

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA CAMPUS DI  
CESENA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E  
DELL'INFORMAZIONE "GUGLIELMO MARCONI"

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

NUOVO COPOLIESTERE DEL PBS CONTENENTE PONTI DISOLFURO  
PER USO BIOMEDICO

Elaborato in  
Fondamenti di Chimica

Relatore

Prof.ssa Nadia Lotti

Correlatore

Dott.ssa Giulia Guidotti

Dott.ssa Michelina Soccio

Presentata da

Cecilia Marini

Anno accademico 2018/2019



# Indice

<b>CAPITOLO 1: INTRODUZIONE .....</b>	<b>5</b>
1.1 Biomateriali .....	5
1.1.1 Definizione .....	5
1.1.2 Utilizzi.....	6
1.1.3 Caratteristiche fondamentali .....	8
1.1.4 Classificazione.....	9
1.1.4.1 Biomateriali metallici .....	9
1.1.4.2 Biomateriali ceramici .....	10
1.1.4.3 Biomateriali polimerici.....	10
1.1.4.4 Biomateriali compositi .....	10
1.2 Polimeri .....	12
1.2.1 Definizione .....	12
1.2.2 Classificazione.....	13
1.2.2.1 Origine .....	13
1.2.2.2 Unità costituenti .....	13
1.2.2.3 Struttura .....	13
1.2.3 Proprietà .....	14
1.2.3.1 Grado di polimerizzazione e Peso Molecolare .....	14
1.2.3.2 Cristallinità.....	17
1.2.3.3 Proprietà termomeccaniche.....	18
1.2.3.4 Strategie di sintesi .....	20
1.2.3.5 Degradazione e Biodegradabilità .....	23
1.2.3.6 Tecniche di Lavorazione e Sterilizzazione .....	27
1.3 Copolimeri .....	29
1.3.1 Classificazione.....	30
1.4 Poliesteri .....	31
1.4.1 Definizione .....	31
1.4.2 Poliesteri alifatici utilizzati in ambito medico.....	32
1.4.2.1 Acido polilattico.....	32
1.4.2.2 Acido poliglicolico .....	34
1.4.2.3 Poli ε-caprolattone.....	35
1.4.2.4 Poli(butilene succinato) .....	35
1.4.3 Polimeri contenenti legami disolfuro.....	39

1.5 Applicazioni biomedicali.....	40
1.5.1 Ingegneria tissutale .....	40
1.5.2 Rilascio controllato di farmaco .....	44
1.5.3 Elettrofilatura.....	50
<b>CAPITOLO 2: SCOPO DELLA TESI .....</b>	<b>53</b>
<b>CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI .....</b>	<b>55</b>
3.1 Sintesi .....	55
3.1.1 Reagenti .....	55
3.1.2. Sintesi del PBS e del copolimero P(BSBDTDP) .....	57
3.1.3 Purificazione.....	58
3.2 Caratterizzazione molecolare.....	59
3.2.1 Cromatografia a permeazione su gel (GPC) .....	59
3.2.2 Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare ( <sup>1</sup> H-NMR) .....	60
3.3 Processing .....	63
3.3.1 Realizzazione di film mediante pressofusione .....	63
3.3.2 Realizzazione di <i>scaffold</i> mediante elettrofilatura .....	64
3.4 Caratterizzazione termica .....	66
3.4.1 Analisi termogravimetrica (TGA) .....	66
3.4.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC).....	68
3.5 Analisi diffrattometrica a Raggi X.....	70
3.6 Misure di bagnabilità su film.....	72
3.7 Caratterizzazione morfologica degli <i>scaffold</i> .....	73
3.8 Caratterizzazione meccanica .....	75
3.9 Studi di degradazione enzimatica .....	77
3.10 Prove di biocompatibilità.....	78
3.10.1 Coltura cellulare .....	78
3.10.2 Studi di proliferazione cellulare .....	78
<b>CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>80</b>
4.1 Caratterizzazione molecolare.....	80
4.1.1 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR).....	80
4.2 Misure di bagnabilità.....	83
4.3 Caratterizzazione Termica.....	83
4.3.1 Analisi Termogravimetrica (TGA).....	83
4.3.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC).....	85
4.4 Caratterizzazione strutturale .....	87

4.5 Caratterizzazione morfologica.....	88
4.6 Caratterizzazione meccanica .....	89
4.7 Studi di degradazione enzimatica .....	91
4.8 Studi di biocompatibilità .....	93
<b>CAPITOLO 5: CONCLUSIONI .....</b>	<b>95</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>97</b>

# CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE

### 1.1 Biomateriali

Del concetto di “biomateriali” si parla ormai da circa 60-70 anni, tuttavia solo recentemente il progresso della ricerca scientifica e lo sviluppo di nuovi processi tecnologici hanno fatto sì che questi materiali facessero il loro ingresso definitivo all’interno dell’industria moderna. Lo studio dei biomateriali è noto per la sua multidisciplinarietà, riguardando la combinazione di scienze chimiche e biologiche, ma anche mediche e meccaniche. Per “scienza dei biomateriali” si intende in generale la branca dedicata a progettazione, fabbricazione, test prestazionali di materiali sintetici e naturali, che vengono utilizzati per la realizzazione di impianti, dispositivi e apparecchiature, il cui utilizzo prevede un’interazione con i sistemi biologici <sup>(1)</sup>. L’avvento di tali dispositivi ha sicuramente inciso in maniera determinante sulla qualità della vita delle persone, in quanto indispensabili non solo ai fini dell’alleviamento o della scomparsa di sintomi patologici, ma anche alla sopravvivenza del paziente stesso.

#### 1.1.1 Definizione

Una prima definizione ufficiale di “biomateriale” venne fornita durante la conferenza dell’*European Society for Biomaterials* (ESB), tenutasi a Chester, Gran Bretagna, nel 1982, quindi soltanto verso la fine del secolo scorso. Questo ritardo è legato probabilmente all’ancora non ben chiara collocazione di tali materiali negli anni 70-80 del ‘900. Durante questi anni l’area dei biomateriali, che andava espandendosi, iniziò a toccare anche ambiti politici e giuridici (normative per la sicurezza e la certificazione dei prodotti). Questo fece nascere l’esigenza di una standardizzazione della terminologia, che doveva risultare pienamente comprensibile non solo a medici ed ingegneri ma anche ad avvocati ed economisti. Vennero dunque elaborate e redatte, nel corso degli anni, più definizioni del termine “biomateriale”, alcune delle quali, tratte dal “Dizionario dei Biomateriali” di D. F. Williams (1999), sono di seguito riportate <sup>(2)</sup>:

- 1) Una sostanza non vivente utilizzata per la realizzazione di un dispositivo (medico), destinato a interagire con i sistemi biologici (ESB 1<sup>st</sup> *Consensus Conference on Biomaterials*);

2) Una sostanza, diversa da un farmaco, di origine sintetica o naturale, che valuti, tratti, supporti o sostituisca qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo (*National Institute of Health*);

3) Un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici al fine di valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo (*ESB 2<sup>nd</sup> Consensus Conference on Biomaterials*);

Risulta subito evidente come, ad esempio, dalla prima alla seconda definizione, si perda la caratteristica “non vivente” del biomateriale, oppure come nella terza, quella che ad oggi ha raccolto un più ampio consenso, si sottolinei il ruolo essenziale del biomateriale come interfaccia con i tessuti biologici.

In ogni caso, indipendentemente dalle diverse definizioni, vi sono due caratteristiche imprescindibili che permettono di identificare un biomateriale come tale: il ruolo svolto all'interno dell'organismo (unitamente o meno ad un dispositivo medico) con il fine ultimo di ripristinare la salute del soggetto, e l'interfacciamento con i tessuti biologici, caratteristica che presuppone la biocompatibilità del materiale stesso (di biocompatibilità si parlerà approfonditamente in seguito).

### 1.1.2 Utilizzi

Il campo di applicazioni dei biomateriali è particolarmente vasto ed in continua crescita. È possibile suddividerlo nelle seguenti macrocategorie, in base al tessuto corporeo in cui è previsto l'impiego (Figura 1.1):

- Muscolo-scheletrico
- Dentale e maxillo-facciale
- Cardiovascolare
- Cute e pelle
- Oftalmologico
- Altro

Per quanto riguarda il primo raggruppamento, vi rientrano ad esempio tutti i biomateriali utilizzati nei casi di sostituzione delle articolazioni (le principali sono anca, ginocchio e spalla). Al suo interno non ricadono unicamente i materiali con cui vengono costruite le protesi stesse (principalmente materiali resistenti come ceramiche e metalli, che soppongono alla funzione di sostegno propria dell'apparato muscolo scheletrico), ma anche materiali di supporto, quali resine polimeriche e viti metalliche, che permettono una migliore stabilizzazione dell'impianto

e, nel caso delle resine, anche una migliore osteo-integrazione. La seconda categoria comprende invece biomateriali utilizzati primariamente a scopo di ricostruzione ossea, in sede di inserimento di un impianto dentale (qualora la quantità di osso presente non sia sufficiente), ma anche per correggere carenze ossee nella regione della mascella. I biomateriali impiegati nel settore cardiovascolare e nella rigenerazione della cute, inoltre, devono possedere come requisito primario l'emo-compatibilità, intesa come la capacità, da parte del materiale, di non innescare fenomeni di coagulazione o emolisi se a contatto con il sangue. In ambito oftalmologico, i biomateriali, soprattutto polimeri, giocano un ruolo fondamentale nella realizzazione di lenti a contatto, esterne ed intraoculari, ma anche di impianti di drenaggio del glaucoma, ove l'operazione non abbia ottenuto i risultati sperati. Al di fuori delle categorie sopracitate, occorre inoltre menzionare altri importanti dispositivi, quali ad esempio le protesi cocleari e mammarie, i dispositivi uterini, i fili di sutura e le sacche contenenti il sangue, tutti realizzati con biomateriali prevalentemente di natura polimerica.

Alla luce di queste numerose applicazioni, non può che emergere l'assiduità con cui i polimeri vengono scelti come biomateriali per la produzione di apparecchiature biomediche e la realizzazione di impianti: essi, infatti, rappresentano più del 50% del mercato dei dispositivi biomedici, i metalli ne rappresentano un terzo, mentre le ceramiche approssimativamente solo il 5% <sup>(3)</sup>.

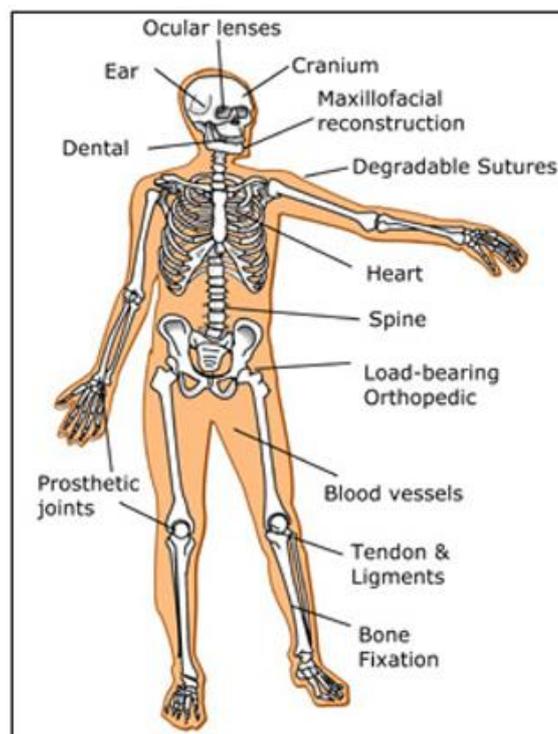


Figura 1.1. Principali applicazioni biomediche dei biomateriali.

### 1.1.3 Caratteristiche fondamentali

Le caratteristiche peculiari di un biomateriale sono di seguito elencate:

- **SPECIFICITA' DI APPLICAZIONE**

Considerato l'elevatissimo numero di materiali disponibili, risulta evidente come un solo biomateriale non possa essere idoneo per tutte le possibili applicazioni; viceversa, in base al tipo di utilizzo previsto, sarà preferibile la scelta di alcuni materiali piuttosto che di altri. Dunque, l'individuazione del biomateriale più adatto nasce solo dopo un'analisi identificativa del ruolo che il dispositivo finale andrà a rivestire a contatto con l'organismo. Individuata la destinazione d'uso, occorre poi valutare attentamente le caratteristiche che il materiale dovrà possedere per risultare un buon candidato per la funzione richiesta, e solo dopo aver stabilito tali proprietà si avranno tutti gli elementi per effettuare la giusta scelta.

- **RIPRODUCIBILITA'**

Il materiale deve possedere un comportamento "caratteristico", ovvero noto e riproducibile, che può essere propriamente definito tramite una serie di test (ad esempio chimico-fisici, termici e meccanici, ecc ...).

- **BIOCOMPATIBILITA'**

Quando si parla di compatibilità di un materiale, occorre tenere in considerazione tre diversi aspetti, quali la compatibilità morfologica, funzionale e biologica. La prima prevede che l'impianto sia in grado di interfacciarsi con il tessuto limitrofo in termini di geometria, di massa e di forma, mentre la seconda richiede che il dispositivo finale sia adeguato allo scopo previsto, ovvero che risponda a tutte le funzionalità per cui è stato progettato. Inoltre, sia in caso di dispositivi temporanei (ad esempio i fili di sutura) che di protesi di più lunga durata (come la protesi d'anca) è fondamentale che le proprietà del biomateriale rimangano inalterate per tutta la durata prevista dell'impianto e che, nel caso di dispositivi biodegradabili, i prodotti di degradazione non siano tossici per l'organismo.

Con il termine biocompatibilità (o compatibilità biologica), invece, si intende "l'abilità del materiale di determinare un'appropriata risposta dell'organismo ospite per una data applicazione"<sup>(2)</sup>. Più in generale è possibile definirla come l'insieme delle proprietà che devono essere soddisfatte nell'interazione tra il dispositivo e l'organismo (in particolare simili proprietà chimiche e biologiche), in modo da prevenire il rischio di una risposta immunitaria indesiderata da parte dei tessuti circostanti.

- **FACILE LAVORABILITA'**

La lavorabilità è una caratteristica essenziale per un biomateriale: esistono infatti protesi con forme molto precise e particolari, e di conseguenza il biomateriale che le costituisce deve passare attraverso un elaborato processo di lavorazione, senza però che le sue proprietà vengano compromesse. Ad esempio, i passaggi che portano al prodotto finale possono prevedere la stiratura, la compressione oppure il trattamento ad alte temperature; per ognuna di queste fasi, dunque, è opportuno controllare che il materiale non risulti compromesso, e che quindi il dispositivo sia ancora in grado di svolgere la funzione per cui è stato progettato.

#### 1.1.4 Classificazione

E' possibile ripartire i biomateriali in quattro categorie: biomateriali metallici, ceramici, polimerici e compositi, ognuna delle quali caratterizzata da proprietà peculiari raccolte in Tabella 1.1.

##### *1.1.4.1 Biomateriali metallici*

I biomateriali metallici sono noti per le loro ottime prestazioni meccaniche: posseggono infatti un modulo di Young sufficientemente elevato, alte tensioni di snervamento e di rottura, così come una buona resistenza a fatica. Sono duttili, ed anche questo può essere considerato un vantaggio, in quanto è possibile osservare in anticipo quando il materiale è in procinto di rompersi. Inoltre, i metalli hanno una buona conducibilità termica ed elettrica, dovuta alla presenza del legame metallico, sono facili da lavorare e in genere resistono anche a temperature piuttosto elevate. Nonostante tutte queste ottime proprietà, che li renderebbero sulla carta degli ottimi biomateriali, i metalli non sempre sono biocompatibili, in quanto spesso vanno incontro a corrosione, con conseguente rischio di cedimento della protesi e rilascio di particolato tossico in ambiente biologico. Tra le patologie che possono insorgere in seguito alla presenza di quantità di metallo in circolo superiori alla norma figurano ad esempio l'anemia, nel caso del cobalto, o l'epilessia ed il morbo di Alzheimer nel caso dell'alluminio. Per prevenire questi scenari, si utilizzano solitamente leghe in sostituzione dei metalli puri, e si eseguono trattamenti superficiali al fine di rendere il metallo (o almeno la sua parte esterna, quella che si interfaccia con il liquido biologico) inossidabile. Esempi di applicazione dei biomateriali metallici sono le protesi ortopediche, per cui viene solitamente utilizzata la lega di titanio Ti6Al4V, dispositivi impiantabili, quali pacemaker, per cui si predilige la lega di cobalto Co-Ni-Cr-Mo, o ancora dispositivi di osteosintesi e strumenti chirurgici, realizzati in acciaio inossidabile.

#### *1.1.4.2 Biomateriali ceramici*

I biomateriali ceramici vengono definiti come materiali inorganici né metallici, né polimerici, e caratterizzati da rottura fragile. Si possono classificare in base ai costituenti, oppure in base al comportamento adottato una volta che si interfacciano con un tessuto biologico. Per quanto riguarda la prima classificazione, si hanno ceramiche tradizionali, a base di argilla (terracotte, maioliche, porcellana), e ceramiche avanzate, come silicati, feldspati, ossidi di alluminio, carbonati, vetri inorganici e idrossiapatiti. Se si considera invece la risposta generata nei confronti dell'organismo, le ceramiche risultano biocompatibili, ed in particolare possono essere inerti, se non mostrano alcun tipo di interazione con l'ambiente circostante, oppure bioattive, quando invece tendono a interagire positivamente con le strutture vicine, entrando a far parte dei processi biologici dell'organismo. La caratteristica distintiva di qualunque biomateriale ceramico è l'elevata fragilità, che ne rende difficile la lavorazione. Ciò significa che il materiale resiste bene a carichi di compressione, anche di entità elevata, ma si rompe di schianto, contrariamente ai metalli, e con rottura fragile, se sottoposto a trazione, flessione o torsione. Per quanto riguarda le applicazioni, le ceramiche trovano impiego come parti di protesi ortopediche e cardiovascolari, e vengono spesso utilizzate in ambito ortodontico per la realizzazione di denti artificiali: ad esempio l'allumina ( $Al_2O_3$ ) viene impiegata per le sue ottime proprietà tribologiche, mentre l'idrossiapatite ed il carbonio pirolitico sono utilizzati rispettivamente per favorire l'osteo-integrazione e per rivestire materiali al fine di garantirne la biocompatibilità.

#### *1.1.4.3 Biomateriali polimerici*

Per la trattazione completa di questo paragrafo si faccia riferimento al capitolo successivo, dedicato interamente ai polimeri.

#### *1.1.4.4 Biomateriali compositi*

Al fine di unire le qualità migliori di diverse classi di materiali, si possono realizzare materiali compositi, costituiti cioè biomateriali dati dalla combinazione di materiali appartenenti a gruppi diversi. Un materiale composito presenta solitamente due parti distinte, con funzioni differenti: la matrice ed il rinforzo. La prima, più abbondante, ha il compito di distribuire il carico in maniera uniforme, mentre il rinforzo, presente in minore quantità, ha la funzione di incrementare le proprietà meccaniche della matrice. Solitamente, vengono preferiti materiali resistenti, quali i ceramici, per la funzione di rinforzo, in forma di particelle puntiformi o fibre, sia di piccole dimensioni che allungate, mentre saranno elementi più duttili e deformabili, quali

polimeri o metalli, a fungere da matrice. Risultano vantaggiosi in termini di facile modulabilità delle proprietà ma, considerata la scarsa coesione tra le due componenti, e dunque le scarse proprietà meccaniche (soprattutto a trazione), i materiali compositi vengono generalmente impiegati come riempitivi dentali e per la realizzazione di cementi ossei.

