

SCUOLA DI SCIENZE  
Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

**Chimica Industriale**

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

***Design di nuovi poliesteri a base di polibutilene succinato per la preparazione di scaffold per l'ingegneria tissutale del miocardio: struttura chimica e architettura molecolare come tool efficienti per modulare le proprietà chimico-fisiche***

Tesi di laurea sperimentale

**CANDIDATO**

Francesca Dionigi

**RELATORE**

Prof.ssa Elisabetta Salatelli

**CORRELATORI**

Prof.ssa Nadia Lotti

Dr.ssa Michelina Soccio

Dr.ssa Silvia Quattrosoldi



# INDICE

<b>CAPITOLO 1: INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
1.1 Malattie cardiovascolari e terapie tradizionali.....	1
1.1.1 Attuali terapie per il trattamento dell'infarto miocardico.....	3
1.1.2 Trapianto di cuore.....	4
1.2 Ingegneria tissutale.....	5
1.2.1 <i>Scaffold</i> .....	7
1.2.2 Elettrofilatura.....	8
1.2.3 Fonti cellulari e cellule staminali.....	11
1.2.4 Fattori di crescita.....	14
1.3 Biomateriali: definizione e classificazione.....	15
1.4 Biomateriali polimerici.....	17
1.4.1 Poliesteri alifatici.....	17
1.4.1.1 Cristallinità.....	18
1.4.1.2 Proprietà termiche.....	19
1.4.1.3 Peso molecolare.....	20
1.4.1.4 Biodegradazione.....	22
1.4.1.5 Strategie sintetiche.....	25
1.4.1.6 Poliesteri alifatici per uso biomedicale.....	26
1.4.1.7 Polimeri elastomerici.....	29
1.4.2 Copolimeri.....	30
1.4.2.1 Copolimeri statistici.....	30
1.4.2.2 Copolimeri a blocchi.....	33
1.4.2.1 <i>Chain extension</i> .....	35
1.4.3 Polibutilene succinato (PBS).....	35
1.4.3.1 Copolimeri a base di PBS.....	37
1.4.4 Pripol 1009.....	38
<b>CAPITOLO 2: SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>39</b>
<b>CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI.....</b>	<b>42</b>
3.1 Sintesi di polimeri OH-terminati e copolimeri ad elevato peso molecolare.....	42

3.1.1 Sintesi di poli(butilene succinato) a basso peso molecolare (PBS-OH).....	42
3.1.2 Sintesi di P(BSBPripol)-OH e P(BSNS)-OH.....	44
3.1.3 Purificazione dei polimeri a basso peso molecolare.....	44
3.2 Sintesi dei copolimeri ad alto peso molecolare PBSP(BSBPripol) e PBSP(BSNS).....	45
3.3 Sintesi del copolimero PBSP(BSPripol) statistico.....	46
3.4 Caratterizzazione molecolare.....	46
3.4.1 Risonanza magnetica nucleare (NMR) .....	46
3.4.2 Cromatografia a permeazione su gel (GPC) .....	50
3.5 Realizzazione di film.....	51
3.6 Realizzazione di <i>scaffold</i> .....	52
3.7 Caratterizzazione termica.....	53
3.7.1 Calorimetria differenziale a scansione (DSC) .....	53
3.7.2 Analisi termogravimetrica (TGA) .....	55
3.8 Analisi diffrattometrica a Raggi X.....	56
3.9 Caratterizzazione meccanica.....	58
3.10 Microscopia elettronica a scansione (SEM) .....	59
3.11 Studi di degradazione idrolitica.....	61
<b>CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>62</b>
4.1 Caratterizzazione molecolare dei polimeri idrossil-terminati PBS-OH, P(BSBPripol)-OH, P(BSNS)-OH e dei copolimeri PBSP(BSBPripol), PBSP(BSNS) e PBSP(BPripol).....	62
4.2 Caratterizzazione morfologica degli <i>scaffold</i> .....	67
4.3 Analisi termogravimetrica.....	68
4.4 Calorimetria differenziale a scansione (DSC).....	69
4.5 Analisi diffrattometrica a Raggi X.....	73
4.6 Caratterizzazione meccanica.....	75
4.7 Degradazione idrolitica.....	80
<b>CAPITOLO 5: CONCLUSIONI.....</b>	<b>84</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>86</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>90</b>



# CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

## 1.1 Malattie cardiovascolari e terapie tradizionali

Le malattie cardiovascolari rappresentano la prima causa di morte nel mondo e, insieme all'ictus, hanno provocato 15,2 milioni di decessi nel 2016 <sup>(1)</sup> (Figura 1.1). In particolare, l'infarto miocardico e l'ictus rappresentano gli eventi più acuti e sono principalmente causati da un'ostruzione che impedisce al sangue di fluire dal cuore al cervello. Una combinazione di fattori di rischio contribuisce alla comparsa di malattie cardiovascolari: fumo, dieta scorretta e obesità, inadeguata attività fisica, ipertensione, diabete, consumo eccessivo di alcool. Negli ultimi due secoli, il cambiamento di stili di vita, associato al raggiungimento di elevati livelli di benessere nei paesi più industrializzati, ha condotto ad una preoccupante impennata per quanto riguarda le malattie che rappresentano una potenziale causa di mortalità (Figura 1.1 e 1.2). Secondo l'*European Heart Network*, ogni anno le malattie cardiovascolari provocano 3,9 milioni di morti in Europa (con una percentuale del 45% sui decessi totali), di cui 1,9 milioni solo nei paesi dell'Unione Europea (37%). Dati aggiornati al 2015, riportano che più di 85 milioni di persone convivono con problemi cardiovascolari, di cui più della metà (49 milioni) solo nell'Unione Europea <sup>(2)</sup>. Inoltre, secondo la *European Society of Cardiology*, un uomo su sei e una donna su sette in Europa moriranno di infarto miocardico <sup>(3)</sup>. Gli scenari non sono di certo migliori se si considera il nuovo continente: l'*American Heart Association* riporta che 795.000 americani vengono colpiti ogni anno da infarto miocardico. Inoltre, circa 92 milioni di statunitensi convivono con malattie cardiovascolari, quali cardiopatia coronarica, difetti cardiovascolari congeniti e insufficienza cardiaca congestizia <sup>(4)</sup>.

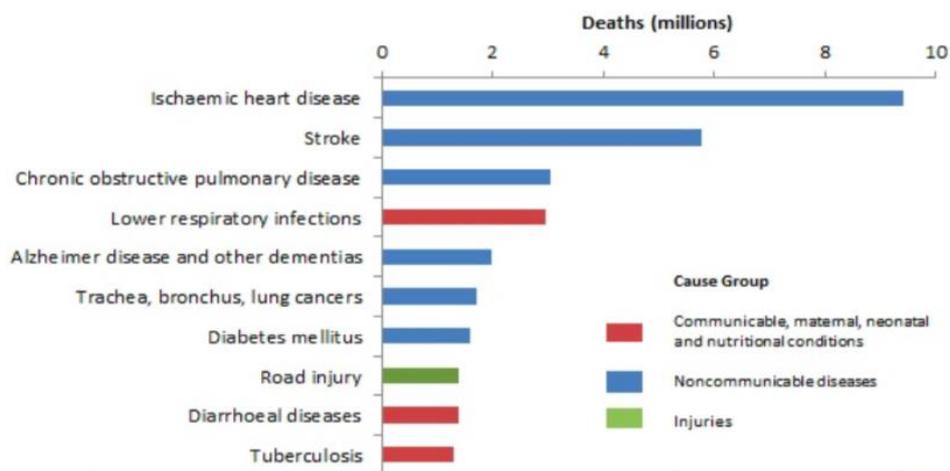


Figura 1.1. Le 10 principali cause di morte nel mondo nel 2016 (Fonte: World Health Organization).

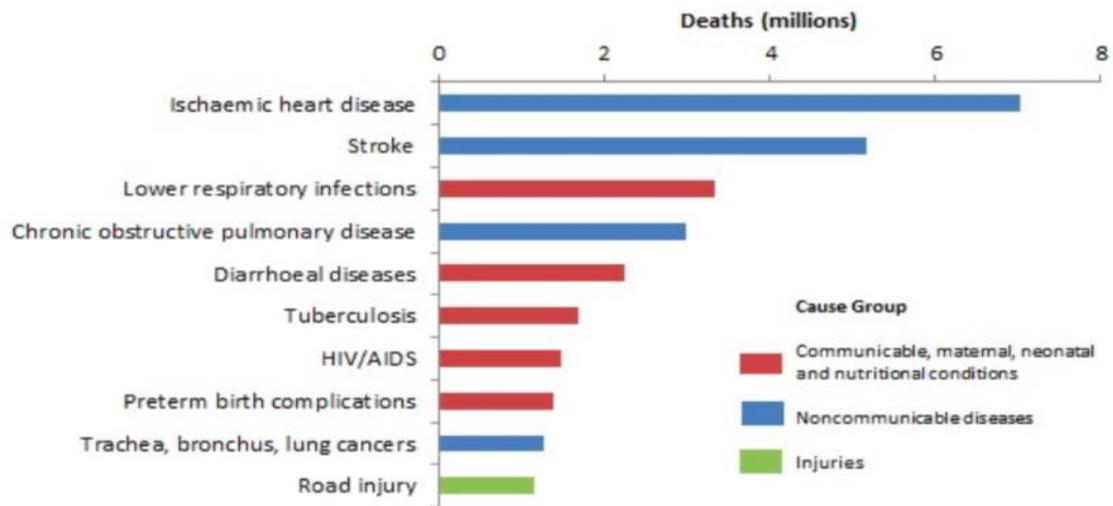


Figura 1.2. Le 10 principali cause di morte nel mondo nel 2000 (Fonte: World Health Organization).

Più in dettaglio, l'infarto miocardico acuto si verifica in seguito all'occlusione di uno dei vasi coronarici e produce una risposta infiammatoria ed un'estesa morte ischemica dei cardiomiociti nell'area colpita, causando ripercussioni sulla funzione ventricolare. Il miocardio risponde all'infarto attraverso il cosiddetto "rimodellamento ventricolare" (Figura 1.3), che consiste in complesse alterazioni morfologiche e funzionali che hanno lo scopo di compensare il malfunzionamento del ventricolo stesso.

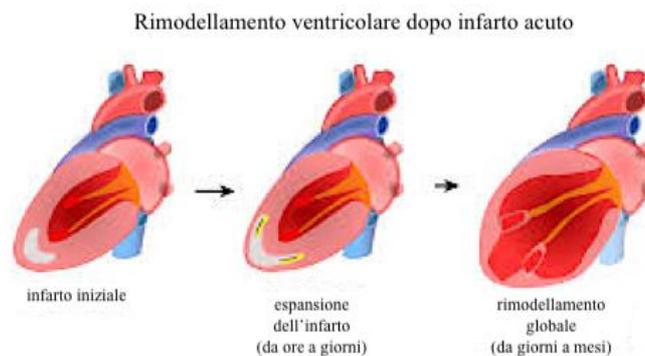


Figura 1.3 Rimodellamento ventricolare post-infartuale.

Tuttavia, il cuore possiede una capacità rigenerativa limitata, quindi il rimodellamento, che comprende la creazione di tessuto cicatriziale collageneo, non contrattile, l'assottigliamento della parete del miocardio e la progressiva dilatazione del ventricolo, provoca una inevitabile diminuzione della funzione contrattile ventricolare. La conseguenza più grave è l'insufficienza cardiaca congestizia, caso in cui il cuore non è più in grado di pompare sangue in quantità sufficiente per soddisfare le richieste metaboliche dell'organismo.

### 1.1.1 Attuali terapie per il trattamento dell'infarto miocardico

Interventi farmacologici e chirurgici rappresentano le principali terapie che permettono di trattare l'infarto miocardico. L'obiettivo di operazioni chirurgiche come la resezione ventricolare, che consiste in un rimodellamento o in una riduzione del ventricolo sinistro sovradimensionato, è quello di riportare il cuore alla sua originale forma e dimensione. Quando invece, a causa di malattie cardiovascolari, le arterie coronarie si restringono o si occludono è necessario un *bypass* (Figura 1.4). Attraverso questa tecnica chirurgica si crea un ponte artificiale (*bypass*), costituito da un tratto di vaso sanguigno sano e ben funzionante, che permette di aggirare il tratto compromesso; i nuovi segmenti vasali vengono dunque innestati a monte e a valle della coronaria occlusa, al fine di far riaffluire al cuore un apporto ottimale di sangue e ossigeno.

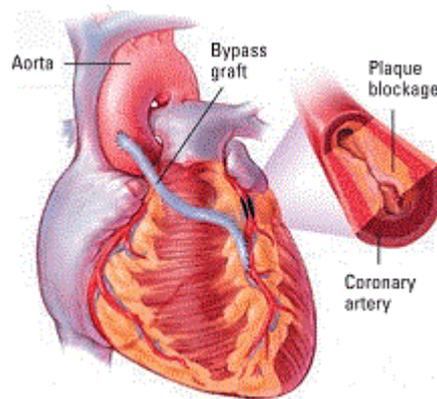


Figura 1.4 Esempio di *bypass*.

Infine, esistono dispositivi di assistenza ventricolare sinistra, quali i *pacemaker* (Figura 1.5), che svolgono una funzione di supporto per ripristinare la funzionalità cardiaca e limitare la progressione della malattia; tuttavia, non sempre si sono rivelati efficaci nel lungo periodo <sup>(3)</sup>.

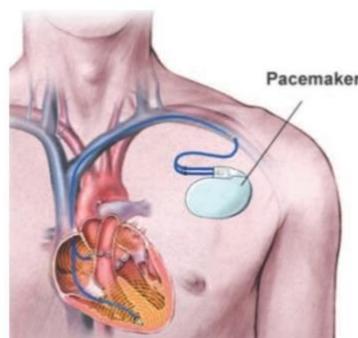


Figura 1.5 Esempio di supporto di assistenza ventricolare.

### 1.1.2 Trapianto di cuore

Per i casi di insufficienza cardiaca congestizia il trapianto di cuore rappresenta l'unica operazione attraverso la quale un individuo affetto da tale malattia allo stadio finale può tornare a condurre una vita normale per un periodo di tempo previsto di circa dieci anni. Ad oggi, la prospettiva di vita in seguito al trapianto di cuore è notevolmente aumentata, grazie a diversi fattori: una corretta selezione dei pazienti da trapiantare, una migliore conservazione dell'organo espantato, l'ottimizzazione delle tecniche chirurgiche, della terapia immunosoppressiva e del controllo delle infezioni <sup>(5)</sup>. Non tutte le persone con cardiopatia allo stadio terminale risultano però idonee per un trapianto di cuore: i trapianti, infatti, non possono essere eseguiti su pazienti con infezioni in atto, oppure affetti da cancro o diabete mellito. In più, tutti gli altri organi principali devono essere in ottime condizioni di salute, affinché l'intervento possa andare a buon fine.

Nonostante le percentuali di riuscita siano notevolmente aumentate con il passare degli anni, questo tipo di intervento risulta decisamente delicato anche per quanto riguarda il decorso post-operatorio, durante il quale possono verificarsi diverse complicanze:

- Fallimento dell'innesto primario: è la prima causa di mortalità precoce dopo il trapianto di cuore e provoca il 36% dei decessi nei primi 30 giorni. La principale manifestazione clinica è l'instabilità emodinamica grave post-operatoria e lo shock cardiogeno (il cuore non riesce a soddisfare le esigenze circolatorie nell'immediato periodo post- trapianto) <sup>(5)</sup>.
- Disfunzione del ventricolo destro: l'ipertensione polmonare con conseguente insufficienza ventricolare destra irreversibile è causa di mortalità dopo trapianto cardiaco; viene trattata con farmaci vasodilatatori ad azione prevalente sul piccolo circolo.
- Complicanze infettive: sono tra le principali cause di mortalità nei primi tre anni dopo il trapianto, corrispondenti al 12% dei decessi nei primi 30 giorni e al 29% tra un mese e un anno successivi all'intervento. Sono particolarmente comuni le infezioni dovute ad agenti patogeni e batteri, favorite dall'immunosoppressione, e le infezioni ospedaliere, che si verificano soprattutto nel primo mese dopo il trapianto: il polmone è l'organo maggiormente interessato, seguito dalle infezioni delle vie urinarie, del tubo gastroenterico e da infezioni della ferita sternotomica. A partire dal sesto mese dopo il trapianto, in corrispondenza della progressiva riduzione della terapia immunosoppressiva, diventano più frequenti le infezioni extraospedaliere <sup>(5)</sup>.

- Rigetto dell'organo: secondo l'ultimo registro ISHLT (*International Registry For Heart And Lung Transplantation*), grazie allo sviluppo di farmaci e strategie di immunosoppressione, il rigetto è un evento in progressiva diminuzione. Ad oggi provoca infatti meno del 10% dei decessi post-trapianto <sup>(5)</sup>. Il rigetto, causato dal sistema immunitario, può essere controllato con potenti farmaci immunosoppressivi, che però rendono i pazienti più suscettibili a infezioni e a tumori di vario genere. L'esame diagnostico più accurato per il monitoraggio del rigetto è la biopsia endomiocardica, mentre una tecnica meno invasiva è rappresentata da una semplice analisi del sangue che permette di esaminare l'espressione di specifici geni. In base alla quantità di questi ultimi è possibile capire se si sta verificando o meno il rigetto. Sono stati documentati tre tipi di rigetto: iperacuto, cellulare e umorale (o mediato da anticorpi) <sup>(5)</sup>:
  - Rigetto iperacuto: si manifesta nelle prime ore successive al trapianto e può verificarsi quando il ricevente presenta anticorpi contro l'antigene dei leucociti dell'organo donato. Al giorno d'oggi, tale episodio è molto raro, grazie allo screening anticorpale prima del trapianto <sup>(6)</sup>.
  - Rigetto cellulare: è dovuto alle cellule T del ricevente, che riconoscono le molecole degli antigeni leucocitari umani del donatore. Si tratta purtroppo di una complicazione post-trapianto frequente: circa il 20-40% dei pazienti manifestano rigetto cellulare acuto, che spesso risulta essere asintomatico, tra i 6 e i 12 mesi successivi al trapianto <sup>(6)</sup>.
  - Rigetto umorale: è caratterizzato dalla presenza di anticorpi che agiscono contro l'endotelio vascolare <sup>(5)</sup>. Le alterazioni istopatologiche sono date da rigonfiamento delle cellule endoteliali, da aggregati di macrofagi che affollano e spesso occludono il lume dei piccoli vasi e da edema. Il rigetto anticorpale ha un'incidenza stimata tra il 10 e il 20% nel primo anno dopo il trapianto <sup>(6)</sup>.

## 1.2 Ingegneria tissutale

Solamente il trapianto di cuore e l'impianto di dispositivi di assistenza ventricolare meccanica, sono in grado di risolvere il problema della scarsa capacità di pompaggio, dovuta alla diminuzione del numero di cardiomiociti <sup>(7)</sup>.

Il trattamento delle malattie cardiovascolari risulta, quindi, limitato, e spesso anche ostacolato dalla mancanza di tessuto autologo necessario per ripristinare il muscolo cardiaco ferito o per realizzare *bypass* di vasi occlusi. In questi casi è possibile utilizzare materiale di innesto di

origine sintetica; i principali problemi legati a tale soluzione sono le proprietà (e di conseguenza le prestazioni) non sempre idonee, ed un maggiore rischio di trombosi e di deposizione di calcio in corrispondenza dell'interfaccia con l'ambiente biologico. Inoltre, è importante sottolineare che il materiale sintetico non ha capacità rigenerative <sup>(8)</sup>.

Le suddette problematiche hanno condotto la ricerca verso soluzioni alternative; in particolare, in questi ultimi anni, l'ingegneria tissutale ha mostrato grandi potenzialità applicative <sup>(4)</sup>. Il termine "ingegneria tissutale" è stato ufficialmente coniato durante il primo *Tissue Engineering Symposium* (California, 1998), per indicare "l'applicazione dei principi e dei metodi dell'ingegneria e delle scienze della vita per comprendere a fondo la relazione che esiste tra struttura e funzione nei tessuti viventi normali e patologici, per lo sviluppo di sostituti biologici che possano ripristinare, mantenere e migliorare la funzione tissutale". Il campo dell'ingegneria tissutale è multidisciplinare e raccoglie conoscenze di medicina, ingegneria, scienza dei materiali, genetica, chimica, biologia e scienze della vita <sup>(9,10)</sup>. L'ingegnerizzazione di tessuti artificiali avviene tramite l'utilizzo di tre componenti principali, che formano la cosiddetta "triade" dell'ingegneria tissutale: *scaffold*, cellule e fattori di crescita <sup>(9)</sup>. Lo *scaffold* è una struttura tridimensionale porosa, realizzata con materiali biocompatibili e biorisorbibili, che funge da supporto alla rigenerazione, in quanto è in grado di favorire l'adesione e la proliferazione cellulare fino alla formazione di un nuovo tessuto funzionale. La procedura che porta alla realizzazione di tale struttura 3D si può suddividere in diversi step (Figura 1.6): isolamento delle cellule dall'ambiente biologico, espansione della coltura in vitro, semina delle cellule in coltura su *scaffold* all'interno di un bioreattore, ed infine impianto dello stesso *scaffold* nel corpo del paziente.

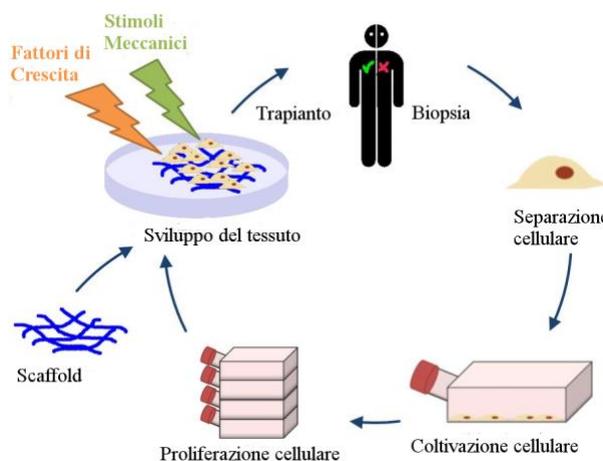


Figura 1.6 Ciclo dell'ingegneria tissutale.

Non è necessario intervenire chirurgicamente per rimuovere lo *scaffold*, poiché questo si biodegrada progressivamente, e viene sostituito con il tessuto biologico rigenerato; in questo modo la funzione compromessa viene ripristinata. Inoltre, è possibile caricare all'interno del costruito un fattore di crescita o un farmaco che promuova la proliferazione e la differenziazione delle cellule. Il farmaco viene rilasciato dai vettori di rilascio in modo controllato per mantenere la sua azione per un periodo di tempo prolungato.

### 1.2.1 Scaffold

Lo *scaffold* supporta la formazione di nuovi tessuti, fornendo una piattaforma strutturale per un nuovo microambiente cellulare, consentendo, quindi, l'adesione, la migrazione, l'organizzazione ed il differenziamento cellulare <sup>(11)</sup>. Uno *scaffold*, affinché possa essere utilizzato nel campo dell'ingegneria tissutale, deve soddisfare alcuni requisiti essenziali:

- Biocompatibilità: le cellule devono poter aderire, migrare e proliferare sia sulla superficie che all'interno della struttura tridimensionale. Per questo motivo, lo *scaffold* non deve produrre reazioni immunitarie o risposte infiammatorie <sup>(9)</sup>.
- Biodegradabilità: le cellule non solo devono aderire, ma devono anche poter produrre la propria matrice extracellulare: a tale scopo è necessario che la struttura impiantata sia realizzata con materiali che si degradino nel tempo. È importante, però, che i sottoprodotti della degradazione non risultino tossici, e che vengano metabolizzati e smaltiti dall'organismo senza che questo ne risulti compromesso <sup>(9)</sup>.
- Proprietà meccaniche: devono essere il più possibile simili a quelle del sito anatomico di impianto, per poter resistere ai carichi imposti dall'ambiente fisiologico. In applicazioni cardiovascolari, per interfacciarsi efficacemente con il tessuto cardiaco, gli *scaffold* devono presentare elevata contrattilità e flessibilità e, contemporaneamente, devono essere abbastanza robusti da resistere alle elevate pressioni che si generano all'interno dei vasi sanguigni durante le pulsazioni.
- Architettura: gli *scaffold* devono presentare una porosità elevata e delle giuste dimensioni per assicurare la penetrazione cellulare, la diffusione dei nutrienti all'interno del costruito e l'eliminazione dei prodotti di scarto. Esiste un intervallo critico di dimensioni dei pori che può variare a seconda del tipo di cellula utilizzato e del tessuto che si sta ingegnerizzando <sup>(9)</sup>. Inoltre, la funzionalizzazione della superficie riveste un ruolo chiave, poiché le cellule interagiscono con gli *scaffold* tramite gruppi chimici (leganti) sulla superficie del materiale. Supporti realizzati con materiali di origine

naturale possiedono questi ligandi, mentre quelli realizzati con materiali sintetici possono richiederne l'inserimento in fase di produzione.

- Tecnologia di produzione: la produzione di uno *scaffold* deve essere realizzabile a livello industriale, quindi economicamente vantaggiosa e facilmente traslabile su grande scala <sup>(9)</sup>.

### 1.2.2 Elettrofilatura

L'elettrofilatura (*electrospinning*) è attualmente l'unica tecnologia che permette la produzione di fibre continue di materiale polimerico o inorganico con dimensioni che possono variare da decine di nanometri a qualche micrometro. Si tratta di una tecnica semplice e dai costi relativamente contenuti, particolarmente utile per applicazioni in campo biomedicale, poichè permette la produzione di *scaffold* costituiti da fibre di dimensione submicrometrica e dall'elevato rapporto superficie volume, con struttura porosa a pori interconnessi, caratteristiche non ottenibili attraverso altre tecniche di fabbricazione.

La procedura consiste nel filare un polimero, disciolto in una soluzione altamente viscosa, grazie ad un campo elettrico ad alto potenziale.

L'apparecchiatura sperimentale è costituita principalmente da tre componenti (Figura 1.7): una siringa che contiene la soluzione polimerica, 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 costituito da una piastra metallica, posizionato ad una distanza regolabile rispetto all'ago metallico e messo a massa, che svolge la funzione di controelettrodo <sup>(12)</sup>.

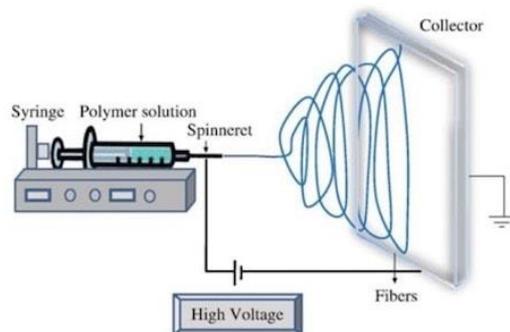


Figura 1.7 Schema dell'apparato per l'elettrofilatura.

Il solvente svolge un ruolo chiave durante l'intero processo: in primo luogo ha il compito di dissolvere le molecole polimeriche per formare il getto elettrificato; a questo scopo si devono valutare le interazioni intermolecolari tra i due componenti del sistema polimero-soluzione che

possono essere attrattive o repulsive a seconda del solvente scelto. Inoltre, il solvente deve condurre le molecole dissolte verso il collettore; sono quindi importanti caratteristiche quali volatilità, tensione di vapore, tensione superficiale e punto di evaporazione, in quanto determinano la morfologia della fibra. Infatti, la tensione di vapore influenza la velocità e quindi il tempo di evaporazione, la volatilità determina la formazione di nanostrutture, poiché influenza il processo di separazione di fase, mentre velocità del getto e tensione superficiale influenzano la dimensione del diametro della fibra.

