzo (σ) e deformazione (ϵ) a rottura, registrati durante le prove meccaniche a trazione.

Campione	E [MPa]	σ_{Max} [MPa]	ϵ_{max} %
PBS	301±25	16 ± 2	5 ± 1
PBSP(BPripol) - FILM	14 ± 2	4 ± 0,4	472 ± 16
PBSP(BPripol) -SCAFFOLD	10 ± 3	2 ± 0,3	104 ± 16

Tabella 4.6 Dati di caratterizzazione meccanica

Si può notare come per effetto della copolimerizzazione la rigidità meccanica del PBS sia fortemente ridotta. Questo comportamento è in linea con le precedenti osservazioni legate alla cristallinità del copolimero. Si nota infatti che il PBSP(BPripol), sia in forma di film che elettrofilato, mostri un modulo elastico (E) inferiore rispetto al PBS ⁽²⁶⁾ di oltre un ordine di grandezza. Contemporaneamente, si assiste ad un significativo miglioramento in termini di allungamento a rottura: dal 5% per l'omopolimero ⁽²⁶⁾ ad un massimo di circa il 470% per il copolimero in forma di film. L'acquisita flessibilità del copolimero è da attribuirsi alla diminuzione della cristallinità, già mostrata nelle analisi calorimetriche e diffrattometriche, apportata dalla subunità Pripol. Infine, è interessante il confronto tra il copolimero sotto forma di film rispetto allo stesso processato come *scaffold*. Il copolimero elettrofilato risulta essere meno resistente, infatti si rompe con un carico inferiore e sopporta una deformazione previa rottura minore. Questo effetto è da attribuire all'intrinseca natura dello *scaffold*: la presenza di strutture fibrillari distribuite in modo casuale, porta statisticamente ad avere alcune fibre orientate perpendicolarmente alla direzione di stiro. Ovviamente questo facilita la rottura del materiale. Bisogna inoltre considerare la porosità tipica degli elettrofilati, elemento fondamentale per l'accrescimento di cellule, che può fungere da innesco per la frattura.

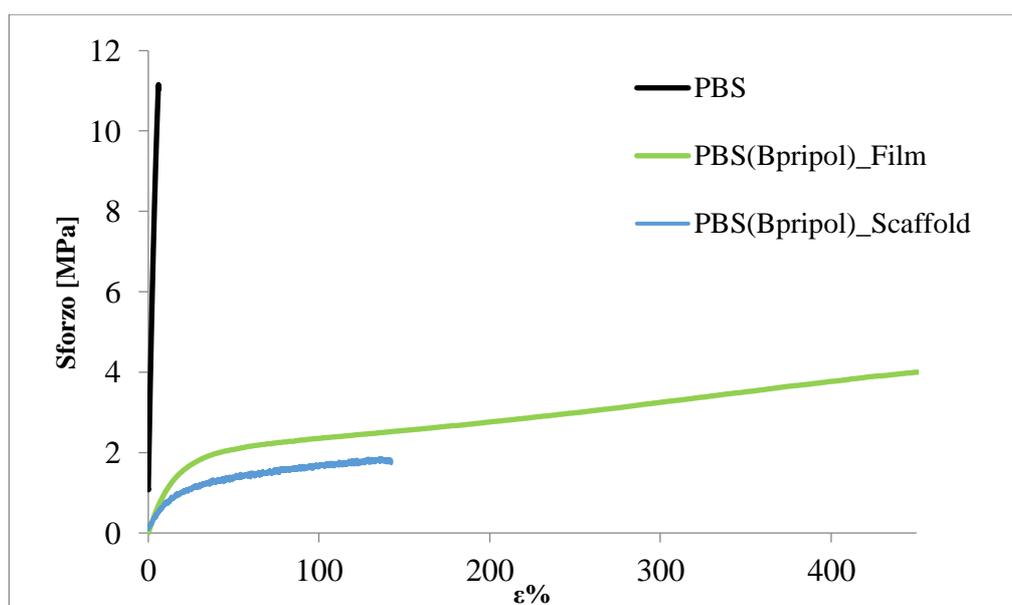


Figura 4.7 Grafico sforzo-deformazione del copolimero statistico filmato PBSP(BPripol)-F e elettrofilato PBSP(BPripol)-S, La curva stress-strain del PBS è aggiunta per confronto