*Tabella 1.1 Principali caratteristiche delle diverse classi di biomateriali.*

<b>Materiali</b>	<b>Vantaggi</b>	<b>Svantaggi</b>	<b>Campi d'applicazione</b>
<b>Biologici</b> (vene, pericardio, valvole cardiache)	Ottima biocompatibilità	Scarsa affidabilità, difficile trattamento e conservazione	Protesi vascolari e valvolari, rivestimenti
<b>Ceramici</b> (ossidi di alluminio, alluminati di calcio, ossidi di titanio, carbonio)	Biocompatibilità, inerzia chimica, resistenza a compressione e corrosione	Bassa affidabilità meccanica, fragilità, difficile lavorabilità	Protesi d'anca e dentali, dispositivi percutanei
<b>Compositi</b> (metalli rivestiti con ceramici, matrici rinforzate con fibre)	Biocompatibilità, inerzia chimica, buone proprietà meccaniche, resistenza alla corrosione	Scarsa coesione tra i componenti, difficile lavorabilità	Protesi valvolari cardiache, protesi di ginocchio
<b>Metalli</b> (acciai, titanio e leghe, leghe di cobalto)	Elevate caratteristiche meccaniche e resistenza alla corrosione	Scarsa biocompatibilità, rigidità, alta densità e corrosione in ambiente biologico	Mezzi di osteosintesi, protesi per ortopedia ed odontoiatria
<b>Polimeri</b> (siliconi, poliuretani, acrilati, poliesteri)	Tenaci, bassa densità, facile lavorabilità	Bassa resistenza meccanica, degradazione nel tempo	Suture, cateteri, drenaggi, protesi cardiovascolari, cementi per ossa

## 1.2 Polimeri

### 1.2.1 Definizione

I polimeri vengono definiti come macromolecole organiche, risultanti dall'aggregazione di unità più semplici, dette monomeri, che si ripetono all'interno di una stessa struttura (dal greco *poly-meros*, che significa molte parti). Ciascun monomero è legato a quello adiacente da legami covalenti, per formare una lunga catena; inoltre, possono essere presenti anche legami deboli, come forze di Van der Waals o legami a idrogeno, che collegano due catene diverse o due parti della stessa. Tra le peculiarità dei polimeri si annoverano l'estesa variabilità di composizione, che permette di ottenere proprietà fisico-meccaniche adeguate al tipo di utilizzo previsto, un basso coefficiente d'attrito e una buona resistenza all'usura, facile processabilità e lavorabilità, in forme anche complesse, e in alcuni casi anche elevata biocompatibilità, dovuta alla normale presenza, all'interno del nostro corpo, di strutture polimeriche di origine naturale come proteine ed enzimi. In generale, dunque, si può affermare che le proprietà chimiche, fisiche e meccaniche di questi materiali possono essere determinate da una serie di fattori, tra cui la loro *composizione*, e quindi la tipologia e quantità di unità costituenti e la presenza o meno di gruppi funzionali, ma anche la loro *struttura*, ovvero l'organizzazione delle catene polimeriche all'interno della macromolecola. Come già più volte messo in evidenza, è proprio questa ampia variabilità di caratteristiche che rende questa classe di materiali estremamente versatile, ed è anche il motivo per il quale i polimeri sono spesso privilegiati rispetto agli altri materiali in termini di utilizzo in campo biomedico. In Figura 1.2 sono riportati alcuni esempi.

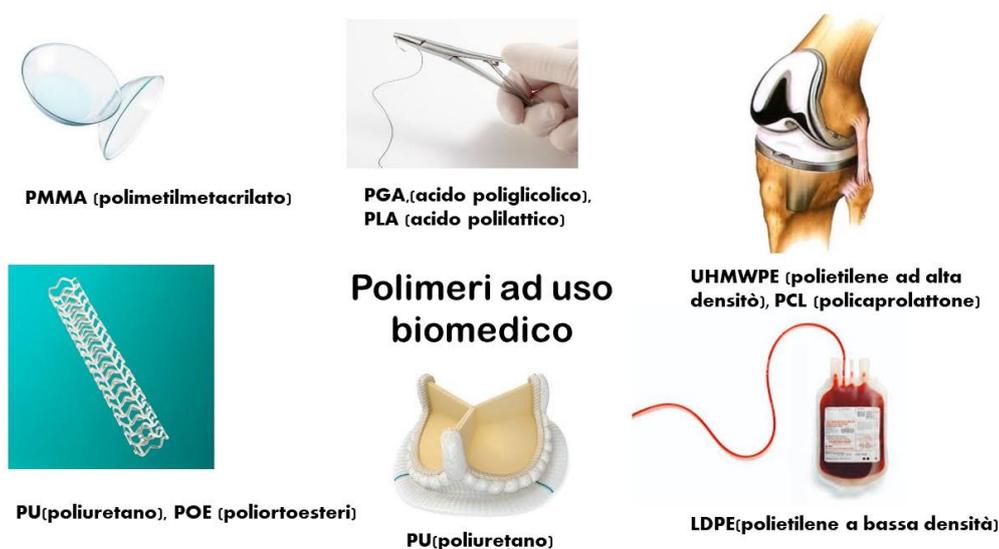


Figura 1.2. Esempi di applicazione dei polimeri in ambito biomedicale.

## 1.2.2 Classificazione

La classificazione dei polimeri si dimostra piuttosto complessa, data la molteplicità di caratteri distintivi che permettono di discriminare un polimero da un altro. Di seguito sono riportate le suddivisioni più comuni.

### 1.2.2.1 Origine

Come già accennato, in natura esistono numerosi polimeri, che si possono trovare all'interno di organismi viventi, come piante ed animali. Parliamo ad esempio di acidi nucleici, quali DNA ed RNA, il cui ruolo è quello di contenere e trasportare l'informazione genetica, di proteine, come il collagene, che ha funzione strutturale ed è presente nei tendini, nella cartilagine e nelle ossa. Altrettanto conosciuti sono la cellulosa e l'amido, che sono rispettivamente polimeri del glucosio e dell'alfa-glucosio, individuabili nelle piante. Tutti gli esempi appena elencati ricadono quindi nel gruppo dei *polimeri naturali*. A partire da questi, effettuando delle opportune modifiche a livello chimico, è poi possibile ottenere *polimeri artificiali*, come il rayon o la celluloido, entrambi derivati della cellulosa. Infine, è possibile trovare anche *polimeri sintetici*, che si differenziano dai precedenti dal momento che sono ottenuti mediante sintesi chimica. Ricadono in questo gruppo alcune plastiche comunemente utilizzate, come il polietilene, il polipropilene, il polivinilcloruro, il polistirene, i policarbonati, le poliammidi e i poliesteri, di cui si parlerà più ampiamente in seguito.

### 1.2.2.2 Unità costituenti

Il monomero, ovvero l'unità costitutiva del polimero, è una piccola molecola dal peso molecolare non elevato. Se i monomeri componenti la macromolecola sono tutti uguali fra di loro, il materiale risultante prende il nome di *omopolimero*. Esempi ne sono il polietilene (dato dalla ripetizione dell'etilene), il polipropilene (la cui unità ripetitiva è il propilene) e il polistirene (il cui monomero è appunto lo stirene), per quanto riguarda i polimeri sintetici, mentre se si considerano i polimeri naturali, occorre citare la cellulosa, l'amido ed il glicogeno. Nel caso in cui, a formare il polimero, concorrano invece due o più monomeri differenti, allora il materiale finale sarà un *copolimero*.

### 1.2.2.3 Struttura

La struttura dei polimeri è uno dei fattori che incide maggiormente sulle proprietà del materiale finale. Le principali organizzazioni delle catene all'interno della macromolecola possono essere suddivise in quattro categorie principali (Figura 1.3):

- *polimero lineare*, quando le catene, lunghe e filiformi, sono disposte una di seguito all'altra;
- *polimero ramificato*, se le catene, nonostante l'andamento lineare, presentano ramificazioni laterali;
- *polimero reticolato*, in cui le catene presentano ramificazioni trasversali, attraverso cui si legano ad altre catene;
- *polimero network*, in cui le ramificazioni presenti nelle catene si legano in modo covalente alle catene adiacenti, formando una sorta di struttura a rete tridimensionale.

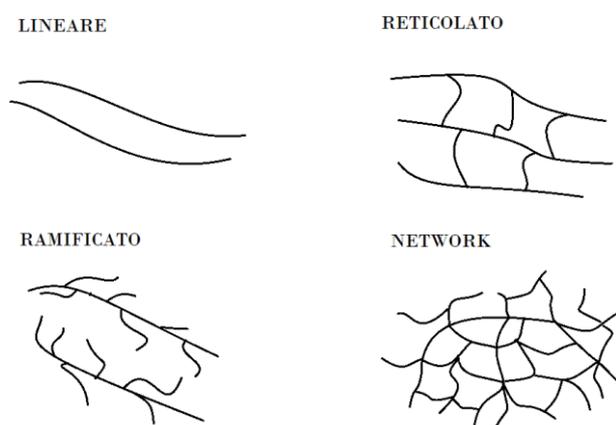


Figura 1.3. Esempi di polimeri a diversa struttura.

La diversa struttura è all'origine della diversa rigidità del materiale: nei primi due casi, infatti, poiché le catene sono legate tra loro da interazioni deboli, è possibile, in seguito a sollecitazioni, lo scorrimento viscoso di una catena sull'altra. Tuttavia, mentre nel caso dei polimeri lineari tale fenomeno risulta piuttosto semplice, nei secondi si dimostra più arduo, in quanto le ramificazioni costituiscono un elemento di ostacolo allo scorrimento. Per quanto riguarda invece i polimeri reticolati e network, la struttura che li caratterizza impedisce lo scorrimento viscoso di una catena sull'altra.

## 1.2.3 Proprietà

### 1.2.3.1 Grado di polimerizzazione e Peso Molecolare

Per quanto riguarda i polimeri sintetici, in fase di polimerizzazione le unità raggiungono valori sia di peso molecolare che di grado di polimerizzazione diverso da catena a catena e variabili

istante per istante, ed è la ragione per cui i polimeri possono essere classificati anche in base a questi due parametri.

Il grado di polimerizzazione (*Degree of Polymerization*, DP) di un polimero coincide sostanzialmente con il numero di unità monomeriche che costituiscono la macromolecola. In base al valore del DP, i polimeri possono essere suddivisi in:

- oligomeri, se  $2 < DP < 10$ ;
- bassi polimeri, se  $10 < DP < 100$ ;
- medi polimeri, se  $100 < DP < 1000$ ;
- alti polimeri, se  $DP > 1000$ .

Per quanto riguarda polimeri risultanti da molecole aventi stesso peso molecolare, il grado di polimerizzazione corrisponde semplicemente al rapporto tra il peso totale del polimero ed il peso della singola unità monomerica ( $M_0$ ). Invece, considerando i polimeri sintetici, si deve introdurre il concetto di grado di polimerizzazione medio, che verrà definito dopo aver introdotto il concetto di peso molecolare.

Il peso molecolare è un fattore estremamente importante da determinare, dal momento che influenza le proprietà termo-meccaniche dei polimeri. Come già detto, dato che spesso non è possibile stabilire un peso molecolare unico, solitamente si sceglie di fare riferimento a valori medi, che sono rispettivamente:

-il peso molecolare medio numerale  $M_n$ :

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} N_i M_i}{\sum_{i=1}^{\infty} N_i} = \frac{\text{Peso totale del polimero (di tutte le molecole)}}{\text{Numero totale delle catene}}$$

dove  $N_i$  è il numero di moli di peso molecolare  $M_i$ ;

-il peso molecolare medio ponderale  $M_w$ :

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} N_i M_i^2}{\sum_{i=1}^{\infty} N_i M_i}$$

Dal rapporto tra il valore di peso molecolare medio ponderale e di peso molecolare medio numerale si ricava un altro dato particolarmente importante, ovvero *l'indice di polidispersità*. Questo rapporto tenderà tanto più al valore unitario quanto più le catene hanno lunghezza simile fra di loro, mentre invece assumerà valori sempre maggiori tanto più il polimero è composto da catene di lunghezza diversa <sup>(4)</sup>.

Tornando alla definizione di grado di polimerizzazione, per quanto riguarda i polimeri sintetici, esso può essere espresso in funzione sia del peso molecolare medio numerale, sia del peso molecolare medio ponderale:

$$DP_n = \frac{M_n}{M_0}$$

oppure

$$DP_w = \frac{M_w}{M_0}$$

È possibile tracciare una curva che rappresenta la distribuzione di peso molecolare di un polimero in funzione del grado di polimerizzazione  $x$ , detta *curva di Distribuzione di Massa Molare o Peso Molecolare (MMD)*, come quella mostrata in Figura 1.4, in cui viene riportato in ordinata il numero di catene aventi una certa lunghezza  $x$  ed in ascissa la lunghezza delle catene stesse, in una tipica distribuzione a campana. L'indice di polidispersità è direttamente proporzionale alla larghezza di tale distribuzione, mentre i pesi molecolari medi possono essere calcolati tramite integrazione delle curve di distribuzione <sup>(5)</sup>.

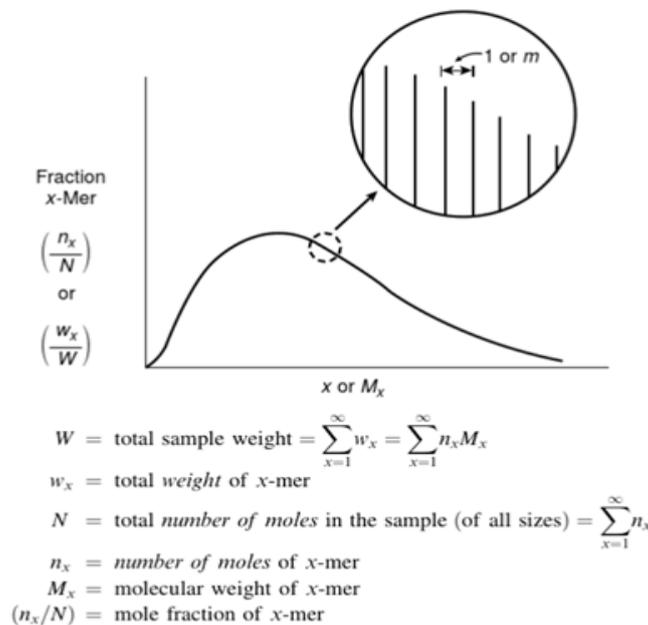
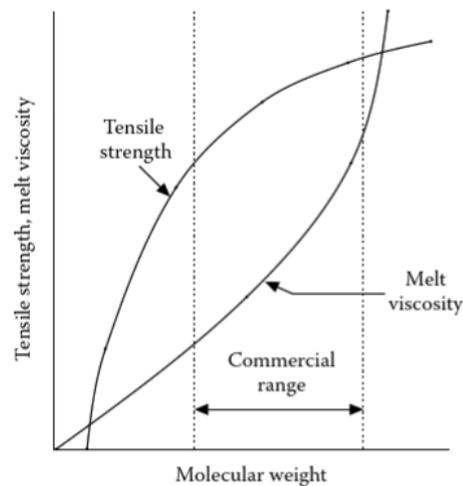


Figura 1.4. Esempio di curva di Distribuzione di Massa Molare o Peso Molecolare (MMD).

Come già detto, il peso molecolare incide notevolmente sulle proprietà meccaniche del materiale finale. In Figura 1.5 è riportato l'andamento della resistenza a rottura (e della viscosità) di un polimero in funzione del peso molecolare: si può notare come la resistenza del

materiale aumenti rapidamente all'inizio della curva, man mano che la lunghezza della catena aumenta, per poi stabilizzarsi in corrispondenza di un valore di plateau <sup>(6)</sup>. Per le applicazioni biomedicali, peso molecolare elevato e distribuzione relativamente stretta garantiscono buone performance e costituiscono dunque requisiti di primaria importanza.



*Figura 1.5. Andamento della resistenza a rottura e della viscosità di un polimero in funzione del peso molecolare.*

### *1.2.3.2 Cristallinità*

La cristallinità nei polimeri può essere intesa come il rapporto percentuale tra la sostanza in forma cristallina ed il peso totale, dove per forma cristallina si intende la disposizione delle catene costituenti secondo una struttura ordinata e ripetibile. Essendo le macromolecole composte da un numero molto elevato di catene, è molto difficile che tutte rispettino lo stesso andamento nello spazio, ed è il motivo per cui non esistono polimeri completamente cristallini. La maggior parte di essi risulta quindi parzialmente cristallina (o parzialmente amorfa); pertanto, solo alcune regioni sono caratterizzate da catene in grado di ordinarsi e cristallizzare, mentre le zone restanti, che non presentano alcuna regolarità, costituiscono la porzione amorfa del materiale, sempre presente (Figura 1.6) <sup>(7)</sup>.

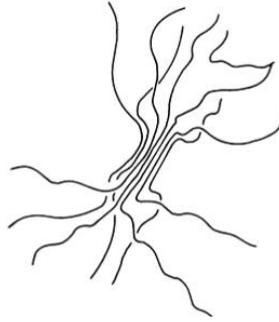


Figura 1.6. Esempio di fase cristallina e amorfa all'interno di un polimero.

Al fine di misurare quanto un materiale è cristallino, si introduce il concetto di *grado di cristallinità*, dato dal rapporto tra il peso della porzione cristallina e il peso totale del polimero. La cristallinità dipende da una molteplicità di fattori; in primo luogo incide sicuramente la tipologia di monomeri che forma le catene: se questi elementi risultano piccoli, semplici ed uguali tra loro, e danno luogo a strutture lineari, la cristallinità viene altamente sviluppata. Se, invece, i monomeri costituenti sono complessi, asimmetrici o contenenti ramificazioni (alle volte anche piuttosto lunghe e voluminose), il materiale difficilmente potrà cristallizzare <sup>(4)</sup>. La cristallinità può inoltre variare a seconda dei processi di lavorazione che subisce il polimero, e può essere indotta tramite particolari deformazioni e stiramenti, che fanno sì che le molecole si allineino tra di loro. Solitamente, materiali semicristallini risultano più rigidi e resistenti dei corrispondenti amorfi, a causa dell'elevato impaccamento delle catene polimeriche e, quindi, di una maggiore densità <sup>(5)</sup>.

Tra i principali metodi utilizzati per analizzare il tipo e la quantità di fase cristallina, figurano la diffrazione a raggi X, l'analisi calorimetrica e analisi dello spettro infrarosso <sup>(4)</sup>.

### 1.2.3.3 Proprietà termomeccaniche

Un'ulteriore modalità di analisi dei polimeri consiste nel valutarne il comportamento in relazione a cambiamenti di temperatura. Non a caso, la prima distinzione tra tipi di polimeri venne effettuata basandosi unicamente sulla risposta mostrata a seguito di determinati riscaldamenti e raffreddamenti; da queste prove risultò che esistevano sostanzialmente due classi di polimeri: *termoplastici* e *termoindurenti*. I primi, a struttura lineare o al più ramificata, con l'aumentare della temperatura, andavano incontro a rammollimento, e potevano essere quindi deformati con facilità; una volta che tali polimeri venivano fatti raffreddare,

riacquistavano la loro natura solida, e tale processo poteva essere ripetuto più volte, senza minare le proprietà intrinseche del polimero. I secondi, a struttura reticolata, potevano anch'essi essere rammolliti, ma solo a temperature elevate, e una volta raffreddati assumevano un comportamento molto rigido, che non permetteva ulteriori lavorazioni <sup>(4)</sup>.

L'effetto della temperatura sui polimeri non si ferma però a tale semplice distinzione, in quanto esistono diversi modi in cui questi materiali possono passare dalla fase solida a quella liquida, a seconda della struttura delle catene polimeriche (lineari, ramificate o reticolate), della cristallinità, ed ovviamente della temperatura a cui sono esposti.

Per ogni polimero possono essere individuate delle temperature fondamentali, che determinano un diverso comportamento meccanico (Figura 1.7):

- temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ): è la temperatura in corrispondenza della quale si ha il passaggio dallo stato vetroso a quello gommoso, ovvero il materiale passa dall'aver un comportamento prevalentemente rigido e fragile (tipico dei vetri), ad uno elasto-plastico (proprio dei materiali gommosi). Tale cambiamento, come si può notare in Figura 1.6, riguarda in maniera predominante i polimeri completamente amorfi, mentre in misura minore i semicristallini, portando ad una diminuzione del modulo elastico, ma non andrà in alcun modo ad alterare il comportamento dei materiali reticolati. La  $T_g$  dei materiali termoplastici è inferiore a quella dei termoindurenti.
- temperatura di rammollimento ( $T_r$ ): è una transizione che riguarda i materiali amorfi, ed è il passaggio di stato che porta il materiale dallo stato gommoso a quello di liquido viscoso, con conseguente ulteriore diminuzione delle proprietà meccaniche del materiale.
- temperatura di fusione ( $T_m$ ): è il punto oltre il quale il polimero si presenta allo stato fuso, e segna il punto di fusione della porzione cristallina del materiale. Determina un decremento delle proprietà meccaniche nei materiali semicristallini (dovuta appunto alla scomparsa dei cristalli), mentre nel caso dei termoindurenti non si verifica alcuna sostanziale variazione del modulo elastico.
- temperatura critica o limite di stabilità termica ( $T_L$ ): è la temperatura oltre la quale il materiale non risulta più fisicamente utilizzabile, in quanto si degrada a causa della rottura dei legami chimici che lo costituiscono.