Il fluido caricato all'interno della siringa viene sottoposto ad una differenza di potenziale e, in corrispondenza della punta dell'ago, subisce un aumento della carica superficiale, essendo indirizzato nel verso del campo elettrico esterno. Dopo un breve percorso il getto è vulnerabile a fattori di instabilità, che, insieme all'elevata area superficiale, provocano una veloce evaporazione del solvente e la solidificazione della fibra.

I parametri che governano il processo di elettrofilatura possono essere classificati in tre gruppi:

1. Parametri della soluzione:

- **Concentrazione:** per ottenere un buon risultato è necessario che la concentrazione della soluzione di partenza vari entro un certo intervallo: se troppo bassa si ottiene un insieme di fibre e granelli, se troppo alta diventa impossibile mantenere un flusso costante a livello della punta dell'ago. All'interno dell'intervallo utile, al crescere della concentrazione aumenta il diametro della fibra (Figura 1.8).

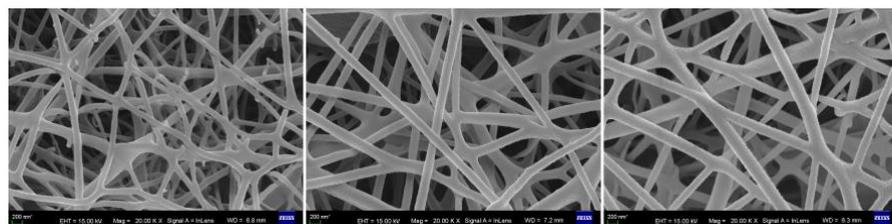


Figura 1.8 Aumento del diametro della fibra all'aumentare della concentrazione della soluzione.

- **Peso molecolare:** influisce sulle proprietà elettriche e reologiche, quindi sulle caratteristiche morfologiche della fibra, in quanto riflette il numero di legami tra le catene polimeriche in soluzione. È stato osservato che al crescere del peso molecolare si riduce la formazione di granelli e aumenta il diametro finale della fibra.

- Viscosità: deve variare in un intervallo specifico, al di sotto del quale non si ottengono fibre continue ed oltre il quale non è più possibile estrarre agevolmente 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: nella maggior parte dei casi, i polimeri impiegati sono conduttori e gli ioni presenti nella soluzione polimerica influenzano la formazione delle fibre e le dimensioni delle stesse. All'aumentare della conducibilità elettrica della soluzione si verifica un significativo aumento del diametro della fibra; al contrario, una conducibilità troppo bassa comporta un'insufficiente forza elettrica, che non consente l'elongazione del getto e la formazione di una fibra uniforme.

## 2. Parametri del processo:

- Voltaggio: il processo di *electrospinning* inizia ad una tensione soglia, dipendente dalla distanza tra ago e collettore, in grado di indurre la polarizzazione della soluzione.
- Velocità di flusso (Flow rate): la velocità con cui viene alimentata la siringa influenza la velocità del getto e dunque il processo di evaporazione del solvente. Solitamente si preferiscono basse velocità di alimentazione, in quanto il solvente ha più tempo per evaporare; flussi troppo elevati, invece, portano alla formazione di fibre granulose, poiché il solvente non riesce ad evaporare completamente prima che la soluzione raggiunga il collettore.
- Tipo di collettore: il collettore funge da substrato conduttivo per la raccolta delle fibre prodotte. I collettori più comuni sono costituiti da piastre di alluminio. Vengono anche impiegati fogli di carta o tessuti conduttivi, cilindri rotanti, torni, bagni liquidi di non solventi. Inoltre, a seconda che il collettore sia fisso o mobile, sarà possibile ottenere fibre distribuite in maniera random, oppure allineate.
- Distanza tra ago e collettore: è necessaria una distanza minima per consentire l'adeguata evaporazione del solvente, ma tale distanza non deve essere troppo elevata, poiché la fibra deve raggiungere facilmente il collettore.

## 3. Parametri ambientali:

- Temperatura: agisce sulla viscosità della soluzione: aumentando la temperatura diminuisce la viscosità, con conseguente diminuzione del diametro della fibra.
- Umidità: influisce sulla volatilità, quindi sulla velocità di evaporazione del solvente. È stato verificato che al diminuire dei tassi di umidità la velocità di evaporazione aumenta fino a superare la velocità di estrusione dalla punta dell'ago rendendo impossibile l'elettrofilatura, mentre all'aumentare della stessa si formano piccoli pori circolari superficiali, che in seguito coalescono. Infine, l'umidità influisce sulla carica e sulla tensione superficiale promuovendo la scarica della fibra estrusa.

Le classi di materiali che ad oggi vengono sottoposte ad *electrospinning* sono: polimeri naturali, polimeri sintetici, materiali compositi, ceramici, semiconduttori. Di questi, solo i polimeri, i compositi polimerici e loro soluzioni non necessitano di post-processing delle fibre.

Alla luce di tutte queste potenzialità, risulta dunque chiaro come l'elettrofilatura sia destinata ad assumere un ruolo chiave nell'ambito delle nanotecnologie per applicazioni biomedicali.

### 1.2.3 Fonti cellulari e cellule staminali

La scelta delle cellule da impiantare su uno *scaffold* dipende dalla funzione che il tessuto ingegnerizzato da trapiantare dovrà svolgere. Solitamente si scelgono cellule autologhe espianate dai tessuti limitrofi o cellule staminali (Figura 1.9); queste ultime stanno acquistando sempre più importanza nella maggior parte delle nuove strategie di sostituzione dei tessuti <sup>(11)</sup>.

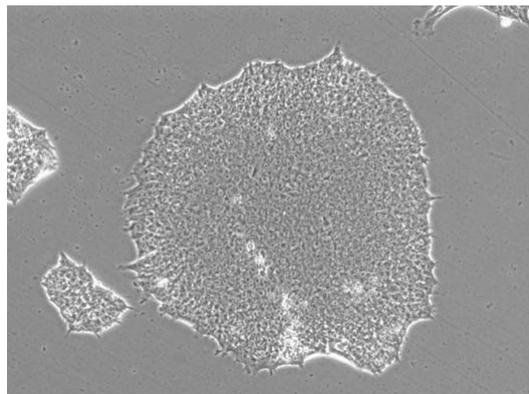


Figura 1.9 Colonia di cellule staminali embrionali in coltura.

Le cellule staminali hanno la capacità di dividersi in modo asimmetrico dando origine a due cellule figlie, diverse tra loro: la prima mantiene le caratteristiche di staminalità ed è uguale alla cellula madre, l'altra, invece, è precursore di una progenie cellulare destinata a differenziarsi e

a dar vita a tessuti e organi. Le cellule staminali sono clonogeniche (capaci di produrre esatti duplicati), autorinnovanti (capaci di dividersi indefinitamente) e potenti (capaci di differenziarsi in molteplici linee cellulari).

Le cellule staminali possono essere distinte in base alla “potenza” di differenziamento in totipotenti, pluripotenti, multipotenti e unipotenti <sup>(13)</sup>.

- Cellule staminali totipotenti: sono in grado di differenziarsi in ogni tessuto embrionale ed extra-embryonale. Comprendono esclusivamente lo zigote (prodotto dalla fusione di un ovulo con uno spermatozoo) e le cellule originate dalle prime divisioni dell'ovulo fecondato <sup>(13)</sup>.
- Cellule staminali pluripotenti: sono capaci di generare i tre strati germinali che costituiscono la matrice embrionale di tutte le cellule del corpo (endoderma, mesoderma ed ectoderma), ma non il trofoblasto. Nei mammiferi tali cellule sono presenti nel nodo embrionale della blastocisti, nell'embrione, nel feto e in minima parte nell'individuo adulto <sup>(13)</sup>.
- Cellule staminali multipotenti: danno origine ad un singolo strato germinale e si formano nel feto e nello stadio precoce di vita postnatale, quando l'espressione genica delle singole cellule è già definita. La loro funzione è quella di sostituire cellule differenziate che vengono perse attraverso fenomeni di deplezione o a causa di danneggiamenti cellulari. Le cellule staminali adulte, somatiche o progenitrici, considerate multipotenti, sono presenti in diversi siti corporei dell'individuo adulto: midollo osseo, sangue, fegato, muscolo, epidermide e cervello <sup>(13)</sup>.
- Cellule staminali unipotenti: possono dar luogo ad un unico tipo di cellula e possiedono la caratteristica di autorinnovarsi, garantendo la riparazione ed il mantenimento dei tessuti sani. Dopo un numero limitato di divisioni cellulari, tali cellule iniziano a differenziarsi e a dare origine a cellule tessuto-specifiche.

Per quanto riguarda il tessuto cardiovascolare, di particolare importanza risultano le cellule staminali embrionali, le quali vengono isolate dai blastociti e sono caratterizzate da un'elevata capacità di differenziarsi in qualsiasi tipologia cellulare. In vitro le cellule staminali embrionali sono capaci di differenziarsi in neuroni, muscolo liscio, muscolo scheletrico e cardiomiociti (Figura 1.10).

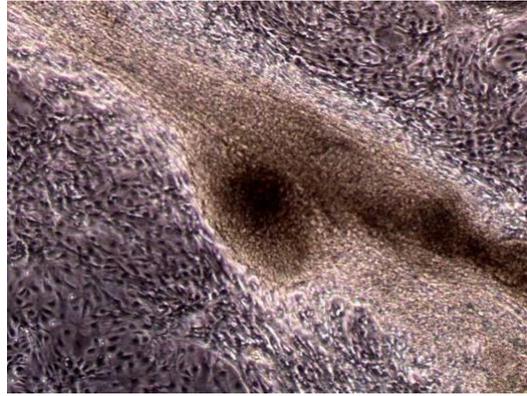


Figura 1.10 Esempio di differenziamento in vitro di cellule staminali verso cardiomiociti.

In particolare, il differenziamento in cardiomiociti avviene attraverso tre stadi: precoce, in cui sono prodotte cellule con attività contrattile, intermedio, nel quale si sviluppano cellule atriali, ventricolari e cellule del sistema di conduzione, ed infine tardivo, nel quale sono ben distinguibili miofibrille e dischi intercalati che contengono desmosomi e *gap junctions*. Diversi studi sulle cellule staminali embrionali e pluripotenti umane hanno mostrato che tali cellule si possono differenziare in vitro in cardiomiociti aventi proprietà elettrofisiologiche, strutturali e contrattili identiche a quelle dei cardiomiociti adulti e capaci di integrarsi elettromeccanicamente nel tessuto miocardico ospite. Per quanto riguarda le cellule staminali embrionali, però, esistono diversi limiti relativamente al loro utilizzo, fra cui: le potenziali reazioni di rigetto, la difficoltà di ottenere popolazioni cellulari pure, gli aspetti etici dell'impiego di embrioni umani e la tumorigenicità di questo tipo di cellule, legata alla loro elevata capacità proliferativa.

Un'ulteriore fonte di cellule che si sta affermando per la terapia rigenerativa del miocardio è rappresentata dai mioblasti scheletrici o cellule satelliti, i quali non presentano problemi immunologici ed etici. Queste cellule si trovano al di sotto della lamina basale delle fibre muscolari scheletriche mature, dove rimangono in uno stadio quiescente ed entrano in funzione solamente per riparare un danno del tessuto muscolare (Figura 1.11).

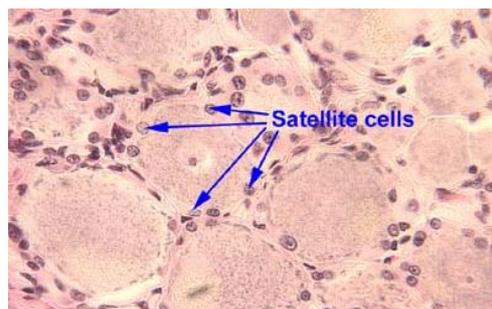


Figura 1.11 Cellule satelliti all'interno del muscolo scheletrico.

La percentuale di cellule satelliti nel muscolo scheletrico dell'individuo adulto è bassa (3-4%), anche se è stata dimostrata la possibilità di isolare ed espandere questo tipo di cellule.

I mioblasti scheletrici sono stati le prime cellule staminali ad essere studiate approfonditamente in modelli sperimentali di cardiopatia ischemica grazie alla loro origine autologa, all'alta capacità proliferativa e di differenziamento in cellule muscolari e alla relativa resistenza all'ischemia.

Un'altra possibilità su cui si è focalizzata la ricerca è quella di utilizzare il midollo osseo (Figura 1.12) come potenziale fonte di cellule staminali multipotenti. Il midollo osseo, infatti, è facilmente accessibile, le cellule staminali sono autologhe e possiedono la capacità di differenziarsi in cardiomiociti e cellule endoteliali.

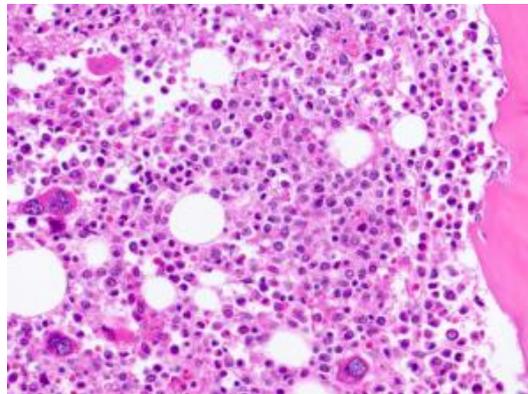


Figura 1.12 Cellule del midollo osseo.

Infine, recenti studi hanno dimostrato che il cuore possiede un potenziale rigenerativo endogeno, poiché contiene cellule staminali adulte capaci di generare cardiomiociti e cellule endoteliali, sia in vitro che in vivo. In particolare, cellule staminali adulte sono state isolate da biopsie miocardiche effettuate su pazienti affetti da miocardite e cardiomiopatia ipertrofica, e da campioni biopsici eseguiti su pazienti sottoposti a trapianto cardiaco: le cellule esprimono in vitro le proteine e le caratteristiche biofisiche tipiche dei cardiomiociti adulti e, se iniettate nell'area perinfartuale del cuore, migrano nella zona infartuata, si differenziano in cardiomiociti e contribuiscono al miglioramento della funzione contrattile cardiaca <sup>(13)</sup>.

#### **1.2.4 Fattori di crescita**

I fattori di crescita sono molecole regolatrici, che agiscono legandosi ai recettori presenti sulla superficie cellulare. Questi stimolano la funzione cellulare influenzandone la differenziazione, cambiandone l'attività biochimica e regolandone il tasso di proliferazione. Sebbene

strutturalmente siano ormoni peptidici, i fattori di crescita agiscono in modo diffuso su diversi tessuti bersaglio (endocrino, autocrino e paracrino) e regolano numerosi eventi cellulari tra cui migrazione, adesione, proliferazione e differenziamento.

### 1.3 Biomateriali: definizione e classificazione

Il campo dei biomateriali rappresenta un settore in costante crescita, nel quale vengono sviluppate continuamente nuove applicazioni, come sistemi a rilascio controllato di farmaci, terapie cellulari, sistemi diagnostici e di *imaging* basati su nanotecnologie, dispositivi microelettronici e tecnologie legate al campo dell'ingegneria tissutale. Quindi, grazie alla loro versatilità, i biomateriali trovano oggi impiego in numerosi ambiti, consentendo ogni anno il miglioramento della qualità della vita di milioni di persone. La prima definizione del termine “biomateriale” venne stabilita nel 1976 dall'*European Society for Biomaterials* (ESB), all'interno della *Consensus Conference on Definitions in Biomaterials Science*; venne identificato come biomateriale qualsiasi “materiale non vivente utilizzato in un dispositivo medico e finalizzato all'interazione con sistemi biologici”<sup>(14)</sup>. Tale definizione è stata più volte rivista e modificata, e ad oggi quella ufficiale è la seguente: “materiale finalizzato all'interazione con un sistema biologico allo scopo di valutare, trattare, aumentare o sostituire qualsiasi tessuto, organo o funzione corporea”<sup>(9)</sup>. I materiali per uso biomedico (Figura 1.13) devono possedere importanti requisiti, quali: biocompatibilità, biofunzionalità, atossicità, proprietà meccaniche compatibili con quelle del sito di impianto, elevata resistenza alla corrosione, all'usura e alla fatica.

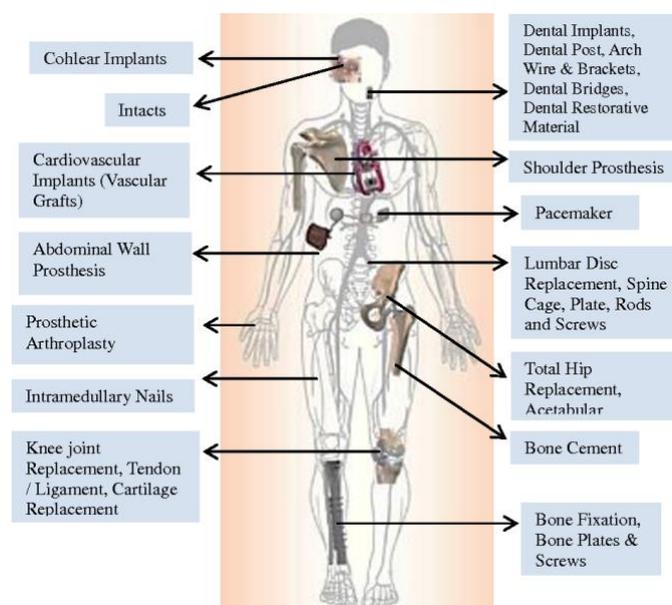


Figura 1.13 Principali applicazioni dei biomateriali in ambito biomedicale.

Esistono diverse classi di biomateriali, per ognuna delle quali variano le proprietà, le caratteristiche e di conseguenza anche le aree di applicazione; le principali categorie sono cinque: materiali metallici, ceramici, biologici, compositi e polimerici.

- **Materiali metallici:** sono impiegati per realizzare dispositivi impiantabili (protesi ortopediche e dentali), strumenti chirurgici e mezzi di osteosintesi. Tali materiali sono ideali per la sostituzione di tessuti duri e per applicazioni in cui sono previsti numerosi cicli di carico, in quanto possiedono un elevato modulo elastico, un'alta resistenza a fatica e una buona duttilità. In più, presentano eccellenti conduttività elettrica e termica. Sono, però, soggetti a corrosione in ambienti fisiologici, e le particelle rilasciate in seguito a tale fenomeno potrebbero dare origine a fenomeni di tossicità.
- **Materiali ceramici:** vengono utilizzati in ambito ortopedico, odontoiatrico e cardiocircolatorio come sostituti di tessuti duri, oltre che nel campo dell'ingegneria tissutale. Sono caratterizzati da elevate durezza, rigidità e fragilità, ottima resistenza alla corrosione e all'usura. Inoltre, riescono a resistere a grandi forze di compressione e sono buoni isolanti elettrici e termici.
- **Materiali polimerici:** sono materiali estremamente versatili, poiché disponibili in un'ampia gamma di composizioni, ciascuna con determinate proprietà fisiche e meccaniche. Esempi di applicazioni includono innesti vascolari, valvole cardiache, cuori artificiali, protesi, lenti a contatto, rivestimenti per compresse e capsule farmaceutiche, suture, cemento osseo, cateteri, dispositivi di assistenza cardiaca. Questa classe di biomateriali verrà trattata più nel dettaglio in seguito.
- **Materiali biologici:** sono tessuti di origine umana o animale, sia duri che molli. Il loro impiego avviene previa devitalizzazione cellulare, al fine di non innescare risposte immunitarie nell'organismo ospite. I tessuti duri sono utilizzati in ambito ortopedico come riempitivi, a supporto di tessuti ossei contenenti cavità provocate da malformazioni, patologie o asportazioni. I materiali provenienti da tessuti molli trovano impiego come protesi valvolari e vascolari.
- **Materiali compositi:** sono formati da due o più costituenti chimicamente distinti, che a seconda della funzione prendono il nome di matrice e rinforzo, e separati tra loro da un'interfaccia. I materiali di partenza vengono scelti in funzione dell'applicazione desiderata; in generale essi possiedono buona compatibilità, inerzia chimica, buone caratteristiche meccaniche e resistenza alla corrosione. Il rinforzo, che si trova in fase dispersa, ha a funzione di assorbire la maggior parte del carico esterno, poiché è il

materiale caratterizzato da maggior rigidità e resistenza meccanica. I compositi vengono ampiamente utilizzati come rivestimento in carbonio al fine di aumentare la biocompatibilità dei dispositivi impiantabili, riempitivi in ambito odontoiatrico e rinforzi per i materiali polimerici, allo scopo di migliorarne le proprietà meccaniche.

## 1.4 Biomateriali polimerici

I polimeri possiedono numerosi vantaggi rispetto alle altre classi di materiali: una grande varietà di composizione, che permette di modulare le proprietà fisico-meccaniche in maniera ottimale per specifiche applicazioni, bassi coefficienti di attrito, facile processabilità e lavorabilità (anche in forme e strutture complesse), possibilità di modificarne chimicamente e fisicamente la superficie, possibilità di immobilizzare cellule o biomolecole al loro interno. Presentano, però, alcuni limiti, quali la presenza di sostanze che possono essere rilasciate nell'organismo (monomeri, catalizzatori, additivi, ecc.), la facilità di assorbimento di acqua e biomolecole dall'ambiente circostante (anche nelle applicazioni in cui non è richiesto) e, in alcuni casi, la difficoltà di sterilizzazione. Nonostante ciò, i principali vantaggi sono rappresentati dalla possibilità di modulare *ad hoc* le loro proprietà in funzione della destinazione d'uso e dalla possibilità di ottenere polimeri dalla struttura molto simile ai polimeri naturali presenti nei tessuti biologici, garantendo un'ottima biocompatibilità.

### 1.4.1 Poliesteri alifatici

I poliesteri alifatici rappresentano una classe di polimeri caratterizzati dal ricorrere dell'unità funzionale esterea nella catena carboniosa (Figura 1.14), ottenuti principalmente mediante policondensazione di uno o più acidi carbossilici polifunzionali con uno o più alcoli polifunzionali.

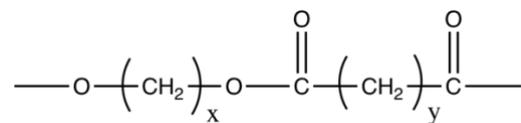


Figura 1.14 Struttura generale di un poliestere alifatico.

Possiedono eccellenti biocompatibilità, biodegradabilità ed una buona resistenza meccanica; proprio per questo motivo costituiscono la classe di maggior successo, importanza e diffusione commerciale tra tutti i polimeri biodegradabili. La maggior parte dei poliesteri alifatici ottenuti a partire da monomeri biologici risulta essere lineare ed alifatica, quindi tali materiali

presentano moduli elastici non elevati e basse temperature di fusione, proprietà che potrebbero limitare le loro applicazioni. La bassa temperatura di lavorazione, però, consente l'utilizzo di questi polimeri nell'ambito del rilascio controllato di farmaci, vaccini, peptidi, proteine e altri composti di natura biologica, i quali risentono negativamente delle alte temperature. Tuttavia, esistono ancora alcune problematiche, legate alla processabilità, alla stabilità sia durante la lavorazione che in fase di utilizzo, e alla scarsa prevedibilità in termini di velocità di degradazione. Alcuni poliesteri alifatici come il poli(propilene succinato) (PPS) ed il poli(butilene succinato) (PBS), biodegradabili e biocompatibili, sono particolarmente indicati per applicazioni in campo biomedicale, anche se l'intervallo all'interno del quale si collocano le loro proprietà fisiche e meccaniche è piuttosto ristretto. Una tecnica efficace per superare questo problema consiste nell'inserire nella catena di PPS e PBS alcune differenti subunità aromatiche o alifatiche, in modo tale da ottenere nuovi materiali biocompatibili e dalle proprietà migliorate.

#### 1.4.1.1 Cristallinità

Per quanto riguarda l'organizzazione strutturale all'interno della macromolecola, i poliesteri, così come i polimeri in generale, risultano solitamente semicristallini, ovvero caratterizzati dalla presenza di due fasi, una amorfa ed una cristallina (Figura 1.15). Nelle aree cristalline le catene polimeriche si dispongono ordinatamente secondo un motivo che si ripete nello spazio tridimensionale, mentre nella regione amorfa, che in percentuali diverse è sempre presente, le catene presentano una disposizione disordinata, caratteristica dello stato fuso.

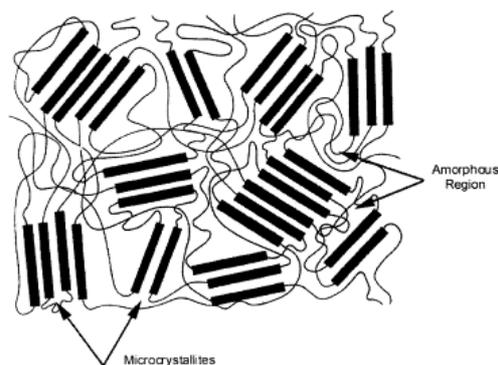


Figura 1.15 Fasi cristalline e amorfe di un polimero.

Si definisce grado di cristallinità il rapporto percentuale tra il peso di materiale in forma cristallina ed il peso totale. Nei materiali polimerici questo valore è compreso tra il 5% ed il 95%, e risulta maggiore nei casi in cui la catena è lineare, minore in presenza di macromolecole

ramificate o che presentano gruppi funzionali stericamente ingombranti. Dal punto di vista delle proprietà, i materiali cristallini sono caratterizzati da un'elevata rigidità, grazie al maggior impaccamento delle catene, da una maggiore resistenza meccanica e sono più difficilmente soggetti a fenomeni di degradazione idrolitica.

#### **1.4.1.2 Proprietà termiche**

I polimeri, e di conseguenza anche i poliesteri, possono essere classificati in base al loro comportamento meccanico al variare della temperatura. Si definiscono così due classi di materiali:

- Termoplastici: polimeri a catena lineare o ramificata che quando vengono riscaldati rammolliscono, diventando modellabili e lavorabili, per poi riacquistare consistenza solida a basse temperature, per un numero di volte teoricamente infinito, a condizione che si rimanga in un intervallo di temperature ben preciso. Ciò risulta possibile grazie alla presenza di legami a bassa resistenza termica all'interno della catena macromolecolare.
- Termoindurenti: polimeri reticolati che all'aumentare della temperatura dapprima rammolliscono, ma in seguito, sempre a causa del calore, reticolano definitivamente senza poter più essere rimodellati.

Tenendo conto del comportamento meccanico del materiale alla temperatura d'esercizio, è possibile riportare in grafico l'andamento del modulo elastico in funzione della temperatura: si possono così individuare tre curve distinte, una riferita ai polimeri reticolati, le altre due a polimeri lineari o ramificati in condizione rispettivamente di amorfismo o di parziale cristallinità (Figura 1.16). A partire da tali andamenti è possibile individuare alcune temperature caratteristiche:

- Temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ), in corrispondenza della quale si verifica il passaggio dallo stato vetroso fragile, a quello gommoso, caratterizzato da deformabilità e tenacità.
- Temperatura di rammollimento ( $T_r$ ): per i polimeri amorfi segna il passaggio dallo stato gommoso, comunque solido, a quello liquido.
- Temperatura di fusione ( $T_m$ ), che rappresenta il punto di fusione termodinamico della fase cristallina, in corrispondenza del quale si verifica la rottura del reticolo.
- Temperatura limite di stabilità chimica ( $T_1$ ), oltre la quale il materiale inizia a degradare a causa della rottura dei legami chimici.