È importante notare che, nonostante l'assenza di una vera e propria struttura a blocchi il copolimero si comporta come tale, mostrando assenza di snervamento, sia nel film che nello *scaffold*. Questo avviene grazie alle elevate dimensioni dell'unità Pripol, che costituisce di per sé una sorta di blocco. Per questo stesso motivo, è stato possibile effettuare prove cicliche sul copolimero statistico PBSP(BPripol), sia sotto forma di film che di *scaffold*. I cicli di carico-scarico effettuati sul film sottolineano, ancora una volta, l'elevata elasticità del materiale, con un ritorno elastico pari al 78% dopo 20 cicli (film). Passando poi alle analisi sullo *scaffold*, questo mostra un recupero elastico intorno al 67%. La minore entità è da attribuirsi ancora una volta alla struttura del materiale: le fibre orientate in modo random si allineano nella direzione di stiro, dissipando in maniera irreversibile una parte dell'energia elastica. Questo comportamento determina sia un recupero elastico inferiore al film che un'isteresi maggiore.

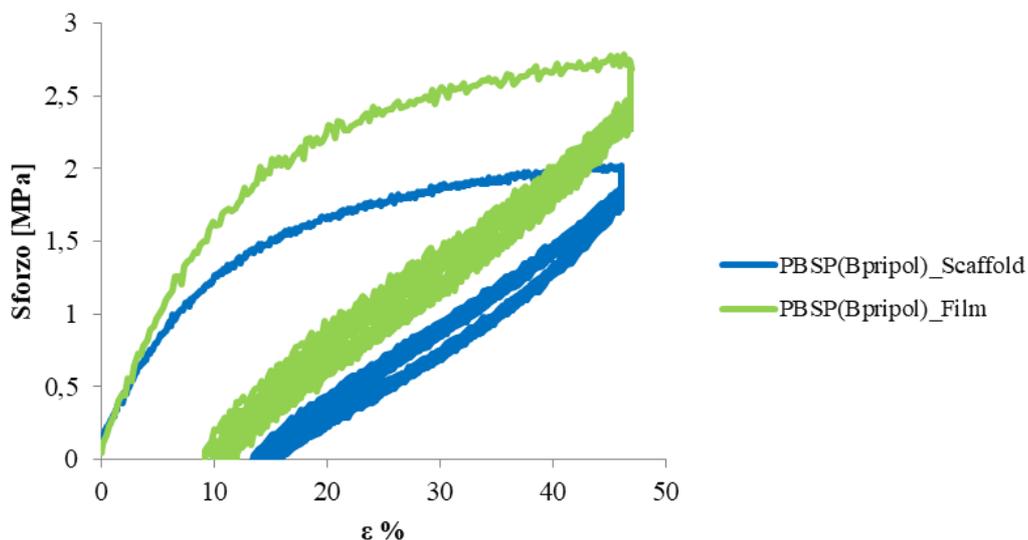


Figura 4.10 Prove cicliche sforzo-deformazione del copolimero statistico (film e *scaffold*)

4.5 Prove di degradazione idrolitica

Le prove di degradazione idrolitica hanno permesso di testare la velocità di degradazione del copolimero in esame in condizioni che simulano l'ambiente corporeo.

In generale, la velocità di degradazione idrolitica dipende da:

Mobilità della catena polimerica: la velocità di degradazione è direttamente proporzionale alla flessibilità di catena.

- Percentuale di fase cristallina e livello di perfezione dei cristalli: la velocità di degradazione è inversamente proporzionale alla percentuale di fase cristallina presente e al grado di perfezione (T_m).