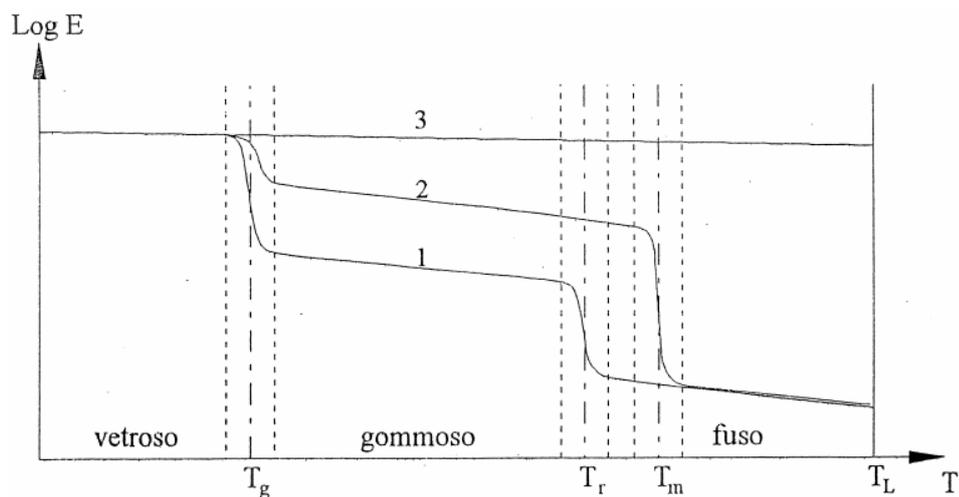


Figura 1.7. Andamento del modulo elastico in funzione della temperatura per polimeri amorfi (1), semicristallini (2) e reticolati (3).

#### 1.2.3.4 Strategie di sintesi

I polimeri vengono ottenuti attraverso reazioni dette di polimerizzazione, che legano fra loro i monomeri, attraverso legami chimici covalenti, per formare le catene polimeriche finali. I metodi di polimerizzazione principali sono essenzialmente due: poliaddizione e policondensazione.

- POLIADDIZIONE

Si tratta di una reazione a catena che prevede l'interazione ripetuta tra una molecola altamente reattiva (radicale, carbocatione, carboanione) ed un monomero caratterizzato dalla presenza di un legame doppio o triplo tra due carboni (Figura 1.8). La reazione inizia fornendo energia (sotto forma di calore, radiazione luminosa o energia chimica) al monomero, al fine di ottenere la prima molecola reattiva (ovvero uno dei due legami che uniscono gli atomi di carbonio si apre, così che ciascuno dei due atomi presenti un elettrone libero). Questo, durante la *fase di attivazione* (1), alla ricerca della stabilità, si unisce ad un altro monomero, andando a rompere il suo legame  $\pi$  (il più debole), e lasciando un elettrone spaiato, pronto ad essere coinvolto in un nuovo legame covalente. La successiva *fase di propagazione* (2) vede il prodotto della precedente reazione andare nuovamente a spezzare il legame  $\pi$  di un'altra unità monomerica, generando così una molecola più grande (un dimero), ma sempre instabile. Risulta a questo punto semplice comprendere il principio di allungamento della catena, ovvero la continua interazione tra prodotto precedente e nuovo

monomero. Il processo si conclude con la *fase di terminazione* (3), durante la quale, nei casi migliori, reagiscono insieme due catene crescenti oppure una catena ed un radicale, che, avendo ciascuno un elettrone spaiato, raggiungono infine la stabilità con la formazione di un nuovo legame covalente.

1.  $R \bullet + M \rightarrow RM \bullet$
2.  $RM \bullet \rightarrow RMM \bullet$   
 $RMM \bullet + nM \rightarrow RM_{n+1}M \bullet$
3.  $RM_nM \bullet + M \rightarrow RM_{n+1}R$   
 $RM_nM \bullet + RM_nM \bullet \rightarrow RM_{n+1} + RM_{n+1}$

*Figura 1.8. Schema del meccanismo di poliaddizione: 1. Fase di inizio; 2. Fase di propagazione; 3. Fase di terminazione.*

Esistono altresì situazioni in cui le due catene crescenti non si legano esattamente a livello dell'ultimo carbonio con l'elettrone spaiato: nel caso più semplice una delle due sottrae all'altra l'idrogeno legato al carbonio più vicino al sito attivo. In questo caso solo una delle due catene si conclude normalmente, dando luogo ad una macromolecola del polimero, mentre l'altra risolve la sua situazione di instabilità (biradicalica, visto che presenta due elettroni spaiati) tramite un doppio legame tra gli ultimi due carboni della catena. Questo tipo di reazione è detta di *disproporzionamento*. Nel caso in cui invece le due catene crescenti interagiscano tra loro in un punto lontano dal centro attivo, risolvere l'instabilità con il doppio legame non sarà possibile; pertanto il nuovo carbonio con l'elettrone spaiato darà luogo ad una ramificazione, ed il polimero risultante da questa catena sarà ramificato piuttosto che lineare. Infine, nel caso in cui una catena crescente termini legandosi ad un'altra molecola stabile (iniziatore, solvente, monomero), rompendo un suo legame, si ha la migrazione del centro attivo da una catena ad un'altra sostanza, e si parla quindi di reazione di *trasferimento di catena*.

I polimeri risultanti dalla poliaddizione sono costituiti, nella maggior parte dei casi, da catene molto lunghe e ad elevato peso molecolare. Come esempio modello può essere considerato il polietilene, polimero dato dalla ripetizione dell'unità monomerica etilene (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>). Altri esempi sono riportati in Figura 1.9.

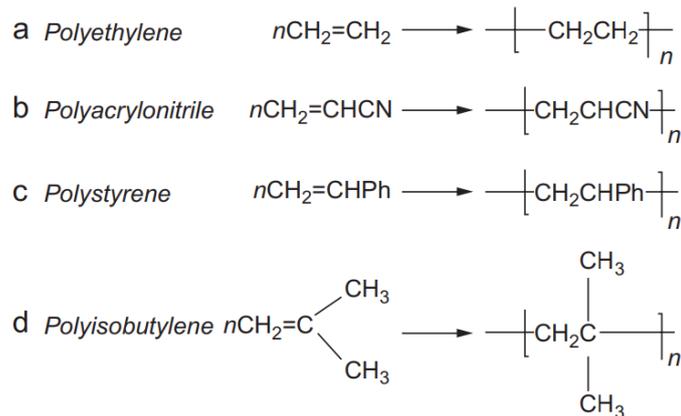
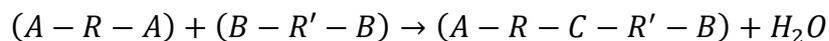


Figura 1.9. Esempi di polimeri ottenuti mediante poliaddizione.

- POLICONDENSAZIONE

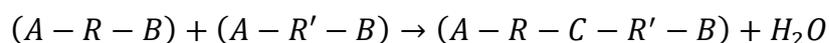
Affinché sia possibile una reazione di policondensazione, è necessario che i monomeri di partenza posseggano almeno due gruppi funzionali, come il gruppo alcolico, il gruppo amminico oppure il gruppo carbossilico, che reagiscono tra loro eliminando molecole più piccole come acqua, metanolo, acido cloridrico o cloruro di sodio. Con monomeri bifunzionali la policondensazione porta alla formazione di polimeri lineari, mentre nel caso di monomeri con tre o più gruppi funzionali si possono ottenere anche polimeri ramificati.

Ad esempio, la reazione di policondensazione che porta alla produzione di poliesteri può essere riassunta nello schema sotto riportato, a partire da monomeri contenenti due gruppi acidi (A) e due gruppi alcolici (B).



La lettera C sta ad indicare il gruppo funzionale estereo, formatosi in seguito all'interazione tra i terminali A e B del primo e del secondo monomero.

Mediante policondensazione vengono sintetizzate anche le poliammidi: in questo caso i monomeri di partenza presentano gruppi carbossilici (A) e gruppi ammidici (B).



Con C viene indicato questa volta il gruppo (COHN), contenente il legame ammidico (C-N). Una poliammide di particolare rilevanza nell'ambito delle plastiche è il nylon 6,6,

ottenuto per policondensazione (Figura 1.10) a partire da acido adipico (avente due gruppi carbossilici) ed esametildiammina (avente due gruppi amminici), utilizzato per realizzare fibre polimeriche altamente robuste.

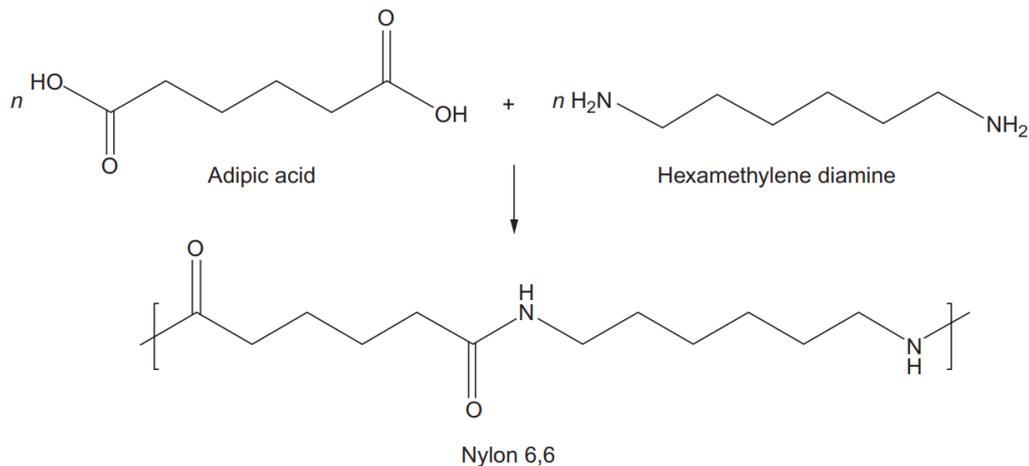


Figura 1.10. Schema di sintesi del Nylon 6,6

#### 1.2.3.5 Degradazione e Biodegradabilità

Per degradazione si intende la rottura chimica dei legami della catena principale o di quelle secondarie, che modifica le caratteristiche fisiche e le proprietà del polimero (resistenza alla trazione, colore, forma, ecc.). Di seguito si riportano le principali cause della degradazione dei polimeri:

- **Degradazione termica**

La degradazione termica è un fenomeno che consiste nella rottura dei legami del polimero a seguito dell'esposizione a temperature elevate. In ambito biomedico solitamente tale rischio non è presente, ma esistono diversi sistemi polimerici che rilasciano composti tossici a basso peso molecolare quando sottoposti a calore, e possono creare condizioni pericolose se entrano in contatto con il corpo umano, sia per ingestione che per inalazione. Per questo motivo è sempre bene valutare la stabilità termica del polimero prima di qualsiasi applicazione; questa dipende da molteplici fattori, tra cui la forza dei legami primari e delle interazioni secondarie, il meccanismo di scissione del legame, la regolarità della struttura, la rigidità del materiale, la presenza di reticolazioni o ramificazioni, l'eventuale presenza di ossigeno o altre sostanze nell'ambiente di degradazione<sup>(8)</sup>.

Dal punto di vista microscopico, esporre il materiale ad alte temperature significa fornire energia ai legami che tengono uniti i monomeri, facendo inizialmente acquisire alla

macromolecola una certa mobilità, ma portando infine ad una sua completa disgregazione. Andando nel dettaglio, si parla di *depolimerizzazione a catena* quando le singole unità monomeriche iniziano a distaccarsi dalla catena, partendo da una sua estremità o da un punto debole (un difetto, un iniziatore, ...). Si tratta di un processo che avviene in maniera lenta e progressiva, per cui le proprietà meccaniche non ne risultano immediatamente influenzate. Al contrario, in caso di *depolimerizzazione random*, dal momento che si ha la rottura di legami in maniera casuale all'interno della catena, il peso molecolare del polimero, così come le proprietà da esso dipendenti, subiranno un improvviso calo. Questi due tipi di degradazione termica possono verificarsi anche contemporaneamente tra loro.

Tra le plastiche che risentono maggiormente di tale degradazione si ricorda il PVC: questo polimero, infatti, a partire da 160° C inizia a degradare formando HCl come sottoprodotto, il quale funge poi da catalizzatore della reazione. Per questo motivo spesso viene aggiunto uno stabilizzante termico in fase di sintesi. Inoltre, sebbene i materiali termoplastici, come già detto, possano essere fusi e riutilizzati per un numero teoricamente illimitato di volte, il passaggio ripetuto ad alte temperature può causare un certo grado di degradazione termica, con conseguente diminuzione del peso molecolare <sup>(5)</sup>.

- **Degradazione fotochimica**

Un polimero può subire questo tipo di degradazione in seguito all'assorbimento di energia da radiazione luminosa. L'energia necessaria a rompere i singoli legami covalenti varia all'incirca da 165 a 420 kJ/mol, che corrisponde a radiazioni di lunghezza d'onda da 720 a 280 nm. Questo significa che una radiazione ultravioletta (300–400 nm), è sufficientemente potente da rompere la maggior parte dei singoli legami covalenti, ad eccezione dei legami forti come C–H e O–H. Teoricamente, polimeri sintetici puri (come polietilene, polipropilene, ecc.), grazie alla loro elevata regolarità strutturale, non dovrebbero assorbire lunghezze d'onda superiori a 300 nm e pertanto non andare incontro a questo tipo di degradazione. Nonostante ciò, la presenza di impurità e difetti potrebbe far sì che anch'essi ne risentano. Il processo può avere come conseguenze lo scolorimento (ingiallimento), la riduzione delle proprietà meccaniche del materiale, oppure entrambe <sup>(4)</sup>.

Nel caso in cui, assieme all'energia fornita dalla radiazione luminosa, sia presente l'ossigeno, i radicali liberi che si formano in seguito all'assorbimento di energia da parte del materiale possono reagire con l'ossigeno, dando prodotti quali i perossidi, e portando a cambiamenti nelle proprietà. Questo processo, che prende il nome di **degradazione foto-ossidativa**, può essere suddiviso in diverse fasi, come riportato in Figura 1.11.

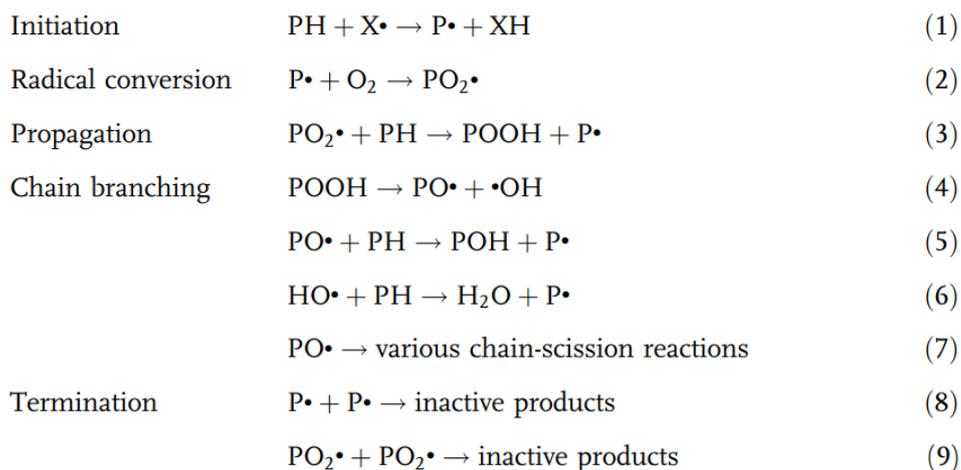


Figura 1.11. Schema del processo di degradazione foto-ossidativa (con P viene indicata una generica poliolefina)

Durante la *fase di iniziazione* si ha la formazione del radicale, che si ottiene fornendo una qualche forma di energia. Quindi, in ambiente ricco d'ossigeno, quest'ultimo va a reagire immediatamente con l'ossigeno per produrre radicali perossidici (*conversione radicalica*), che possono a loro volta estrarre atomi di H da molecole vicine per formare l'idroperossido (*fase di propagazione*). Si giunge quindi al passaggio fondamentale della degradazione, che è la decomposizione dell'idroperossido. Questa può avvenire fornendo energia sufficiente a spezzare il legame O-O, oppure può essere catalizzata dalla presenza di cationi metallici. Il processo si conclude con la *fase di terminazione*, nella quale avviene la ricombinazione dei macroradicali.

- **Degradazione fisica**

In tale categoria rientra l'insieme dei processi di degradazione a cui va incontro il materiale durante la lavorazione e l'utilizzo. In questo contesto giocano un ruolo fondamentale l'insieme degli agenti che possono portare al danneggiamento del polimero e, come risultato del processo di usura del materiale, alla formazione di un principio di crepa. Questa può avere origine a partire dai processi di lavorazione del polimero, come manifestazione di uno stress interno causato, ad esempio, da un raffreddamento non omogeneo; in alternativa la frattura superficiale può essere dovuta all'azione di agenti atmosferici (ad esempio esposizione a radiazioni e a cambiamenti di temperatura). Questi effetti sono difficilmente prevedibili, ma non devono essere trascurati.

- **Biodegradazione**

Una caratteristica di particolare interesse per quanto riguarda i polimeri, è la loro capacità di andare incontro a degradazione, anche totalmente, in ambienti biologici, spesso senza rilasciare sostanze nocive per l'organismo. Tale processo prende il nome di biodegradazione. Si possono individuare due tipi di biodegradazione, una a livello del *bulk* (idrolitica) e una superficiale (enzimatica). Per quanto riguarda la prima, essa avviene quando molecole d'acqua sono in grado di rompere i legami presenti all'interno delle catene polimeriche. Questo processo avviene a livello di tutta la massa del materiale, in quanto l'acqua è in grado di penetrare all'interno della macromolecola andando a rompere legami facilmente idrolizzabili (come ad esempio quelli esterei). In un primo momento, dunque, si verifica una perdita del solo peso molecolare; successivamente, quando i frammenti di catena sono sufficientemente piccoli per passare in soluzione, si avrà una diminuzione anche del peso gravimetrico. Un esempio di polimero naturale che subisce reazione di idrolisi, diventando glucosio, è la cellulosa (Figura 1.12).

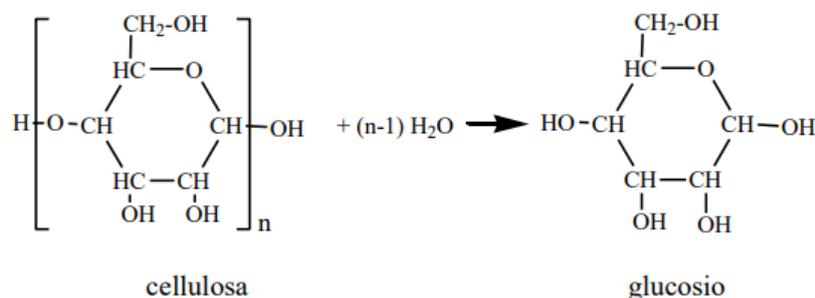


Figura 1.12. Degradazione idrolitica della cellulosa in glucosio.

Il secondo tipo di biodegradazione avviene per opera di enzimi, e si verifica prevalentemente a livello della superficie del materiale: tali microorganismi vanno a frammentare la catena polimerica in corrispondenza di specifici siti attivi, per poi degradarla a metaboliti ossidati (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O) <sup>(9)</sup>. In questo caso, quello che si osserva macroscopicamente è una diminuzione del peso gravimetrico, ma non di quello molecolare, in quanto il volume interno della macromolecola non è soggetto a degradazione.