Come si può notare dalla Figura 1.16, i polimeri reticolati, prima di raggiungere la  $T_1$ , non mostrano alcuna caduta del modulo elastico: risulta dunque impossibile stabilire i valori di  $T_g$  e  $T_m$  per questi materiali, dal momento che le proprietà meccaniche rimangono costanti all'interno dell'intero intervallo di stabilità. La curva relativa al polimero amorfo presenta una prima caduta di modulo elastico in corrispondenza della  $T_g$ , corrispondente al raggiungimento dello stato gommoso ed una seconda in corrispondenza della  $T_r$ , oltre la quale il polimero può considerarsi del tutto fuso. Il modulo elastico di un polimero semicristallino, invece, presenta una prima diminuzione in corrispondenza della  $T_g$  ed una seconda in corrispondenza della  $T_m$ , causata dalla rottura dei legami della fase cristallina. Si può inoltre notare che la diminuzione del modulo elastico in corrispondenza della  $T_g$  è inferiore in questo caso piuttosto che nel caso del polimero amorfo.

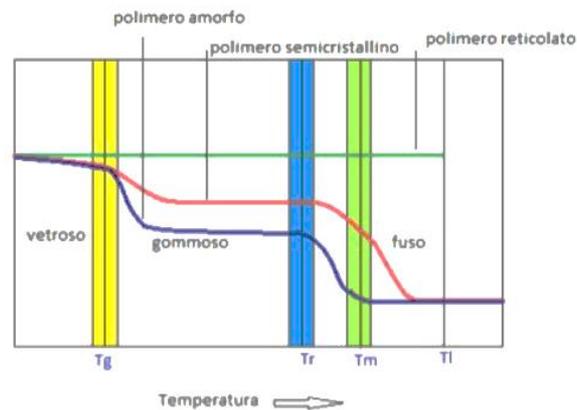


Figura 1.16 Andamento del modulo elastico, in funzione della temperatura, per polimeri a differente struttura. La maggior parte dei poliesteri alifatici risulta semicristallina, con temperatura di fusione compresa tra 40 e 130°C (tale variabilità è direttamente proporzionale al rapporto tra il numero di gruppi metilenici e carbossilato in catena); la temperatura di transizione vetrosa è invece compresa tra -70 e -30°C, mentre la densità varia tra 0,9 g/cm<sup>3</sup> e 1,3 g/cm<sup>3</sup>. Dal punto di vista della stabilità termica, essi risultano generalmente stabili fino a temperature di 200-250°C.

### 1.4.1.3 Peso molecolare

Il peso molecolare dei polimeri è un parametro particolarmente importante, in quanto da esso dipendono le proprietà del materiale (Figura 1.17).

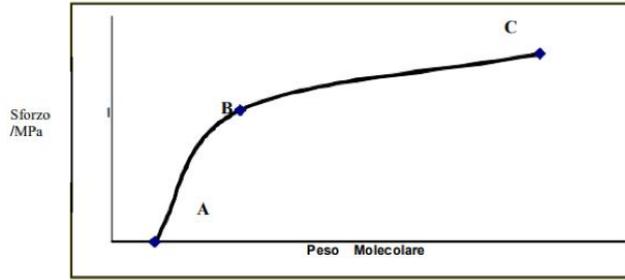


Figura 1.17 Andamento che descrive le proprietà meccaniche in funzione del peso molecolare.

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.

Le macromolecole che costituiscono i polimeri sono caratterizzate da lunghezza, e quindi da pesi molecolari, diversi tra loro. A causa di questa polidispersità al polimero viene assegnato un peso molecolare medio, la cui stima viene calcolata a partire dal 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. Da questo è poi ottenibile 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 numerico ( $M_n$ ): è definito come il rapporto tra il peso di una certa quantità di polimero ed il numero di macromolecole in esso presenti; l' $M_n$  esprime la media numerica dei pesi molecolari.

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

dove  $N_i$  indica il numero di molecole di peso molecolare  $M_i$ .

- Peso molecolare medio ponderale ( $M_w$ ): 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; infatti le molecole polimeriche più grandi rendono la soluzione più viscosa di quanto lo facciano le molecole 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.

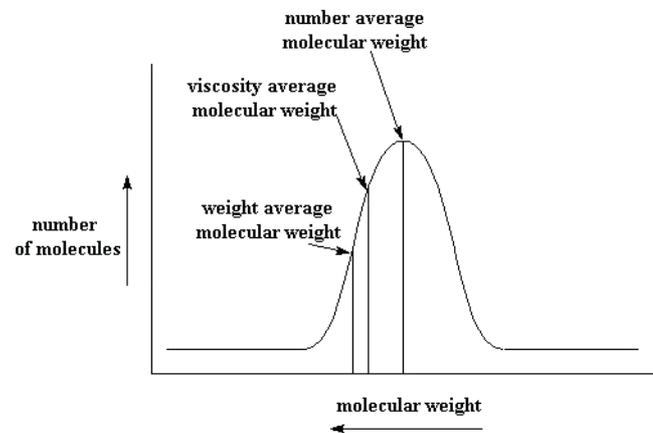


Figura 1.18 Distribuzione del peso molecolare.

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.

#### 1.4.1.4 Biodegradazione

La biodegradazione consiste essenzialmente nell'alterazione chimica e fisica che un materiale subisce in ambiente biologico. Si tratta di un fenomeno molto vasto che va dalla biodegradazione dei materiali di scarto operata dai microrganismi nelle discariche, alle modificazioni che i biomateriali, utilizzati per costruire gli impianti medicali, subiscono in vivo. La biodegradazione interessa, in modo più o meno importante, tutti i materiali impiantati nell'organismo e quindi anche i biomateriali di natura polimerica. Può essere voluta, come nel caso dei polimeri utilizzati per il rilascio controllato dei farmaci e per le protesi riassorbibili, oppure può essere del tutto indesiderata, come nel caso di protesi programmate per durare per molti anni o, addirittura, per tutta la vita del paziente. Il processo può essere artificialmente indotto ad un tempo specifico dopo l'inserimento dell'impianto oppure può scatenarsi

inaspettatamente. I materiali impiantati, nel tempo, possono solubilizzarsi, sbriciolarsi e/o assumere indesiderate caratteristiche di deformabilità o di fragilità. I prodotti di degradazione possono risultare tossici per l'organismo oppure possono essere ben tollerati e/o svolgere un'azione farmacologica specifica. In applicazioni recenti, la degradazione di membrane polimeriche viene telecomandata e controllata da sistemi computerizzati esterni all'organismo, permettendo il rilascio di reagenti o di molecole bioattive nella successione e nella quantità richiesta. Un tipico esempio di questa promettente tecnologia è costituito dai sistemi che permettono la determinazione quantitativa della glicemia e rilascio controllato di insulina in situ. La biodegradazione interessa tutti i biomateriali siano essi metalli, polimeri, ceramici o compositi. Le cosiddette "condizioni fisiologiche" sono caratterizzate da valori di pH intorno alla neutralità, da temperature blande e da basse concentrazioni saline. Tuttavia, contrariamente a quanto si potrebbe pensare, l'ambiente biologico risulta particolarmente "ostile" nei confronti di molti materiali che possono andare incontro, in queste condizioni, ad un degrado più o meno rapido. Il tipico ambiente salino acquoso rappresenta infatti il mezzo ideale, non solo per l'instaurarsi di reazioni elettrochimiche di corrosione a carico dei materiali metallici, ma anche per innescare modificazione di carattere chimico e fisico nei materiali polimerici. I principali fenomeni che possono portare al deterioramento di protesi impiantabili, costruite in tutto o in parte con materiali polimerici, possono essere di natura chimica, come l'ossidazione, oppure possono essere ricondotti a modificazioni chimiche innescate da processi di termolisi, fotolisi e radiolisi. Per quanto riguarda le modificazioni di carattere più propriamente fisico si passa dall'assorbimento, al rigonfiamento, al rammollimento, alla solubilizzazione, alla mineralizzazione, alla cristallizzazione. Inoltre, non può essere trascurata l'importanza per la degradazione di fattori meccanici quali: rotture causate da sollecitazioni meccaniche (stress cracking), fratture riconducibili a fatica del materiale o causate da impatti, tensioni dovute a carichi costanti o ciclici. Tutto ciò, aggiungendosi ad abrasioni e fratture superficiali che costituiscono ideali punti di attacco per reazioni chimiche e/o biochimiche, porta ad una accelerazione dei processi di degradazione. Nella maggior parte dei casi, la degradazione del biomateriale è dovuta alla combinazione di più meccanismi che operano simultaneamente sul materiale.

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

1. Biodegradazione chimica e biochimica
2. Biodegradazione idrolitica
3. Processi idrolitici indotti dall'organismo ospite
4. Biodegradazione ossidativa

5. Ossidazione diretta da parte dell'organismo
6. Ossidazione indotta da ioni metallici
7. Ossidazione mediata dall'ambiente esterno
8. Rottura per sollecitazione meccanica
9. Sterilizzazione

Il processo di idrolisi comporta la scissione di legami chimici ad opera dell'acqua. La suscettibilità di un polimero all'idrolisi è ricollegabile alla sua natura chimica, alla struttura, alle dimensioni e, naturalmente, all'ambiente. La velocità di idrolisi tende ad aumentare al crescere del numero di gruppi funzionali idrolizzabili (ad esempio, nel caso dei poliesteri il legame estereo), con una bassa cristallinità, con la mancanza o lo scarso numero di legami trasversali, e anche con la sollecitazione meccanica. Le strutture porose, a causa dell'elevato rapporto tra area superficiale e volume, sono particolarmente suscettibili all'idrolisi. Fattori che, al contrario, tendono a ridurre l'idrolisi sono la presenza nel polimero di zone idrofobiche, la reticolazione, una elevata cristallinità, bassi valori di sollecitazione meccanica e forme compatte. In situazioni normali, le condizioni all'interno del corpo umano tendono ad un equilibrio controllato attraverso l'omeostasi. È quindi ragionevole attendersi che i parametri ambientali al contorno dell'impianto, in configurazione non traumatica e stazionaria, siano 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. I fenomeni di infiammazione acuta e di infezione provocano spesso variazioni di pH localizzate nelle vicinanze dell'innesto, che possono portare ad un rapido aumento della velocità di idrolisi. Gli enzimi permettono di aumentare la velocità di reazione, catalizzando un processo degradativo di erosione superficiale. Il conseguente aumento di rugosità e/o l'insorgenza di fessurazioni, favoriscono ulteriormente l'azione enzimatica che può risultare più efficace in quanto aumenta la superficie del biomateriale accessibile alle cellule, tipo fagociti, che contengono grandi quantità di enzimi attivi. Il rilascio di enzimi può inoltre essere stimolato da campi di deformazione indotti sui tessuti circostanti la protesi.

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 (Tabella 1.1).

<b>Fattori</b>	<b>Metodi di controllo</b>
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

Tabella 1.1 Fattori strutturali e metodi di controllo della degradazione

#### **1.4.1.5 Strategie sintetiche**

Le strategie sintetiche utilizzate per ottenere i poliesteri alifatici sono principalmente due: la policondensazione e la *ring opening polymerization* (ROP). La policondensazione (Figura 1.19) avviene tramite un meccanismo a due stadi in cui sono impiegati come reagenti *i*) dioli e diacidi o diesteri oppure *ii*) idrossiacidi, al fine di ottenere polimeri ad alto peso molecolare. La formazione del legame estereo comporta l'eliminazione di piccole molecole come acqua, ammoniaca, alcoli e acidi inorganici a seconda dei monomeri di partenza. Tale meccanismo avviene solamente se, tra i due monomeri coinvolti nella formazione del legame, sono presenti altrettanti gruppi funzionali che interagiscono tra loro. I principali problemi della policondensazione sono le alte temperature raggiunte, i lunghi tempi di reazione, la necessità di rimuovere costantemente i prodotti secondari di reazione e di avere sempre un preciso bilanciamento stechiometrico tra gruppi acidi e gruppi ossidrilici. In più, è necessario ottenere strutture con elevato peso molecolare per garantire buone proprietà meccaniche, condizione spesso difficile da raggiungere data l'elevata volatilità dei monomeri e la presenza di reazioni collaterali.

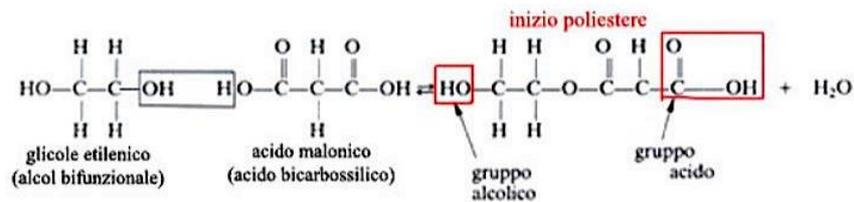


Figura 1.19 Esempio di reazione di policondensazione per la produzione di polietilentereftalato.

Un più recente approccio sintetico, utilizzato anche a livello industriale, prevede la realizzazione, tramite policondensazione, di poliesteri a basso peso molecolare (5000-10000 Da) che presentano un'altissima percentuale di gruppi terminali ossidrilici (> 95%), i quali vengono fatti reagire successivamente con un estensore di catena, generalmente un isocianato a doppia funzionalità, che, per formazione di un legame uretanico con gli idrossili terminali del poliestere, permette un veloce accrescimento della lunghezza delle catene e quindi del peso molecolare. I polimeri così ottenuti vengono chiamati poli(esteri uretani) (PEU), per la presenza, appunto, del legame uretanico tra due catene di poliestere, e presentano proprietà intermedie tra queste due categorie di polimeri.

In alternativa, la ROP (Figura 1.20) è una reazione sfruttabile se si parte da monomeri quali: lattoni, diesteri ciclici o acetali chetonici ciclici. Questa tecnica prevede la scissione dei legami delle strutture ad anello al fine di ottenere una molecola lineare con un gruppo estereo all'interno. La costruzione della macromolecola avviene sempre per policondensazione, ma è possibile limitare il numero di reazioni secondarie e si ha la capacità di controllare meglio proprietà come il peso molecolare, la sua distribuzione e la presenza di opportuni gruppi funzionali terminali.

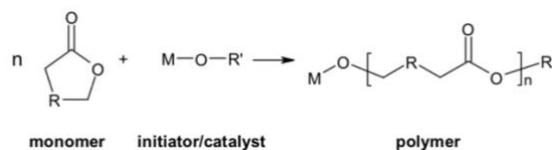


Figura 1.20 Rappresentazione schematica della ROP di un estere ciclico.

#### 1.4.1.6 Poliesteri alifatici per uso biomedicale

Fra i poliesteri alifatici utilizzati in campo biomedicale è importante citare:

- Acido poliglicolico (PGA): è un polimero semicristallino (Figura 1.21) ottenuto mediante policondensazione dell'acido glicolico o attraverso ROP del glicolide. La sua  $T_m$  è intorno ai 224-226°C e la  $T_g$  è compresa tra i 36°C e i 40°C<sup>(15)</sup>; dal punto di vista delle proprietà meccaniche, presenta un modulo elastico piuttosto elevato. Tali

caratteristiche consentono di utilizzarlo per la realizzazione di suture degradabili (DEXON®), come materiale per *scaffold* per la rigenerazione di ossa, cartilagine, tendini, denti e, in accoppiamento ad altri materiali biodegradabili, come riempitivo. La sua rapida degradazione è una problematica da non sottovalutare, poiché porta ad una veloce perdita delle proprietà meccaniche e al rilascio locale di acido glicolico. Questa sostanza, nonostante venga assorbita dalle cellule attraverso il ciclo dell'acido citrico ed escreta per via urinaria, a lungo termine provoca gravi risposte infiammatorie nell'organismo ospite.

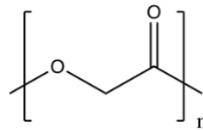


Figura 1.21 Struttura dell'acido poliglicolico.

- Acido polilattico (PLA): è un polimero biodegradabile (Figura 1.22), che può essere preparato sia mediante condensazione dell'acido lattico sia mediante ROP del lattide. L'acido lattico è una molecola chirale, per cui sono presenti 4 forme di PLA: acido poli-L-lattico (PLLA), poli-D-lattico (PDLA), poli-D,L-lattico (PDLLA) e l'acido mesopolilattico. I più studiati in ambito biomedicale sono il PDLLA ed il PLLA; quest'ultimo, in particolare, ha riscontrato un notevole successo grazie alle sue buone caratteristiche meccaniche e di biocompatibilità. Il PLLA è un materiale semicristallino con una  $T_m$  di circa 175°C e una  $T_g$  di 60-65°C, possiede modulo elastico e resistenza a trazione elevati, caratteristiche che lo rendono adatto per l'utilizzo in dispositivi che devono sostenere carichi. Il PLLA è impiegato in ingegneria tissutale come materiale per *scaffold* per la rigenerazione di tessuto osseo, vascolare, neurale e tendineo. A causa della lenta velocità di degradazione, sistemi unicamente a base di PLLA non possono essere impiegati per il rilascio controllato di farmaci. Il PDLLA è un polimero amorfo (a causa della 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 (anche se comunque non inferiori ad un anno), fattori che lo rendono idoneo per la realizzazione di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci e di *scaffold* <sup>(16)</sup>.

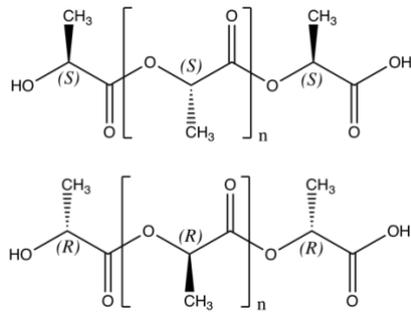


Figura 1.22 Struttura dell'acido polilattico (L e D).

- Acido polilattico-co-glicolico (PLGA): è un copolimero sintetico ottenuto dalla polimerizzazione tra PLA (nelle sue due forme D,L-lattico e L-lattico) e PGA (Figura 1.23). I due omopolimeri presentano caratteristiche molto diverse tra loro, perciò, a seconda della composizione del copolimero, possono essere ottenuti PLGA con proprietà molto diverse. Il PLGA viene utilizzato per la fabbricazione di suture e impianti, per la realizzazione di nano e microparticelle biodegradabili per il rilascio controllato di particelle come proteine, vaccini, farmaci chemioterapici, antibiotici, analgesici, antinfiammatori e RNA. Inoltre, questo polimero favorisce l'adesione e la proliferazione cellulare: rappresenta, quindi, un materiale ideale per la realizzazione di supporti per la rigenerazione di tessuto osseo, cartilagineo, tendineo, pelle, fegato e tessuto nervoso.

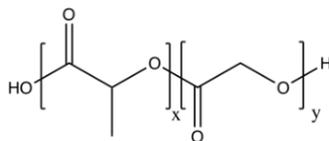


Figura 1.23 Struttura dell'acido polilattico-co-glicolico.

- Policaprolattone (PCL): è un polimero semicristallino (Figura 1.24) ottenuto tramite ROP del monomero ciclico  $\epsilon$ -caprolattone. Il PCL presenta una  $T_m$  di 55-69°C e una  $T_g$  di circa -60°C<sup>(17)</sup>. Per quanto concerne le proprietà meccaniche, si ha: modulo elastico di circa 23 MPa e allungamento a rottura del 4700%. Tali valori fanno del PCL un biomateriale altamente elastico. Queste caratteristiche, insieme all'elevata processabilità, lo rendono adatto per la realizzazione di *scaffold* per la rigenerazione di ossa, legamenti, cartilagine, pelle, tessuto nervoso e vascolare<sup>(18)</sup>. I tempi di degradazione sono lunghi (circa 2 anni), proprietà che ne consente l'utilizzo per la realizzazione di dispositivi impiantabili a rilascio controllato.

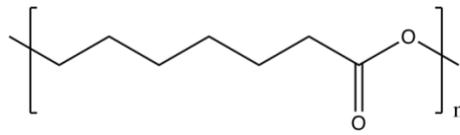


Figura 1.24 Struttura del policaprolattone.

#### 1.4.1.7 Polimeri elastomerici

Un elastomero è un materiale caratterizzato da una temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) inferiore alla temperatura ambiente e che, in seguito a sollecitazione meccanica, presenta un comportamento di tipo elastico, ritornando in maniera del tutto reversibile al suo stato iniziale al termine della sollecitazione stessa. Al fine di interfacciare questi materiali con tessuti dinamici dal punto di vista meccanico, come i muscoli <sup>(19)</sup>, risulta necessaria una buona compatibilità, insieme all'adattabilità di forma e a proprietà meccaniche conformi alle destinazioni d'uso. Grazie a tutte queste caratteristiche, unitamente ai bassi costi di produzione, gli elastomeri stanno destando un notevole interesse, soprattutto per potenziali applicazioni in ambito biomedicale. Ad oggi sono impiegati per la realizzazione di un ampio numero di dispositivi impiantabili in ambito cardiovascolare, protesico e ortodontico. Gli elastomeri per uso biomedico possono essere suddivisi in due categorie, in base ai polimeri impiegati per la loro sintesi:

- Elastomeri naturali: uno dei più utilizzati come substrato naturale per l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare, soprattutto in *soft tissue engineering*, è il collagene, materiale che si trova nella matrice extracellulare dei tessuti molli. Anche elastina, fibrina e alginato vengono impiegati per la ricostruzione di osso, cartilagine, pelle, legamenti, vasi sanguigni, cuore, fegato e fibre nervose. Tutti possiedono eccellente biocompatibilità e biodegradabilità, ottime proprietà fisiche, chimiche e meccaniche. Vi sono, però, problemi connessi alla procedura di purificazione, alla processabilità, ed alle proprietà meccaniche non omogenee, variabili a seconda del tipo di tessuto da cui provengono.
- Elastomeri sintetici: i più interessanti sono i materiali termoplastici, contraddistinti da un'alternanza di segmenti rigidi e segmenti flessibili, all'interno della loro catena. A temperatura ambiente, i segmenti flessibili conferiscono un comportamento elastico e gommoso al materiale, mentre i segmenti più rigidi formano numerosi legami tra catene adiacenti, dando origine a domini cristallini. Gli elastomeri termoplastici presentano una buona processabilità, ma la loro cristallinità è spesso causa di degradazione

eterogenea; inoltre, l'andamento delle proprietà meccaniche risulta piuttosto difficile da prevedere. Gli elastomeri termoplastici maggiormente impiegati in applicazioni di tipo biomedicale sono i poli(esteri uretani).

## 1.4.2 Copolimeri

I copolimeri, diversamente dagli omopolimeri (che sono formati dall'unione di unità ripetitive dello stesso tipo), derivano dall'unione di due o più tipi di monomeri diversi. Le variabili attraverso cui è possibile modificare e modulare le proprietà finali del copolimero sono: la natura dei monomeri, la loro distribuzione nelle macromolecole e la loro percentuale relativa.

I copolimeri possono essere classificati in base alla disposizione dei diversi monomeri all'interno della catena polimerica:

- Copolimeri statistici (*random*): le unità monomeriche sono disposte casualmente;
- Copolimeri alternati: le unità monomeriche sono disposte in modo alternato;
- Copolimeri aggraffati (o ad innesto): nella catena principale, costituita dallo stesso tipo di unità monomeriche, sono innestate catene laterali di diversa lunghezza del secondo monomero;
- Copolimeri a blocchi: una catena più o meno lunga dello stesso monomero è unita, ad un'estremità, ad una catena dell'altro monomero.

### 1.4.2.1 Copolimeri statistici

Nei copolimeri statistici le diverse unità comonomeriche sono disposte in maniera casuale e indipendente dalla natura delle unità adiacenti <sup>(20)</sup>. I copolimeri statistici vengono ottenuti mediante processi di poliaddizione radicalica, ionica o di coordinazione, o mediante policondensazione delle diverse subunità comonomeriche. Per quanto riguarda la copolimerizzazione, la problematica principale consiste nel prevedere la composizione di un certo copolimero, nota la quantità iniziale dei monomeri. La reattività di questi ultimi, infatti, varia durante la reazione: di conseguenza la composizione del copolimero evolve continuamente nel tempo rispetto a quella del mezzo di reazione. Per questo motivo, si può affermare che la composizione di un copolimero, in relazione ad una certa miscela di alimentazione, è istantanea e definibile come l'esito di conversioni infinitesime di monomeri.

Per quanto concerne la temperatura di transizione vetrosa, nei copolimeri statistici questa varia in maniera monotona con la composizione ed è intermedia rispetto a quelle proprie dei due omopolimeri.

Al fine di descrivere l'andamento di  $T_g$  al variare della composizione polimerica, sono state formulate diverse equazioni, tra cui quella 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.

Esiste una più recente equazione, quella di Couchman, utilizzata anche per 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.

Entrambe le equazioni delineano un andamento monotono crescente di  $T_g$  al variare della composizione. In alcuni casi, però, i copolimeri mostrano un massimo o un minimo di  $T_g$  a composizioni intermedie. Le equazioni di cui sopra non descrivono correttamente l'andamento dei dati sperimentali.

Supponendo che le diadi AA, BB, AB (o BA) determinino il valore di  $T_g$  del copolimero, l'equazione di Fox può essere così scritta:

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

dove  $T_{gAB}$  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.

Attraverso questa formula si è potuto raggiungere un valido compromesso tra previsioni ed evidenze sperimentali.

I copolimeri, inoltre, possono mostrare una o più fasi cristalline. Considerando un copolimero statistico composto da due unità comonomeriche distinte, A e B, di cui A in grado di cristallizzare e B no, si possono avere due situazioni differenti <sup>(21)</sup> (Figura 1.25): *a*) fase cristallina A pura in equilibrio con una fase amorfa mista di unità A e unità B non cristallizzabili (esclusione di comonomero); *b*) le unità del comonomero B possono entrare a far parte del reticolo cristallino, sia in forma di difetti, sia in condizioni di equilibrio (inclusione del comonomero).

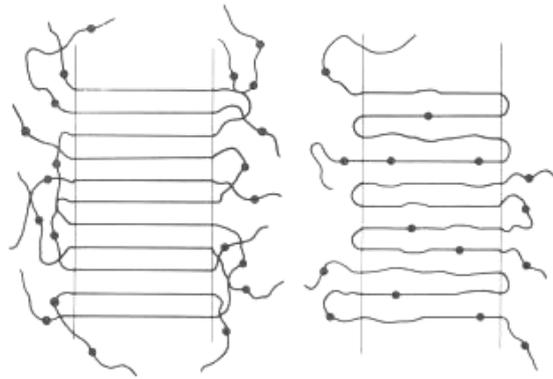


Figura 1.25 Rappresentazione del modello di esclusione (a sinistra) e del modello di inclusione (destra).

Relativamente al caso *a*), la temperatura di fusione  $T_m$  dei copolimeri statistici può essere calcolata utilizzando la equazione di Flory:

$$\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T_m^\circ} = -\left(\frac{R}{\Delta H_u}\right) \cdot \ln x_A$$

dove  $T_m^\circ$  è la temperatura di fusione di equilibrio dell'omopolimero cristallizzabile (A),  $\Delta H_u$  è l'entalpia di fusione per unità ripetitiva di A nel cristallo perfetto, e  $x_A$  è la frazione molare di A nel copolimero.

L'equazione assume che la temperatura di fusione del copolimero a distribuzione statistica sia indipendente dalla natura del comonomero B, a condizione che esso risulti effettivamente escluso dal reticolo cristallino. Inoltre, poiché la  $T_m^\circ$  sperimentale si riferisce alla scomparsa di sequenze di A più brevi di quanto richiesto dalla teoria di fusione all'equilibrio dinamico, i copolimeri, seppure cristallizzati accuratamente, manifestano  $T_m^\circ$  inferiori al valore teorico previsto, con uno scarto direttamente proporzionale al crescere del numero di co-unità B. Tale errore può essere corretto considerando l'effetto della lunghezza delle sequenze cristallizzabili grazie all'equazione di Baur:

$$\frac{1}{T_{m,co}^\circ} = \frac{1}{T_m^\circ} - \left(\frac{R}{\Delta H_m^\circ}\right) (\ln x_c - 2x_c(1 - x_c))$$

dove con  $T_{m,co}^\circ$  si intende la temperatura di fusione di equilibrio dell'omopolimero cristallizzabile (C), con  $\Delta H_m^\circ$  l'entalpia di fusione per unità ripetitiva di C nel cristallo perfetto, e con  $x_c$  la frazione molare di C nel copolimero.