- Densità di gruppi esterei: durante la degradazione idrolitica i gruppi esterei sono coloro che vengono maggiormente attaccati (vengono rotti i loro legami), dunque la velocità sarà direttamente proporzionale al loro contenuto.

A tempi stabiliti, i campioni parzialmente degradati sono stati pesati per valutare la perdita di peso gravimetrico, e analizzati mediante cromatografia a permeazione su gel (GPC) per determinare le variazioni relative al peso molecolare. Inoltre, sono state condotte analisi calorimetriche e diffrattometriche per verificare eventuali variazioni del rapporto fase amorfa/fase cristallina. I risultati ottenuti per il PBS(BPripol) sono stati poi confrontati con quelli precedentemente determinati dal gruppo di ricerca della Prof. Lotti per il PBS ⁽²⁷⁾.

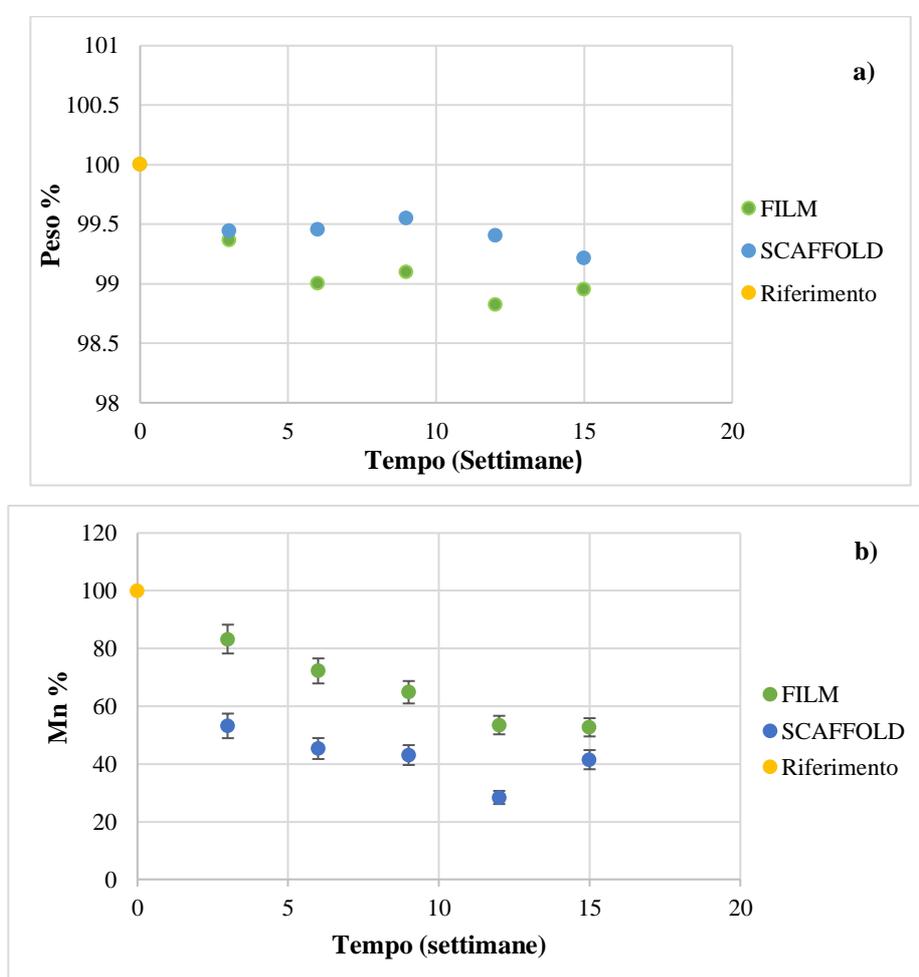


Figura 4.11 Peso gravimetrico residuo percentuale (a) e peso molecolare residuo percentuale (b) del copolimero PBS(BPripol) a diversi tempi di incubazioni in condizioni fisiologiche

In Figura 4.11 a) e b) sono riportati: il peso gravimetrico residuo dei campioni degradati rispetto al loro valore iniziale e il peso molecolare numerico residuo rispetto al campione non incubato, rispettivamente, entrambi in funzione del tempo di incubazione in condizioni fisiologiche. Inoltre, in

Tabella 4.6 sono riassunti i dati di caratterizzazione termica insieme a quelli di degradazione idrolitica.