Oltre ai meccanismi, è importante tenere conto anche della velocità a cui la biodegradazione avviene; essa dipende principalmente da quattro fattori fondamentali che intervengono sia nel caso di degradazione idrolitica che enzimatica:

- $T_m$ : dal momento che in corrispondenza della  $T_m$  le catene polimeriche presentano elevata mobilità e di conseguenza sono più facilmente attaccabili, maggiore è la differenza tra la temperatura di esercizio e quella di fusione del materiale, minore sarà la biodegradabilità (un discorso analogo può essere fatto per la  $T_g$ );
- Grado di cristallinità: polimeri maggiormente cristallini sono anche più lentamente degradabili. Infatti, la fase amorfa è la prima ad essere aggredita, in quanto la porzione cristallina, dato l'elevato grado di ordine ed impacchettamento delle catene, rende le catene stesse meno accessibili;
- Grado di perfezione dei cristalli: a parità di grado di cristallinità, cristalli piccoli e contenenti difetti vengono degradati più facilmente rispetto a strutture maggiormente impacchettate e pure;
- Idrofilicità: maggiore la bagnabilità della superficie polimerica, tanto più alta sarà la velocità di degradazione.

Incidono sulla velocità di degradazione anche il tipo di unità ripetitiva, composizione e lunghezza della sequenza, geometria, peso molecolare, area superficiale esposta, eventuale presenza di additivi e valore di pH dell'ambiente di degradazione, che possono produrre un considerevole effetto catalitico, in particolare sull'idrolisi dei legami estereo e ammidico <sup>(10)(11)</sup>.

#### 1.2.3.6 Tecniche di Lavorazione e Sterilizzazione

I materiali polimerici possono essere lavorati in forme molto diverse, come ad esempio fibre, film, ma anche forme molto più precise e complicate, a seconda della diversa applicazione prevista.

Per quanto riguarda la realizzazione di fibre polimeriche, la tecnica a cui si fa riferimento è la filatura (Figura 1.13). La *filatura per fusione* prevede che il polimero si trovi a una temperatura superiore alla  $T_m$ , e quindi allo stato fuso, prima di essere fatto passare attraverso una filiera, di matrice variabile. Segue poi una fase di raffreddamento a temperatura ambiente. Nei processi di filatura *a secco* e *ad umido* invece, il polimero viene innanzitutto sciolto fino a formare una soluzione; all'uscita dalla filiera, esso solidifica nel primo caso grazie ad un flusso d'aria calda che lo investe completamente, mentre nel secondo caso, in seguito al contatto con un fluido in cui la filiera è immersa.

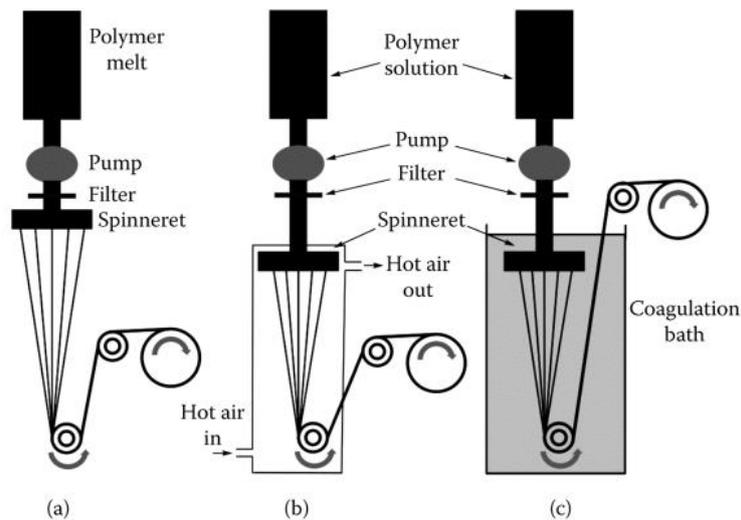


Figura 1.13. Schematizzazione delle tecniche di filatura a) per fusione; b) a secco; c) ad umido

I film polimerici vengono invece ottenuti secondo le tecniche di *solvent-casting* e *pressofusione*. La prima prevede innanzitutto la dissoluzione di un polimero in un opportuno solvente; la soluzione così ottenuta viene poi versata su di una superficie piana e non adesiva, ed in seguito all'evaporazione del solvente si otterrà un film particolarmente sottile. La pressofusione è un procedimento che sfrutta elevate pressioni e temperature, ed è dunque indicata per polimeri che mostrano una buona stabilità termica. Si parte da polveri o granuli del polimero, che vengono posizionati tra due fogli di alluminio o teflon e poi trasferiti all'interno di una pressa idraulica con piatti riscaldati. Una volta terminata l'azione della pressa, il film viene fatto raffreddare in compressione <sup>(12)</sup>.

Infine, per la realizzazione di manufatti tridimensionali di matrice polimerica, occorre fare una distinzione per i materiali termoindurenti e quelli termoplastici. Per quanto riguarda i primi, la tecnica più semplice è lo *stampaggio a compressione*: il materiale, leggermente riscaldato, viene condotto tramite l'azione di una pressa all'interno di uno stampo, fino al suo completo riempimento. Altrimenti si può procedere facendo colare all'interno della forma desiderata il materiale precedentemente fuso; questo metodo rende però impossibili successive lavorazioni. Per quanto riguarda i materiali termoplastici, oltre alle tecniche utilizzate per i termoindurenti, si può procedere anche mediante *stampaggio a iniezione* (Figura 1.14), in cui il polimero viene spinto all'interno dello stampo mediante pressione, oppure mediante *stampaggio per soffiatura*, in cui il materiale viene fatto aderire allo stampo per mezzo di un getto d'aria. Infine, i polimeri termoplastici possono essere lavorati in forma di barre e tubi tramite il processo di *estrazione*

(Figura 1.14), in cui i granelli plastici vengono riscaldati direttamente all'interno del macchinario, che poi li porta, grazie ad una vite senza fine, alla matrice in uscita.

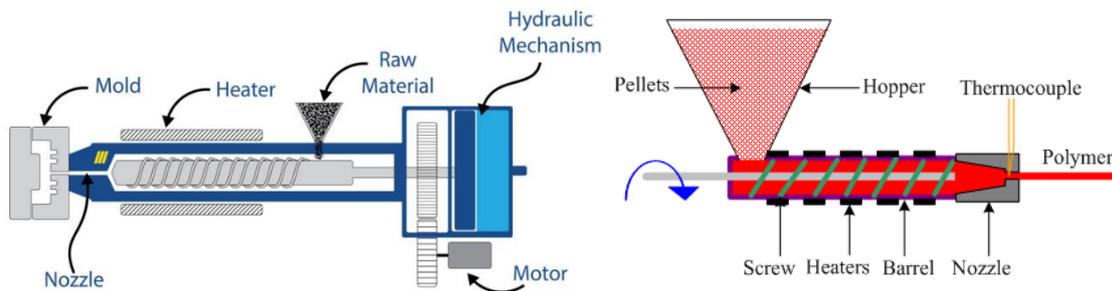


Figura 1.14. Schema della strumentazione per lo stampaggio a iniezione (sinistra) e per l'estrusione (destra).

Per quanto riguarda le applicazioni biomedicali, una volta ottenuto il manufatto nella forma, dimensioni e finitura desiderate, è bene procedere con il processo di sterilizzazione. Tale operazione mira a rimuovere qualsiasi tipo di particella vivente sulla superficie del campione, per evitare che venga a contatto con il corpo umano una volta che il dispositivo verrà impiantato. Tra i diversi metodi di sterilizzazione i più importanti sono:

- *sterilizzazione a calore secco*: esposizione del campione ad un getto di aria calda, con una temperatura compresa tra 160-190° C, per un massimo di due ore;
- *sterilizzazione a vapore*: procedura che prevede il posizionamento del materiale in autoclave, che lavora ad alte pressioni e medie temperature (inferiori ai 135° C); da non utilizzare su polimeri sensibili all'umidità;
- *sterilizzazione chimica*: caratterizzata da temperature piuttosto basse e l'ausilio di un gas (ossido di etene o gas a base di fenolo), comporta un basso rischio di danneggiamento del campione;
- *sterilizzazione a raggi gamma*: utilizza radiazioni prodotte dal  $^{60}\text{Co}$ , la cui energia può danneggiare i legami chimici dei polimeri.

### 1.3 Copolimeri

Quando due o più monomeri di diverso tipo si combinano tra loro si parla di copolimeri. Questi, a differenza degli omopolimeri, presentano proprietà variabili e modulabili a seconda del tipo, della quantità relativa, e della sequenza dei monomeri di partenza, del modo in cui tali unità

possono legarsi tra loro a formare la catena polimerica, delle condizioni di reazione, del peso molecolare e della sua distribuzione. Al fine di ottenere determinate proprietà, è quindi estremamente importante avere un buon controllo della reazione di copolimerizzazione.

### 1.3.1 Classificazione

In base alla disposizione delle co-unità all'interno del copolimero, si possono distinguere (Figura 1.15):

- Copolimeri alternati: in cui i monomeri si alternano in maniera regolare a formare la catena;
- Copolimeri a blocchi, in cui si alternano sequenze di un tipo di monomero con sequenze di un monomero di un tipo diverso. Si possono avere, ad esempio, copolimeri di-blocco A-B, copolimeri tri-blocco A-B-A o A-B-C, e così via, dove A, B e C rappresentano tre diversi tipi di co-unità;
- Copolimeri innestati o *graft*, dove la catena principale è costituita da un omopolimero, su cui poi si innestano ramificazioni di uno o più omopolimeri, diversi dal primo.
- Copolimeri random, se i monomeri non seguono alcun ordine di disposizione ma si alternano tra loro in maniera casuale.

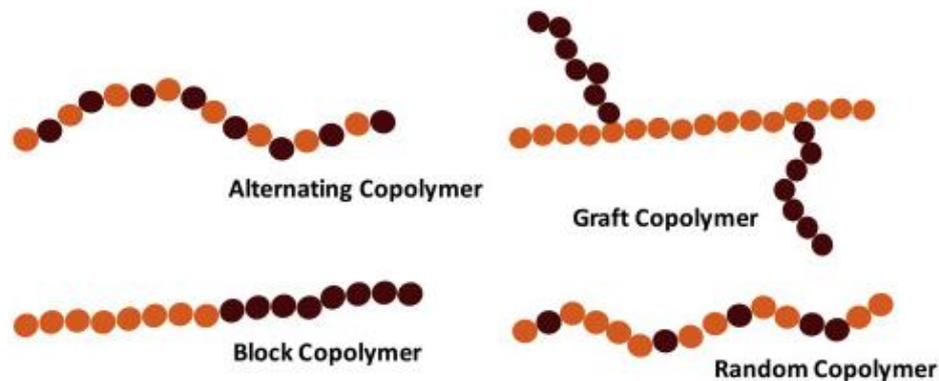


Figura 1.15. Diverse tipologie di copolimeri

## 1.4 Poliesteri

### 1.4.1 Definizione

I poliesteri sono una classe di polimeri identificabili dalla presenza di gruppi funzionali esterei lungo la catena principale, e possono essere ottenuti principalmente mediante policondensazione di uno o più acidi carbossilici polifunzionali con uno o più alcoli polifunzionali. Essi possono essere suddivisibili in due categorie distinte, a seconda della presenza o meno di anelli benzenici all'interno dell'unità monomerica: si avranno quindi, rispettivamente, poliesteri alifatici ed aromatici (Figura 1.16). Generalmente, i poliesteri aromatici possiedono proprietà meccaniche superiori a quelle degli alifatici, i quali a loro volta sono caratterizzati da biocompatibilità e biodegradabilità più elevate rispetto agli aromatici <sup>(13)</sup>.

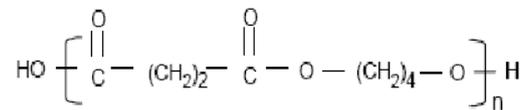


Figura 1.16. Struttura chimica di un generico poliesteri alifatico

I poliesteri alifatici rappresentano la classe di polimeri biodegradabili di maggior successo, importanza e diffusione commerciale in riferimento all'applicazione in campo biomedico, ad oggi ampliata rispetto al tradizionale impiego per la realizzazione di suture chirurgiche. Inoltre, tale classe è la più intensamente studiata in termini di meccanismi di degradazione e relazioni struttura-proprietà. La ragione di questo successo è da ricercare nella loro elevata biodegradabilità, dovuta sia alla facilità con cui il legame estereo è soggetto ad idrolisi, sia alla facile riassorbibilità dei prodotti di degradazione da parte dei meccanismi metabolici presenti all'interno del corpo. Tuttavia, occorre tenere presente che tali prodotti tendono ad abbassare il valore del pH locale, il che, a sua volta, accelera ulteriormente il processo di degradazione del poliesteri <sup>(14)</sup>. La più grande sfida legata allo sviluppo di questi materiali ha come scopo quello di ottenere polimeri processabili con la strumentazione già esistente, stabili sia durante la lavorazione sia al momento dell'utilizzo, e che degradino in tempi prestabiliti, rilasciando soltanto particelle atossiche per l'organismo ospite. Dal momento che la maggior parte dei polimeri ottenuti a partire da monomeri biologici risulta essere lineare ed alifatica, questi materiali tendono a presentare moduli elastici non elevati e basse temperature di fusione, proprietà che potrebbero limitarne le loro applicazioni. D'altro canto, la bassa temperatura di lavorazione li rende particolarmente idonei nell'ambito del rilascio controllato di farmaci,

vaccini, peptidi, proteine e altri composti di natura biologica, i quali risentono negativamente delle alte temperature.

#### 1.4.2 Poliesteri alifatici utilizzati in ambito medico

Di seguito sono riportati alcuni dei poliesteri alifatici (tutti approvati dalla *Food and Drug Administration*) che trovano applicazione nel settore biomedicale.

##### 1.4.2.1 Acido polilattico

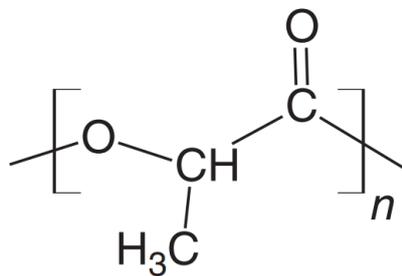


Figura 1.17. Struttura chimica dell'acido polilattico

L'acido polilattico (PLA) venne sintetizzato la prima volta nel 1932 da Wallace Carothers, chimico della DuPont. Inizialmente non ottenne particolare successo in quanto facilmente idrolizzabile, finché non venne preso in considerazione per i vantaggi, in termini di biodegradabilità, che invece poteva offrire in campo biomedico.

Il PLA può essere ottenuto mediante policondensazione diretta dell'acido lattico, che però porta ad un polimero dal basso peso molecolare e quindi con proprietà funzionali spesso non idonee per la maggior parte delle applicazioni, oppure mediante polimerizzazione per apertura d'anello a partire da dimeri ciclici, come ad esempio il lattide. Con questa seconda strategia è possibile ottenere un PLA con elevato peso molecolare <sup>(15)</sup>(Figura 1.18).

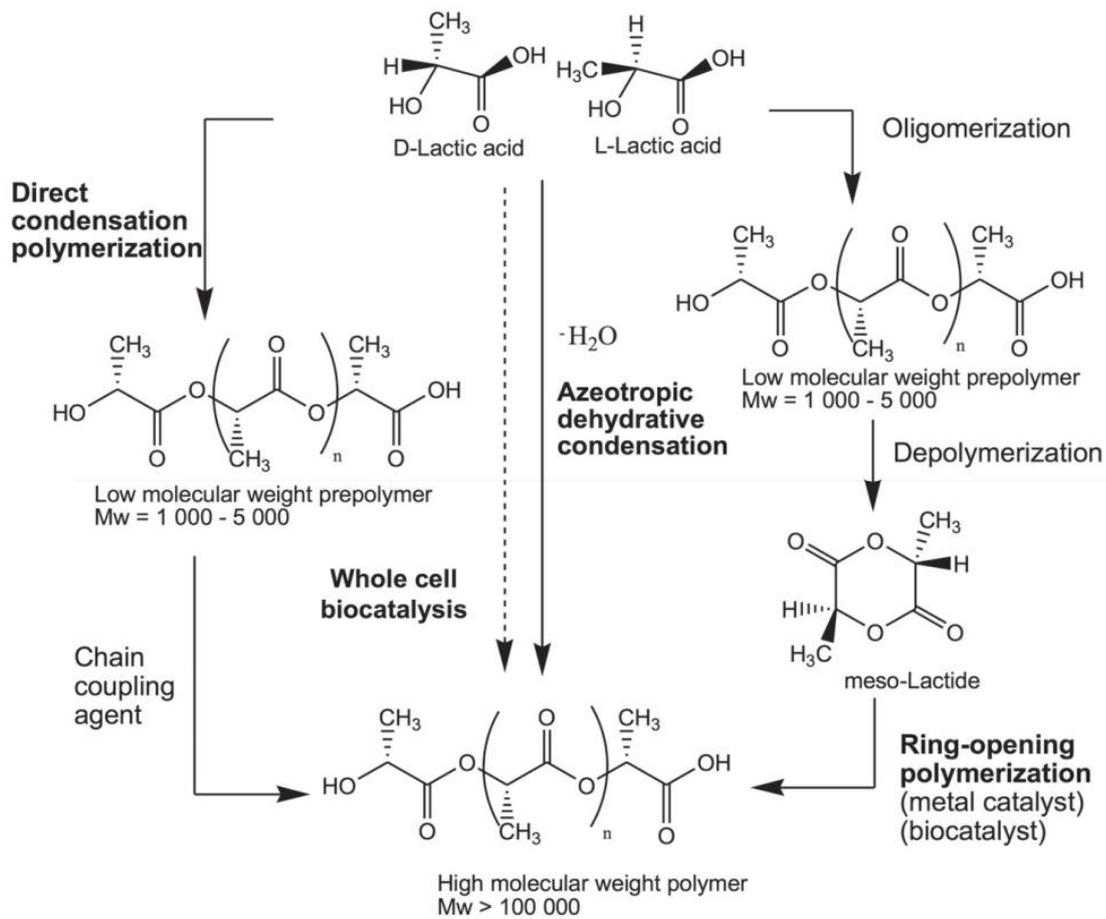


Figura 1.18. Strategie di sintesi del PLA

L'acido lattico presenta due isomeri ottici, L (+) e D (-), il primo preponderante rispetto al secondo (99.5% vs. 0.5%). (Figura 1.19).

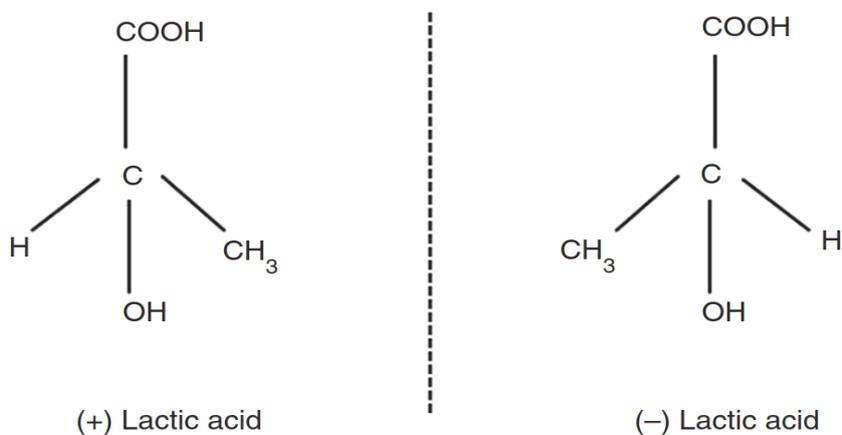


Figura 1.19. Struttura chimica dei due isomeri del PLA.

Di conseguenza, si possono ottenere differenti tipi di acido polilattico: acido poli L-lattico PLLA, acido poli D-lattico (PDLA), acido poli DL-lattico (PDLLA) e meso-polilattico (PLDLLA). Ciascuna di queste forme presenta caratteristiche differenti, riportate in Tabella 1.2.

Tabella 1.2 Principali caratteristiche dei diversi tipi di acido polilattico

Samples	PLLA	PDLA	PDLLA	PLDLLA
$T_g$ (°C)	62.1; 50–65	50–60	50–60	50–55
$T_m$ (°C)	106–122;170–190	165–187	Amorphous	—
Density (g cm <sup>-3</sup> )	1.25–1.29	1.24	1.27	1.3
Tensile strength (MPa)	0.08–1	—	0.04–0.05	32
Young's modulus (GPa)	2.7–16	3.2–7.9	1.5–1.9	2.3
Elongation at break (%)	30–40	—	5–10	5

Fra questi tipi, quello più utilizzato in campo biomedico è il PLLA, il più cristallino (circa 37%): questa caratteristica conferisce buone proprietà meccaniche al materiale (buona resistenza a trazione, ed elevato modulo elastico), che può quindi essere utilizzato per applicazioni strutturali. Viceversa, l'acido poli-DL-lattico (PDLLA), le cui unità L e D sono distribuite casualmente nella catena polimerica, risulta completamente amorfo, con prestazioni meccaniche molto inferiori rispetto al PLLA <sup>(16)</sup>.