Come menzionato sopra (caso *b*)), in alcune situazioni i copolimeri statistici possono anche mostrare co-cristallizzazione, definita come la sostituzione isomorfa delle unità comonomeriche. Questi, quindi, mostrano un elevato grado di cristallinità in corrispondenza di tutto il campo di composizione.

Si distinguono due tipi di sostituzione isomorfa:

- Se gli omopolimeri dei due comonomeri presentano una struttura cristallina molto simile, la fase cristallina del copolimero risulta caratterizzata da parametri che cambiano gradualmente in corrispondenza di variazioni della composizione.
- Se i due omopolimeri mostrano struttura cristallina differente, una delle unità monomeriche entra a far parte di un reticolo diverso da quello del proprio omopolimero (isodimorfismo), e la composizione alla quale il copolimero passa da una struttura cristallina all'altra risulta ben precisa. A causa delle unità estranee ospitate, i parametri del reticolo cristallino appaiono differenti da quelli dell'omopolimero corrispondente.

In entrambi i casi, l'andamento della temperatura di fusione al variare della composizione si discosta da quello previsto per copolimeri la cui fase cristallina rimane pura, ovvero inaccessibile alle unità dell'altro monomero. La sostituzione isodimorfa è studiata dal modello di Wendling e Suter, che combina quello di Baur e quello di inclusione di Sanchez-Eby.

#### 1.4.2.2 Copolimeri a blocchi

Oggi, i copolimeri a blocchi sono oggetto di studio da parte di numerosi gruppi di ricerca, poiché questi possiedono la capacità di auto-organizzarsi in strutture aventi periodicità anche su scala nanometrica. I blocchi costituiti dalle due diverse unità comonomeriche possono formare macromolecole con architettura lineare (copolimeri di-, tri- e multiblocco) o non lineare (multirami, a stella e graffati) (Figura 1.26).

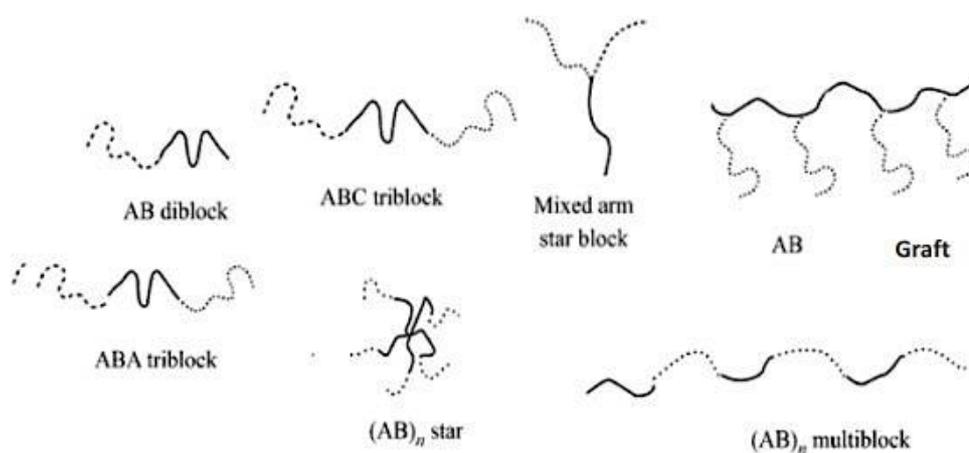


Figura 1.26 Architettura lineare e non lineare dei copolimeri a blocchi.

In particolare, tra le principali strutture copolimeriche a blocchi figurano:

- Di-blocchi (Am-Bn): i blocchi possono contenere gruppi terminali (-OH), gruppi di giunzione (-COO-), oppure, il secondo blocco può includere un terzo monomero C (Am-B-C), distribuito in maniera casuale, alternato, o in sequenze decrescenti, ecc.
- Tri-blocchi (Am-Bn-Am, Am-Bn-Aq, Am-Bn-Cq): sequenze che rappresentano copolimeri contenenti tre blocchi.
- Multi-blocchi (Am-Bn-Am-Bq-Am-Bq): copolimeri segmentati.
- Copolimeri a di-blocchi ripetuti ((Am-Bn)<sub>x</sub>).
- Copolimeri a stella: presentano multi-braccia collegate da un'unità di giunzione (caso particolare di copolimeri ad innesto).

Nel caso di copolimeri a blocchi amorfi, se le sequenze costituenti risultano compatibili, allora il copolimero consiste di un'unica fase con un'unica temperatura di transizione vetrosa. Se, invece, i diversi blocchi polimerici sono chimicamente incompatibili, si ha separazione di fase con segregazione spontanea delle differenti macromolecole in diversi microdomini amorfi. Se uno o entrambi i blocchi sono cristallizzabili, si ha segregazione di fase con formazione di domini cristallini (*self-assembly*). La periodicità, le dimensioni di tali domini regolari e le transizioni termiche di questi sistemi dipendono dalla morfologia, che dipende a sua volta dal metodo di preparazione del campione (effetto della storia termica, meccanica, del solvente, ecc.), oltre che dalle caratteristiche molecolari del copolimero.

Si distinguono, quindi, due tipologie di copolimeri a blocchi:

- Blocchi non cristallizzabili: ad ogni fase amorfa presente corrisponde una transizione vetrosa che, nell'ipotesi di una separazione di fase, porta a microdomini nettamente distinti, facilmente correlabili alla  $T_g$  dell'omopolimero corrispondente. La situazione reale si avvicina a quella descritta solo quando il peso molecolare dei blocchi è elevato e l'incompatibilità tra i blocchi molto marcata.
- Blocchi cristallizzabili: se nel copolimero uno o entrambi i blocchi risultano cristallizzabili, la segregazione di fase comporta anche la formazione di domini cristallini. Questi possono dare luogo a strutture organizzate con un arrangiamento periodico, come avviene nel caso di copolimeri a due o tre blocchi, oppure a strutture prive di organizzazione, come nel caso di polimeri multi-blocchi. Quando entrambi i blocchi sono cristallizzabili, la morfologia è dettata dal blocco che cristallizza per primo e il secondo componente cristallizza in presenza delle restrizioni steriche imposte dai domini cristallini già formati.

#### 1.4.2.2.1 *Chain extension*

La *chain extension* è una strategia sintetica utilizzata per ottenere polimeri multiblocco di peso molecolare elevato <sup>(22)</sup>. Come già accennato sopra, questa consiste in una reazione di polimerizzazione, che avviene a partire da omopolimeri o copolimeri ottenuti per policondensazione, che presentano un'alta percentuale di gruppi terminali ossidrilici (> 95%). Questi ultimi vengono fatti reagire allo stato fuso con un estensore di catena, generalmente un isocianato a doppia funzionalità, che tramite la formazione di un legame uretanico, permette una veloce unione dei blocchi comonomerici, con conseguente rapido aumento del peso molecolare. In fase di sintesi è necessario inserire la corretta quantità di estensore di catena, poiché un sovradosaggio porterebbe alla gelificazione del polimero, che renderebbe impossibile ogni sua successiva lavorazione.

#### 1.4.3 Polibutilene succinato (PBS)

Il polibutilene succinato (PBS) è un poliestere alifatico semicristallino ad alta capacità di cristallizzazione ( $X_c = 35-45\%$ ) con temperatura di fusione di circa 110-115°C. La temperatura di transizione vetrosa è al di sotto di 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%). Come altri poliesteri, tuttavia, il PBS presenta diverse caratteristiche interessanti: un moderato costo di produzione, un processo di sintesi semplice, già consolidato a livello industriale e la possibilità di ottenerlo partendo da fonti rinnovabili; è stato inoltre recentemente approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA). I suoi principali impieghi 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. Attualmente, in ambito biomedicale, sono commercializzati da Bionolle® *stents*, involucri compatibili con la sterilizzazione a vapore, e componenti per la diagnostica a immagini.

I monomeri impiegati nella sintesi di PBS sono acido succinico (SA) o dimetil succinato (DMS) e 1,4-butandiolo (BD), comunemente ottenuti da risorse fossili. Sia l'acido succinico che l'1,4-butandiolo possono essere ottenuti, come già accennato, anche da fonti rinnovabili, ad esempio attraverso la fermentazione di zuccheri <sup>(23)</sup>, rendendo il PBS un copolimero completamente *bio-based*. Più nel dettaglio, il processo di produzione convenzionale di acido succinico (SA) si basa su prodotti grezzi dell'industria petrolchimica come n-butano o butadiene. Il butano viene

in primo luogo ossidato per produrre anidride maleica (processo che provoca una perdita di circa il 50% di butano, rilasciato sotto forma di CO<sub>2</sub>), la quale subisce, in seguito, un'idrogenazione catalitica diventando anidride succinica, che viene ulteriormente idrogenata per ottenere acido succinico<sup>(24)</sup>. La produzione di SA *petrol-based* ha dominato il mercato per anni, ma i recenti sviluppi nella fermentazione delle fonti di glucosio e nelle tecnologie di purificazione hanno reso la produzione *bio-based* di SA economicamente attrattiva, nonostante il processo fermentativo necessiti di grandi volumi, dovuti all'elevata diluizione del substrato e dei prodotti, di tempi di reazione più lunghi, e si raggiungano rese e livelli di purezza minori. L'acido succinico *bio-based* viene prodotto attraverso processi fermentativi, per mezzo di lieviti e batteri in grado di metabolizzare diversi zuccheri C<sub>5</sub> e C<sub>6</sub> sia in forma pura che sotto forma di derivati, come la lignocellulosa.

L'1,4-butandiolo è un importante intermedio chimico impiegato, ad esempio, nella produzione di polimeri come PBS, PBT e poliuretani. Viene ottenuto convenzionalmente dall'anidride maleica proveniente dall'industria petrolchimica, ma sono presenti anche altri metodi di produzione come il Reppe, l'acetossilazione e il processo multistep dell'etilenossido. Come nel caso dell'acido succinico, molte grandi compagnie e consorzi stanno lavorando sullo *scale-up* di impianti per la produzione di BD da fonte rinnovabile; la maggior parte di questi si basa sull'idrogenazione catalitica di SA *bio-based*.

Negli ultimi anni, inoltre, sono stati messi a punto processi biotecnologici che utilizzano microrganismi di vario tipo per la produzione di acido succinico; quest'ultimo, può essere poi convertito in 1,4-butandiolo attraverso meccanismi di idrogenazione.

Comunemente il PBS viene sintetizzato per policondensazione in massa a due stadi (Figura 1.27): nel primo si verifica una reazione di esterificazione (o transesterificazione se il monomero di partenza è il DMS) con rimozione di acqua (o metanolo), mentre nel secondo, condotto a temperatura più elevata e a pressione via via sempre minore fino al raggiungimento del vuoto spinto, viene rimosso il glicole in eccesso, promuovendo contemporaneamente le reazioni di transesterificazione che permettono di ottenere alti pesi molecolari. La reazione viene condotta in presenza di un catalizzatore, solitamente il titanio (IV) butossido (TBT).

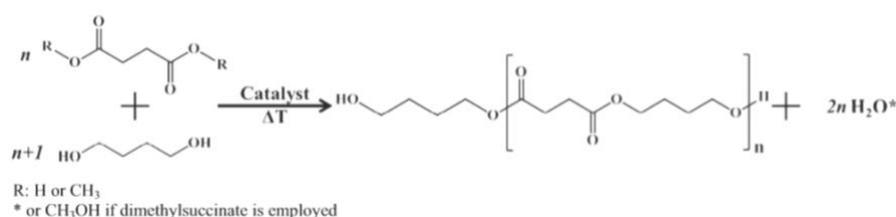


Figura 1.27 Schema di reazione della polimerizzazione del PBS.

Infine, il poli(butilene succinato) è caratterizzato da una comprovata biodegradabilità e biocompatibilità. 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. Per quanto riguarda gli 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 la biocompatibilità anche in vivo <sup>(25)</sup>.

#### **1.4.3.1 Copolimeri a base di PBS**

L'applicazione più studiata dei copolimeri a base di PBS in campo biomedicale è l'ingegneria tissutale, in cui questi materiali sono stati impiegati sotto forma di film e di *scaffold*. I copolimeri a base di PBS vengono realizzati allo scopo di diminuire la cristallinità del PBS, migliorarne le proprietà meccaniche in termini di flessibilità e aumentarne la biodegradabilità, mantenendo la buona stabilità termica e la biocompatibilità. Attraverso le principali strategie sintetiche di copolimerizzazione, la copolicondensazione, la miscelazione reattiva e la *chain extension*, è stato possibile ottenere rispettivamente copolimeri statistici a diversa composizione, copolimeri multiblocco con blocchi a diversa lunghezza e copoliesteri-uretani multiblocco ad alto peso molecolare <sup>(23)</sup>. Negli ultimi anni è stata condotta un'intensa attività di ricerca a livello globale: 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 compositi 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. Nonostante tali vantaggi, questi due materiali non possiedono delle buone proprietà

meccaniche, motivo per cui, ad oggi, sono oggetto di ricerca nel campo dell'ingegneria biomedica <sup>(23, 26-31)</sup>.

#### 1.4.4 Pripol 1009

Pripol 1009 è un diacido completamente *bio-based* a catena lunga, prodotto dalla dimerizzazione di acidi grassi e commercializzato da CRODA (Figura 1.28).

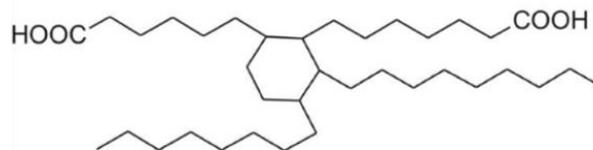


Figura 1.28 Struttura dell'acido grasso dimero di olio vegetale Pripol 1009.

I polimeri a base di Pripol 1009 sono caratterizzati da elevata stabilità termica, sono idrofobici ed idrorepellenti, particolarmente flessibili e deformabili, anche a basse temperature. Tali caratteristiche, insieme alla colorazione neutra, ne permettono l'impiego come *coating* adesivi a basso impatto ambientale, anche in combinazione con substrati flessibili, sigillanti e come materiale per la produzione di elastomeri e plastiche ingegnerizzate <sup>(32)</sup>. Questo materiale, altamente versatile, è stato utilizzato anche in combinazione con l'olio di lino epossidato per produrre pellicole termoindurenti di natura *green*. Per quanto riguarda le possibili applicazioni in ambito biomedicale, il Pripol 1009 è già stato copolimerizzato con il PBS per realizzare sistemi copolimerici biodegradabili e biocompatibili utilizzati per il *coating* di nanoparticelle <sup>(33)</sup>.

## **CAPITOLO 2:**

### **SCOPO DELLA TESI**

Le malattie cardiovascolari come l'infarto miocardico, le malattie congenite complesse, e la conseguente insufficienza cardiaca sono tra le principali cause di mortalità. Attualmente, i grafts impiegati per la terapia sostitutiva o riparativa sono imperfetti e sottopongono i pazienti a uno o più rischi tra cui la trombosi, la durata limitata, l'aumentata suscettibilità alle infezioni e la necessità di reintervento nei bambini e nei giovani a causa della mancata contemporanea crescita di tali condotti. Il trapianto cardiaco rimane l'opzione terapeutica di scelta nei pazienti con insufficienza cardiaca terminale anche se limitata dalla insufficiente disponibilità di donatori e dai problemi legati al rigetto immunitario, alle infezioni ed alle complicanze trombotiche.

L'ingegneria tissutale sta emergendo come nuovo e valido approccio alternativo per la sostituzione del miocardio danneggiato o per la ricostruzione di malformazioni congenite. In generale, le cellule sono posizionate su matrici tridimensionali di polimeri biodegradabili per formare prodotti tissutali viventi tridimensionali aventi proprietà strutturali o funzionali tali da poter essere usati nel ripristino, mantenimento o miglioramento della funzione tissutale.

I principali vantaggi che i polimeri di sintesi presentano rispetto alle altre classi di materiali (metalli, ceramiche, compositi, etc.) sono una maggiore biocompatibilità, la possibilità di modificarne ampiamente composizione e proprietà fisicomeccaniche, 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 intorno o sulla superficie. In questo ambito, i poliesteri costituiscono una classe di polimeri davvero promettente, in quanto le variegata strutture chimiche che li caratterizzano permettono di soddisfare un'ampia gamma di esigenze. Tra i poliesteri alifatici risultano già commercializzati per la realizzazione di dispositivi biomedicali l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA), il poli( $\epsilon$ -caprolattone) (PCL) e i loro copolimeri, tutti approvati dalla Food and Drug Administration (FDA). Questi ultimi, tuttavia, risultano troppo rigidi per la realizzazione di dispositivi deputati alla rigenerazione dei tessuti molli e sono, inoltre, caratterizzati da un profilo di degradazione idrolitica non sempre idoneo rispetto all'applicazione.

Negli ultimi anni, l'attenzione della ricerca si è incentrata sul poli(butilene succinato) (PBS), già presente in commercio e utilizzato soprattutto nel campo degli imballaggi biodegradabili

grazie alla buona stabilità termica e alla elevata temperatura di fusione (115°C), una delle più alte tra i poliesteri alifatici ottenuti per policondensazione. Recentemente ha ottenuto l'approvazione della Food and Drug Administration ed è stata dimostrata la sua biocompatibilità con l'organismo umano (nostra review). Di contro, il PBS possiede proprietà meccaniche non ottimali per alcune applicazioni in campo biomedicale, come l'ingegneria dei tessuti molli, ed evidenzia tempi di degradazione lunghi, dovuti al grado di cristallinità elevato (circa 45-50%) ed all'elevata idrofobicità.

Il gruppo di ricerca presso cui è stata condotta la presente Tesi, ha pubblicato un anno fa una review <sup>(23)</sup> che ha raccolto i risultati delle ricerche condotte sul PBS e sui relativi copolimeri, blends e nanocompositi in ambito biomedico. Da questi risultati si evince l'enorme potenzialità di questo poliestere nella medicina rigenerativa e nella realizzazione di sistemi per il rilascio controllato dei farmaci.

Nell'ottica di migliorare le proprietà non soddisfacenti di un omopolimero, la copolimerizzazione rappresenta senza dubbio lo strumento più efficace, perché si può raggiungere l'obiettivo senza andare a detrimento di quelle già soddisfacenti. Mediante copolimerizzazione è, infatti, possibile ottenere una nuova classe di polimeri con un'ampia gamma di proprietà, modulabili in modo mirato in base al tipo, alla quantità e alla distribuzione delle unità comonomeriche lungo la catena macromolecolare.

Alla luce di quanto sopra detto, il presente lavoro di Tesi si è proposto come scopo la sintesi e successiva caratterizzazione di nuovi copoliesteri alifatici a base di PBS biocompatibili, biodegradabili e caratterizzati da proprietà meccaniche tipiche degli elastomeri termoplastici da utilizzare per la fabbricazione di scaffold idonei per l'ingegneria tissutale del miocardio.

Più dettagliatamente, l'ampio lavoro svolto ha mirato al conseguimento dei seguenti obiettivi specifici:

- ✓ Valutazione dell'effetto dell'architettura molecolare (copolimero statistico *vs.* copolimero multiblocco) sulle proprietà finali del materiale a parità di quantità e tipo di unità comonomerica.
- ✓ Valutazione dell'effetto del tipo di comonomero introdotto nel PBS (Pripol 1009 *vs.* neopentil glicole) a parità di architettura molecolare (multiblocco) e composizione sulle proprietà finali del materiale.

L'attività di ricerca, svolta presso i laboratori LAMAC del Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali dell'Università degli Studi di Bologna e presso il CNR di Bologna, si è articolata nelle seguenti fasi:

- Preliminare analisi bibliografica per focalizzare gli sviluppi recenti sull'argomento trattato.
- Sintesi tramite policondensazione in massa degli oligomeri PBS-OH, P(BSBPripol)-OH e P(BSBNS)-OH e loro purificazione.
- Verifica della struttura chimica e, nel caso dei copolimeri, della composizione effettiva tramite risonanza magnetica nucleare (NMR).
- Determinazione della quantità di gruppi terminali ossidrilici tramite risonanza magnetica nucleare (NMR).
- Sintesi dei copolimeri multiblocco PBSP(BSBPripol) e PBSP(BSBNS) tramite estensione di catena in presenza di esametilene diisocianato (HDI).
- Sintesi del copolimero PBSP(BPripol) statistico ad elevato peso molecolare.
- caratterizzazione molecolare dei campioni sintetizzati ai due punti di cui sopra mediante risonanza magnetica nucleare (NMR) e cromatografia a permeazione su gel (GPC).
- Stampaggio in film sottili dei polimeri sintetizzati mediante pressofusione.
- Realizzazione di *scaffold* mediante elettrofilatura.
- Caratterizzazione termica mediante analisi termogravimetrica (TGA) e calorimetria differenziale a scansione (DSC) dei film e degli *scaffold*.
- Analisi diffrattometrica a Raggi X dei film e degli *scaffold*.
- Caratterizzazione meccanica dei campioni mediante prove a trazione a rottura e cicliche dei film e degli *scaffold*.
- Studi di degradazione idrolitica sui film e sugli *scaffold*.
- Analisi dei risultati ottenuti ed estrapolazione di correlazioni proprietà struttura.

## CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

### 3.1 Sintesi di polimeri OH-terminati e copolimeri ad elevato peso molecolare

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 Electrosponning Gene-Assembler del CNR di Bologna.

#### 3.1.1 Sintesi di poli(butilene succinato) a basso peso molecolare (PBS-OH)

L'omopolimero idrossil-terminato a basso peso molecolare è stato sintetizzato tramite policondensazione in massa a due stadi, utilizzando come monomeri di partenza dimetil succinato (DMS) e 1,4-butandiolo (BD), quest'ultimo impiegato in eccesso del 70% per assicurare la formazione preferenziale dei terminali idrossilici; entrambi i reagenti, le cui strutture chimiche sono riportate in Figura 3.1, si presentano in forma di liquido incolore.

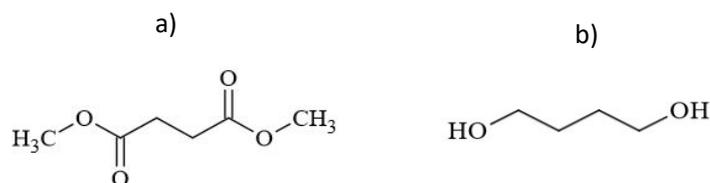


Figura 3.1 Struttura chimica del dimetil succinato (a) e dell'1,4-butandiolo (b).

In aggiunta ai reagenti è stato inserito il catalizzatore titanio(IV)tetrabutossido ( $\text{Ti}(\text{OBu})_4$ , 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. Il polimero ottenuto, la cui struttura chimica è riportata in figura 3.2 è risultato essere di colore bianco e dalla consistenza piuttosto rigida.

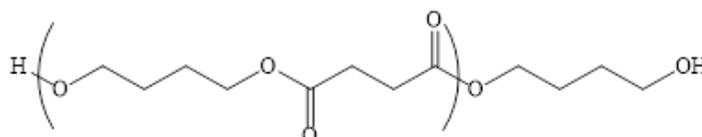


Figura 3.2 Struttura del PBS-OH

La strumentazione per la sintesi si compone di un reattore in vetro a tre colli, immerso in un bagno di sali inorganici (nitrati e nitriti di potassio e sodio) che garantiscono il mantenimento di una temperatura uniforme e costante (Figura 3.3). Il sistema che permette l'agitazione dei reagenti è di tipo 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.

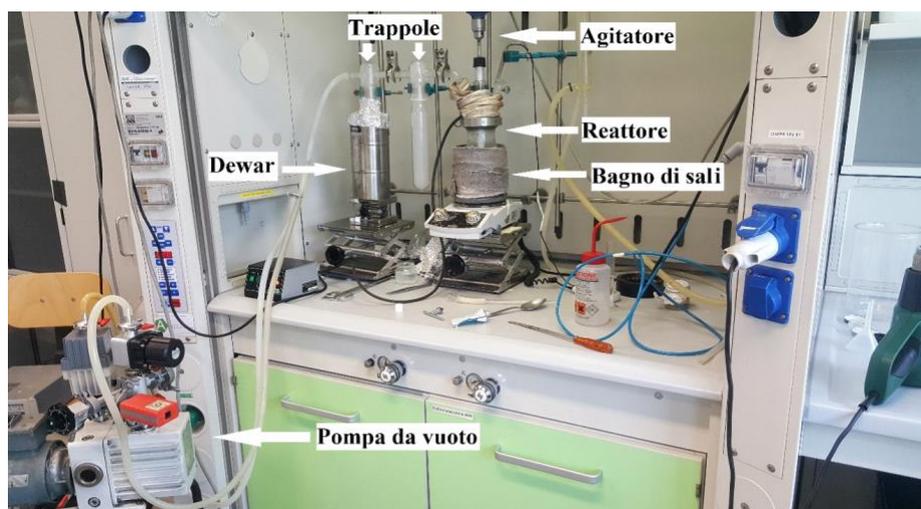


Figura 3.3 Schema dell'apparecchiatura per la polimerizzazione.

### 3.1.2 Sintesi di P(BSBPripol)-OH e P(BSNS)-OH

I due copolimeri idrossil-terminati sono stati sintetizzati tramite policondensazione in massa a due stadi, utilizzando come reagenti di partenza dimetil succinato (DMS), 1,4-butandiolo (BD) e, in un caso, Pripol 1009 (Figura 3.4), un diacido commerciale prodotto da CRODA, mentre per il secondo copolimero è stato utilizzato neopentil glicole (NG) (Figura 3.5). DMS e Pripol 1009 in un caso e BD e NG nell'altro, sono stati aggiunti al sistema di reazione in quantità tale da avere una composizione equimolare di DMS e Pripol 1009 e di BD e NG.

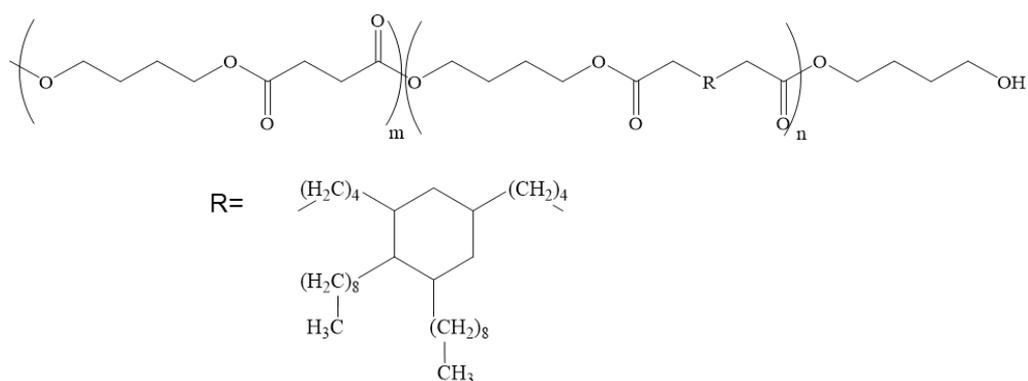


Figura 3.4 Struttura chimica del P(BSBPripol)-OH.