Come è possibile notare dal grafico in Figura 4.11, la perdita di peso gravimetrico, sia per lo *scaffold* che per il film, anche dopo 15 settimane, non è molto elevata (circa 1 %) e paragonabile al medesimo dato del PBS trattato nelle stesse condizioni (2 %) ⁽²⁷⁾. Per entrambi i campioni, la perdita di peso molecolare, al contrario, si mostra più marcata raggiungendo un valore di circa 50 % dopo 15 settimane di incubazione. La diversa velocità di perdita di peso gravimetrico e di peso molecolare è da ricondursi al fatto che il processo di degradazione idrolitica è un fenomeno che avviene in *bulk*, dunque l'idrolisi non si limita alla superficie del materiale ma si estende a tutto il volume. Una volta che le catene polimeriche subiscono degradazione non vengono necessariamente rilasciate nella soluzione fisiologica, ma possono permanere nella struttura polimerica. È quindi chiaro che, soprattutto nei primi step, il peso gravimetrico non è soggetto a particolari variazioni mentre il peso molecolare diviene indice del fenomeno degradativo in quanto fornisce informazioni sulla dimensione delle catene già nelle prime fasi del processo.

La maggiore velocità di degradazione del PBSP(BPripol) rispetto al PBS è da attribuire alla co-unità inserita: Pripol. Questa, come già mostrato dalle analisi precedenti, determina una forte diminuzione della rigidità di catena (T_g minore), ma soprattutto un'altrettanto forte diminuzione sia della temperatura di fusione che della percentuale di porzione cristallina (ΔH_m), (Tabella 4.5)

Polimero	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	Perdita di peso gravimetrico (%)	Perdita di peso molecolare M_n (%)
PBS ²⁷	-32	115	62	2,0	35
PBSP(BPripol) FILM	-50	65	21	1,0	47
PBSP(BPripol) SCAFFOLD	-51	64	23	0,8	59

Tabella 4.6 Dati di caratterizzazione termica e di degradazione idrolitica del PBS e del copolimero PBSP(BSBPripol), sotto forma di film e *scaffold*

Questi parametri, nonostante il ridotto numero di gruppi esterei rispetto all'omopolimero, concorrono ad aumentare la velocità di degradazione del copolimero. È interessante anche il confronto film/*scaffold*: inizialmente la perdita di peso molecolare sembra avvenire in maniera più lenta per il film, in quanto si registra una diminuzione di M_n graduale, circa pari al 10% per settimana, costante, con un valore finale pari al 47% dopo 15 settimane. Lo *scaffold* invece mostra una degradazione più veloce all'inizio: infatti dopo 6 settimane in soluzione fisiologica raggiunge già una perdita

percentuale di peso molecolare del 45%. Successivamente il processo rallenta, terminando con una perdita massima del 59% dopo 15 settimane. La più alta velocità di degradazione dello *scaffold* nelle prime fasi è probabilmente legata alla maggiore area superficiale esposta alle molecole d'acqua. Per spiegare invece la diminuzione della velocità del processo nello *scaffold* rispetto al film per tempi di incubazione maggiori, bisogna tenere in considerazione che l'idrolisi una volta avviata porta alla formazione di gruppi acidi -COOH che operano un'azione autocatalitica che accelera il processo di degradazione. Tale effetto risulta più intenso per il film spesso circa 200 micron che non per le fibre submicrometriche.

In conclusione, la differente morfologia (film vs. *scaffold*) ha un impatto sulla degradazione idrolitica, la cui cinetica complessiva risulta simile, ma caratterizzata da un meccanismo diverso.