L'acido polilattico ed i suoi copolimeri vengono largamente impiegati in ambito biomedicale per realizzare supporti per la rigenerazione dei tessuti, matrici per i sistemi di rilascio dei farmaci, suture, innesti vascolari e altri impianti chirurgici.

#### 1.4.2.2 Acido poliglicolico

L'acido poliglicolico o poliglicolide (PGA), la cui struttura chimica è riportata in Figura 1.20, è il più semplice membro della famiglia dei poliesteri alifatici lineari.

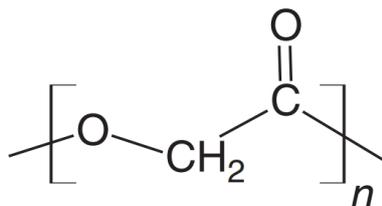


Figura 1.20. Struttura chimica del PGA

La sintesi dell'acido poliglicolico prevede due opzioni, equivalenti a quelle già viste per il PLA: si può ottenere per reazione di policondensazione a partire da molecole di acido glicolico, sconsigliata a causa del basso peso molecolare raggiunto dal prodotto, oppure tramite ROP a partire dal glicolide, che invece porta alla formazione di un polimero a più alto peso. È un polimero semicristallino (46-50%), con temperature di transizione vetrosa e di fusione rispettivamente di circa 36 e 225 °C. Le fibre di PGA presentano elevata resistenza a rottura e modulo elastico (circa 7 GPa), e vengono quindi utilizzate per la stabilizzazione di fratture, osteotomie e innesti ossei, nonché come supporto in caso di frattura di legamenti e tendini. Di contro, sebbene l'acido glicolico possa essere assorbito dalle cellule attraverso il ciclo dell'acido citrico, livelli elevati di questo monomero innescano una forte risposta infiammatoria all'interno dell'organismo <sup>(17)</sup>; per questo motivo, questo polimero è utilizzato raramente nella sua forma pura, ma piuttosto viene copolimerizzato con, ad esempio, acido polilattico e poli ε-caprolattone.

#### 1.4.2.3 Poli ε-caprolattone

Il policaprolattone (PCL), la cui struttura chimica è riportata in Figura 1.21, è un poliesteri alifatico semicristallino, caratterizzato da temperature di transizione vetrosa e di fusione rispettivamente di -60° C e 60° C, bassa resistenza a trazione ma elevato allungamento a rottura. Il PCL possiede inoltre un basso rateo di degradazione in vivo (circa 2-3 anni), che lo rende idoneo per la realizzazione di impianti semi-permanenti e di dispositivi a rilascio controllato di farmaco a lungo termine. Per quanto riguarda l'ingegneria tissutale, il PCL e i suoi copolimeri vengono usati come *scaffold* per la rigenerazione di legamenti, cartilagini, pelle, nervi e tessuti vascolari <sup>(14)(17)</sup>.

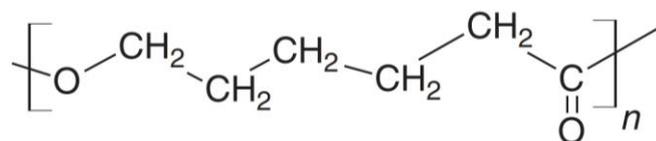


Figura 1.21. Struttura chimica del PCL

#### 1.4.2.4 Poli(butilene succinato)

Il polibutilene succinato (PBS) è un poliesteri alifatico che solo recentemente ha fatto il suo ingresso nel campo dei polimeri ad uso biomedicale. Venne sintetizzato per la prima volta da

Carothers nel 1931, ma il peso molecolare raggiunto non era particolarmente elevato <sup>(18)</sup>. Solo negli anni '90, grazie al crescente interesse in nuovi biopolimeri ed ai miglioramenti del processo di sintesi, è stato possibile ottenere PBS ad elevato peso molecolare, caratterizzato da buone proprietà meccaniche e facile processabilità.

## SINTESI

Il PBS viene comunemente sintetizzato mediante policondensazione in massa a due stadi (Figura 1.22), a partire da acido succinico (o il suo dimetil estere) e 1,4-butandiolo: durante il primo stadio, condotto a pressione atmosferica, si verificano reazioni di esterificazione tra acido succinico e 1,4-butandiolo (o transesterificazione nel caso del dimetil succinato) per ottenere oligomeri, con la produzione di acqua (o metanolo se si parte da dimetil succinato). La seconda fase, che consiste nell'ulteriore transesterificazione degli oligomeri, è condotta a temperature più elevate e a ridotta pressione, per facilitare la rimozione del butandiolo non reagito (generalmente si usa un eccesso di glicole di circa il 10-20%) ed ottenere PBS ad alto peso molecolare.

In fase di sintesi, vengono inoltre aggiunti catalizzatori metallici, solitamente a base di titanio, come il titanio (IV) tetrabutossido ( $\text{Ti}(\text{OBU})_4$ ) <sup>(19)</sup>. Più di recente è stata esplorata la possibilità di ottenere il PBS usando anche catalizzatori di tipo enzimatico <sup>(20)</sup>.

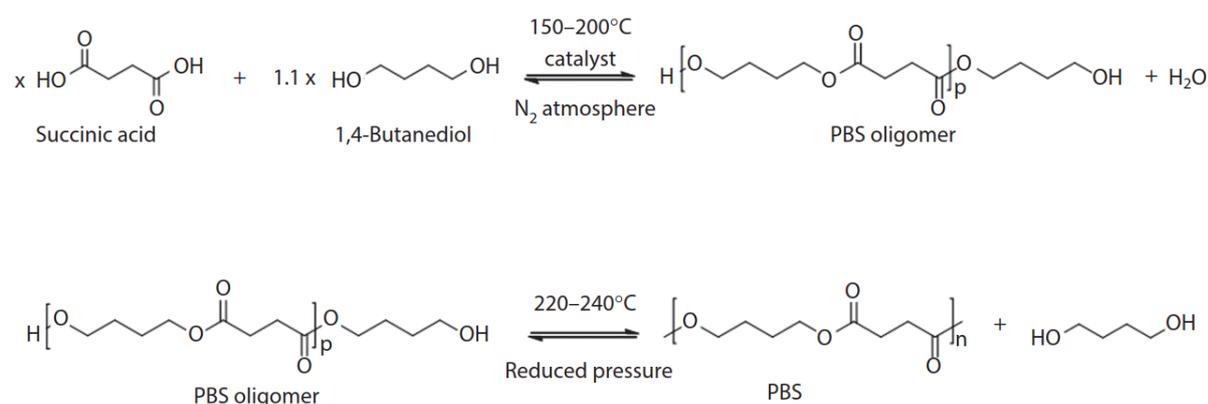


Figura 1.22. Schema di sintesi del PBS

Per quanto riguarda l'origine dei monomeri, l'acido succinico, oltre che da fonti fossili (come n-butano o n-butadiene), può essere ottenuto anche da fonti rinnovabili, ad esempio mediante fermentazione del glucosio, sfruttando il metabolismo anaerobico di alcuni batteri (*Bacteroides ruminicola*, *Bacteroides amylophilus*, *Enterococcus faecalis*) e di alcuni funghi (*Aspergillus strains*, *Byssochlamys nivea*, *Lentinus degener*) <sup>(21)</sup>. Sebbene questa tecnica di produzione non

sia ancora la più comune, col passare degli anni va affermandosi sempre di più: nel 2004, infatti, l'acido succinico è stato incluso, *dall'US Department of Energy*, tra i dodici monomeri a più alto potenziale per la sintesi di polimeri *bio-based*<sup>(22)</sup>. L'altro reagente, l'1,4-butandiolo, risulta essere anch'esso potenzialmente ottenibile da fonti rinnovabili, in quanto a sua volta è un derivato dell'acido succinico.

## PROPRIETA'

Il PBS è un poliestere altamente cristallino (circa 35-45%), con una temperatura di transizione vetrosa che varia dai -37 ai -31° C, e temperatura fusione sopra i 100 °C (113-115°C), una tra le più alte fra i poliesteri alifatici. Queste caratteristiche ne consentono la lavorazione mediante estrusione, stampaggio ad iniezione e termoformatura<sup>(23) (24) (25)</sup>.

Per quanto riguarda la risposta a sollecitazione meccanica, il PBS puro possiede un modulo di Young variabile nell'intervallo 300-500 MPa, a seconda del grado di cristallinità, resistenza a rottura compresa tra i 30–35 MPa e bassa deformazione a rottura (inferiore al 10%)<sup>(23) (25)</sup>.

In vista di potenziali applicazioni in ambito biomedico, occorre tenere presente che il PBS subisce degradazione sia di tipo idrolitico che enzimatico, anche se in tempi piuttosto lunghi. Per quanto riguarda la degradazione idrolitica, come già visto in precedenza, un PBS maggiormente cristallino tenderà a degradare più lentamente, dal momento che l'acqua attacca preferibilmente le regioni amorfe. In caso di degradazione enzimatica, invece, è stato verificato che tra i quattro ceppi maggiormente responsabili della degradazione (*Aspergillus versicolor*, *Penicillium*, *Bacillus* e *Thermopolyspora*) l'*Aspergillus versicolor* è risultato quello più efficace. Inoltre, in base alla forma del campione, si verificherà una degradazione più o meno rapida in funzione della maggiore o minore superficie disponibile all'attacco enzimatico<sup>(26)</sup>.

Un'altra proprietà cruciale per applicazioni che prevedono il contatto con l'organismo è la biocompatibilità: in questo senso sono stati condotti numerosi test, sia *in vitro* sia *in vivo*, sull'omopolimero e su diversi copolimeri, che hanno evidenziato buoni risultati. Ad esempio, nelle prove *in vitro* sono state prese in considerazione cellule di origine sia animale che umana, poste in contatto diretto o indiretto con la base polimerica, mentre nei test *in vivo* il materiale sintetizzato è stato impiantato in piccoli roditori come conigli e topi. Per quanto riguarda le diverse linee cellulari, negli studi *in vitro* sono state adoperate diverse tipologie, tra cui cellule staminali, fibroblasti, osteoblasti, condrociti, splenociti, cardiomiociti e cardiomioblasti. Inoltre, gli studi di citotossicità indiretta non hanno evidenziato differenze sostanziali tra il controllo negativo ed i materiali analizzati, confermando la biocompatibilità da contatto indiretto, così come diversi studi di immunostochimica, effettuati per determinare il grado di

mutazione cellulare indotta dal film polimerico, hanno dato esito negativo: le cellule poste in contatto con PBS e suoi copoliesteri hanno infatti mantenuto inalterati i marker caratteristici delle linee cellulari sane. Negli studi *in vivo*, strutture omo- o co-polimeriche a base di PBS sono state impiantate in piccole cavie: a fronte di una iniziale risposta infiammatoria, si è riscontrata una successiva stabilizzazione della zona d'impianto, a conferma della biocompatibilità anche *in vivo*.

Infine, test di citocompatibilità diretta e indiretta sono stati condotti anche su materiali elettrofilati a base di PBS, mostrando esiti assolutamente positivi: le cellule infatti sono state in grado non solo di proliferare, ma anche di produrre la loro matrice extracellulare. In aggiunta, test di differenziamento condotti utilizzando cellule staminali, hanno confermato come sia stato possibile indurre efficacemente il differenziamento su tali cellule, verso il fenotipo previsto <sup>(23)</sup>. Al fine di modularne le proprietà in funzione delle diverse applicazioni, il poli(butilene succinato) può essere copolimerizzato, introducendo diversi tipi di co-unità, sia alifatiche che aromatiche, per realizzare nuovi copolimeri a diversa architettura molecolare. Ad esempio, nel caso del poli(butilene succinato-co-adipato) (PBSA), introducendo diverse percentuali di co-unità alifatica BA è possibile ottenere materiali con una maggiore flessibilità rispetto al polimero di partenza. Se invece si introduce una co-unità aromatica, come nel caso del poli(butilene succinato-co-tereftalato) (PBST), si può ottenere un materiale caratterizzato da una maggiore resistenza a rottura <sup>(25)</sup>. Sono stati inoltre studiati altri sistemi copolimerici contenenti ad esempio acido polilattico, poli  $\epsilon$ -caprolattone, poliidrossialcanoati, carbonati ciclici e poli(butilene tereftalato) <sup>(23)</sup>. Inoltre, presso il gruppo di ricerca in cui è stata svolta la presente Tesi, che da anni lavora sul PBS e i suoi copolimeri e ha maturato una solida esperienza nel campo, sono stati studiati diversi sistemi copolimerici sia statistici che multiblocco, ottenuti introducendo all'interno della catena del PBS diversi tipi di co-unità alifatiche <sup>(27)(28)</sup>, contenenti anche ossigeni eteri <sup>(23) (29) (30) (31) (32) (33)</sup>. Questi materiali sono stati sottoposti a test di biocompatibilità, per verificarne la potenzialità per applicazioni in ambito biomedicale, utilizzando diverse linee cellulari, attraverso studi di crescita e adesione cellulare e, in alcuni casi, anche di differenziamento <sup>(34) (35) (36)</sup>. Tutte le prove effettuate hanno comprovato la biocompatibilità dell'omopolimero e dei relativi copolimeri.

## UTILIZZI

Nonostante le ottime caratteristiche presentate, il PBS trova ancora oggi il suo impiego principale in settori diversi dal biomedicale. In quello agrario ad esempio, il poli(butilene succinato) è adoperato per la produzione di film protettivi per la pacciamatura ma anche per la

realizzazione di vasi ed altri contenitori. Nel settore degli imballaggi, invece, è utilizzato per la produzione di confezioni e sporte biodegradabili, che vanno a sostituire le equivalenti non compostabili a base di polipropilene, polietilene o polistirene. Nel settore biomedicale, infine, questo materiale è stato studiato per applicazioni in ingegneria tissutale, per la realizzazione di *scaffold* destinati alla sostituzione o riparazione di tessuti non troppo rigidi <sup>(27)</sup>, e come materiale per dispositivi a rilascio controllato di farmaci e principi attivi di vario genere.

### 1.4.3 Polimeri contenenti legami disolfuro

L'interesse per i polimeri contenenti legami disolfuro (-S-S-), in accordo con i dati riportati in letteratura, è molto recente, soprattutto per quanto riguarda i poliesteri. Solo negli ultimi anni, infatti, sono stati riportati studi su diversi poliesteri alifatici contenenti un numero variabile di legami disolfuro in catena, ottenuti principalmente a partire da acido ditiodipropionico e ditiodiglicolico, caratterizzati da buona stabilità e da biodegradabilità variabile in funzione del numero di legami -S-S-.

Questo tipo di legame, presente anche nelle proteine, risulta particolarmente interessante, in quanto è considerato un legame "dinamico". Esso, infatti, è generalmente stabile, ma può funzionare da trigger, ovvero da innesco, rompendosi ed eventualmente riformandosi sotto diverse sollecitazioni (calore, pH, luce, ecc...): ad esempio, la scissione può avvenire in condizioni anaerobiche (riduttive), mentre in condizioni ossidative, ovvero in presenza di ossigeno, il legame può riformarsi, mantenendo inalterate le proprietà meccaniche del materiale di partenza.

Per queste ragioni, i polimeri contenenti legami disolfuro, già noti per essere buoni ritardanti di fiamma nonché buoni materiali conduttori, sono stati studiati in ambito biomedicale soprattutto per quanto riguarda il rilascio controllato di farmaci e altre molecole (geni e principi attivi di vario genere) in un sito specifico dell'organismo. Ad esempio, sono state realizzate micelle, anche in combinazione con poliesteri alifatici come il poli  $\epsilon$ -caprolattone, per il rilascio di chemioterapici in maniera mirata: il tessuto malato, infatti, è caratterizzato da pH acido e un ambiente fortemente riduttivo, in cui il legame -S-S- può rompersi e far sì che venga rilasciato il principio attivo <sup>(37)</sup><sup>(38)</sup>. È stato inoltre possibile, in vista di applicazioni in ingegneria tissutale ottenere materiali caratterizzati da memoria di forma e con ottime proprietà meccaniche <sup>(39)</sup>, ma anche idrogel in cui, mediante l'applicazione di opportune sollecitazioni meccaniche, è possibile apportare modifiche alle caratteristiche del materiale, al fine di favorire l'adesione cellulare <sup>(40)</sup>.

Occorre poi tenere presente che, mentre fino al secolo scorso monomeri contenenti legami disolfuro venivano sintetizzati con basse rese e a partire da reagenti altamente tossici, oggi essi possono essere ottenuti a partire da microorganismi come *Ralstonia eutropha*, *Escherichia coli* o *Advenella mimigardefordensis* opportunamente ingegnerizzati, caratteristica che potrebbe aprire la strada ad una loro produzione su larga scala <sup>(41)</sup>.

## 1.5 Applicazioni biomedicali

### 1.5.1 Ingegneria tissutale

*“Regenerative Medicine is an emerging interdisciplinary field of research and clinical applications focused on the repair, replacement or regeneration of cells, tissues or organs to restore impaired function resulting from any cause, including congenital defects, disease, trauma, and aging.”* (Dr. C. Mason and Dr. P. Dunnill, 2008)

La definizione di ingegneria tissutale (o medicina rigenerativa) sopra riportata è solo l'ultima di una serie di definizioni che si sono susseguite nel corso degli anni nel tentativo di chiarire l'obiettivo di questa branca dell'ingegneria. In generale, lo scopo della medicina rigenerativa è quello di replicare e rigenerare tessuti e organi del corpo umano. Nell'ultimo decennio, la ricerca sull'ingegneria dei tessuti si è notevolmente ampliata, soprattutto in ambito cardiovascolare e dell'apparato muscolo-scheletrico: sono stati ricostruiti infatti vasi sanguigni, pompe cardiache a base cellulare, ma anche tendini, tessuto osseo e cartilagine. Ad oggi, le principali sfide sono legate alla realizzazione di tessuti più complessi, come quello epatico, che possiede proprietà autorigenerative, o quello nervoso, caratterizzato da una molteplicità di connessioni finora difficilmente riproducibili. Uno dei principali vantaggi che la crescita di questo settore potrebbe portare, è sicuramente la riduzione, o addirittura l'eliminazione, delle problematiche legate ai trapianti di organi: la possibilità di progettare in laboratorio tessuti e organi in relazione alle specifiche esigenze del paziente costituirebbe una vera e propria rivoluzione in ambito medico, portando sia ad una riduzione dei tempi di attesa (che si traduce in un minor tasso di mortalità), sia ad una drastica diminuzione del rischio di rigetto dell'organo stesso. In aggiunta, la possibilità di sostituire i tessuti danneggiati con quelli ingegnerizzati potrebbe portare alla guarigione completa da malattie che al giorno d'oggi non sono curabili con farmaci o sono farmaco resistenti, come ad esempio diverse forme di cancro, diabete, oppure patologie allo stato avanzato, come morbo di Parkinson e di Alzheimer.

## LA TRIADE

Per quanto la realizzazione di un tessuto artificiale possa sembrare a prima vista un processo estremamente complesso, il punto di partenza consiste nella determinazione di tre componenti fondamentali, che definiscono la cosiddetta triade dell'ingegneria tissutale (Figura 1.23). Tale triade si compone di cellule, di supporti tridimensionali, detti *scaffold*, realizzati a partire da biomateriali di diverso tipo, ed infine di bioreattori, all'interno dei quali le cellule crescono in opportune condizioni e grazie al supporto di specifici fattori di crescita.