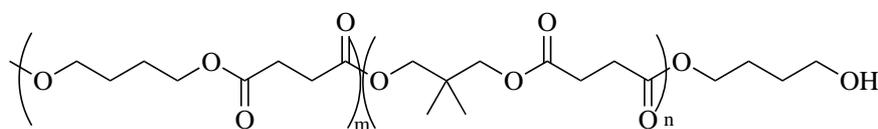


Figura 3.5 Struttura chimica del P(BSNS)-OH.

Anche in questo caso si è lavorato con un eccesso del 70% di BD o miscela BD/NG per assicurare la formazione preferenziale di terminali idrossilici, utilizzando il TBT come catalizzatore. Il processo di sintesi e le condizioni di reazione sono le stesse utilizzate per l'omopolimero PBS-OH. Il P(BSBPripol)-OH è risultato essere un materiale di colore giallo chiaro e di consistenza gommosa, mentre il P(BSNS)-OH un materiale più scuro e più rigido, anche se comunque più flessibile rispetto all'omopolimero di riferimento.

### 3.1.3 Purificazione dei polimeri a basso peso molecolare

I polimeri idrossil-terminati sono stati purificati per eliminare eventuali residui monomerici e prodotti indesiderati. Ciascun polimero allo stato solido è stato sciolto nella minima quantità di cloroformio necessaria per avere la completa solubilizzazione del materiale: per velocizzare tale processo, il sistema è stato mantenuto in agitazione. La soluzione è stata poi fatta

sgocciolare in un becher contenente un largo eccesso di metanolo, un non solvente: il polimero, a contatto con il metanolo, precipita sul fondo del becher, mentre le impurezze rimangono in soluzione (Figura 3.6). Al termine di tale procedura, il precipitato viene filtrato, al fine di eliminare la miscela di solventi, e lasciato a riposo per qualche giorno, per permettere la completa evaporazione di eventuali metanolo e cloroformio residui.

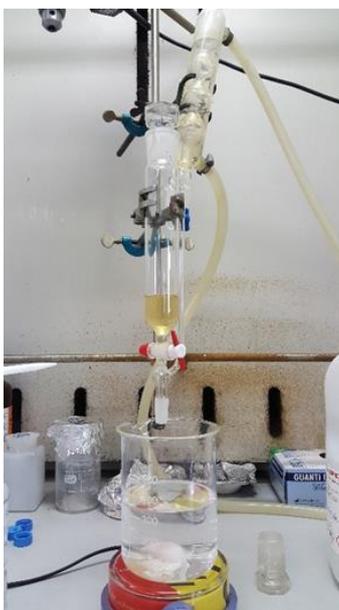


Figura 3.6 Processo di purificazione dei polimeri sintetizzati.

### 3.2 Sintesi dei copolimeri ad alto peso molecolare PBSP(BSBPripol) e PBSP(BSNS)

I copolimeri multiblocco PBSP(BSBPripol) e PBSP(BSNS) sono stati ottenuti mediante reazione di estensione di catena dei polimeri idrossil-terminati precedentemente sintetizzati e purificati, PBS-OH e P(BSBPripol)-OH in un caso, e PBS-OH e P(BSNS)-OH nell'altro, in un rapporto in peso 30:70, usando l'esametilenediisocianato (HDI) come estensore di catena (Figura 3.7).

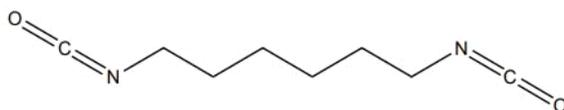


Figura 3.7 Struttura dell'esametilenediisocianato (HDI).

La reazione è stata eseguita in un reattore da 200 mL, all'interno del quale sono stati caricati 2,14 g di PBS-OH e 5 g di P(BSBPripol)-OH in un caso, e 2,33 g di PBS-OH e 5,45 g di P(BSNS)-OH nell'altro. La temperatura è stata portata a 160°C per favorire la fusione dei prepolimeri; contemporaneamente, la pressione è stata ridotta fino a 0,1 mbar e mantenuta per

10 min per favorire l'eliminazione delle molecole residue dei solventi usati per la purificazione. Successivamente, ristabilita la pressione atmosferica, è stata aggiunta una quantità equimolare, rispetto ai gruppi ossidrilici dei due prepolimeri, di HDI (140 $\mu$ L e 180  $\mu$ L rispettivamente). La reazione tra i gruppi -OH e l'esametilendiisocianato, con conseguente formazione di legami uretanici, ha portato ad un aumento istantaneo della viscosità della massa polimerica all'interno del reattore. Tale effetto è da imputarsi all'aumento del peso molecolare dovuto all'unione dei blocchi PBS-P(BSBPripol) e PBS-P(BSNS). Il processo di estensione di catena è durato circa 10 min. I polimeri ottenuti sono stati purificati seguendo la stessa procedura utilizzata per i prepolimeri OH-terminati.

### **3.3 Sintesi del copolimero PBSP(BPripol) statistico**

Il copolimero statistico PBSP(BSPripol) è stato ottenuto tramite policondensazione in massa a due stadi, utilizzando come reagenti di partenza dimetil succinato (DMS), 1,4-butandiolo (BD) e Pripol 1009. In questo caso si è lavorato con un eccesso del 30% di BD, utilizzando il TBT come catalizzatore. Il processo di sintesi e le condizioni di reazione del primo stadio sono le stesse utilizzate per l'omopolimero PBS-OH, mentre per il secondo stadio, la temperatura è stata innalzata di 10°C e la pressione ridotta ogni ora fino a raggiungere 0,09 mbar. 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:PBripol. Il copolimero P(BSBPripol) è risultato essere un materiale trasparente ed elastico.

### **3.4 Caratterizzazione molecolare**

#### **3.4.1 Risonanza magnetica nucleare (NMR)**

La spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare è una tecnica analitica strumentale utilizzata per determinare la struttura molecolare dei materiali. Viene sfruttato il principio secondo cui i nuclei di alcuni elementi, caratterizzati da spin non intero, quando sottoposti ad un campo magnetico esterno  $B_0$ , intenso e stazionario, si orientano nella stessa direzione di tale campo, a causa dell'azione di una coppia di forze; in questo caso i nuclei, ruotando, danno origine ad un campo magnetico elementare. Le possibili orientazioni che il nucleo può avere in un campo magnetico sono governate dal numero quantico  $m$ , che può assumere valori da  $-I$  a  $+I$ , dove  $I$  è il numero quantico di spin nucleare; gli incrementi sono di una unità, quindi sono ammessi  $2I+1$  valori diversi. Per quanto riguarda i nuclei maggiormente utilizzati, come  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , che presentano spin pari a  $1/2$ , gli orientamenti permessi risultano due, uno parallelo al campo (bassa

energia), con  $m = +1/2$ , e uno antiparallelo (alta energia), con  $m = -1/2$ . Inoltre, il momento magnetico nucleare  $\mu$ , in seguito all'allineamento del nucleo, non rimane fermo, ma continua ad oscillare attorno alla direzione di  $B_0$ , compiendo un moto di precessione (Figura 3.8).

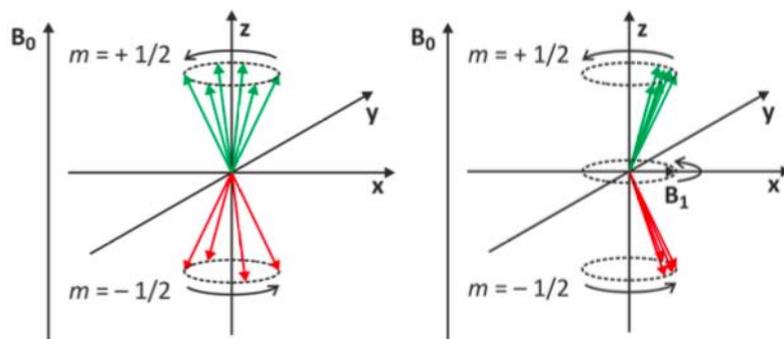


Figura 3.8 Possibili orientamenti dei nuclei in presenza di campo magnetico esterno.

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, data dalla formula:

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

dove  $\gamma$  è il rapporto giromagnetico, il cui valore dipende dal tipo di nucleo in esame. All'aumentare dell'intensità del campo magnetico applicato  $B_0$ , aumenta quindi la differenza di energia tra i due livelli. Tale differenza risulta essere molto piccola, dell'ordine di qualche kcal/mol, di conseguenza la popolazione di nuclei nei due stati è praticamente identica, con una leggerissima prevalenza per lo stato a bassa energia. Tuttavia, grazie a questo piccolo numero di nuclei in eccesso allineati con il campo magnetico  $B_0$  è possibile estrarre il segnale NMR, dal momento che la risultante di tutti i momenti magnetici nucleari risulta diversa da zero ed esprimibile mediante un vettore di debole intensità, allineato con il campo magnetico primario  $B_0$  (Figura 3.9).

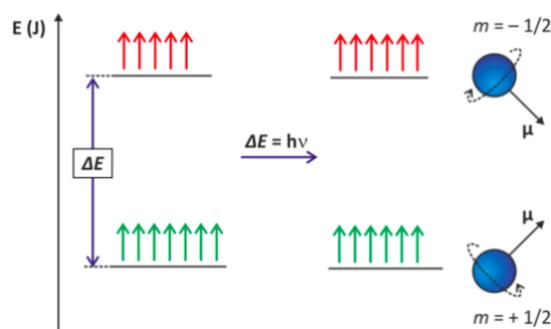


Figura 3.9 Energia ed orientamento dei nuclei con campo magnetico esterno.

Se il campione viene irradiato con una radiazione elettromagnetica di frequenza uguale alla frequenza di Larmor dei nuclei in esame, l'energia della radiazione può essere trasferita a tali nuclei. Di conseguenza, ogni assorbimento di radiazione comporta un cambiamento di orientazione dello spin nucleare, da allineato con il campo ad opposto al campo. Quando si verifica questa transizione di spin, si dice che i nuclei sono in risonanza con la radiazione applicata: da qui il nome di risonanza magnetica nucleare. Il passaggio, da parte di un nucleo, da un'orientazione all'altra, è possibile tramite l'assorbimento di una quantità di energia pari a:

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

dove  $h$  è la costante di Planck e  $\nu$  è la frequenza della radiazione elettromagnetica assorbita. Nei moderni strumenti FT-NMR il segnale NMR viene generato con il metodo ad impulso e acquisito sfruttando la trasformata di Fourier: tutti i nuclei di una specie vengono eccitati contemporaneamente da un impulso a radiofrequenza che contiene tutto l'intervallo di frequenze necessario; i dati vengono poi elaborati da un software mediante l'utilizzo della trasformata di Fourier. Quando si interrompe l'impulso della radiazione elettromagnetica, i nuclei eccitati continuano ad emettere per qualche istante un debole segnale a radiofrequenza che nel tempo tende a spegnersi, come una sorta di eco del segnale assorbito. Per registrare questo segnale entra in funzione un circuito ricevente. Il segnale raccolto oscilla dunque con una frequenza pari alla frequenza di Larmor del nucleo in esame, e prende il nome di FID (*free induction decay*).

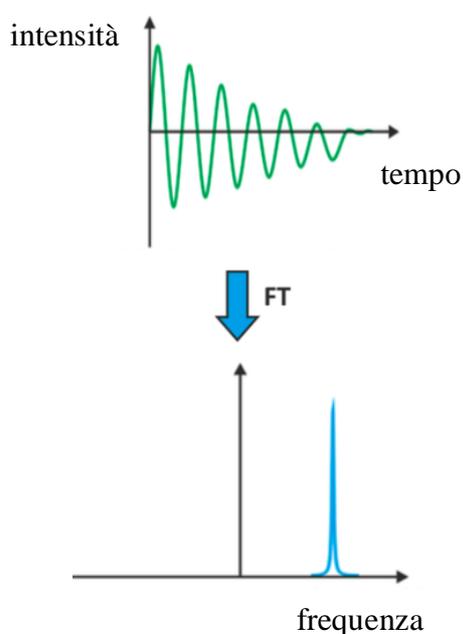


Figura 3.10 Esempio di grafico FID e relativo spettro NMR per nuclei di idrogeno.

Nel grafico FID la frequenza d'oscillazione è facilmente individuabile misurando la lunghezza d'onda  $\lambda$  e tenendo presente che essa risulta l'inverso della frequenza ( $\nu = 1/\lambda$ ). A partire da questo grafico in funzione del tempo, il FID, si ottiene un nuovo grafico in funzione delle frequenze, chiamato spettro NMR (Figura 3.10). È possibile rilevare alcune lievi variazioni del segnale NMR di un certo nucleo, il quale risulta spostato nello spettro a frequenze più o meno alte a seconda del suo intorno chimico. 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; 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  $\delta$ , misurato in ppm [Hz/MHz], e definito dall'equazione:

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

dove  $\nu_r$  è la frequenza di risonanza del tetrametilesano (TMS), il nucleo di riferimento, e  $\nu$  è la frequenza di risonanza del campione considerato. Tipicamente, per il nucleo dell'atomo  $^1\text{H}$  e per molte molecole organiche,  $\delta$  è compreso nell'intervallo tra 0 e 10 ppm, mentre per  $^{13}\text{C}$ -NMR  $\delta$  si estende all'interno dell'intervallo 0-220 ppm. In uno spettro  $^1\text{H}$ -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.

Nel presente lavoro di tesi, la spettroscopia  $^1\text{H}$ -NMR è stata impiegata per appurare la struttura chimica dei materiali sintetizzati e la composizione effettiva dei copolimeri. 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%). Gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  sono stati acquisiti a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) con concentrazione dei polimeri pari al 0,5 wt%, con tempo di rilassamento pari a 0 secondi e tempo di acquisizione di 2 secondi per 100 ripetizioni.

### 3.4.2 Cromatografia a permeazione su gel (GPC)

La cromatografia a 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 è basato sulla creazione di curve di taratura attraverso standard polimerici a peso noto e su un successivo confronto tra queste ed i segnali provenienti dai campioni. La strumentazione (Figura 3.11) è costituita da una pompa volumetrica, una colonna riempita di particelle porose (polistirene reticolato con divinilbenzene a granulometria differente, impaccato in modo tale da generare una porosità controllata) ed un rivelatore. Durante la scansione in colonna viene fatto circolare un solvente con portata volumetrica costante.

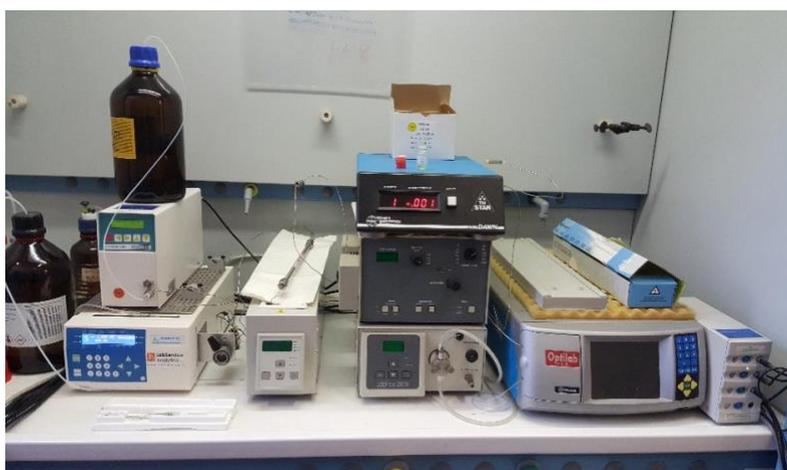


Figura 3.11 Strumentazione GPC.

I campioni da analizzare vengono sciolti nello stesso solvente circolante in colonna, nel caso in esame cloroformio, filtrati per mezzo di un'apposita siringa, al fine di eliminare eventuali particelle non solubili che potrebbero ostruire i pori, e quindi iniettati. Gli analiti, una volta iniettati, permeano le porosità della colonna a seconda del loro volume idrodinamico, generalmente correlato al peso molecolare. Il tempo di ritenzione varia a seconda della frazione di porosità permeata: molecole di piccolo peso molecolare riescono a permeare tutta la porosità con tempi di ritenzione più lunghi, molecole di grandi dimensioni sono invece escluse dalla porosità, e vengono di conseguenza eluite a bassi tempi di ritenzione, mentre molecole

intermedie possono permeare solo parte della porosità, con tempi di ritenzione intermedi. Il detector è generalmente a indice di rifrazione o UV-Vis. La soluzione in uscita dalla colonna viene analizzata da un sensore che fornisce, istante per istante, un segnale di intensità proporzionale alla concentrazione del soluto. Il risultato dell'analisi è un grafico relativo all'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 i campioni standard di 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 5µm 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 (polinomiale del terzo ordine) sono stati impiegati vari standard di polistirene con peso molecolare variabile tra 2000 e 100000. Il software associato al cromatografo calcola automaticamente, in base alla distribuzione ottenuta, il peso molecolare medio numerico e l'indice di polidispersità del campione.

### **3.5 Realizzazione di film**

La preparazione di film sottili è stata effettuata tramite pressofusione, utilizzando una pressa con piastre in alluminio (Figura 3.12). Per avere un film delle dimensioni di 10x10 cm sono stati utilizzati circa 2 grammi di materiale, inserito 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.

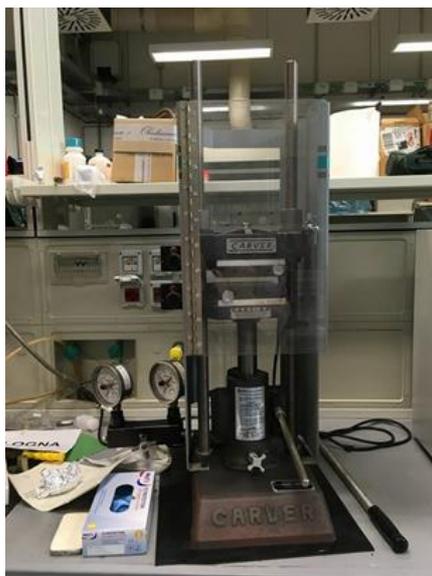


Figura 3.12 Pressa utilizzata per la preparazione di film sottili.

### 3.6 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 ( $\pm 30$  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, ed un collettore metallico in acciaio inossidabile, collegato a terra (Figura 3.13).



Figura 3.13 Strumentazione per elettrofilatura.

La preparazione di ciascun tappetino 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.

### **3.7 Caratterizzazione termica**

#### **3.7.1 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)**

La calorimetria differenziale a scansione (*differential scanning calorimetry*), o DSC, è una tecnica che consente di studiare le transizioni termiche dei materiali e determinarne le proprietà termodinamiche, come la temperatura ed il flusso di calore associati alla transizione vetrosa, alla fusione ed alla cristallizzazione. Il principio su cui si basa tale tecnica consiste nel riscaldare o raffreddare il materiale in modo controllato, in particolare misurando la differenza di flusso termico tra il campione in esame e uno di riferimento, mentre i due sono vincolati ad una temperatura variabile, definita da un programma prestabilito.

La strumentazione (Figura 3.14) è costituita da due piatti dedicati all'alloggiamento di due capsule in alluminio: una contiene il campione (6-8 mg), mentre l'altra capsula contiene il riferimento (nel caso in esame una capsula vuota). Le due celle calorimetriche costituiscono dei microcalorimetri, mantenuti in atmosfera inerte di azoto per tutta la durata delle misure. Queste sono sottoposte allo stesso programma termico: in assenza di transizioni di fase, campione e riferimento si mantengono alla stessa temperatura; al contrario, in caso di variazioni di fase, che avvengono nel materiale al variare della temperatura, il crogiolo contenente il campione si troverà ad una temperatura diversa rispetto al riferimento, perciò al microcalorimetro contenente il riferimento viene fornita energia sufficiente per riportare campione e riferimento alla stessa temperatura. Il computer interfacciato allo strumento permette di impostare il programma e di rilevare ed elaborare i dati.

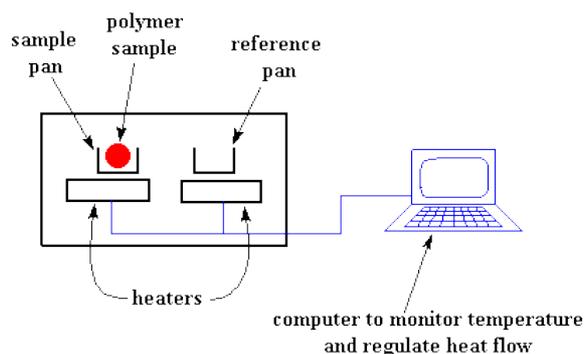


Figura 3.14 Strumentazione DSC.

La temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) è una temperatura caratteristica dei solidi polimerici, che individua il passaggio dallo stato rigido-vetroso ad uno viscoso o gommoso, in corrispondenza del quale risultano possibili movimenti di rotazione della catena polimerica. Tale passaggio di stato non avviene in maniera netta, ma si manifesta come una variazione endoterma della linea di base; il valore di  $T_g$  è determinato in corrispondenza della metà della variazione di calore specifico associata alla transizione. L'entità della variazione di calore specifico associato alla transizione vetrosa ( $\Delta C_p$ ), proporzionale alla componente amorfa presente nel materiale, è pari alla distanza verticale tra le linee di base estrapolate alla  $T_g$ , secondo la seguente formula:

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

dove  $(dT/dt)$  rappresenta la velocità di scansione.

La temperatura di fusione ( $T_m$ ) costituisce una transizione termodinamica di primo ordine, alla quale si verifica il passaggio da stato solido a stato fuso; nel tracciato DSC si presenta come un picco endotermico. Il valore della  $T_m$  si riferisce all'ascissa del picco, mentre l'area sottesa ad esso corrisponde al calore di fusione  $\Delta H_m$  [J/g], proporzionale alla cristallinità del polimero; il rapporto tra quest'ultima grandezza ed il calore di fusione del polimero completamente cristallino costituisce il grado di cristallinità del materiale.

Se, infine, il polimero tende a formare delle strutture cristalline ordinate, si verifica una cessione di calore da parte del materiale ( $\lambda$  cristallizzazione), che si evidenzia come una diminuzione del flusso di calore (Figura 3.15).

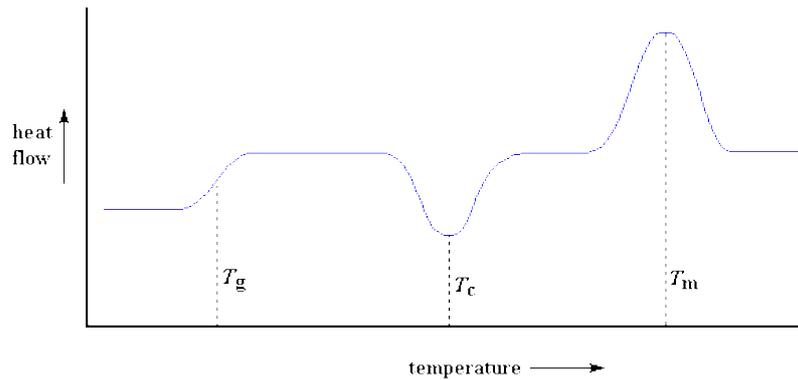


Figura 3.15 Esempio di curva DSC.

Le misure DSC sono state ottenute con un DCS6 Perkin-Elmer equipaggiato di accessori per il raffreddamento a temperature minori di  $0^{\circ}\text{C}$  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  $-70^{\circ}\text{C}$  a  $180^{\circ}\text{C}$  a velocità di  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , mantenimento a  $180^{\circ}\text{C}$  per 4 minuti.
- Raffreddamento rapido (velocità di  $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) fino a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- Seconda scansione: riscaldamento in condizioni di temperatura e velocità analoghe alla prima scansione.

### 3.7.2 Analisi termogravimetrica (TGA)

Con il termine termogravimetria si intende un'analisi tramite cui è possibile registrare il peso di una sostanza mentre essa è soggetta ad un riscaldamento controllato in atmosfera di gas di diverso tipo ( $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ , aria). Tale tecnica permette di ottenere informazioni sia sulla cinetica del processo di decomposizione sia sulla stabilità termica del materiale oggetto di studio. Queste informazioni risultano di fondamentale importanza per definire il valore di temperatura che non deve essere oltrepassato durante il trattamento del polimero, per non incorrere nella sua degradazione. La variazione di peso che si verifica durante la scansione in temperatura è dovuta alla perdita di sostanze volatili in seguito a processi fisici o chimici che modificano la natura del materiale.

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

Il termogramma in uscita, detto anche curva termogravimetrica o curva di decomposizione termica, riporta la variazione percentuale di peso all'aumentare della temperatura (Figura 3.16).

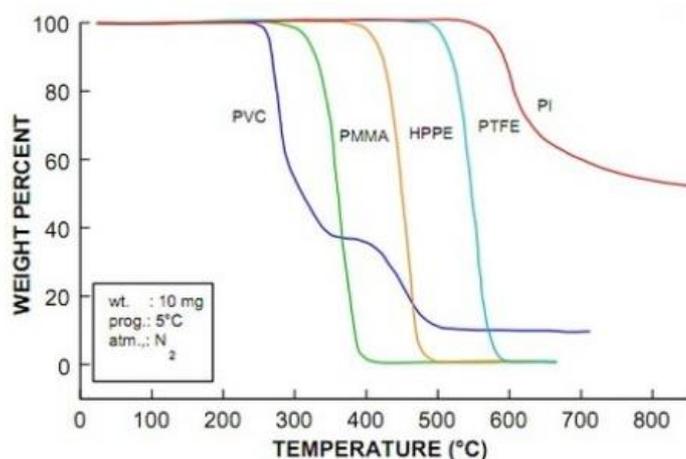


Figura 3.16 Esempio di termogramma di alcuni polimeri in atmosfera di azoto.

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 ( $T_{max}$ ).

### 3.8 Analisi diffrattometrica a Raggi X

L'analisi diffrattometrica a Raggi X è una tecnica utilizzata per individuare i parametri strutturali e molecolari dei materiali e per determinarne sia il grado di cristallinità che la fase cristallina presente. In particolare, si tratta di un'analisi non distruttiva che consente di determinare in maniera non ambigua la struttura del materiale in esame, corrispondente alla conformazione di minima energia; essa permette anche di comprendere funzioni e meccanismi molecolari, quali dinamica in stato solido, tipo di legame chimico (semplice o multiplo) e distanza di legame, transizioni di fase, polimorfismo e possibili arrangiamenti spaziali, studiando gli effetti dell'interazione tra un fascio di Raggi X e la materia cristallina. L'analisi viene condotta mediante un diffrattometro, che emette una radiazione indirizzata verso il cristallo, dove si diffonde in tutte le direzioni grazie al contributo degli elettroni. 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  $\lambda$  e misurando l'angolo di incidenza  $\theta$  (Figura 3.17). La geometria del fenomeno comporta che

la differenza di cammino tra raggi riflessi da due piani sia  $2d\sin\theta$ : solo quando questa differenza è pari ad un numero intero di lunghezze d'onda  $\lambda$  si osserva un'interferenza costruttiva. Nella formula,  $d$  rappresenta la distanza tra i piani in esame ed  $n$  l'ordine della riflessione.

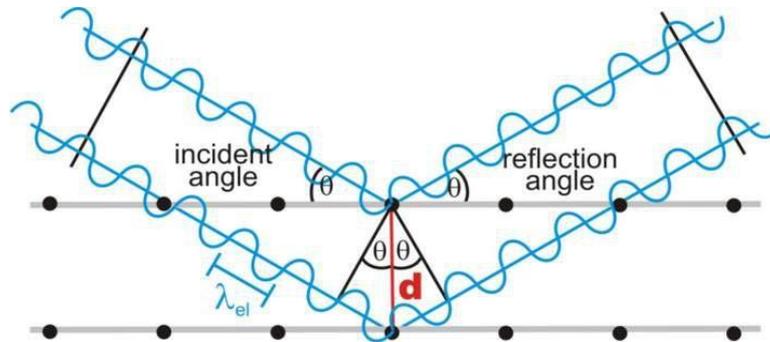


Figura 3.17 Legge di Bragg.