Da ultimo, le analisi calorimetrica e diffrattometrica sui campioni degradati non hanno evidenziato variazioni significative del rapporto fase amorfa/fase cristallina, indicando che sia le zone disordinate che quelle ordinate vengono attaccate in egual misura.

CAPITOLO 5 – CONCLUSIONI

I biomateriali rivestono un ruolo di grande importanza nel settore biomedicale, in particolare in campi emergenti quali l'ingegneria tissutale ed il rilascio controllato di farmaci. I polimeri, ed in particolare i poliesteri alifatici, sono la classe di materiali che si è rivelata più interessante per le applicazioni sopracitate. Ad oggi però, solo pochi poliesteri sono stati approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per la realizzazione di dispositivi medici impiantabili nel corpo umano; tra questi si possono ricordare l'acido polilattico, l'acido poliglicolico, il policaprolattone e i loro copolimeri. Purtroppo, tali materiali non riescono a soddisfare gli stringenti requisiti fisico/meccanici per ogni diversa applicazione, per cui la sintesi di nuovi polimeri, che offrano garanzie di biocompatibilità e biodegradabilità, o la modifica chimica mirata di quelli già disponibili in commercio e già approvati per uso biomedico, come il PLLA, può aprire nuove prospettive in tali ambiti. Tra i polimeri di origine sintetica sperimentati per questo tipo di applicazione, il polibutilene succinato (PBS), recentemente approvato dalla *Food and Drug Administration*, rappresenta anch'esso sicuramente un ottimo candidato, per la sua comprovata biocompatibilità e biodegradabilità. Purtroppo, analogamente al sopracitato PLLA, è un materiale troppo rigido per poter essere impiegato nell'Ingegneria tissutale del miocardio, ambito di interesse della presente Tesi e caratterizzato da una velocità di degradazione troppo bassa.

In questo contesto si inserisce il presente lavoro di Tesi finalizzato alla sintesi e caratterizzazione di un nuovo copoliestere alifatico a base di PBS con proprietà meccaniche migliorative rispetto a quelle dell'omopolimero di riferimento per applicazioni in ambito “*soft tissue engineering*”.

Il gruppo di ricerca presso cui è stata condotta la presente Tesi, vanta una esperienza ventennale nella sintesi e modifica chimica di poliesteri, nonché nella estrapolazione di correlazioni proprietà-struttura fondamentali per il design *ad hoc* di materiali per uso specifico.

Tenuto conto dello scenario sopra descritto e dei risultati precedentemente ottenuti, il lavoro della presente Tesi è specificamente consistito nella preparazione e caratterizzazione di un nuovo copolimero statistico ad elevato peso molecolare, derivato dall'introduzione lungo la catena macromolecolare del PBS del segmento Pripol 1009, disponibile in commercio (CRODA) ed approvato per il contatto con i cibi. Pripol 1009 è utilizzato per svariati motivi, tra questi impartire flessibilità e stabilità termo ossidativa al materiale finale. Il nuovo materiale è stato processato mediante due diverse tecnologie per formare un film e uno *scaffold* con fibre disposte in modo *random*, allo scopo di valutare anche l'impatto della morfologia sulle proprietà finali.

Dai risultati ottenuti nella presente Tesi si evince come gli obiettivi siano stati raggiunti pienamente: le proprietà meccaniche del copolimero studiato sono risultate significativamente diverse dal PBS e, soprattutto, decisamente migliorative in vista di impieghi del materiale nell'ingegneria dei tessuti

molli, indipendentemente dalla morfologia (film o *scaffold*): infatti, il modulo elastico si è ridotto di più di un ordine di grandezza, mentre l'allungamento a rottura è aumentato di 20 volte nel caso dello *scaffold* e di 80 volte nel caso del film. In aggiunta, sia il film che lo *scaffold* mostrano un comportamento tipico degli elastomeri termoplastici: dopo 20 cicli di carico/scarico si è osservato un ritorno elastico del 78% nel caso del film e del 67% per lo *scaffold*. Per quanto concerne la cinetica di riassorbimento idrolitico, i risultati, seppure preliminari sembrano molto promettenti: la cinetica del PBS risulta difatti accelerata per copolimerizzazione.