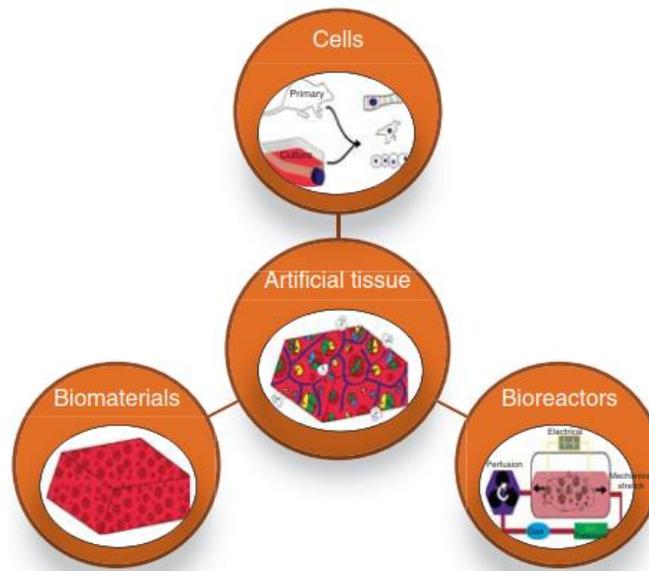


Figura 1.23. Triade dell'ingegneria tissutale

## CELLULE

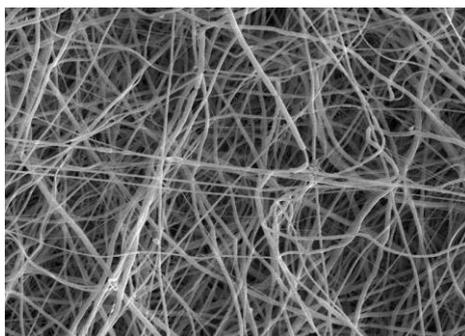
Le cellule, unità costituenti qualsiasi tessuto, sono il punto di partenza per la creazione di organi sostitutivi artificiali. Si può scegliere di espianarle da un tessuto con proprietà equivalenti a quello che si vuole realizzare, oppure si può partire da cellule staminali, le quali possiedono la particolarità di differenziarsi e specializzarsi in diversi fenotipi. Generalmente, ove possibile, le cellule staminali vengono prelevate dallo stesso paziente, per evitare una risposta immunitaria: si parla in questo caso di cellule autologhe. Data tuttavia la scarsa reperibilità di queste ultime, non è raro il caso in cui si ripieghi su altre fonti, come altri donatori compatibili, ricorrendo quindi a cellule allogene, oppure si faccia uso di cellule provenienti da una specie diversa da quella del ricevente, ed in tal caso si parla di cellule xenogene. In questi casi, però, il rischio di una risposta immunitaria negativa aumenta vertiginosamente. Tra le cellule staminali occorre fare una distinzione tra cellule adulte e cellule embrionali. Le prime, che ad

oggi sono quelle maggiormente impiegate data la loro reperibilità in differenti “nicchie” dell’organismo, posseggono tuttavia una differenziazione limitata, legata al sito di prelievo (ad esempio cellule staminali neurali isolate dal tessuto cerebrale, una volta indotte a differenziarsi daranno vita solo a cellule neurali). Questa limitazione potrebbe essere superata impiegando cellule staminali embrionali, che possiedono un potenziale di differenziamento pressoché illimitato, ma il cui utilizzo è ancora controverso e limitato da questioni etiche. Recentemente, però, è stata sviluppata una tecnica (premiata con un Nobel nel 2012) in grado di far acquisire a cellule staminali adulte lo stesso potenziale di differenziamento delle cellule embrionali. Tali cellule, dette staminali pluripotenti, potrebbero aprire la strada ad una vera e propria rivoluzione nel mondo delle cellule staminali <sup>(42)</sup>.

## BIOMATERIALI

Nel corso degli anni sono stati utilizzate diverse classi di biomateriali nel campo dell’ingegneria tissutale per la realizzazione di *scaffold*; essi sono delle vere e proprie “impalcature” tridimensionali progettate per favorire la corretta crescita e proliferazione delle cellule, e con porosità tale da garantire l’ingresso di sostanze nutritive all’interno della matrice e la fuoriuscita delle sostanze di scarto (legate al naturale metabolismo cellulare). Al fine di produrre una matrice il più somigliante possibile alla matrice extracellulare prodotta dalle cellule all’interno dei tessuti, occorre tenere presente due fattori determinanti: le caratteristiche del biomateriale e le tecniche di lavorazione. Le proprietà meccaniche del materiale (in termini di elasticità, rigidità, compattezza, etc...) devono essere decise in base al tipo di tessuto da replicare: uno *scaffold* costruito per la sostituzione di un tessuto osseo, quindi resistente e compatto, non avrà di certo le stesse caratteristiche di uno destinato al tessuto cardiaco o polmonare. Un altro requisito essenziale è la biodegradabilità, con una velocità di degradazione compatibile a quella di proliferazione cellulare.

La tecnica di lavorazione utilizzata per creare lo *scaffold* è anch’essa decisiva, in quanto possono essere realizzate forme estremamente differenti: ad esempio, mediante elettrofilatura (di cui si parlerà ampiamente nel prossimo paragrafo) si possono ottenere strutture fibrose e altamente porose, con fibre disposte in maniera casuale o allineata (Figura 1.24), mentre con la tecnica del congelamento a secco e di separazione di fase indotta termicamente si possono ottenere strutture a porosità controllata. Esistono, tuttavia, anche *scaffold* ottenuti mediante decellularizzazione di una matrice extracellulare (ECM) estratta da un tessuto allogeneico o xenogeneico, successivamente revitalizzata attraverso l’inserimento della nuova popolazione cellulare <sup>(43)</sup>.



*Figura 1.24. Immagine SEM di uno scaffold elettrofilato.*

Tenuto conto di tutti questi fattori, appare evidente come i materiali polimerici rivestano un ruolo di particolare rilievo, per i vantaggi che offrono in termini di biocompatibilità, biodegradabilità e lavorabilità, rispetto alle altre classi di materiali precedentemente analizzate.

## BIOREATTORI

Dopo aver fornito alle cellule una struttura adeguata in cui poter proliferare, è necessario fornire loro anche gli stimoli giusti affinché crescano e sintetizzino la loro matrice extracellulare. Tali segnali provengono normalmente dal microambiente nel quale le cellule sono immerse, e che vengono percepiti da opportuni recettori di membrana, oppure possono avere origine direttamente all'interno delle cellule stesse. In ogni caso, è stato attestato che tessuti differenti richiedono combinazioni di stimoli differenti, e replicare tali segnali rappresenta dunque una sfida per l'ingegneria tissutale. Gli stimoli possono avere natura molteplice: possono essere di tipo fisico (temperatura), chimico (livelli di ossigeno e CO<sub>2</sub>), biologico (terreni di coltura), ma anche meccanico <sup>(43)</sup>, e vengono forniti alle cellule mediante l'impiego di bioreattori. Essi sono dispositivi costituiti da vari elementi: una camera tissutale che ospita il costrutto, dei serbatoi dei terreni di coltura cellulare ed infine dispositivi periferici come pompe o sensori, che hanno il compito di mantenere il sistema in condizioni (in termini di temperatura, atmosfera, pH, ecc...) compatibili con la proliferazione cellulare. <sup>(44)</sup>. In Figura 1.25 sono riportati alcuni esempi di bioreattori.

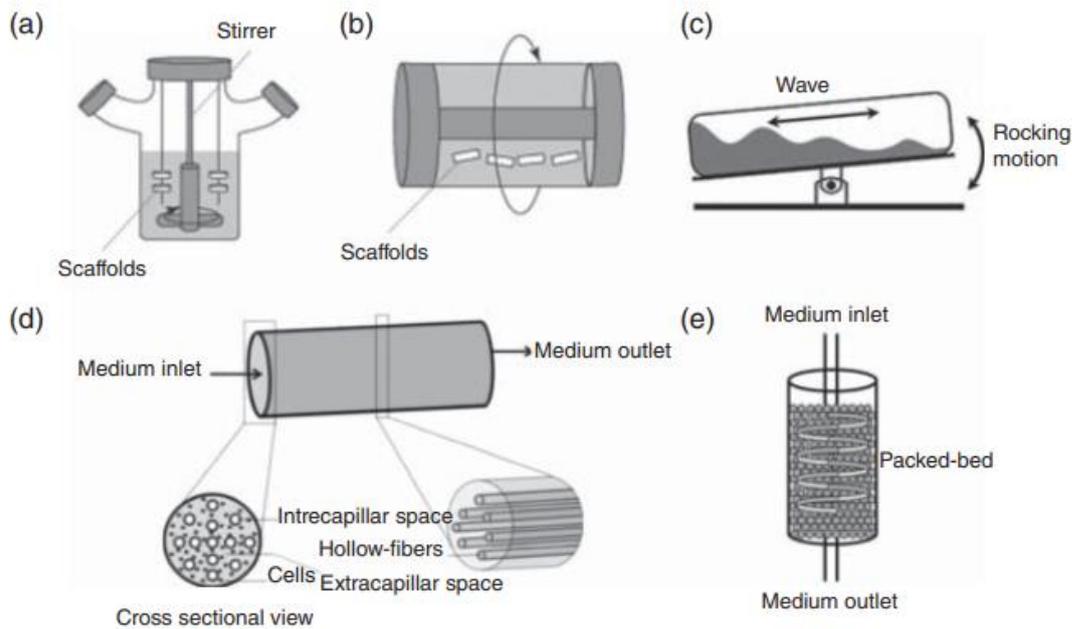


Figura 1.25. Esempi di diversi tipi di bioreattore: a) bioreattore spinner-flask; b) bioreattore a parete rotante; c) bioreattore a onde; d) bioreattore a fibre cave; e) bioreattore a letto fisso.

Una volta che il costrutto esce dal bioreattore, è dunque pronto per essere impiantato. Riassumendo, i passi che portano alla realizzazione di un tessuto ingegnerizzato sono quelli riportati in Figura 1.26.

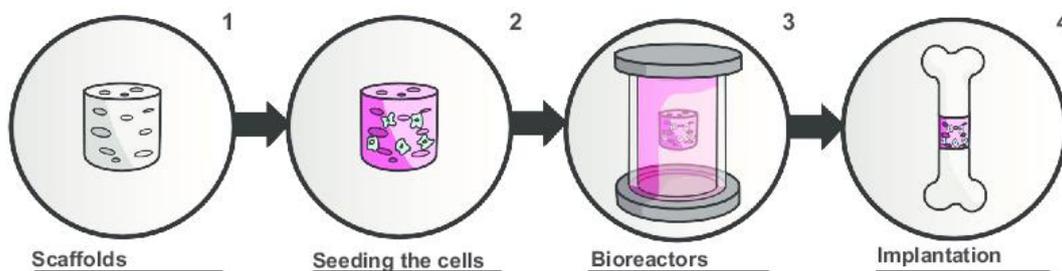


Figura 1.26. Step di realizzazione di un costrutto in ingegneria tissutale

### 1.5.2 Rilascio controllato di farmaco

Il *controlled drug delivery*, detto anche rilascio controllato di farmaco, è una disciplina che mira allo sviluppo di sistemi in grado di somministrare un farmaco in una specifica parte del corpo con una cinetica predeterminata. Attraverso questa tecnica è possibile superare alcuni limiti della somministrazione tradizionale, quali dosaggi ripetuti e in quantità non sempre ottimali, in

quanto inizialmente superiori a quelle necessarie, ma che raggiungono dopo poco tempo un valore al di sotto di quello minimo di efficacia <sup>(45)</sup>.

I sistemi a rilascio controllato, dunque, possono portare enormi vantaggi in termini di riduzione degli effetti collaterali e di maggiore compliance del paziente: infatti, il farmaco viene rilasciato in maniera mirata solo nello specifico tessuto in cui è necessario, minimizzando il dosaggio e migliorando l'efficienza terapeutica.

Un ulteriore obiettivo del *Controlled Drug Delivery* è quello di mantenere la concentrazione del farmaco ad un determinato livello (inferiore a quello di tossicità ma superiore a quello di efficacia) per un certo intervallo di tempo, contrariamente ai profili tradizionali di rilascio, che prevedono la somministrazione di un'unica dose, in maniera singola o a rilascio prolungato nel tempo (Figura 1.27). Attraverso questi sistemi innovativi si può dunque ottenere un profilo di rilascio controllato, con velocità praticamente costante per tutto l'intervallo di azione previsto.

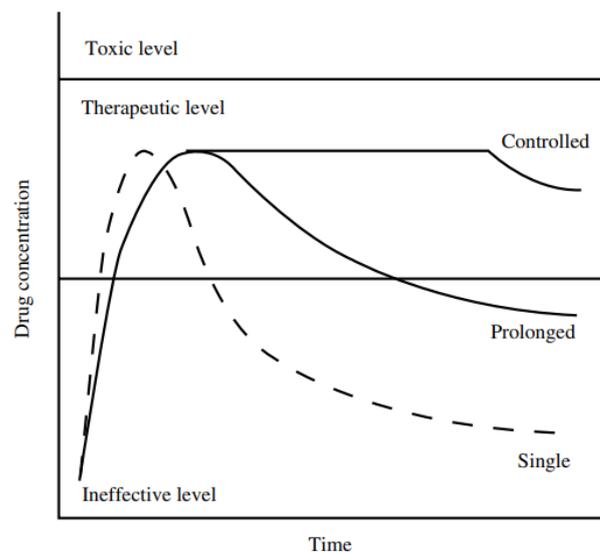


Figura 1.27. Esempi di profili di rilascio controllato, prolungato e singolo.

A loro volta, i sistemi a rilascio controllato possono essere suddivisi in sistemi a *reservoir*, se il farmaco è contenuto all'interno di un serbatoio racchiuso da un involucro cavo, e sistemi a matrice, in cui il farmaco è disperso in maniera uniforme all'interno di una matrice (Figura 1.28). Nel primo caso il rilascio del farmaco avviene per diffusione attraverso la membrana semipermeabile, per azione della pressione osmotica, o tramite un piccolo orifizio che può essere creato tramite laser. Questo sistema risulta poco sicuro, poiché nell'ipotesi in cui la membrana si rompa improvvisamente, si ha la messa in circolo di un'ingente quantità di farmaco. Viceversa, nei sistemi a matrice, il rilascio avviene mediante dissoluzione della

matrice stessa, oppure, in caso di matrice insolubile, tramite diffusione del farmaco attraverso di essa.

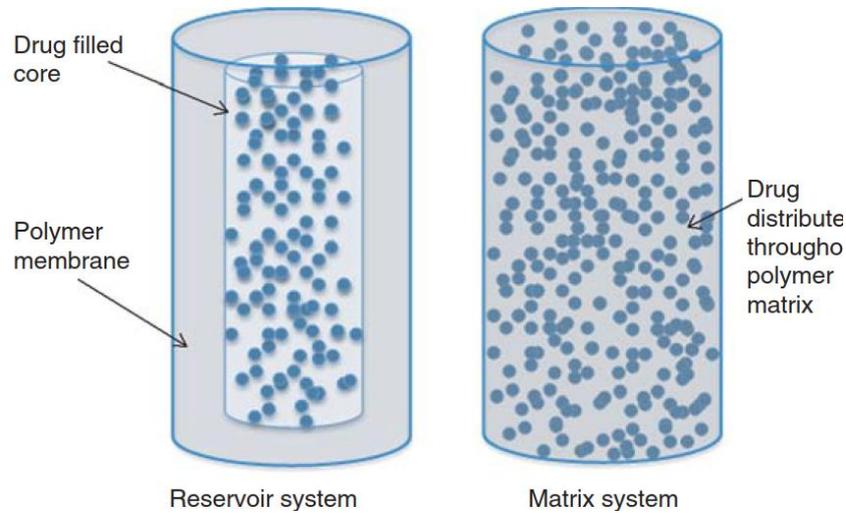


Figura 1.28. Sistemi di rilascio a reservoir e a matrice.

## DISPOSITIVI POLIMERICI PER IL RILASCIO CONTROLLATO

Le principali modalità di somministrazione di un farmaco sono: orale, transdermico, parenterale, ed aerosol. Per viaggiare verso il sito di azione ed avere la massima efficacia, il farmaco deve essere solubile e stabile nell'ambiente acquoso del corpo, ed eventualmente essere anche in grado di oltrepassare alcune barriere particolarmente selettive, come quella cutanea o quella ematoencefalica. Per questo motivo, i sistemi di rilascio più efficaci, realizzati a partire da materiali polimerici, sono liposomi, micro- e nanoparticelle, micelle, idrogel, coniugati polimero-farmaco, ma anche *patch* transdermiche, e dispositivi impiantabili.

I liposomi (Figura 1.29a) sono vescicole della dimensione compresa fra i 25 nm e 1  $\mu\text{m}$ . Posseggono una membrana fosfolipidica simile a quella cellulare, che racchiude uno spazio interno: tale morfologia consente l'incapsulamento ed il rilascio di molecole attive sia idrofile che idrofobiche: le prime saranno racchiuse all'interno, mentre le seconde potranno essere collocate fra i due strati lipidici.

Nel caso invece delle microparticelle (Figura 1.29b), ovvero sfere caratterizzate da diametro inferiore ai 100 micrometri, il farmaco può essere fisicamente intrappolato all'interno della matrice polimerica, soluzione preferibile nel caso di un farmaco idrofobico, oppure venire disciolto in un liquido incapsulato all'interno del polimero, scelta migliore nel caso di farmaco idrofilico. Il rilascio del farmaco può avvenire in modi differenti, come diffusione o degradazione controllata, a seconda del tipo di struttura particellare <sup>(46)</sup>.

Le nanoparticelle (caratterizzate da diametri non superiori ai 200 nanometri) sono strutturalmente simili alle precedenti, ma la loro ridotta dimensione ha un effetto determinante nel definire le caratteristiche di assorbimento del farmaco. A titolo di esempio, nanoparticelle delle dimensioni di 100 nm portano ad un assorbimento di 2.5 volte maggiore rispetto alle particelle di diametro di 1  $\mu\text{m}$ , e di 6 volte maggiore rispetto a particelle di 10  $\mu\text{m}$  <sup>(47)</sup>. Questi carrier permettono il raggiungimento di tessuti altrimenti non accessibili, e possono circolare anche all'interno di piccoli vasi sanguigni senza ostruirli; tuttavia, per lo stesso motivo, possono essere più facilmente assimilati da parte del fegato prima di espletare la loro funzione <sup>(45)</sup>.

Le micelle (Figura 1.29c) sono piccole particelle caratterizzate dalla peculiarità di potersi autoassemblare mediante segregazione idrofilica o idrofobica. Ad esempio, un copolimero a blocchi con segmenti idrofobici e idrofilici ha la capacità, in un ambiente idratato, di disporsi in modo tale che i segmenti idrofobici creino un nucleo al centro, mentre i segmenti idrofilici si dispongono a formare un guscio che circonda la particella, aumentando così notevolmente la solubilità di un farmaco idrofobico. La formazione delle micelle è influenzata da fattori come il peso molecolare del copolimero, e la quantità relativa di blocchi idrofilici e idrofobici <sup>(46)</sup>.

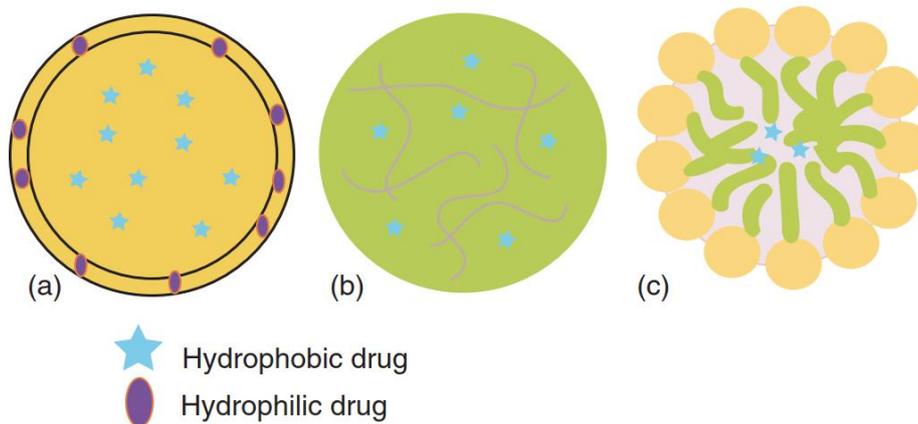


Figura 1.29. Esempio di a) liposoma; b) microparticella; c) micella

Gli idrogel (Figura 1.30), sono polimeri reticolati (la reticolazione può essere di tipo chimico o fisico) idrofilici, in grado di assorbire acqua o fluidi acquosi in quantità fino a mille volte superiore alla propria massa. Queste macromolecole, grazie al loro elevato contenuto di acqua, alla loro consistenza e porosità sono in grado di incapsulare efficacemente diversi tipi di farmaco. Quando per azione di stimoli esterni (come temperatura, pH, stimoli esterni, ecc ...) l'idrogel comincia ad assorbire acqua, ovvero rigonfia, l'acqua può permeare all'interno del gel, e permettere la fuoriuscita del principio attivo.