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  $2\theta$  da  $5$  a  $60^\circ$  con passo di  $0,1^\circ$ , e tempo di conteggio pari a 100 secondi per punto. Gli indici di cristallinità  $\chi_c$  sono stati calcolati in base ai diagrammi di diffrazione (Figura 3.18), 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.

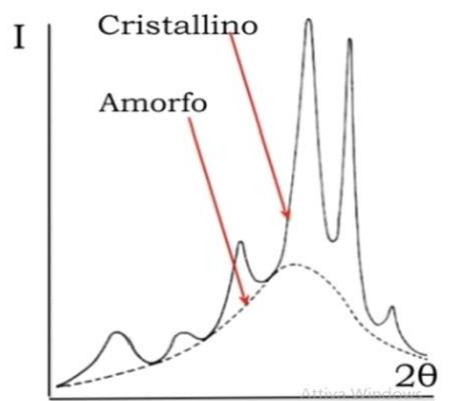


Figura 3.18 Esempio di diffrattogramma di un polimero semicristallino.

### 3.9 Caratterizzazione meccanica

Le misure di resistenza meccanica permettono di studiare il comportamento dei materiali polimerici in presenza di sollecitazioni meccaniche di diverso tipo. Per quanto riguarda le prove tensili, nelle quali il provino viene sottoposto a trazione, si possono definire due diversi valori:

- *Stress* (tensione  $\sigma$ ): rapporto tra il carico applicato in direzione normale  $N$  e l'area della sezione del provino resistente a riposo,  $A$ :

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

- *Strain* (deformazione,  $\varepsilon$ ): indica l'allungamento del provino  $\Delta l$  rapportato alla lunghezza iniziale  $l$ :

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

Durante la prova viene misurato il valore dell'allungamento in funzione del carico applicato; i risultati vengono importati su un diagramma che presenta in ascissa  $\varepsilon$  ed in ordinata  $\sigma$ , al fine di tracciare la curva sforzo-deformazione, caratteristica del materiale. Un tipico andamento nel caso di materiali polimerici è mostrato in Figura 3.19.

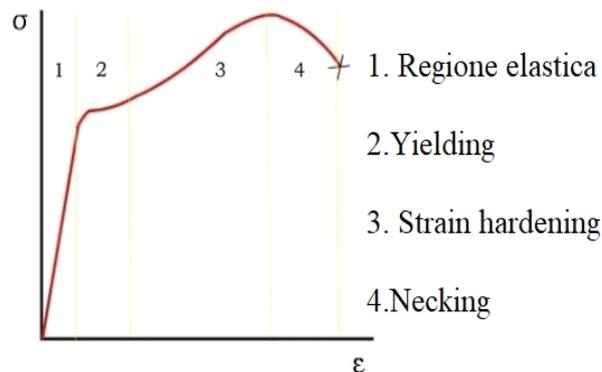


Figura 3.19 Esempio di curva sforzo-deformazione per materiali duttili.

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. In corrispondenza di carichi contenuti all'interno di questo primo tratto, il materiale presenta

allungamenti elastici, cioè reversibili una volta che il carico viene rimosso. All'aumentare della deformazione si entra nella regione plastica, in cui la deformazione subita dal materiale è permanente e irreversibile anche a seguito della rimozione del carico; il punto nel quale avviene il passaggio tra le due regioni è detto di snervamento (*yielding*) ed è causato dallo scorrimento dei piani reticolari all'interno del materiale. Successivamente si riscontra la zona di *strain hardening* in cui sia l'allungamento che la tensione crescono, fino a raggiungere un apice corrispondente alla tensione di rottura. Il campo plastico viene completato dall'ultimo tratto, il *necking*, in cui tipicamente la tensione diminuisce ma la deformazione continua e si rende più marcata in un punto particolare del provino. L'ultimo punto della curva è detto punto di rottura. Questa descrizione è applicabile ai soli materiali duttili, poiché i materiali fragili sono caratterizzati da un unico tratto rettilineo, che termina nel punto di rottura.

Dall'area sottesa all'intera curva è possibile ricavare la tenacità, che è una misura dell'energia necessaria per rompere il materiale. È importante sottolineare che i dati ottenuti risentono delle condizioni ambientali, quali temperatura e umidità, e delle condizioni sperimentali, come velocità di scorrimento, forma e dimensioni dei provini.

Le prove meccaniche sono state condotte utilizzando un dinamometro Instron 4465 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 dunque fissati per mezzo di agganci, 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 struttura 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.

### **3.10 Microscopia elettronica a scansione (SEM)**

La microscopia elettronica a scansione (SEM) è una tecnica analitica che permette di esaminare la morfologia superficiale di un campione. Un fascio di elettroni, emesso da una sorgente

mobile, viene fatto collimare da un sistema di lenti verso il campione; l'interazione tra il fascio di elettroni e la superficie del campione in esame dà luogo a numerosi fenomeni tra i quali l'emissione di elettroni secondari, di elettroni retrodiffusi, di Raggi X e di radiazione UV-visibile. Tali fenomeni forniscono informazioni sulla topologia superficiale, sulla composizione e sulle proprietà elettroniche del materiale. L'immagine della superficie si ottiene attraverso l'elaborazione del segnale fornito dagli elettroni secondari in uscita dal campione (Figura 3.20). La peculiarità dei microscopi elettronici rispetto a quelli ottici è l'utilizzo di radiazioni provenienti non da fotoni luminosi, bensì da elettroni, caratterizzati da una lunghezza d'onda minore. In questo modo si possono ottenere immagini con risoluzione più alta e dettagli dalle dimensioni anche inferiori al nanometro.

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 con un software di acquisizione e analisi di immagine (EDAX Genesis).

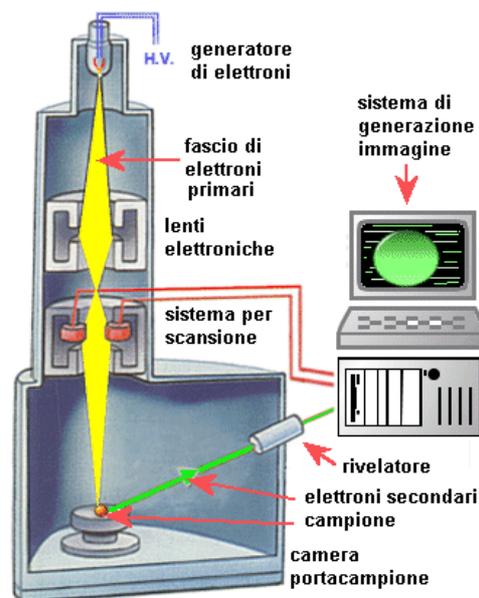


Figura 3.20 Struttura del SEM.

### 3.11 Studi di degradazione idrolitica

Le prove di degradazione idrolitica permettono di testare il comportamento dei polimeri, in particolare la loro velocità di degradazione, in condizioni che simulano l'ambiente corporeo. Gli esperimenti di degradazione idrolitica sono stati condotti, in condizioni di temperatura e pH fisiologici (37°C e pH 7,4), su campioni di film e *scaffold* dal peso di circa 40 mg. Questi sono stati inseriti in provette contenenti 5 mL di soluzione acquosa tamponata a pH 7,4 con tampone fosfato. Essi 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 seguendo la procedura di seguito riportata: in 800 mL di acqua distillata sono stati disciolti 8 g di NaCl, 0,2 g di KCl, 1,44 g di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,24 g di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 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 state preparati e mantenuti in incubazione 14 provini per ciascun copolimero. Al fine di analizzare le conseguenze legate al processo degradativo, sono stati effettuati 5 prelievi, uno ogni 21 giorni, in duplicato: i campioni sono stati rimossi dalla soluzione, lavati con acqua distillata per eliminare i sali della soluzione tampone, asciugati con carta assorbente ed 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 analisi NMR, DSC e diffrattometrica a Raggi X.

## CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Caratterizzazione molecolare dei polimeri idrossil-terminati PBS-OH, P(BSBPripol)-OH, P(BSNS)-OH e dei copolimeri PBSP(BSBPripol), PBSP(BSNS) e PBSP(BPripol)

Nella Tabella 4.1 e 4.2 sono riportati i dati della caratterizzazione molecolare dei polimeri idrossil-terminati PBS-OH, P(BSBPripol)-OH, P(BSNS)-OH e dei copolimeri PBSP(BSBPripol), PBSP(BSNS) e PBSP(BPripol), ottenuti da analisi <sup>1</sup>H-NMR.

	M <sub>n</sub> (g/mol)	DP	BS (mol%)	BS (wt%)
PBS-OH	9700	55,6	100	100
P(BSBPripol)-OH	25800	63,6	52	22
P(BSNS)-OH	8000	44,0	45	43

Tabella 4.1. Caratterizzazione molecolare di PBS-OH, P(BSBPripol)-OH e P(BSNS)-OH.

	M <sub>n</sub> (g/mol)	PD	PBS <sub>blocco</sub> (mol%)	PBS <sub>blocco</sub> (wt%)
PBSP(BSBPripol)	67000	2,2	45	26
PBSP(BSNS)	36000	2,5	29	28
PBSP(BPripol)	39000	2,4	60	28

Tabella 4.2. Caratterizzazione molecolare di PBSP(BSBPripol), PBSP(BSNS) e PBSP(BPripol).

In Figura 4.1 (a, b e c), 4.2 (a e b) e 4.3 sono riportati gli spettri dei polimeri idrossil-terminati e dei copolimeri con la struttura molecolare corrispondente e la relativa attribuzione dei picchi. Gli spettri ottenuti sono risultati coerenti con la struttura prevista, ciò permette di escludere la presenza di reazioni secondarie durante la polimerizzazione. Gli spettri in Figura 4.1 (a, b e c) mostrano i segnali caratteristici del PBS-OH, P(BSBPripol)-OH e PBSP(BSBPripol). Per quanto riguarda lo spettro del PBS-OH (Figura 4.1 a), a  $\delta$  4,2 ppm e a  $\delta$  1,7 ppm sono registrati i segnali dei protoni metilenici della subunità glicolica, rispettivamente *a* e *b*, mentre a  $\delta$  2,6 ppm si trova il singoletto ascrivibile agli idrogeni della subunità acida, *c*. Oltre ai segnali sopracitati, che sono relativi alle unità ripetitive interne, nello spettro è anche possibile distinguere la presenza di un altro picco, *a'*, dovuto ai protoni metilenici delle subunità glicoliche esterne. Dall'analisi <sup>1</sup>H-NMR è stato possibile calcolare il peso molecolare medio delle catene polimeriche (M<sub>n</sub>), utilizzando la formula:

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

dove  $W_{ur}$  e  $W_{glicole}$  sono rispettivamente il peso molecolare dell'unità ripetitiva e del glicole, e il grado di polimerizzazione (DP). DP viene definito come:

$$DP = \left[ \frac{(I_a)/2}{I_{a'}} \cdot 2 \right] + 1$$

in cui  $I_{a'}$  è l'area sottesa dai segnali dei protoni delle unità glicoliche esterne  $a'$ , mentre  $I_a$  è l'area dei segnali metilenici delle stesse unità interne  $a$ . Il grado di polimerizzazione (quindi il numero di unità ripetitive per catena) e il peso molecolare medio per il PBS-OH, determinati tramite  $^1\text{H-NMR}$ , sono risultati rispettivamente pari a 55,6 e a 9700 g/mol (Tabella 4.1).

Nello spettro  $^1\text{H-NMR}$  del copolimero P(BSBPripol)-OH (Figura 4.1 b), oltre ai picchi delle unità ripetitive BS precedentemente identificate, si hanno dei segnali dovuti ai segmenti BPripol: a  $\delta$  4,2 ppm e a  $\delta$  1,6 ppm troviamo i picchi dei protoni metilenici della subunità glicolica, rispettivamente  $a'$  e  $b'$ ; a  $\delta$  2,3 ppm si trova il singoletto ( $d$ ) ascrivibile agli idrogeni della subunità acida in  $\alpha$  al gruppo carbossilico. A campi più alti ( $1,5 \text{ ppm} < \delta < 0,7 \text{ ppm}$ ) si evidenziano dei picchi dovuti alla subunità R dell'unità acida Pripol, mentre il contributo  $a''$  è dovuto ai protoni metilenici delle subunità glicoliche esterne. Sono stati quindi calcolati i valori di DP e  $M_n$  del P(BSBPripol)-OH, rispettivamente 63,6 e 25800 g/mol (Tabella 4.1). La composizione del copolimero P(BSBPripol)-OH è stata poi determinata analizzando l'area dei picchi dei protoni  $c$  della subunità succinica a  $\delta$  2,6 ppm e l'area del segnale dei metileni  $d$  della subunità Pripol a  $\delta$  2,3 ppm. La percentuale delle due unità ripetitive è risultata essere: BS 52 mol% e BPripol 48 mol% (Tabella 4.1).

Come descritto nella Parte Sperimentale, i due polimeri idrossil-terminati PBS-OH e P(BSBPripol)-OH sono stati copolimerizzati per la realizzazione del copolimero multiblocco PBSP(BSBPripol), tramite reazione di estensione di catena con HDI. Nello spettro  $^1\text{H-NMR}$  del copolimero multiblocco PBSP(BSBPripol) (Figura 4.1 c), oltre ai segnali dovuti ai picchi dei segmenti BS e BPripol, si osservano anche i segnali ascrivibili all'estensore di catena esametilendiisocianato:  $e$ ,  $f$  e  $g$  cadono rispettivamente a  $\delta$  3,1 e  $\delta$  1,1 ppm. L'analisi  $^1\text{H-NMR}$  ha permesso di determinare la composizione del copolimero multiblocco, in particolare del blocco PBS, dall'area del segnale dei metileni  $d$  della subunità Pripol a  $\delta$  2,3 ppm e dall'area dei picchi dei protoni  $c$  della subunità succinica a  $\delta$  2,6 ppm. A quest'ultima è stato sottratto il contributo delle subunità succinato all'interno del blocco P(BSBPripol), calcolato precedentemente. La percentuale dei due blocchi all'interno del copolimero PBSP(BSBPripol) è risultata essere: PBS 45% (corrispondente al 26% in peso) e P(BSBPripol) 55 mol% (corrispondente al 74% in peso), come riportato in Tabella 4.2. Mediante misure GPC è stato

determinato il peso molecolare medio numerico ( $M_n$ ) che è risultato pari a 67000, mentre la polidispersità uguale a 2,2 (Tabella 4.2).

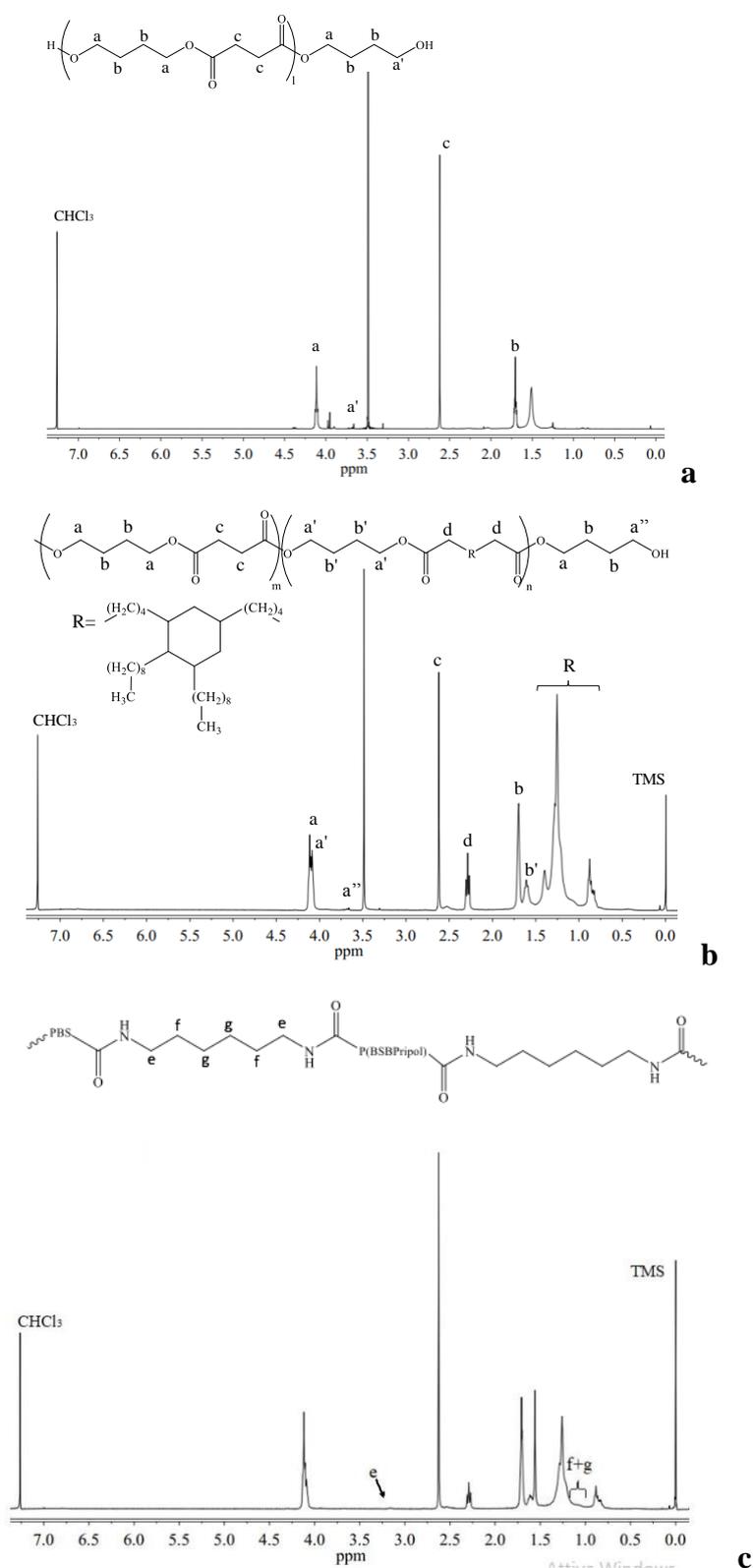


Figura 4.1 Spettri  $^1\text{H-NMR}$  degli omopolimeri PBS-OH (a), del P(BSBPripol)-OH (b) e del copolimero PBSP(BSBPripol) (c), con attribuzione dei picchi.

Gli spettri in Figura 4.2 (a e b) mostrano i segnali caratteristici dell'omopolimero P(BSNS)-OH e del copolimero PBSP(BSNS), ottenuto da PBS-OH e P(BSNS)-OH. Nello spettro del P(BSNS)-OH (Figura 4.1 a), oltre ai picchi delle unità ripetitive BS già identificati nell'analisi del PBS-OH, si hanno dei segnali dovuti ai segmenti NS: a  $\delta$  3,9 ppm e a  $\delta$  0,95 ppm troviamo i picchi dei protoni metilenici della subunità glicolica, rispettivamente *d* ed *e*, a  $\delta$  2,6 ppm si trova il singoletto ascrivibile agli idrogeni della subunità acida, *f*. Sono stati quindi calcolati DP e  $M_n$  del P(BSNS)-OH, rispettivamente 44,0 e 8000 g/mol (Tabella 4.1). Analizzando lo spettro  $^1\text{H-NMR}$ , dall'area dei picchi dei protoni *a* della subunità glicolica BD a  $\delta$  4,1 ppm e dall'area del segnale dei metileni *d* della subunità NS a  $\delta$  3,9 ppm, è stata determinata la composizione del copolimero P(BSNS)-OH. La percentuale delle due unità ripetitive è risultata essere: BS 45 mol% e NS 55 mol% (Tabella 4.1).

Come descritto nella Parte Sperimentale, i due polimeri idrossil-terminati PBS-OH e P(BSNS)-OH sono stati copolimerizzati per la realizzazione del copolimero multiblocco PBSP(BSNS), tramite reazione di estensione di catena con HDI. Nello spettro  $^1\text{H-NMR}$  del copolimero multiblocco PBSP(BSNS) (Figura 4.1 b), oltre ai segnali dovuti ai picchi dei segmenti BS e NS, si osservano anche i segnali ascrivibili all'estensore di catena esametilendiisocianato: *g*, *h* e *i* che cadono rispettivamente a  $\delta$  3,15 e  $\delta$  1,25 ppm.

L'analisi NMR ha permesso di determinare la composizione del copolimero multiblocco dall'area del segnale dei metileni *d* della subunità NS a  $\delta$  3,9 ppm e dall'area dei picchi dei protoni *a* della subunità glicolica BD a  $\delta$  4,1 ppm. A quest'ultima è stato sottratto il contributo delle subunità glicolica BD all'interno del blocco P(BSNS), calcolato precedentemente. La percentuale dei due blocchi all'interno del copolimero PBSP(BSNS), riportata in Tabella 4.2, è risultata essere: PBS 29 mol% (corrispondente al 28% in peso) e P(BSNS) 71 mol% (corrispondente al 72% in peso). Mediante misure GPC è stato determinato il peso molecolare medio numerico ( $M_n$ ) che è risultato pari a 36000, mentre la polidispersità uguale a 2,5 (Tabella 4.2).

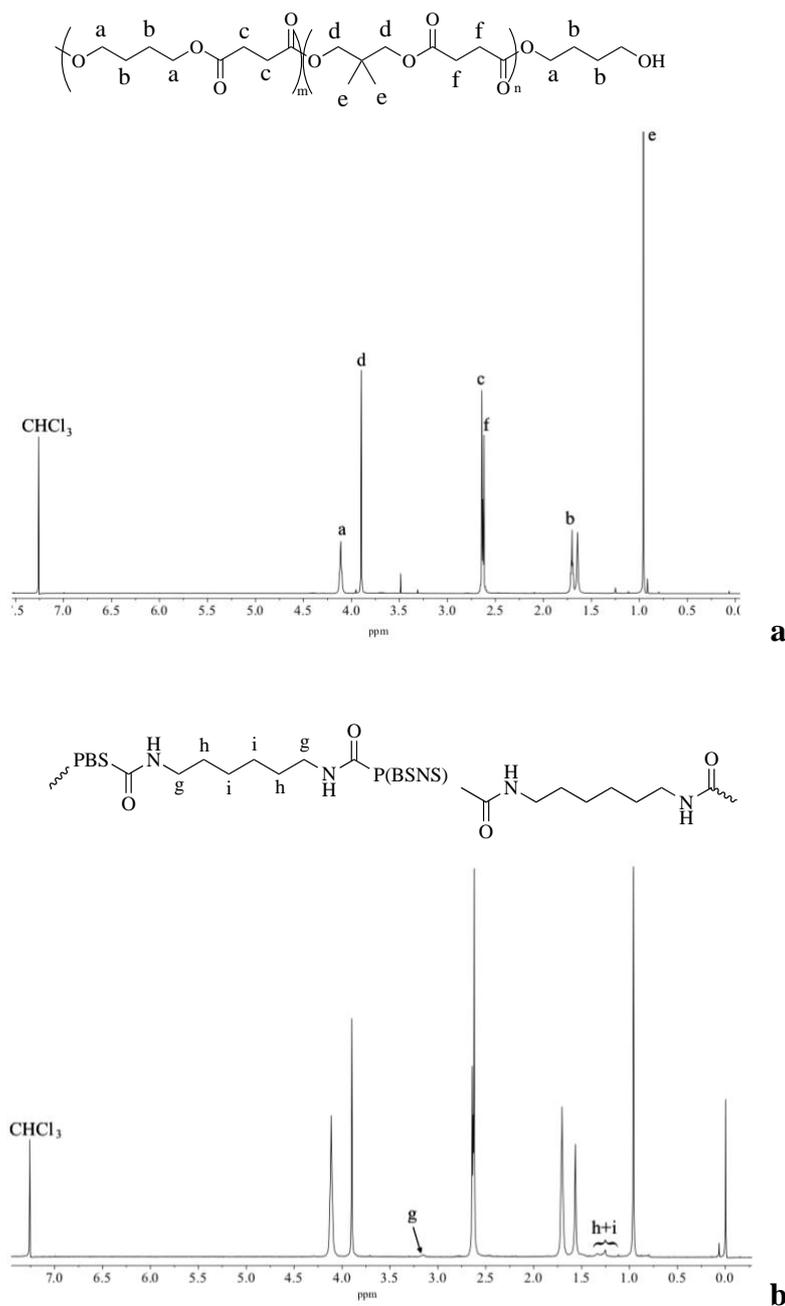


Figura 4.2 Spettri  $^1\text{H-NMR}$  del P(BSNS)-OH (a) e del PBSP(BSNS) (b), con attribuzione dei picchi.

Lo spettro in figura 4.3 mostra i segnali caratteristici del copolimero statistico PBSP(BPripol). Tali segnali mantengono i *chemical shifts* dei picchi appartenenti al PBSP(BSBPripol), ad eccezione di quelli relativi all'estensore di catena HDI (Figura 4.1). L'analisi  $^1\text{H-NMR}$  ha permesso di determinare la composizione del copolimero statistico dall'area del segnale dei metileni *d* della subunità Pripol a  $\delta$  2,3 ppm e dall'area dei picchi dei protoni *c* della subunità succinica a  $\delta$  2,6 ppm. La percentuale di PBS presente nel copolimero è risultata essere pari al 60% (corrispondente al 28% in peso). Mediante misure GPC è stato determinato il peso

molecolare medio numerico ( $M_n$ ) che è risultato pari a 39000, mentre la polidispersità uguale a 2,4.

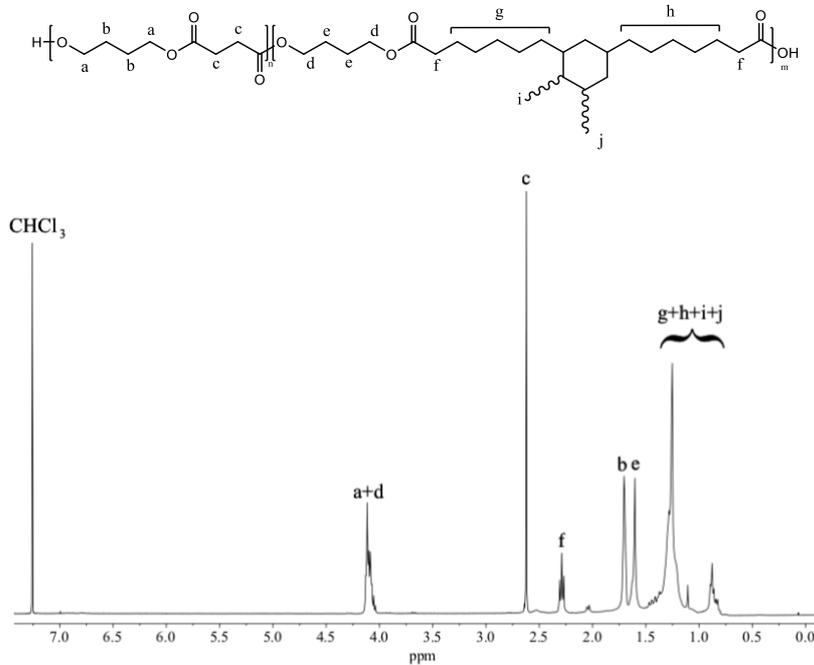


Figura 4.3 Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del PBSP(BPriol), con attribuzione dei picchi.

#### 4.2 Caratterizzazione morfologica degli scaffold

La Figura 4.4 riporta, a titolo di esempio, l'immagine SEM, con ingrandimento 12.00k X, del tappetino elettrofilato del copolimero multiblocco PBSP(BSBPriol), ottenuto tramite elettrofilatura (come riportato nella parte sperimentale).