Da ultimo, ma non meno importante, è da segnalare un miglioramento della stabilità termica del PBS per copolimerizzazione. Va ricordato che qualunque materiale polimerico per uso biomedico deve poter essere processabile senza incorrere in problemi di degradazione termica durante le fasi di lavorazione per la realizzazione del dispositivo.

Grazie al lavoro di ricerca qui descritto è stato infatti possibile realizzare un materiale con spiccate caratteristiche di elastomero termoplastico (basso modulo elastico, relativamente elevato allungamento a rottura, ottimo recupero elastico e bassa isteresi) e al contempo tenace, con buona stabilità termica, addirittura più alta dell'omopolimero di riferimento. Gli obiettivi della ricerca siano stati dunque raggiunti: le proprietà meccaniche sono state significativamente migliorate rispetto a quelle dell'omopolimero di riferimento (PBS) e a quelle dei materiali "*FDA approved*" disponibili in commercio.

Occorre poi sottolineare che il processo di sintesi è molto semplice e non prevede l'uso di solventi o di condizioni operative spinte; le enormi potenzialità di tale strategia sono comprovate dall'utilizzo su scala industriale. Non di secondaria importanza la sua fattibilità economica, la quale è già stata testata.

In conclusione, le proprietà del copoliestere in oggetto risultano estremamente interessanti in vista di possibili applicazioni nel campo dell'ingegneria dei tessuti molli, in particolare del miocardio.

A riprova di ciò, lo *scaffold* è stato sottoposto a prove di biocompatibilità presso i laboratori di Translational Cardiomyology, Department of Development and Regeneration, presso la Katholieke Universiteit di Leuven (KUL), in Belgio, condotte da una dottoranda del gruppo di ricerca presso il quale è stata condotta la presente Tesi, sotto la supervisione del Prof. Maurilio Sampaolesi.

Gli esperimenti sono stati eseguiti su cellule staminali umani pluripotenti (*induced Pluripotent Stem Cells*, iPSCs). In primo luogo, è stata valutata la crescita e la proliferazione di tali cellule a sei giorni dalla semina. Parallelamente, sono state effettuate analisi di immunofluorescenza mediante microscopia ottica e microscopia confocale, e di espressione genica mediante analisi quantitativa PCR *real time* (real time qPCR).

Da tali prove, comparando i risultati con quelli relativi al controllo, è possibile affermare che le cellule proliferano e mantengono il loro stato di pluripotenza nell'intervallo di tempo esplorato. Dalle analisi è emerso che le cellule sugli *scaffold* e sul controllo differenziano allo stesso modo fino al giorno 4, corrispondente all'inizio dello stadio di progenitori cardiaci. È importante sottolineare che questi dati risultano di particolare rilievo, in quanto per la prima volta nel gruppo di ricerca presso cui sono state svolte queste prove, è stato possibile far proliferare e addirittura differenziare cellule staminali umane su *scaffold* polimerici. Alla luce degli ottimi risultati finora ottenuti, ulteriori prove verranno condotte al fine di migliorare il processo di differenziamento fino a cardiomiociti.