Figura 1.30. Esempio di idrogel

I coniugati polimero-farmaco (Figura 1.31) sono sistemi di rilascio di dimensione nanometrica in cui principi attivi a basso peso molecolare sono legati covalentemente ad un trasportatore polimerico, tramite un cosiddetto “*linker*” biodegradabile.

La coniugazione, così impostata, va inevitabilmente ad alterare sia le proprietà chimico-fisiche (es. solubilità e stabilità), sia la farmaco-cinetica del principio attivo. Inoltre, i polimeri utilizzati come veicoli per il farmaco devono rispondere a determinati requisiti in termini di peso molecolare e di biodegradabilità. Questi sistemi di rilascio sono tipicamente destinati all'erogazione di terapie antitumorali.

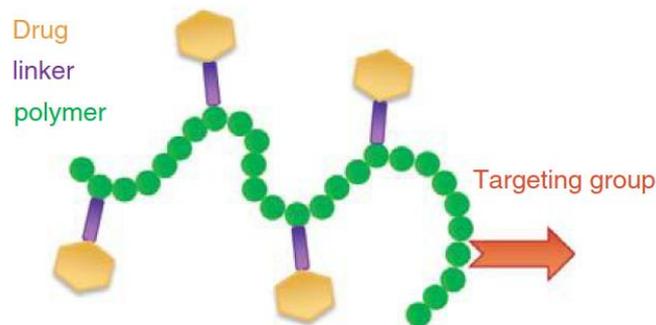


Figura 1.31. Esempio di coniugato polimero-farmaco

Per quanto riguarda le patch transdermiche (Figura 1.32), esse sono membrane adesive medicate studiate per rilasciare una specifica dose di farmaco in modo continuo, attraverso la pelle, verso la circolazione sistemica, per il trattamento o la prevenzione di disturbi locali o sistemici. Il rilascio del farmaco transdermico rappresenta un'attraente alternativa alle tradizionali tecniche di somministrazione del farmaco stesso, come quella orale o endovenosa, poiché permette di superare alcuni problemi legati a queste tipologie di somministrazioni, come il primo stadio del metabolismo epatico, la digestione enzimatica, e l'idrolisi del farmaco in ambiente acido. Le patch sono soluzioni non invasive, economiche e indolori, anche se un

importante limite fisico da considerare è costituito dallo strato corneo, la barriera più esterna della pelle che funge da difesa contro gli agenti esterni; questo strato, essendo idrofobico, impone un ostacolo alla diffusione della gran parte dei farmaci idrofilici. In più, nel caso in cui un farmaco riesca ad attraversare liberamente lo strato corneo, è possibile che vada incontro ad una degradazione precoce dovuta agli enzimi epidermici.

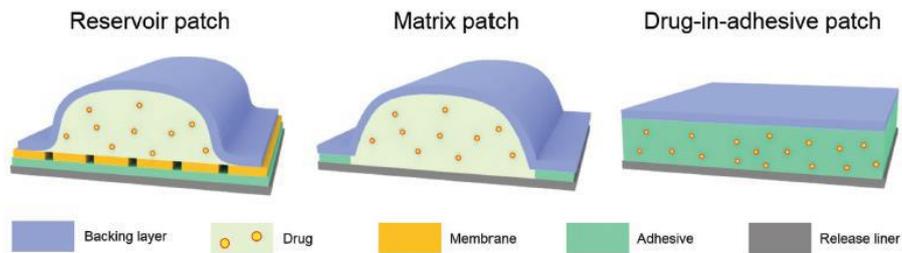


Figura 1.32. Esempi di diversi tipi di patch transdermiche

Nell'ipotesi di trattamenti terapeutici di durata considerevole, i dispositivi impiantabili a rilascio controllato (Figura 1.33) possono essere considerati una valida soluzione in quanto, rispetto ai precedenti, prevedono l'impianto del sistema direttamente sul sito d'azione. I dispositivi impiantabili polimerici possono essere classificati in due categorie distinte: sistemi preformati o sistemi che si formano dopo l'iniezione nel sito di azione. I primi sono in genere realizzati attraverso metodi di lavorazione come elettrofilatura e stampa 3D, mentre i secondi, tipicamente gel che solidificano in risposta alla temperatura o al pH, vengono iniettati direttamente nel sito d'azione previsto <sup>(48)</sup>. Anche questi dispositivi sono risultati particolarmente efficienti per combattere patologie tumorali, dal momento che offrono un'alternativa alle terapie tradizionali che, non essendo localizzate, vanno inevitabilmente a danneggiare tessuti sani (es. chemioterapia).

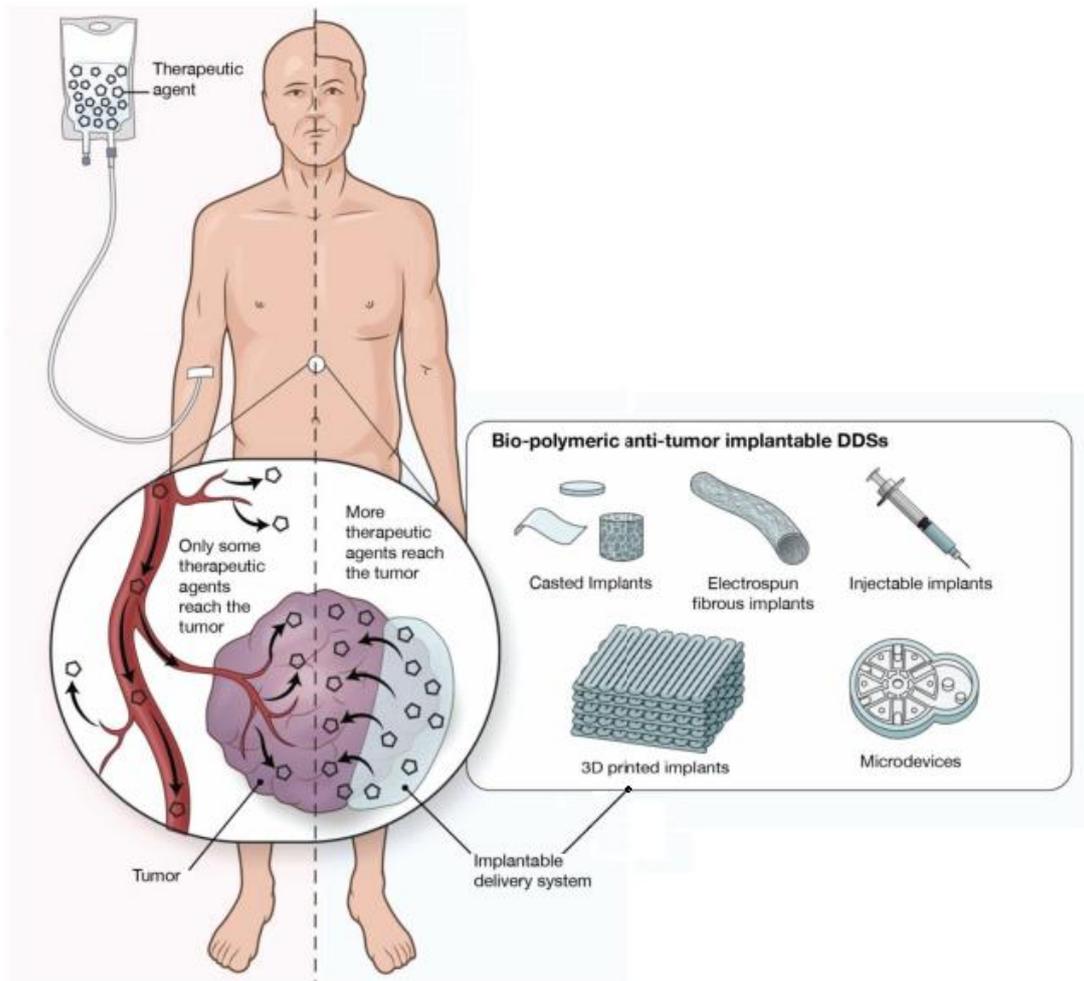


Figura 1.33. Esempi di dispositivi impiantabili a rilascio controllato

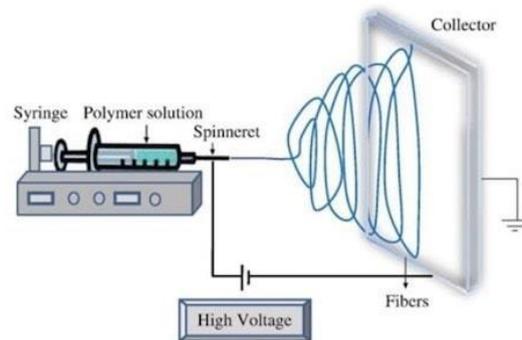
### 1.5.3 Elettrofilatura

Come già accennato, l'elettrofilatura è una tecnica utilizzata per la realizzazione di membrane porose, attraverso cui è possibile ottenere fibre continue di dimensioni micro e nanometriche interconnesse e dall'elevato rapporto superficie/volume. Agendo sulla dimensione delle fibre, è anche possibile modulare la porosità e la dimensione dei pori stessi. Questo consente di realizzare un supporto efficace e *ad hoc* sia per quanto riguarda l'incapsulamento ed il rilascio di un farmaco, sia per quanto concerne la crescita e la proliferazione cellulare, semplicemente variando alcuni parametri del processo.

La tipica strumentazione è costituita da tre elementi principali, come illustrato in Figura 1.34:

- Una siringa contenente la soluzione di polimero disciolto in un solvente.

- Un generatore di alta tensione (10-50 kV) che, mediante l'ago metallico della siringa, carica positivamente il polimero.
- Un collettore metallico caricato negativamente o con messa a terra, da cui il polimero viene attratto.



*Figura 1.34 Schema del processo di elettrofilatura*

Quando il fluido polimerico viene sottoposto ad una differenza di potenziale, in corrispondenza della punta dell'ago, subisce un aumento della sua carica superficiale e, una volta raggiunto un valore di tensione critica, l'accumulo di cariche uguali nella soluzione genera una forza auto-repulsiva maggiore della tensione superficiale della soluzione stessa. Questo provoca l'eruzione della soluzione, con la formazione di un getto polimerico nel verso del campo elettrico esterno, che termina sul collettore, in prossimità del quale si ha la formazione di fibre polimeriche solide in seguito all'evaporazione istantanea del solvente.

Come già accennato, uno dei principali vantaggi offerti da questa tecnica è l'ampio numero di parametri su cui è possibile agire in funzione delle applicazioni previste: i principali sono i parametri di processo, della soluzione e ambientali.

1. Parametri di processo: comprendono la tensione applicata (deve essere tale da permettere la formazione di un getto continuo, dalla punta dell'ago al collettore), la distanza ago-collettore (abbastanza elevata da consentire l'evaporazione del solvente, ma allo stesso tempo non eccessiva, al fine di non compromettere il percorso del getto e la morfologia finale della fibra), la velocità di infusione (che influisce sulla dimensione dei pori dell'elettrofilato e sulla velocità di evaporazione del solvente) ed il tipo di collettore (comunemente si utilizzano piastre di alluminio, oppure fogli o tessuti conduttivi), che può essere fisso, se si desiderano fibre disposte in maniera casuale, oppure mobile, qualora si preferiscano fibre orientate.

2. Parametri della soluzione: giocano un ruolo chiave la concentrazione, che solitamente è direttamente proporzionale al diametro della fibra (se troppo bassa si ottengono tappetini granulosi, mentre se troppo alta diventa difficile mantenere un flusso costante a livello della punta dell'ago), il peso molecolare, legato al numero di legami tra le catene polimeriche in soluzione (al crescere del peso molecolare aumenta il diametro finale della fibra), la viscosità (se troppo bassa non si riescono ad ottenere fibre continue, viceversa se troppo alta diventa impossibile processare il materiale), la tensione superficiale (se non troppo elevata è possibile ottenere fibre prive di granuli ed operare con campi elettrici inferiori) e la conducibilità, anch'essa direttamente proporzionale al diametro della fibra.
  
3. Parametri ambientali: sono parametri non intrinsecamente legati al processo o alla soluzione, ma che comunque incidono sulla realizzazione dell'elettrofilato. I principali sono la temperatura, che può influenzare il diametro della fibra modificando la viscosità del getto della soluzione polimerica (generalmente, a temperature più alte si registrano valori di viscosità più bassi), e l'umidità, capace di modificare la morfologia delle fibre (se presente in percentuali eccessive può impedire l'evaporazione del solvente, se invece troppo bassa può velocizzarne l'evaporazione), e di influire sulla carica e sulla tensione superficiale della soluzione.

## CAPITOLO 2

### SCOPO DELLA TESI

L'ingegneria tissutale, branca multidisciplinare d'avanguardia che racchiude competenze in ambito ingegneristico, medico, biologico e di scienza dei materiali, rappresenta ad oggi uno degli ambiti di ricerca più importanti e innovativi in campo biomedicale. Questa disciplina ha come obiettivo quello di porsi come alternativa valida e vincente a metodi più tradizionali, e spesso non risolutivi, come il trapianto ed il trattamento farmacologico, per far fronte alla sostituzione o riparazione di tessuti mancanti o danneggiati mediante il design di *scaffold* opportunamente ingegnerizzati.

Tra i nuovi materiali di sintesi proposti per la realizzazione di questi *scaffold* tridimensionali, destinati alla funzione di supporto alla crescita e alla proliferazione cellulare, i polimeri stanno emergendo in modo significativo. La ragione del loro successo rispetto ad altre classi di biomateriali deve essere ricercata nella loro maggiore biocompatibilità, nella possibilità di modificarne composizione e proprietà fisicomeccaniche, nella facile processabilità anche in forme complesse e, caratteristica non meno importante, questi materiali sono in grado di immobilizzare cellule o biomolecole, sia al loro interno che sulla superficie. All'interno dell'ampia famiglia dei polimeri, ad oggi la classe di maggior interesse risulta essere quella dei poliesteri alifatici. Tra questi, oltre all'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA), il poli( $\epsilon$ -caprolattone) (PCL) ed i loro copolimeri, tutti approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA), e già ampiamente commercializzati per applicazioni biomedicali, il poli(butilene succinato) (PBS), già prodotto a livello industriale, ma per scopi diversi (ad esempio nel campo degli imballaggi biodegradabili), sta suscitando un crescente interesse anche in campo biomedicale, come testimoniato dai numerosi lavori presenti in letteratura e dalla sua recente approvazione da parte della FDA. Il PBS presenta infatti una comprovata biocompatibilità, stabilità termica ed elevata temperatura di fusione (115°C), una delle più alte tra i poliesteri alifatici policondensati. Di contro, il PBS possiede proprietà meccaniche non ottimali per alcune applicazioni in ambito dell'ingegneria dei tessuti, e mostra un elevato grado di cristallinità (circa 45-50%), responsabile anche di tempi di degradazione particolarmente lunghi.

Per migliorare le proprietà non soddisfacenti di un omopolimero, senza andare a detrimento di quelle già soddisfacenti, si possono sfruttare diverse strategie. Tra queste, la copolimerizzazione rappresenta uno strumento efficace per ottenere nuovi polimeri con

proprietà modulabili *ad hoc* in base al tipo, alla quantità e alla distribuzione delle unità comonomeriche all'interno della catena macromolecolare.

In questo contesto, il presente lavoro di Tesi ha come scopo la sintesi e la successiva caratterizzazione di un nuovo copoliestere alifatico a base di PBS biocompatibile da utilizzare per la fabbricazione di *scaffold* per applicazioni in ambito dell'ingegneria tissutale del tessuto connettivo. Come co-unità è stato scelto l'acido 3,3-ditiodipropionico, caratterizzato dalla presenza, lungo la catena monomerica, del legame S-S tra due atomi di zolfo. Questo tipo di legame risulta particolarmente interessante, in quanto è considerato un legame "dinamico". Esso, infatti, è generalmente stabile, ma può rompersi ed eventualmente riformarsi se sottoposto a sollecitazioni di varia natura, come calore, pH, o luce. Per questa ragione, negli ultimi anni i poliesteri contenenti il legame S-S sono stati studiati con crescente interesse anche per applicazioni biomedicali, come il rilascio controllato di farmaco e l'ingegneria tissutale, come testimoniato dal numero di pubblicazioni scientifiche in merito.

Più in dettaglio, 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 nei seguenti step:

- Preliminare analisi bibliografica per focalizzare gli sviluppi recenti sull'argomento trattato.
- Sintesi tramite policondensazione in massa dell'omopolimero PBS e del copolimero P(BSBDTDP) ad alto peso molecolare, e loro purificazione.
- Verifica della struttura chimica e, nel caso del copolimero, della composizione effettiva tramite risonanza magnetica nucleare (NMR).
- Valutazione del peso molecolare mediante 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*.
- Studi di bagnabilità mediante valutazione dell'angolo di contatto su film.
- Caratterizzazione meccanica, mediante prove a trazione a rottura, su film e *scaffold*.
- Studi di degradazione enzimatica sugli *scaffold*.
- Studi di biocompatibilità sugli *scaffold*.
- Analisi dei risultati ottenuti ed estrapolazione di correlazioni proprietà struttura.

# CAPITOLO 3

## MATERIALI E METODI

Il presente lavoro di Tesi di Laurea è stato svolto presso i laboratori di Sintesi e Caratterizzazione di Materiali Macromolecolari (LAMAC) del Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali dell'Università di Bologna (DICAM) e presso i laboratori ISOF del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) di Bologna. Lo studio è suddivisibile in due fasi distinte: la prima è inerente alla sintesi dell'omopolimero PBS e del suo copolimero P(BSBDTDP), la seconda riguarda invece la loro caratterizzazione.

### 3.1 Sintesi

#### 3.1.1 Reagenti

Sia l'omopolimero poli(butilene succinato) (PBS) che il copolimero poli(butilene succinato/ditiodipropionato) (P(BSBDTDP)) sono stati sintetizzati mediante policondensazione in massa a due stadi, a partire da dimetilsuccinato, acido 3,3-ditiodipropionico e 1,4-butandiolo, quest'ultimo impiegato con un eccesso molare del 20% rispetto alle moli di dimetil estere e di diacido, per facilitare le reazioni di esterificazione e transesterificazione durante il primo stadio della sintesi. Come catalizzatore è stato impiegato il titanio (IV) tetrabutossido o TBT, in quantità pari a 400 ppm/grammi di polimero teoricamente ottenibile.

Più in dettaglio:

- Il dimetil succinato è il diestere derivato dall'acido succinico, che a temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore (Figura 3.1).

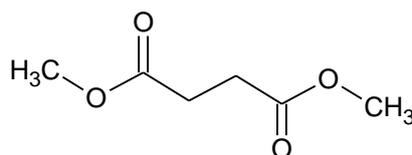


Figura 3.1: Struttura chimica del dimetilsuccinato

- L'1,4-butandiolo è un diolo costituito da quattro atomi di carbonio, che si presenta come liquido trasparente e viscoso (Figura 3.2).

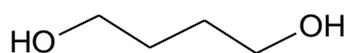


Figura 3.2: Struttura chimica dell'1,4-butandiolo

- L'acido 3,3-ditiopropionico è un diacido contenente il legame S-S lungo la sua catena. Si presenta come una polvere bianca a temperatura ambiente (Figura 3.3).

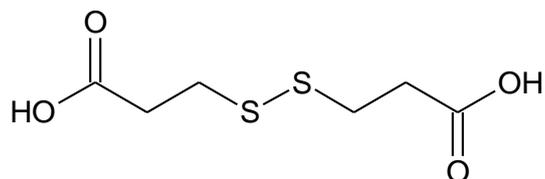


Figura 3.3: Struttura chimica dell'acido 3,3-ditiopropionico

- Il titanio (IV) tetrabutossido, infine, è un catalizzatore a base di titanio comunemente utilizzato per la sintesi dei poliesteri alifatici, che a temperatura ambiente è in forma liquida, di colore giallo chiaro e trasparente (Figura 3.4).