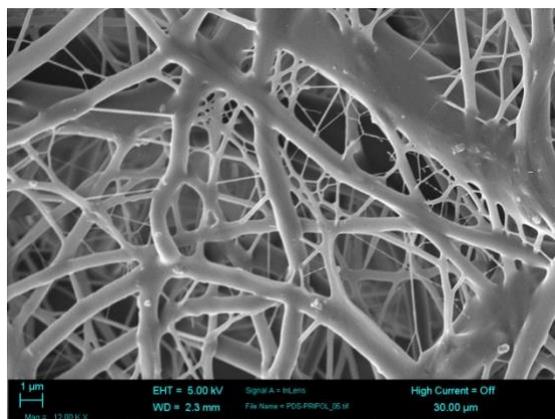


Figura 4.4 Immagine SEM delle fibre del copolimero multiblocco PBSP(BSBPriol).

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. Per quanto riguarda i copolimeri multiblocco, la distribuzione dimensionale delle fibre non è Gaussiana e questo è probabilmente una conseguenza del *jet-splitting*. La dimensione delle nanofibre è compresa tra 100 e 400 nm, mentre le microfibre hanno un diametro che varia da 1 a 10  $\mu\text{m}$  (Figura 4.4). Tali considerazioni possono essere estese a tutti i campioni elettrofilati, analizzati tramite SEM.

### 4.3 Analisi termogravimetrica (TGA)

Attraverso questa analisi è stato possibile valutare la stabilità termica dei campioni in esame. Dal punto di vista tecnologico è fondamentale individuare la temperatura di inizio decomposizione, poiché permette di processare il materiale senza incorrere in problemi legati a processi di degradazione termica. I dati ottenuti dall'analisi termogravimetrica sui polimeri idrossil-terminati e sui copolimeri sono riassunti in Tabella 4.3 e in Tabella 4.4.

	T <sub>onset</sub> (°C)	T <sub>max</sub> (°C)
PBS-OH	376	409
P(BSBPripol)-OH	407	440
P(BSNS)-OH	380	412

Tabella 4.3 Analisi termogravimetrica dei polimeri idrossil-terminati PBS-OH, P(BSBPripol)-OH e P(BSNS)-OH.

	T <sub>onset</sub> (°C)	T <sub>max</sub> (°C)
PBSP(BSBPripol)	386	418
PBSP(BSNS)	378	415
PBSP(BPripol)	391	426

Tabella 4.4 Analisi termogravimetrica dei copolimeri PBSP(BSBPripol), PBSP(BSNS) e PBSP(BPripol).

L'analisi termogravimetrica dimostra un'ottima stabilità termica di tutti i campioni esaminati. In particolare, l'introduzione lungo la catena macromolecolare del PBS delle co-unità determina un incremento della sua stabilità termica, questo effetto è particolarmente evidente in seguito all'introduzione del segmento Pripol. Nel caso del copolimero PBSP(BSNS) la

maggior stabilità termica è probabilmente legata alla presenza dei due gruppi metilici sul C<sub>2</sub> dell'unità glicolica che limita le reazioni di  $\beta$  scission (34), mentre nel caso dei copolimeri contenenti co-unità Pripol l'incremento della stabilità termica è da attribuirsi alla diminuzione, per unità di lunghezza di catena, dei gruppi carbossilici. Si nota, inoltre, che il PBSP(BPripol), statistico, risulta più stabile del corrispondente copolimero a blocchi, PBSP(BSBPripol). Questo effetto può essere attribuito alla maggiore quantità totale (27 mol% nel PBSP(BSBPripol) e 40% nel PBSP(BPripol)) lungo la macromolecola del diacido Pripol, che favorisce la stabilizzazione termica.

Il processo di elettrofilatura non compromette la stabilità termica degli *scaffold*.

#### 4.4 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

Nel caso dei prepolimeri PBS-OH, P(BSBPripol)-OH e P(BSNS)-OH, l'analisi calorimetrica è stata effettuata subito dopo purificazione (Tabella 4.5). Per quanto riguarda invece PBSP(BSBPripol), PBSP(BSNS) e PBSP(BPripol), in forma di film e di *scaffold*, l'analisi è stata eseguita dopo tre settimane di permanenza a temperatura ambiente per uniformare la storia termica pregressa (Tabella 4.6 e Tabella 4.7).

	I SCAN			
	T <sub>g</sub> (°C)	$\Delta C_p$ (J/g·°C)	T <sub>m</sub> (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)
PBS-OH	-29	0,155	119	67
P(BSBPripol)-OH	-52	0,409	36	15
P(BSNS)-OH	-26	0,459	43	16

Tabella 4.5 Dati di caratterizzazione termica dei polimeri idrossil-terminati PBS-OH, P(BSNS)-OH, P(BSBPripol)-OH.

	I SCAN			
	T <sub>g</sub> (°C)	$\Delta C_p$ (J/g·°C)	T <sub>m</sub> (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)
PBSP(BSBPripol)	-50	0,266	40 110	27
PBSP(BSNS)	-27	0,303	43 104	41
PBSP(BPripol)	-50	0,194	42 65	21

Tabella 4.6 Dati di caratterizzazione termica dei copolimeri PBSP(BSBPripol), PBSP(BSNS) e PBSP(BPripol) sotto forma di film.

	I SCAN			
	T <sub>g</sub> (°C)	ΔC <sub>p</sub> (J/g·°C)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J/g)
PBSP(BSBPripol)	-50	0,151	37 109	27
PBSP(BSNS)	-26	0,365	45 102	42
PBSP(BPripol)	-51	0,192	47 64	23

Tabella 4.7 Dati di caratterizzazione termica dei copolimeri PBSP(BSBPripol), PBSP(BSNS) e PBSP(BPripol) sotto forma di *scaffold*.

In Figura 4.5 sono riportate le curve calorimetriche di prima scansione dei blocchetti idrossil-terminati PBS-OH e P(BSBPripol)-OH e il copolimero multiblocco derivante dagli stessi: PBSP(BSBPripol), sotto forma di film e di *scaffold*.

Il tracciato DSC del PBS-OH è tipico di un materiale semicristallino con una variazione endotermica della linea di base intorno a -30°C, associata al fenomeno della transizione vetrosa, seguita da un intenso picco di fusione a temperatura più alta (119°C).

La curva DSC del copolimero idrossil-terminato P(BSBPripol)-OH presenta delle differenze quantitative rispetto a quello dell'omopolimero PBS. La copolimerizzazione, infatti, determina delle variazioni sia in corrispondenza della transizione vetrosa che della fusione. In particolare, la presenza della subunità Pripol lungo la catena di PBS induce un abbassamento della T<sub>g</sub> unitamente ad un aumento del calore associato alla transizione vetro-gomma (ΔC<sub>p</sub> maggiore). Tale risultato è da imputare all'effetto plastificante impartito dai lunghi segmenti alifatici del Pripol. Allo stesso tempo l'introduzione della co-unità provoca una cospicua diminuzione della capacità di cristallizzazione dei segmenti BS, che si traduce in un picco endotermico di fusione multiplo e molto meno intenso dell'omopolimero PBS (ΔH<sub>m</sub> minore) e localizzato a temperatura molto più bassa. La diminuzione della T<sub>m</sub> e del ΔH<sub>m</sub> sono indici della formazione di una minore quantità di cristalli caratterizzati da basso grado di perfezione. La forma a doppio picco dell'endoterma di fusione può essere dovuta a fenomeni di fusione/ricristallizzazione/fusione dei cristalli formati in precedenza che fondono e ricristallizzano in forme più perfette durante la scansione calorimetrica.

La curva di prima scansione corrispondente al PBSP(BSBPripol) sotto forma di film sembra essere la somma dei tracciati DSC dei due prepolimeri. Presenta, infatti, lo step tipico della transizione vetrosa intorno a -50°C e due picchi endotermici nettamente separati: quello a 40°C corrisponde alla fusione dei cristalli del blocco P(BSBPripol) mentre quello a 110°C è imputabile alla fusione dei cristalli del blocco PBS. Tale risultato conferma che la strategia

sintetica messa in campo permette l'ottenimento di un copolimero caratterizzato da due blocchi cristallizzabili le cui  $T_m$  non sono significativamente abbassate dalla copolimerizzazione. Infine, si può affermare che il processo di elettrofilatura non determina dei cambiamenti sostanziali della microstruttura del materiale finale. Le curve DSC del PBSP(BSBPripol) sotto forma di film e di *scaffold*, infatti, risultano essere molto simili. In particolare, il processo di evaporazione del solvente durante la realizzazione dello *scaffold* favorisce la cristallizzazione sia dei segmenti BS corti del blocco P(BSBPripol), che di quelli lunghi del blocco PBS. I valori di  $\Delta H_m$  di entrambi i processi di fusione, infatti, sono confrontabili con quelli del copolimero multiblocco in forma di film.

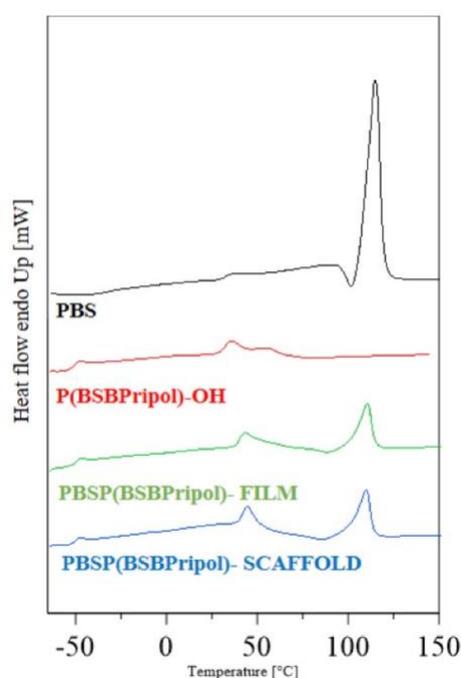


Figura 4.5 Curve DSC del PBS, P(BSBPripol)-OH e del PBSP(BSBPripol) sotto forma di film e di *scaffold*.

In Figura 4.6 sono riportate le curve calorimetriche di prima scansione del PBS, P(BSNS)-OH e PBSP(BSNS) sotto forma di film e di *scaffold*.

Anche nel tracciato DSC del copolimero P(BSNS)-OH si evidenziano delle sostanziali differenze rispetto a quello del PBS: la subunità NS induce un leggero aumento della  $T_g$  e del  $\Delta C_p$ . Tale effetto è dovuto ai due  $-CH_3$  sul  $C_2$  glicolico che determinano una diminuzione della mobilità di catena e al tempo stesso ostacolano il processo di cristallizzazione. Il picco di fusione, infatti, si trova a una temperatura minore ed è meno intenso rispetto a quello del PBS ( $\Delta H_m$  minore). Il picco di fusione più allargato indica la presenza di cristalli meno perfetti.

Per quanto riguarda il copolimero PBSP(BSNS) sotto forma di film la  $T_g$  si assesta intorno a  $-27^\circ\text{C}$  e i due picchi di fusione si trovano a  $43^\circ\text{C}$  e  $104^\circ\text{C}$ : il primo corrisponde alla fusione dei cristalli del blocco P(BSNS) mentre quello a  $104^\circ\text{C}$  è imputabile alla fusione dei cristalli del blocco PBS. Anche in questo caso si può affermare che tramite questa metodologia di sintesi si riesce ad ottenere un copolimero caratterizzato da due blocchi cristallizzabili le cui  $T_m$  non sono significativamente abbassate dalla copolimerizzazione.

Analizzando la curva DSC del copolimero PBSP(BSNS) sotto forma di *scaffold*, si evidenzia come sia simile alla curva sotto forma di film. I valori di  $\Delta H_m$  di entrambi i processi di fusione sono confrontabili con quelli del copolimero multiblocco in forma di film, a prova del fatto che il processo di realizzazione dello *scaffold* favorisce la cristallizzazione dei segmenti BS corti del blocco P(BSNS) e di quelli lunghi del blocco PBS.

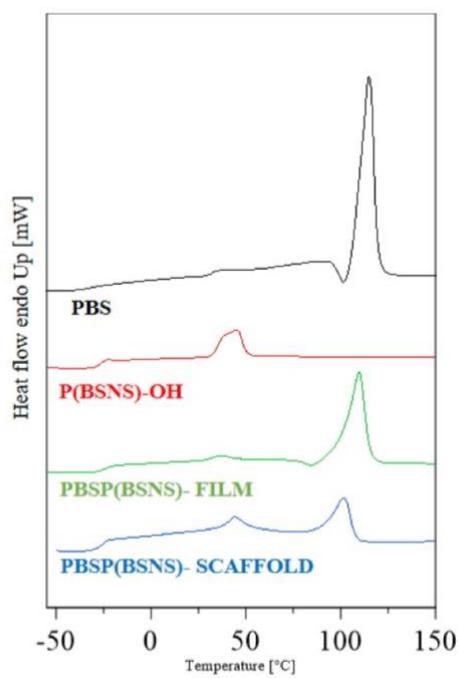


Figura 4.6 Curve DSC del PBS, P(BSNS)-OH e PBSP(BSNS) sotto forma di film e di *scaffold*.

In Figura 4.7 sono riportate le curve calorimetriche di prima scansione del copolimero statistico PBSP(BPripol) sotto forma di film e di *scaffold*.

L'effetto della copolimerizzazione con Pripol evidenzia gli aspetti descritti in precedenza per l'oligomero idrossil-terminato P(BSBPripol)-OH:  $T_g$  minore, innalzamento del  $\Delta C_p$ , picco endotermico di fusione multiplo, molto meno intenso dell'omopolimero ( $\Delta H_m$  minore) e a temperatura molto più bassa.

Si può notare, però, una differenza fra le curve calorimetriche del PBSP(BPripol) e del PBSP(BSBPripol). I due campioni, infatti, differiscono per la strategia sintetica e di conseguenza per la distribuzione delle co-unità: il PBSP(BSBPripol) è un copolimero a blocchi, mentre il PBSP(BPripol) è statistico. Il tracciato DSC di quest'ultimo copolimero mostra due picchi endotermici ravvicinati, a 42°C e a 65°C, diversamente il copolimero a blocchi mostra due picchi di fusione ben distinti a 41°C e a 110°C. Le temperature di fusione risentono, quindi, dell'architettura molecolare, così come il  $\Delta H_m$ . Si può notare, infatti, che l'intrinseca costituzione del copolimero statistico determina un abbattimento della cristallinità di PBS.

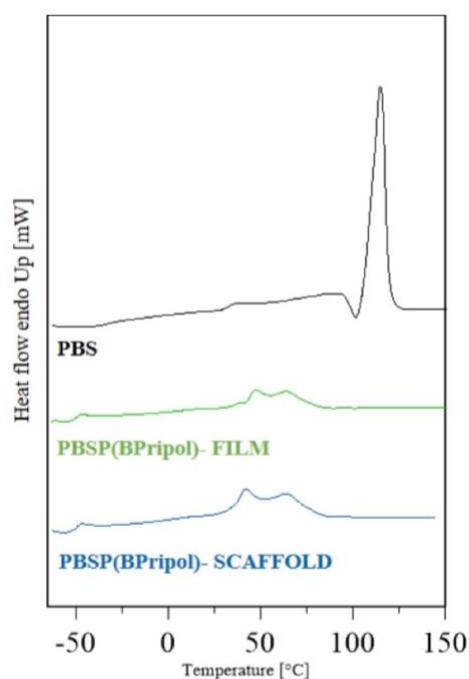


Figura 4.7 Curve DSC del PBS e del PBSP(BPripol) sotto forma di film e di *scaffold*.

#### 4.5 Analisi diffrattometrica a Raggi X

Tutti i polimeri sintetizzati nel presente lavoro di Tesi Magistrale sono stati sottoposti anche ad analisi diffrattometrica volta a determinare il tipo e la quantità di fase cristallina presente.

In Figura 4.8 sono riportati i diffrattogrammi di tutti i polimeri studiati. Come è possibile notare, i campioni analizzati sono dei materiali semicristallini: i diffrattogrammi, infatti, presentano alcuni riflessi dovuti alla componente cristallina del materiale, sovrapposti ad una linea di base a campana dovuta alla porzione amorfa del materiale.

I materiali analizzati, sia sotto forma di film che di *scaffold*, presentano il profilo di diffrazione caratteristico della fase  $\alpha$  del PBS <sup>(35)</sup>. Non si osservano ulteriori riflessi, dunque è presente un'unica fase cristallina, costituita appunto dal PBS. La posizione dei riflessi dei copolimeri

non varia rispetto a quella dell'omopolimero. Questo porta ad ipotizzare la completa esclusione della co-unità nella fase amorfa.

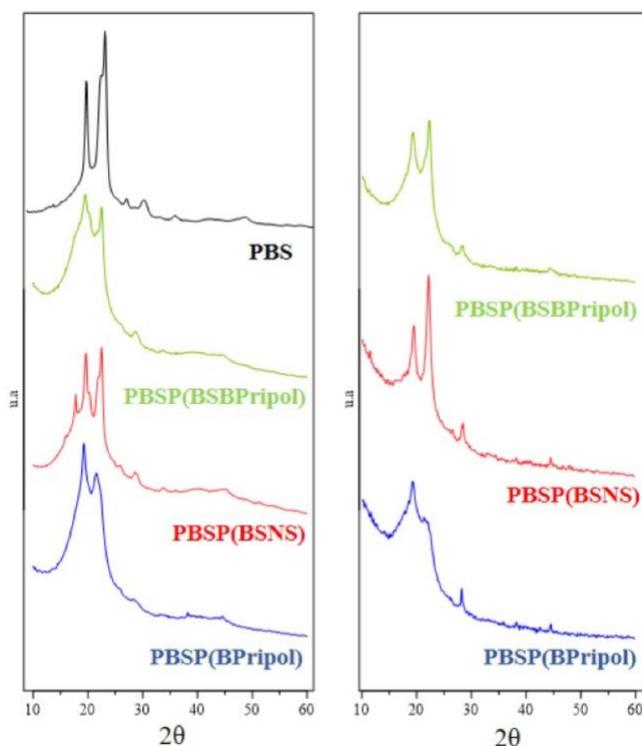


Figura 4.8 Curve diffrattometriche del PBS in forma di film e dei copolimeri PBSP(BSBPripol), PBSP(BSNS) e PBSP(BPripol) sotto forma di film (a sinistra) e *scaffold* (a destra).

Confrontando i diffrattogrammi dei campioni in forma di film, si nota come il PBSP(BSNS) sia il materiale più cristallino tra i copolimeri sintetizzati (Tabella 4.8). Questa evidenza sperimentale non stupisce considerando che per questo copolimero la struttura della co-unità glicolica introdotta (neopentil glicole) è molto più simile alla subunità di riferimento (butandiolo) rispetto ai copolimeri a base di Pripol, in cui la co-unità acida introdotta (Pripol) differisce in modo sostanziale dalla subunità di riferimento (acido succinico). Inoltre, le ramificazioni del neopentilglicole sono corte quindi è plausibile che non disturbino eccessivamente la cristallizzazione del PBS. Al contrario, la struttura chimica del Pripol è maggiormente ingombrante e ostacola in maniera più decisa il processo di cristallizzazione. Infatti, confrontando i diffrattogrammi di questi due copolimeri con lo spettro dell'omopolimero PBS, si osserva una maggiore ampiezza del riflesso. Questo può essere attribuito alla probabile diminuzione della dimensione del dominio cristallino causata dalla presenza della seconda co-unità non cristallizzabile. Considerando invece il rapporto tra i due picchi principali a 19 e 23  $2\theta$  nel PBS, è interessante osservare la variazione della loro intensità

nei tre campioni studiati. Se nell'omopolimero il riflesso a  $23\ 2\theta$  è più intenso di quella a  $19\ 2\theta$ , per il PBSP(BSNS) l'altezza dei due è simile mentre diminuisce progressivamente per il PBSP(BSBPripol) e per il PBSP(BPripol). In quest'ultimo campione le altezze dei due picchi sono visibilmente differenti. Considerando che questo fenomeno va di pari passo con la diminuzione della cristallinità, si può ipotizzare che nel copolimero statistico a base di Pripol vi sia una parziale distorsione del reticolo cristallino.

Per quanto riguarda gli *scaffold*, si evidenzia un comportamento simile a quello osservato per gli stessi campioni sotto forma di film. Anche in questo caso il copolimero statistico PBSP(BPripol) presenta una diminuzione dell'intensità del riflesso intorno a  $23\ 2\theta$  rispetto ai due copolimeri multiblocco PBSP(BSBPripol) e PBSP(BSNS).

I valori di cristallinità determinati tramite analisi diffrattometrica a Raggi X sono in linea con i risultati calorimetrici.

	$\chi_c$ film (%)	$\chi_c$ <i>scaffold</i> (%)
PBS <sup>(36)</sup>	46	-
PBSP(BSBPripol)	27	28
PBSP(BSNS)	35	38
PBSP(BPripol)	14	19

Tabella 4.8 Indici di cristallinità del PBS sotto forma di film e dei copolimeri PBSP(BSBPripol), PBSP(BSNS) e PBSP(BPripol) sotto forma di film e di *scaffold*.

#### 4.6 Caratterizzazione meccanica

Le misure meccaniche *stress-strain*, a rottura e cicliche, sono state eseguite su campioni di forma rettangolare (film  $50 \times 5 \times 0,3$  mm e *scaffold*  $50 \times 5 \times 0,05$  mm). Nelle misure di trazione, il provino è stato allungato a velocità costante e si è registrata la variazione dello sforzo, che viene poi riportata in grafico in funzione della deformazione. Nelle prove cicliche il campione è stato sottoposto ad un allungamento pari al 50% e, sottoposto a 20 cicli. Si registra lo sforzo applicato durante la deformazione. Per ogni campione le misure sono state effettuate su 6 provini diversi, riportando il risultato come valore medio  $\pm$  deviazione standard.

In Figura 4.9 sono rappresentate le curve sforzo-deformazione a rottura e le prove cicliche per i materiali oggetto di questa Tesi, sotto forma di film e di *scaffold*. In Tabella 4.9 e 4.10 sono raccolti i valori di sforzo massimo ( $\sigma_{max}$ ), deformazione a rottura ( $\epsilon_{max}$ ) e modulo elastico (E) dei campioni (film e *scaffold*), registrati durante le prove meccaniche a trazione.

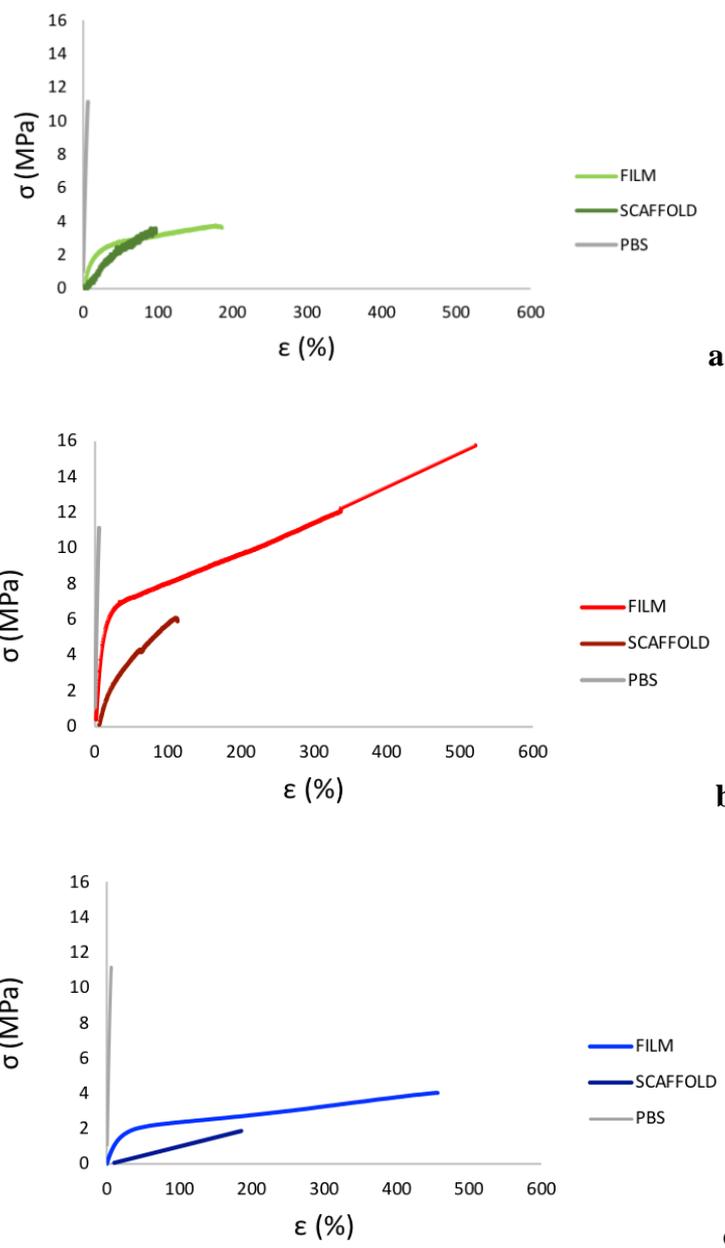


Figura 4.9 Grafico sforzo-deformazione del PBSP(BSBPripol) sotto forma di film e di *scaffold* (a), del PBSP(BSNS) sotto forma di film e di *scaffold* (b) e del PBSP(BPripol) sotto forma di film e di *scaffold* (c), in relazione al PBS.

	$\sigma_{\max}$ (MPa)	$\epsilon_{\max}$ (%)	E (MPa)
PBS <sup>(36)</sup>	$16 \pm 2$	$5 \pm 1$	$301 \pm 25$
PBSP(BSBPripol)	$3,7 \pm 0,5$	$185 \pm 20$	$22 \pm 2$
PBSP(BSNS)	$15 \pm 2$	$520 \pm 27$	$78 \pm 10$
PBSP(BPripol)	$4,6 \pm 0,3$	$460 \pm 22$	$14 \pm 2$

Tabella 4.9 Dati di caratterizzazione meccanica del PBS e dei copolimeri PBSP(BSBPripol), PBSP(BSNS) e PBSP(BPripol) sotto forma di film.

	$\sigma_{\max}$ (MPa)	$\varepsilon_{\max}$ (%)	E (MPa)
PBSP(BSBPripol)	$3,3 \pm 0,5$	$127 \pm 20$	$5 \pm 1$
PBSP(BSNS)	$2,2 \pm 0,8$	$120 \pm 18$	$5 \pm 1$
PBSP(BPripol)	$1,9 \pm 0,3$	$104 \pm 16$	$10 \pm 3$

Tabella 4.10 Dati di caratterizzazione meccanica dei copolimeri PBSP(BSBPripol), PBSP(BSNS) e PBSP(BPripol) sotto forma di *scaffold*.