BIBLIOGRAFIA

1. James W. Levenson MD, *Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease: The Role of Risk Factors*, Wiley Online Library, (2007)
2. M. Radisić, G. Vunjak-Novaković, *Cardiac tissue engineering*, J. Serb. Chem. Soc. 70, (2005), 541-556.
3. F. J. O'Brien, *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*, Materialstoday 14, (2011), 88-95.
4. F.Felline, *Tissue Engineering. Materiali innovativi per la medicina rigenerativa*, CNI Scintille, (2015)
5. M. T Alrefai1, D. Murali, A. Paul, K. M. Ridwan, J. M Connell, D. Shum-Tim, *Cardiac tissue engineering and regeneration using cell-based therapy*, Stem Cells and Cloning: Advances and Applications 8, (2015), 81-101.
6. M. Centola, K. Schuleri, A. Lardo, J. Hare, *Stem cell therapy for myocardial regeneration: mechanisms and current clinical applications*, G Ital Cardiol 9, (2008), 234-50. - 91 –
7. M.Sampaolesi, *Cellule Staminali, XXI Secolo, Treccani (2010)*
8. A. Leri, J.Kajstura, P.Anversa, *Cardiac Stem Cells and Mechanisms of Myocardial Regeneration*, American Physiological Society, Physiological Reviews, (2005)
9. C.Di Bello, A.Bagno, *Biomateriali. Dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*, Collana di Ingegneria Biomedica, Patron Editore, (2016).
10. Vineet Singh, Meena Tiwari, *Structure-Processing-Property Relationship of Poly(Glycolic Acid) for Drug Delivery Systems 1: Synthesis and Catalysis*, International Journal of Polymer Science, 2010, Article ID 652719, 1-23
11. S. Eshraghi, S.Das, *Mechanical and Microstructural Properties of Polycaprolactone Scaffolds with 1-D, 2-D, and 3-D Orthogonally Oriented Porous Architectures Produced by Selective Laser Sintering*, Acta Biomater.6, (2010), 2467–2476.
12. L. Li, K. Raghupathi, C. Song, P. Prasad, S. Thayumanavan, *Self-assembly of Random Copolymers*, Chem Commun (Camb) 77A, (2014), 13417–13432.
13. C. Piconi, *Biomateriali e dispositivi medici*, Energia Ambiente Innovazione, Enea, (2014), 48-65.
14. M. Gigli, M. Fabbri, N. Lotti, R. Gamberini, B. Rimini, A.Munari, *Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review*, European Polymer Journal 75, (2016), 431-460.

15. S. Torron, D. Hult, T. Pettersson, M. Johansson, *Tailoring Soft Polymer Networks Based on Sugars and Fatty Acids toward Pressure Sensitive Adhesive Applications*, ACS Sustainable Chem. Eng. 5, (2017), 2632–2638
16. A. Jager, D. Gromadzki, E. Jager, F. C. Giacomelli, A. Kozłowska, L. Kobera, J. Brus, B. Rihova, M. El Fray, K. Ulbrich, P. Stepanek, “*Novel “soft” biodegradable nanoparticles prepared from aliphatic based monomers as a potential drug delivery system*”, Soft Matter 8, (2012), 4343–4354.
17. E. Jager, A. Jager, T. Etrych, F.C. Giacomelli, P. Chytil, A. Jigounov, J.L. Putaux, B. Rihova, K. Ulbrich, P. Stepanek, *Self-assembly of biodegradable copolyester and reactive HPMA-based polymers into nanoparticles as an alternative stealth drug delivery system*, Soft Matter 8, (2012), 9563–9575
18. M. Gigli, N. Lotti, M. Gazzano, L. Finelli, A. Munari, *Novel eco-friendly random copolyesters of poly(butylene succinate) containing ether-linkages*, React. Funct. Polym. 72, (2012), 303–310.
19. M. Gigli, M. Fabbri, N. Lotti, R. Gamberini, B. Rimini, A. Munari, *Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review*, European Polymer Journal 75, (2016), 431–460.
20. M. Gigli, N. Lotti, M. Gazzano, L. Finelli, A. Munari, *Novel eco-friendly random copolyesters of poly(butylene succinate) containing ether-linkages*, React. Funct. Polym. 72, (2012), 303–310.
21. M. Soccio, N. Lotti, L. Finelli, M. Gazzano, A. Munari, *Influence of transesterification reactions on the miscibility and thermal properties of poly (butylene/diethylene succinate) copolymers*, Eur. Polym. J. 44, (2008), 1722–1732.
22. M. Gigli, N. Lotti, M. Gazzano, L. Finelli, A. Munari, *Macromolecular design of novel sulfur-containing copolyesters with promising mechanical properties*, J. Appl. Polym. Sci. 126, (2012), 686–696.
23. C. Gualandi, M. Soccio, E. Saino, M.L. Focarete, N. Lotti, A. Munari, L. Moroni, L. Visai, *Easily synthesized novel biodegradable copolyesters with adjustable properties for biomedical applications*, Soft Matter 8, (2012), 5466–5476.
24. M. Gigli, N. Lotti, M. Gazzano, L. Finelli, A. Munari, *Synthesis and characterization of novel poly(butylene succinate)-based copolyesters designed as potential candidates for soft tissue engineering*, Polym. Eng. Sci. 53, (2013), 491–501.
25. C. Gualandi, M. Soccio, M. Govoni, S. Valente, N. Lotti, A. Munari, E. Giordano, G. Pasquinelli, M.L. Focarete, *Poly(butylene/diethylene glycol succinate) multiblock copolyester as a candidate biomaterial for soft tissue engineering: solid-state properties, degradability, and biocompatibility*, J. Bioact. Compat. Polym. 27, (2012), 244–264.