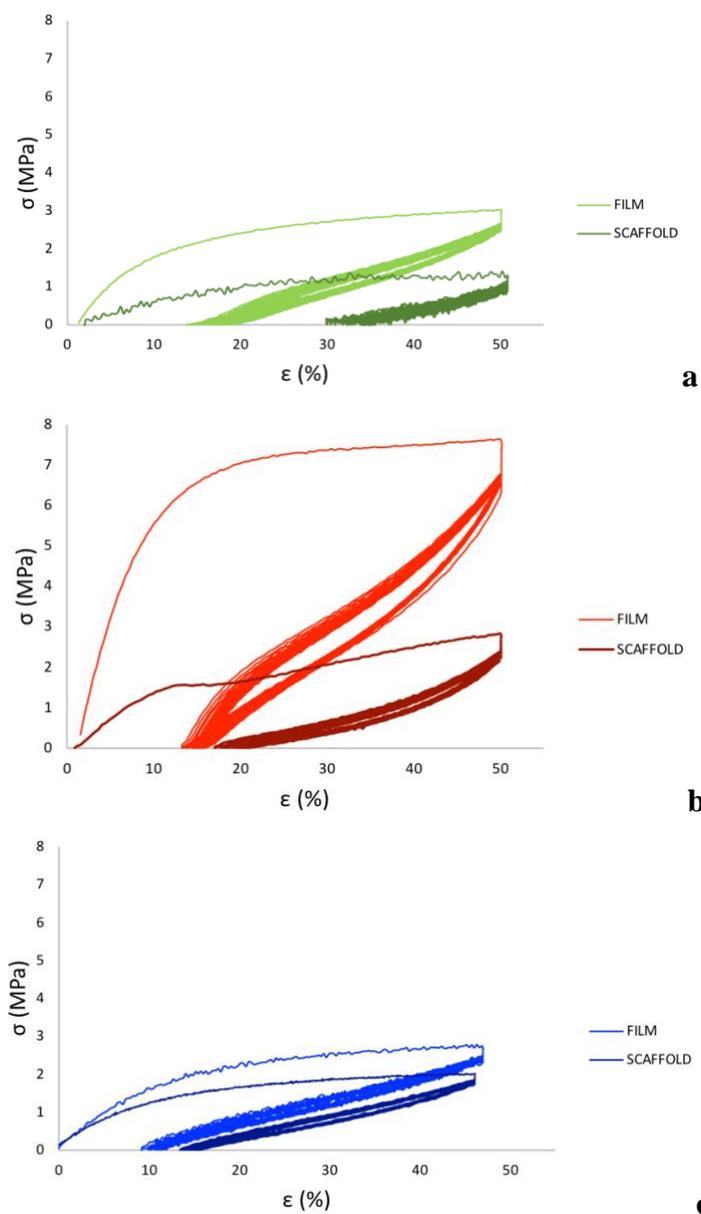


Figura 4.10 Prove cicliche sforzo-deformazione del PBSP(BSBPripol) sotto forma di film e di *scaffold* (a), del PBSP(BSNS) sotto forma di film e di *scaffold* (b) e del PBSP(BPripol) sotto forma di film e di *scaffold* (c).

Si può notare come il copolimero multiblocco PBSP(BSBPripol), sotto forma di film, mostri un valore di modulo elastico di un ordine di grandezza inferiore rispetto all'omopolimero di riferimento PBS, insieme ad uno sforzo a rottura tre volte più basso (Tabella 4.9). Il risultato più interessante rimane il grande aumento della deformazione a rottura, che passa da 5% nell'omopolimero a 185% nel copolimero multiblocco, a conferma dell'elasticità del PBSP(BSBPripol). Il diverso comportamento meccanico del PBSP(BSBPripol) rispetto al PBS può essere sicuramente imputato al duplice effetto di aumento della mobilità di catena ( $T_g$  minore) e riduzione della porzione cristallina ( $\chi_c$  minore) nel copolimero rispetto all'omopolimero (Figura 4.9 a), dovuto alla presenza di Pripol all'interno della struttura macromolecolare. Un altro aspetto da osservare è l'assenza di snervamento nella curva *stress-strain* del PBSP(BSBPripol). Tale comportamento può essere ricondotto all'architettura molecolare, che alterna segmenti *hard* (PBS) a segmenti *soft* (P(BSBPripol)). In questo modo si riescono a conferire al materiale finale le caratteristiche di un elastomero termoplastico.

Per valutare le proprietà elastomeriche e la resistenza alle sollecitazioni di carico-scarico, il PBSP(BSBPripol), sotto forma di film, è stato sottoposto a prove cicliche condotte secondo le condizioni riportate nel Capitolo 3 (Figura 4.10 a). I cicli di carico-scarico evidenziano un'elevata elasticità del materiale, avendo un ritorno elastico di circa il 65% anche dopo 20 cicli. Il differente comportamento che si osserva tra il primo e il secondo ciclo può essere spiegato sulla base del riorientamento delle macromolecole con conseguente cristallizzazione durante l'allungamento. Dal secondo ciclo, il comportamento del materiale si stabilizza, senza particolari variazioni. Si nota che il polimero presenta una bassa isteresi, dunque è in grado di rendere buona parte dell'energia impiegata per la deformazione elastica. Questo aspetto rende il comportamento di questo polimero simile a quello di un elastomero ideale, in cui tutta l'energia fornita per la deformazione viene restituita al momento dello scarico, senza essere dispersa in altre forme.

La risposta meccanica del copolimero multiblocco è stata testata anche sullo *scaffold*. Dai dati raccolti in Tabella 4.10, è possibile notare un ulteriore abbassamento del modulo elastico nel campione elettrofilato; tuttavia, non si osserva un miglioramento dell'allungamento a rottura, che rimane comunque buono, rispetto al film. Possiamo ipotizzare che le fibre che costituiscono il campione rendano il materiale più elastico ma determinino anche la presenza di difetti e pori che innescano la rottura a sforzi inferiori rispetto al film.

Per quanto riguarda le prove cicliche, anche il PBSP(BSBPripol) sotto forma di *scaffold* presenta proprietà tipiche degli elastomeri termoplastici, con un recupero elastico di circa il 40% (Figura 4.10 a). Anche in questo caso, la minore entità del ritorno è dovuto alla differente

struttura intrinseca dello *scaffold* rispetto al film: 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.

Per quanto concerne l'altro copolimero multiblocco PBSP(BSNS), sotto forma di film, anche in questo caso si assiste a una diminuzione del modulo elastico  $E$  rispetto all'omopolimero PBS (Tabella 4.9). Tuttavia, in questo caso la riduzione è più contenuta rispetto al copolimero multiblocco a base di Pripol, probabilmente a causa del maggior grado di cristallinità e dalla  $T_g$  maggiore del PBSP(BSNS) rispetto al PBSP(BSBPripol). Allo stesso tempo, l'allungamento a rottura e lo sforzo a rottura sono i maggiori osservati tra i polimeri testati. Questo aspetto può sempre essere ricondotto all'architettura molecolare del polimero: la natura del glicole impiegato gioca un ruolo fondamentale. Si può ipotizzare che le minori dimensioni del glicole favoriscano un impaccamento maggiore delle catene, quindi una densità di materiale maggiore. Durante lo stiro, le catene polimeriche possono scorrere le une sulle altre senza provocare la formazione di spazi vuoti, e quindi porosità, che innescerebbero la rottura. In questo modo sia l'allungamento che lo sforzo a rottura vengono incrementati. Tuttavia, nonostante il maggiore sforzo massimo e modulo elastico del copolimero multiblocco a base di neopentil glicole, rispetto a quello contenente segmenti Pripol, esso mostra comunque un'elevata elasticità come confermato dai cicli di carico-scarico (Figura 4.10 b) che evidenziano anche per questo materiale un ritorno elastico pari al 70%.

Analizzando il materiale elettrofilato, si può evidenziare come per il PBSP(BSNS) il processo di elettrofilatura non determini un peggioramento in termini di ritorno elastico, che si mantiene molto simile a quello del film corrispondente (65%) (Figura 4.10 b), abbassando allo stesso tempo sia il valore di modulo elastico che di sforzo a rottura rispetto al film, a confermare l'influenza della struttura 3D porosa dello *scaffold* sulle proprietà meccaniche (Tabella 4.10). Passando ad analizzare il copolimero statistico PBSP(BPripol) sotto forma di film, anch'esso, come vediamo dai valori riportati in Tabella 4.9, presenta proprietà meccaniche migliorate rispetto all'omopolimero di riferimento, come evidenziato dal minore modulo elastico e dalla maggiore deformazione raggiunta prima che sopravvenga la rottura. È interessante notare l'effetto della diversa architettura molecolare: grazie alla distribuzione statistica della co-unità Pripol, tale copolimero possiede una deformazione a rottura maggiore rispetto al copolimero multiblocco a base di Pripol. Nonostante l'assenza di una vera e propria struttura a blocchi, il polimero si comporta come tale mostrando assenza di snervamento (Figura 4.9 c). 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 anche sul copolimero statistico PBSP(BPripol). I cicli di carico-scarico sottolineano, ancora una volta, l'elevata elasticità del materiale, con un ritorno elastico, pari al 78% dopo 20 cicli, addirittura migliorato rispetto all'analogo copolimero a blocchi (Figura 4.10 c).

Anche per tale copolimero, si sono testate le proprietà meccaniche dello *scaffold*. Questo ha un comportamento simile al film, ad eccezione dell'allungamento a rottura, che diminuisce (Tabella 4.10 e Figura 4.9 c). Questo effetto è da attribuire alla struttura 3D porosa tipica dello *scaffold*, che probabilmente innesca in maniera più facile la rottura del materiale.

L'elasticità del copolimero statistico PBSP(BPripol) viene dimostrata anche dai cicli di carico-scarico effettuati sullo *scaffold*: il recupero elastico, infatti, si aggira intorno al 67% (Figura 4.10 c).

Per concludere, tutti i materiali analizzati, in forma di film ed elettrofilati, possedendo le proprietà sopra descritte, possono essere definiti degli elastomeri termoplastici.

In particolare, i copolimeri analizzati sotto forma di *scaffold* possiedono dei valori di modulo elastico che si avvicinano a quello del tessuto miocardico, che risulta essere compreso fra 0,02 e 0,5 MPa <sup>(37)</sup>.

#### **4.7 Degradazione idrolitica**

Come già spiegato nel Capitolo 3, le prove di degradazione idrolitica hanno permesso di testare il comportamento dei tre copolimeri in esame, in particolare la loro velocità di degradazione, in condizioni che simulano l'ambiente corporeo. A tempi stabiliti, i campioni parzialmente degradati sono stati pesati e analizzati mediante cromatografia a permeazione su gel (GPC), per poter valutare la perdita di peso gravimetrica e le variazioni relative al peso molecolare. Inoltre, sono state condotte analisi DSC e diffrattometrica a Raggi X, per valutare eventuali variazioni del rapporto fase cristallina/fase amorfa.

L'idrolisi è un fenomeno che avviene in *bulk*: le catene macromolecolari in ambiente acquoso, infatti, vengono tagliate, motivo per cui il valore di  $M_n$  diminuisce. La perdita di peso gravimetrico può non essere rilevata nei primi stadi, poiché le catene idrolizzate non necessariamente passano subito in soluzione acquosa.

	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J/g)	Perdita di peso gravimetrico (%)	Perdita di peso molecolare M <sub>n</sub> (%)
PBS <sup>(38)</sup>	-32	115	62	2,0	35
PBSP(BSBPripol)	-50	110	27	1,7	21
PBSP(BSNS)	-26	104	41	1,3	23
PBSP(BPripol)	-51	65	21	1,0	47

Tabella 4.11. Dati di caratterizzazione termica e di degradazione idrolitica del PBS e dei copolimeri PBSP(BSBPripol), PBSP(BSNS) e PBSP(BPripol) sotto forma di film.

I parametri che influenzano la velocità di degradazione idrolitica sono molteplici: la densità di gruppi esterei, la flessibilità di catena e il grado di cristallinità rappresentano i fattori più importanti. In particolare, la velocità di degradazione è direttamente proporzionale alla quantità di gruppi -COOR- e alla mobilità di catena, mentre è inversamente proporzionale alla percentuale di fase cristallina presente.

Come evidenziato dai risultati riportati in Tabella 4.11, rispetto al PBS, il copolimero multiblocco PBSP(BSBPripol) mostra un valore di T<sub>g</sub> minore (maggiore flessibilità molecolare) e una T<sub>m</sub> confrontabile con quella del PBS, ma un minore grado di cristallinità. La densità di gruppi -COOR-, invece, è sensibilmente minore grazie alla presenza della subunità Pripol caratterizzata da lunghi segmenti alifatici. Quest'ultimo fattore concorre a rallentare la velocità di degradazione rispetto all'omopolimero PBS.

Per quanto riguarda il copolimero multiblocco PBSP(BSNS), rispetto al PBS, il valore di T<sub>g</sub> è leggermente maggiore, mentre la porzione cristallina e la T<sub>m</sub> corrispondente diminuiscono, mantenendosi comunque alte (Tabella 4.11). Inoltre, essendo le due co-unità glicoliche (BD e NG) di lunghezza simile, la quantità di gruppi -COOR- non varia sensibilmente rispetto all'omopolimero di riferimento. In quest'ottica, il rallentamento della velocità di degradazione di tale copolimero rispetto al PBS può essere spiegato sulla base del maggior valore di temperatura di transizione vetrosa, che indica una minore mobilità della catena macromolecolare, che risulta meno accessibile all'acqua.

Possiamo ipotizzare che la stessa velocità di degradazione dei due copolimeri multiblocco PBSP(BSBPripol) e PBSP(BSNS) sia il risultato della combinazione di diversi fattori: minore rigidità, grado di cristallinità e densità di gruppi esterei nel copolimero contenente subunità Pripol e maggiore rigidità, grado di cristallinità e quantità di gruppi idrolizzabili nel copolimero a base di neopentil glicole.

Infine, nel copolimero statistico PBSP(BPripol) si evidenzia un significativo abbassamento sia di  $T_g$  che di  $T_m$  e  $\Delta H_m$  rispetto al PBS. Questi parametri, nonostante il ridotto numero di gruppi idrolizzabili rispetto all'omopolimero, concorrono ad aumentare la velocità di degradazione in ambiente fisiologico, che risulta essere la più alta dei polimeri oggetto del presente lavoro di Tesi. Tale risultato mette in evidenza l'importanza dell'architettura molecolare che permette di modulare la velocità di degradazione nei due copolimeri a base di Pripol: più bassa nel copolimero multiblocco grazie al maggiore grado di cristallinità e perfezione della fase cristallina e più elevata nel copolimero statistico caratterizzato da valori minori di  $T_m$  e  $\Delta H_m$ .

Da ultimo, la maggiore diminuzione di  $M_n$  rispetto alla perdita di peso gravimetrico che si evidenzia in tutti i campioni analizzati, non stupisce se si considera che il fenomeno di degradazione idrolitica è un processo che avviene in *bulk*: per brevi tempi di incubazione, la variazione di peso molecolare non è accompagnata da una perdita di peso gravimetrico.

In tutti i copolimeri parzialmente degradati non sono stati riscontrati, tramite analisi NMR, sbilanciamenti nella composizione. In più, le analisi DSC e diffrattometrica a Raggi X non hanno evidenziato variazioni del grado di cristallinità e della fase cristallina presente.

Quindi, si può affermare che la degradazione coinvolge allo stesso modo le fasi amorphe e cristalline dei materiali analizzati.

È interessante soffermarsi sul confronto fra film e *scaffold* nel copolimero statistico PBSP(BPripol), caratterizzato dalla perdita di peso molecolare  $M_n$  maggiore dopo 15 settimane di incubazione in condizioni fisiologiche. Come si osserva dalla figura 4.11, 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 60% 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 porta alla formazione di gruppi acidi -COOH che operano un'azione autocatalitica <sup>(31)</sup> che accelera il processo di degradazione. La differente morfologia, quindi, influenza la degradazione idrolitica, la cui cinetica complessiva risulta simile, ma caratterizzata da un meccanismo diverso.

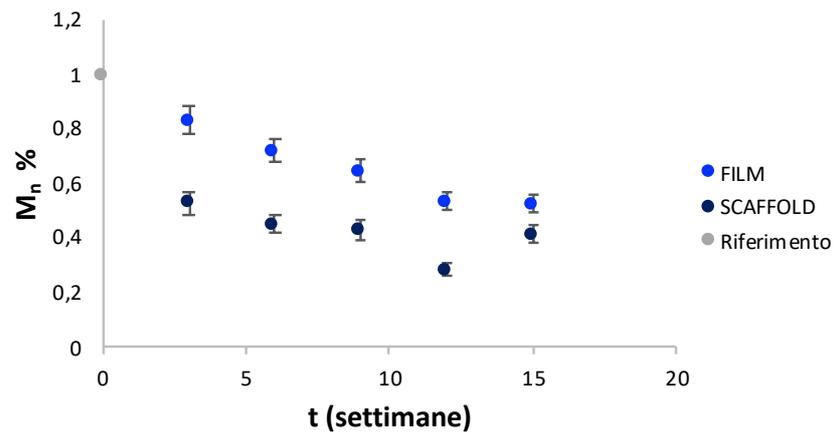


Figura 4.11 Peso molecolare residuo percentuale del copolimero statistico PBSP(BPripol) a diversi tempi di incubazione in condizioni fisiologiche.

## **CAPITOLO 5: CONCLUSIONI**

Il cuore è il primo organo che si forma nel corpo umano. A sole due settimane di gestazione inizia a battere per pompare sangue e continua a farlo per tutta la vita. Tuttavia, a sviluppo completato, la sua capacità di rigenerarsi dopo un danno o una malattia, è minima. Di conseguenza, le malattie cardiovascolari restano la principale causa di morte in tutto il mondo. Questo sta spingendo i ricercatori verso nuovi approcci tra cui l'ingegneria tissutale che, per le sue potenziali applicazioni, riveste un ruolo di primo piano. Anche se lo sviluppo è nella sua fase iniziale, l'obiettivo finale è quello di costruire tessuti funzionali o interi organi per i trapianti. Al momento, tuttavia, gli sforzi si concentrano sulla creazione di singoli tessuti (sistema vascolare, valvole per il miocardio) le cui dimensioni sono limitate dalle tecnologie esistenti.

Nel caso del miocardio, per ridurre al minimo la complessità, l'ingegneria tissutale ha cercato di sviluppare unità di tessuto con caratteristiche tridimensionali, ma abbastanza sottili da permettere lo scambio di nutrienti più critici, come ossigeno e metaboliti.

In tale contesto, i biomateriali hanno un ruolo essenziale, e tra questi, quelli che hanno suscitato il maggiore interesse sono i materiali polimerici, grazie alle loro proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità, facile lavorabilità e compatibilità meccanica con il sito di applicazione.

In particolare, per quanto riguarda l'ingegneria tissutale, la classe di polimeri che si è rivelata più idonea è quella dei poliesteri alifatici. Ad oggi la FDA ha consentito l'uso dei soli PCL, PLA, PGA e loro copolimeri; tali materiali non riescono però a soddisfare completamente l'ampia gamma di richieste. La sintesi di nuovi materiali polimerici con proprietà modulabili con la composizione chimica e l'architettura molecolare, biocompatibili, biodegradabili e i cui prodotti di degradazione non risultino tossici per l'organismo, può aprire nuove prospettive future.

In quest'ambito, il lavoro di ricerca svolto nella presente Tesi ha portato a notevoli risultati applicativi. Infatti, l'introduzione di co-unità con struttura chimica *ad hoc* lungo la catena polimerica del PBS, nonché la disposizione delle stesse (architettura molecolare), si sono rivelati strumenti estremamente efficaci nel modulare le proprietà finali del materiale; su tutte, la flessibilità della catena macromolecolare e la velocità di cristallizzazione con conseguente impatto sul grado di cristallinità. Tutte queste proprietà hanno inciso significativamente sulla risposta meccanica e sulla velocità di biodegradazione.

L'ottimizzazione delle condizioni di elettrofilatura ha consentito la realizzazione di costrutti ingegnerizzati tridimensionali con morfologia controllata, i quali, hanno mostrato proprietà meccaniche interessanti per i tre polimeri oggetto della presente Tesi.

Nello specifico, il miglioramento delle *performance* meccaniche è confermato dall'abbassamento del modulo elastico, che si avvicina a quello del miocardio, e dagli ottimi valori di ritorno elastico.

Per quanto concerne la cinetica di degradazione idrolitica, questa è risultata rallentata nei due copolimeri multiblocco rispetto al PBS, mentre il copolimero statistico si è rivelato il materiale con la più veloce cinetica di degradazione. Tali risultati indicano che anche in questo caso struttura chimica e architettura molecolare sono parametri su cui si può giocare nel design di un materiale con profilo di degradazione controllata. Il confronto a parità di materiale tra film e *scaffold* ha mostrato che la morfologia è un ulteriore fattore che può essere sfruttato per ottenere un materiale con le proprietà desiderate.

La strategia adottata si è dunque rivelata vincente: la copolimerizzazione ha infatti consentito di migliorare le proprietà non soddisfacenti del PBS rendendolo più adatto per applicazioni nell'ingegneria dei tessuti molli. Inoltre, l'elettrofilatura ha dimostrato di essere una tecnica semplice e versatile, che consente di ottenere costrutti ingegnerizzati a morfologia controllata. Infine, presso i laboratori di Translational Cardiomyology, Department of Development and Regeneration (Katholieke Universiteit di Leuven KUL), sono stati condotti studi di biocompatibilità e differenziamento cellulare nel fenotipo cardiaco. Gli esperimenti sono stati eseguiti su cellule staminali umane pluripotenti (*induced Pluripotent Stem Cells*, iPSCs). Dai risultati ottenuti, è possibile affermare che le cellule proliferano e mantengono il loro stato di pluripotenza nell'intervallo di tempo esplorato. 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.

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.

## BIBLIOGRAFIA

1. The top 10 causes of death, *World Health Organization*, (2018).
2. E. Wilkins, L. Wilson, K. Wickramasinghe, P. Bhatnagar, J. Leal, R. Luengo-Fernandez, R. Burns, M. Rayner, N. Townsend, *European Cardiovascular Disease Statistics 2017*, European Heart Network, (2017).
3. C. L. Hastings, E. T. Roched, E. Ruiz-Hernandez, K. Schenke-Layland, C. J. Walsh, G. P. Duffya, *Drug and cell delivery for cardiac regeneration*, *Advanced Drug Delivery Review* 84, (2015), 85-106.
4. M. Radisić, G. Vunjak-Novaković, *Cardiac tissue engineering*, *J. Serb. Chem. Soc.* 70, (2005), 541-556.
5. S. Mangini, B. Rubim, A. Odílson, M. Silvestre, P. V. Pires, L. J. T. Pires, M. N. C. Curiati, F. Bacal, *Heart transplantation: review*, *Einstein (São Paulo)* 13, (2015), 1679-4508.
6. A. C. Alba, E. Bain, M. Stein, K. O'Brien, F. Foroutan, H. Ross, *Complications after Heart Transplantation: Hope for the Best, but Prepare for the Worst*, *Int J Transplant Res Med* 2, (2016), 1-11.
7. M. L. Steinhauser, R. T. Lee, *Regeneration of the heart*, *Embo Molecular Medicine* 3, (2001), 701-712.
8. H. M. Nugent, E. R. Edelman, *Tissue Engineering Therapy for Cardiovascular Disease*, *Circulation Research* 92, (2003), 1068-1078.
9. F. J. O'Brien, *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*, *Materialstoday* 14, (2011), 88-95.
10. D.S. Kohane, R. Langer, *Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering*, *Pediatric Research* 63, (2008), 487-491.
11. M. T. Arefai, 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.
12. M. L. Focarete, M. Scandola, *Elettrofilatura: una tecnologia antica per applicazioni innovative su scala 'nano'*, CNES 2007 I Congresso Nazionale di Electrospinning, Milano, 4-5 Giugno 2007, 34-41.
13. 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.
14. D. F. Williams, *On the nature of biomaterials*, *Biomaterials*, (2009), 5897- 5909.

15. V. Singh, M. Tiwari, *Structure-Processing-Property Relationship of Poly(Glycolic Acid) for Drug Delivery Systems 1: Synthesis and Catalysis*, International Journal of Polymer Science, (2010), 1-23.
16. A. Kramschuster, L. S. Turng, *Fabrication of Tissue Engineering Scaffolds*, Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics, (2013).
17. 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 Biomaterialia 6, (2010), 2467–2476.
18. L. S. Nair, C. T. Laurencin, *Biodegradable Polymers as Biomaterials*, Progress in Polymer Science, (2007), 762-798.
19. Y. Li, G. A. Thouas, Q. Z. Chen, *Biodegradable soft elastomers: synthesis/properties of materials and fabrication of scaffolds*, RSC Advances 2, (2012), 8229-8242.
20. L. Li, K. Raghupathi, C. Song, P. Prasad, S. Thayumanavan, *Self-assembly of Random Copolymers*, Chem Commun (Camb) 77A, (2014), 13417-13432.
21. C. Piconi, *Biomateriali e dispositivi medici*, Energia Ambiente Innovazione, Enea, (2014), 48-65.
22. L. C. Arruda, M. M. Rosário, E. S. Bretas, M. M. Ueki, *Influence of chain extender on mechanical, thermal and morphological properties of blown films of PLA/PBAT blends*, Polymer Testing 43, (2015), 27-37.
23. 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.
24. M. Howe-Grant, Kir-Othmer, Encyclopedia of chemical technology, New York, John Wiley & Sons, (1991).
25. J. T. Oliveira, V. M. Correlo, P. C. Sol, A. R. Costa-Pinto, P. B. Malafaya, A. J. Salgado, M. Bhattacharya, P. Charbord, N. M. Neves, R. L. Reis, *Assessment of the Suitability of Chitosan/PolyButylene Succinate Scaffolds Seeded with Mouse Mesenchymal Progenitor Cells for a Cartilage Tissue Engineering Approach*, Tissue Engineering (Part A), Vol. 14, No. 10, (2008).
26. 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.

27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. M. Soccio, N. Lotti, L. Finelli, M. Gazzano, A. Munari, *Neopentyl glycol containing poly(propylene azelate)s: Synthesis and thermal properties*, *European Polymer Journal* 43, (2007), 3301–3313.
35. Y. Ichikawa, H. Kondo, Y. Igarashi, K. Okuyama, J. Washiyama, *Crystal structures of  $\alpha$  and  $\beta$  forms of poly(tetramethylene succinate)*, *Polymer* 41, (2000), 4719–4727.
36. G. Guidotti, M. Soccio, V. Siracusa, M. Gazzano, E. Salatelli, A. Munari, N. Lotti, *Novel Random PBS-Based Copolymers Containing Aliphatic Side Chains for Sustainable Flexible Food Packaging*, *Polymers* 9, (2017), 724–740.
37. Q. Chen, A. Bismarck, U. Hansen, S. Junaid, M. Q. Tran, S. E. Harding, N. N. Ali, A. R. Boccaccini, *Characterisation of a soft elastomer poly(glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue*, *Biomaterials* 29, (2008), 47–57.

38. M. Fabbri, G. Guidotti, M. Soccio, N. Lotti, M. Govoni, E. Giordano, M. Gazzano, R. Gamberini, B. Rimini, A. Munari, *Novel biocompatible PBS-based random copolymers containing PEG-like sequences for biomedical applications: From drug delivery to tissue engineering*, *Polymer Degradation and Stability* 153, (2018), 53-62.

## RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare in primo luogo la mia relatrice, Prof.ssa Elisabetta Salatelli, per la sua disponibilità e la sua cortesia.

Un grazie di cuore va alla Prof.ssa Lotti, che con la sua esperienza mi ha aiutata sin dal primo giorno ed è sempre stata disponibile nel seguirmi con costanza.

Grazie a Michela, Silvia e Giulia, per avermi fatta sentire a casa ogni giorno in laboratorio e per l'enorme aiuto che mi hanno saputo dare durante la stesura della Tesi e durante i momenti più difficili passati al DICAM.

Grazie agli amici che questo percorso mi ha fatto incontrare, Alexia, Lorenzo e Irene, con cui ho condiviso gioie, delusioni ed esaurimenti di questo percorso di studi.

Grazie a Chiara, che mi è sempre stata vicina, incoraggiandomi e dandomi conforto quando ne avevo più bisogno, da sempre un punto di riferimento fondamentale.

Vorrei ringraziare infinitamente gli amici, che con un gesto, un messaggio o una chiacchierata sanno sempre farmi sorridere.

Infine, un sentito ringraziamento alla mamma, al babbo e ad Anna, che mi hanno supportato e sopportato in questo percorso di studi.