RINGRAZIAMENTI

Arrivati alla conclusione di questo primo ma importante traguardo, ci tengo a ringraziare le persone che mi hanno accompagnato lungo questo percorso.

Alla Prof.ssa Lotti, che mi ha dato la possibilità di partecipare a questo progetto permettendomi di conoscere l'ambiente della ricerca che mi affascina sin da quando ero una bambina. Un grazie infinito alle correlatrici Michela e Silvia, sempre pronte a chiarire ogni più piccolo dubbio con estrema competenza e gentilezza. A Francesca, importante spalla dentro e fuori il laboratorio.

Alle amiche di sempre. Grazie per esserci state, nonostante la lontananza e il poco tempo che ci siamo potute dedicare, vi ho sempre portate con me.

A quelli che sono passati dall'essere "amici dell'università" ad "amici di una vita". Siete stati ossigeno puro, risate e crescita. A Marta, che ha cercato invano di portare un po' di colore nel mio armadio "sabbioso", cercherò qualcuno a cui tenere un "posto esterno" a Milano, promesso. A Eleonora, compagna di maratone folli, non vedo l'ora di scoprire cosa ci riserva il futuro. Ad Andrea, per avermi inondata di gioia e leggerezza soprattutto nei momenti più bui.

A Luca, Dave, Emi ed Enri, se c'è una cosa che mi spaventa se penso al domani, è l'idea di non avervi tutti al mio fianco, come tra i banchi scomodi di questo posto.

Alle persone che, incomprensibilmente e con la forza di un uragano, sono entrate a far parte della mia quotidianità. A Menny, mia copia incasinata, sapere di avere qualcuno in grado di capirti realmente senza bisogno di parole è stato uno dei più bei regali che potessi ricevere. Rincorri i tuoi sogni seguendo la strada che preferisci. A Martina, compagna di studi, viaggi e coinquilina perfetta. Mi hai insegnato ad apprezzare ogni piccola soddisfazione ed ogni singolo momento perché "non ce ne sono mai abbastanza". Mi impegnerò sempre a proteggere e mantenere la nostra promessa.

A Greta, mio punto fisso. Ogni soddisfazione, ogni traguardo, ogni lacrima o risata non è e non sarà mai la stessa se non è condivisa con te. Sei la mia certezza e il mio più grande orgoglio. Non credo che tu possa nemmeno lontanamente renderti conto della forza che mi dai ogni giorno.

Infine, ai miei genitori. Siete la luce della mia vita, le spalle sulle quali mi appoggio costantemente, nonostante fatichi ad ammetterlo. Vorrei che riusciste a vedervi attraverso i miei occhi.

Mi avete trasmesso serenità, amore, fiducia in me stessa e coraggio nei momenti più duri come in quelli più belli.

Un sincero grazie dal profondo del cuore, vi voglio bene.

Siria