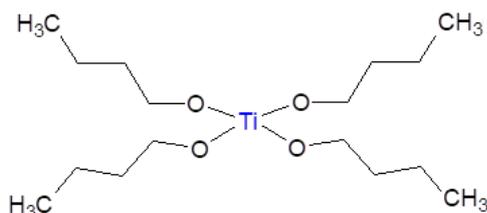


Figura 3.4: Struttura chimica del titanio (IV) tetrabutossido

Le strutture chimiche del PBS e del P(BSBDTDP) sono invece riportate in Figura 3.5.

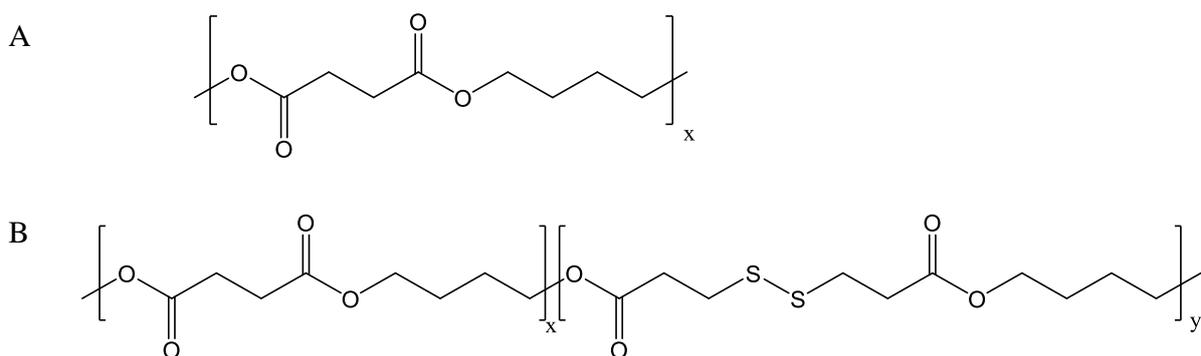


Figura 3.5: Struttura chimica del PBS e del P(BSBDTDP).

### 3.1.2. Sintesi del PBS e del copolimero P(BSBDTDP)

Come già accennato, i due poliesteri oggetto della presente Tesi sono stati ottenuti mediante policondensazione in massa a due stadi, a partire da dimetilsuccinato e 1,4-butandiolo nel caso del PBS, e da dimetilsuccinato, acido 3,3-ditiodipropionico (in percentuale molare, rispettivamente, del 70 e del 30%) e 1,4-butandiolo per quanto riguarda il P(BSBDTDP). Più in dettaglio, durante la prima fase, condotta alla temperatura di 180 °C, in atmosfera inerte di azoto e mantenendo in agitazione il sistema (100 rpm), si hanno reazioni di esterificazione diretta (o transesterificazione nel caso si parta da estere) che portano alla formazione di oligomeri e di prodotti a basso peso, come acqua o metanolo. La seconda fase, invece, inizia quando circa il 90% dell'acqua (o del metanolo) teoricamente prodotto viene distillato e raccolto nella trappola. Da questo momento viene applicato un vuoto graduale fino a raggiungere 0.1 mbar e si aumenta la temperatura fino a 220 °C, mantenendo l'agitazione a 100 rpm, per favorire da una parte le reazioni di transesterificazione che portano alla formazione di lunghe catene dall'alto peso molecolare, dall'altra la rimozione, mediante distillazione, del glicole in eccesso. La reazione termina quando non si ha più distillazione né di metanolo né di glicole, ed il valore di momento torcente, direttamente proporzionale alla viscosità del fluido polimerico, e dunque al suo peso molecolare, raggiunge un valore costante.

Al termine della sintesi, entrambi i polimeri sono di colore marrone, più chiaro nel caso del PBS, più intenso nel caso del P(BSBDTDP).

Per quanto riguarda la strumentazione utilizzata (Figura 3.6), essa si compone di un reattore in vetro a tre colli (in cui vengono caricati tutti i reagenti ed il catalizzatore) immerso in un bagno di sali di sodio, che ha la funzione di mantenere il sistema a temperatura costante durante la reazione, un agitatore meccanico dotato di misuratore di momento torcente (o *torque*), una trappola per la raccolta dei prodotti di scarto, ed infine una pompa da vuoto. L'agitatore meccanico è costituito da un albero motore e da alcuni estensimetri, che hanno la funzione di misurare il valore di *torque* necessario per mantenere costante l'agitazione.

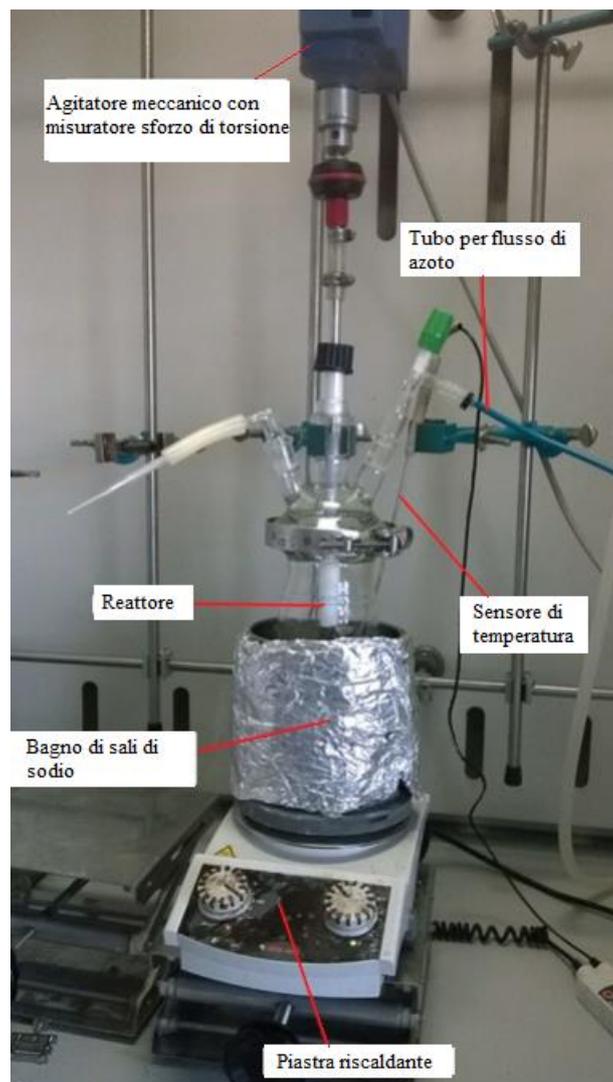


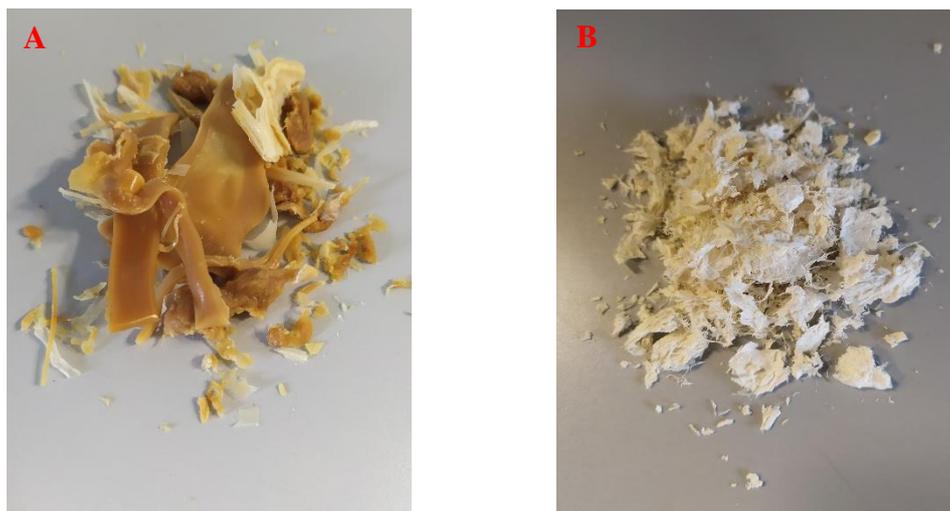
Figura 3.6: Strumentazione utilizzata per la sintesi

### 3.1.3 Purificazione

Al fine di eliminare eventuali monomeri non reagiti e prodotti di reazione a basso peso molecolare lineari e/o ciclici (come glicole, catene corte, residui di catalizzatore, ecc...), il PBS ed il copolimero P(BSBDTDP) ottenuti hanno subito un processo di purificazione: il materiale viene sciolto nella minore quantità possibile di solvente, comunemente cloroformio, in modo tale da ottenere una soluzione molto concentrata. Si procede quindi con la precipitazione, goccia a goccia, della soluzione precedentemente ottenuta in un becker contenente metanolo, in largo eccesso rispetto alla quantità di soluzione polimerica. Quello che si osserva è la precipitazione delle catene più pesanti del polimero sul fondo del becker, mentre le impurità e le molecole a più basso peso rimangono intrappolate nel metanolo, il quale diventa via via più opaco con

l'avanzare della purificazione. È stato dunque possibile raccogliere il polimero purificato dal fondo del becker, il quale assume una conformazione a fiocchi ed una colorazione più chiara, tendente al bianco (Figura 3.7).

Segue una fase di essiccazione della durata di qualche giorno, durante la quale vengono eliminati eventuali residui di cloroformio e metanolo, prima di procedere con ulteriori caratterizzazioni.



*Figura 3.7: Immagini del copolimero P(BSBDTDP): A) prima e B) dopo purificazione.*

## **3.2 Caratterizzazione molecolare**

### **3.2.1 Cromatografia a permeazione su gel (GPC)**

La cromatografia a permeazione su gel è una tecnica di separazione fisica utilizzata per misurare la distribuzione di peso molecolare di un polimero. La strumentazione si compone di una pompa volumetrica, una colonna costituita da particelle di polistirene organizzate in modo tale da generare una porosità predefinita, ed infine un rivelatore, che per i poliesteri alifatici è solitamente a indice di rifrazione.

Il polimero da analizzare viene in primo luogo sciolto in un solvente, e la soluzione ottenuta viene iniettata in colonna, all'interno della quale scorre un solvente che solitamente corrisponde a quello in cui è stato sciolto il polimero (nel nostro caso cloroformio). Ciò che si osserva dopo l'iniezione è un tempo di uscita dalla colonna differente a seconda del peso molecolare di ogni catena polimerica, in accordo con il cosiddetto principio del "setaccio molecolare". Secondo tale principio, infatti, le catene più lunghe non riescono ad attraversare le singole porosità,

uscendo rapidamente dalla colonna; viceversa, le catene a più basso peso molecolare sono in grado di permeare attraverso l'intera porosità della colonna, uscendo quindi per ultime, mentre le catene a peso molecolare intermedio, riusciranno a penetrare solo attraverso alcuni pori, uscendo dalla colonna a tempi intermedi (Figura 3.8).

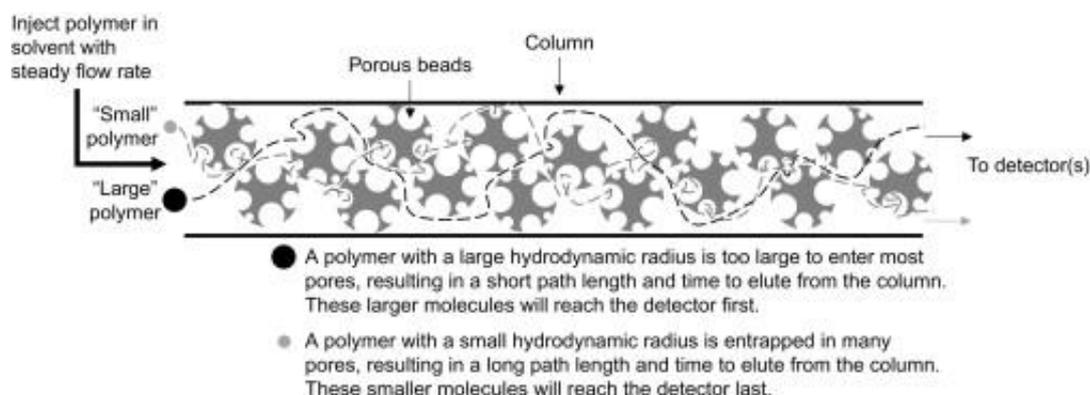


Figura 3.8: Principio di funzionamento di una tipica colonna per GPC

In fondo alla colonna è presente un detector, che istante per istante dà come output un segnale direttamente proporzionale al numero delle catene in uscita; da questo segnale è possibile ottenere un grafico che riporta l'andamento della concentrazione del soluto in uscita in funzione del tempo. Successivamente, grazie ad opportune curve di taratura, ottenute analizzando campioni polimerici standard di peso molecolare noto, è possibile convertire i tempi in pesi molecolari, e dunque ottenere una curva di distribuzione dei pesi molecolari.

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

### 3.2.2 Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare ( $^1\text{H-NMR}$ )

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare è una tecnica di analisi che permette di ottenere informazioni sulla struttura molecolare e sulla composizione dei polimeri sintetizzati, attraverso l'applicazione di campi magnetici esterni, sia fissi che variabili.

Viene infatti sfruttata la capacità di alcuni nuclei, caratterizzati da spin non intero (come ad esempio  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ), se sottoposti ad un campo magnetico esterno  $B$ , intenso e stazionario, di allinearsi lungo la direzione di tale campo. Il valore dello spin è quantizzato, e può assumere solo quantità discrete; ipotizzando che lo spin valga  $J$ , il nucleo può orientarsi in  $2J+1$  direzioni differenti: se si considerano, ad esempio  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , che hanno spin pari a  $1/2$ , le orientazioni possibili sono solo due, una parallela alla direzione del campo magnetico applicato, corrispondente al livello di energia più basso, ed una antiparallela, corrispondente invece al livello energetico più alto (Figura 3.9). Per far passare un nucleo da un livello energetico all'altro è necessario fornirgli un quantitativo di energia  $\Delta E$ , pari a

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

dove  $\nu$  è la frequenza della radiazione elettromagnetica emessa o assorbita dal nucleo durante il salto (detta frequenza di risonanza) e  $h$  è la costante di Planck.

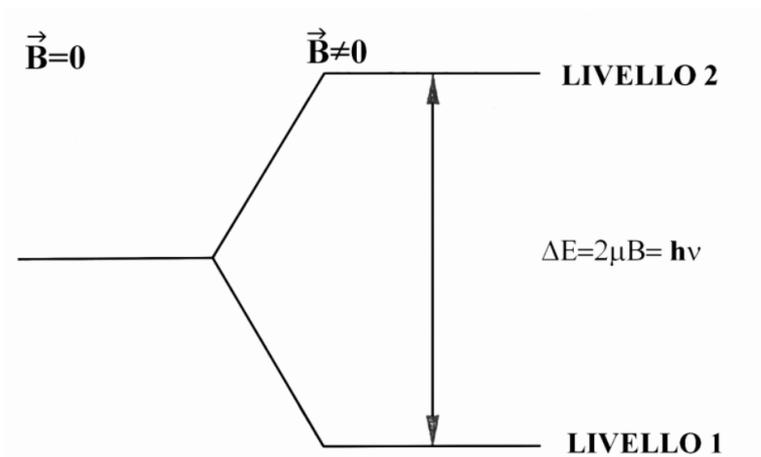


Figura 3.9: Livelli energetici dei nuclei con spin  $1/2$  sottoposti a campo magnetico  $B$

Lo spettro NMR è costituito da picchi a frequenze più o meno elevate a seconda dell'intorno chimico del nucleo in esame, e in particolare dell'effetto di schermatura dovuto alle nubi elettroniche degli atomi e delle molecole che costituiscono tale intorno: gli elettroni, infatti, possono andare a ridurre l'effetto del campo magnetico esterno  $B$ , generando un campo magnetico locale e opposto. Di conseguenza, atomi con intorni ricchi di elettroni subiranno uno spostamento, detto spostamento chimico ( $\delta$  [Hz]) o *chemical shift*, a frequenze più basse rispetto agli atomi con intorni poveri di elettroni.

Solitamente, per eliminare la dipendenza del *chemical shift* dall'entità del campo magnetico applicato B, si fa riferimento allo spostamento chimico relativo ( $\delta_r$ ), misurato in ppm [Hz/MHz]:

$$\delta_r = \frac{\nu_r - \nu}{\nu_r} \cdot 10^6$$

Dove  $\nu$  è la frequenza di risonanza del campione considerato mentre  $\nu_r$  è la frequenza di risonanza del tetrametilsilano ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ), che viene utilizzato come standard.

Generalmente, inoltre, si preferisce effettuare un'analisi al protone, piuttosto che al carbonio, dal momento che l'isotopo 13 del carbonio è molto raro in natura (0.1% di tutto il carbonio esistente), ed il segnale che ne deriva è caratterizzato da un basso rapporto segnale/rumore.

Dallo studio dello spettro ottenuto, ed in particolare concentrandoci sui parametri di intensità, posizione e forma dei picchi, è possibile ottenere informazioni sulla struttura chimica e sulla composizione. La prima informazione ottenibile a partire dallo spettro è, come già accennato, la schermatura a cui sono sottoposti i protoni, valutata considerando la posizione dei picchi rispetto allo zero: quelli più schermati si collocano in posizioni più vicine al riferimento, mentre quelli meno schermati si collocano a valori di *chemical shift* superiori. Dall'area sottesa ad ogni picco, poi, è possibile calcolare il numero di protoni a cui il picco fa riferimento, confrontabili con quelli della formula chimica del polimero. Infine, anche la forma del picco risulta essere un'informazione importante, in quanto indica il numero di protoni che circondano il nucleo in esame: se nell'intorno non è presente alcun protone il picco avrà la forma di un singoletto (un'unica punta), se ne sono presenti due si avrà un tripletto (tre punte) e così via.

Gli spettri sono stati ottenuti usando uno spettrometro NMR Varian XL-400 (Figura 3.10). Le soluzioni sono state preparate sciogliendo circa 10 mg di polimero in cloroformio deuterato (0.03%) contenente TMS come riferimento. Gli spettri sono stati acquisiti a temperatura ambiente con concentrazione dei polimeri pari al 0.5 wt%, con tempo di rilassamento (tempo tra un impulso elettromagnetico ed il successivo) pari a 0 secondi e tempo di acquisizione di 1 secondo per 100 ripetizioni.



*Figura 3.10: Spettrometro Varian XL-400, utilizzato per l'analisi NMR*

### **3.3 Processing**

Prima di procedere con ulteriori caratterizzazioni, a partire sia dall'omopolimero che dal copolimero sono stati ottenuti film mediante pressofusione e tappetini nanofibrosi mediante elettrofilatura.

#### **3.3.1 Realizzazione di film mediante pressofusione**

La pressofusione è una tecnica che permette di ricavare film sottili mediante l'utilizzo di una pressa (provvista di sistema di raffreddamento ad acqua) e di piastre resistenti al calore (solitamente in teflon).

Per realizzare il film si posizionano circa 1.5 – 2 grammi di materiale tra due piastre di teflon; il "sandwich" ottenuto viene poi collocato tra le due piastre metalliche della pressa (Carver Laboratory Press) (Figura 3.11) mantenute ad una temperatura di circa 30-40° C sopra la  $T_m$  del materiale (in modo da consentirne la completa fusione, ma non la degradazione). Dopo qualche minuto, tempo necessario per la completa fusione del polimero, viene applicata una pressione costante di circa 5 ton/m<sup>2</sup> per un paio di minuti, per permettere al materiale di

distribuirsi uniformemente tra le due piastre in teflon. Il film viene poi mantenuto in pressione e lasciato raffreddare fino a temperatura ambiente.



Figura 3.11: Pressa Carver utilizzata per la realizzazione di film polimerici.

### 3.3.2 Realizzazione di *scaffold* mediante elettrofilatura

L'elettrofilatura è una tecnica di processing finalizzata alla produzione di tappetini polimerici costituiti da fibre dal diametro anche dell'ordine dei nanometri. La realizzazione dei tappetini di PBS e del suo copolimero P(BSBDTDP) è stata svolta presso il CNR di Bologna.

La strumentazione si compone di soli tre elementi: una siringa, mossa da un pistone mobile, un generatore di tensione, ed un collettore (Figura 3.12). Ciascun polimero (600 mg) è stato inizialmente disciolto in 4 ml di 1,1,1,3,3,3-esfluoro isopropanolo (concentrazione pari al 15% peso/volume) e mantenuto in agitazione per una notte, per garantire l'omogeneità della soluzione. Il giorno successivo tale soluzione è stata caricata nella siringa, il cui ago è collegato al generatore di tensione; in questo modo si instaura una differenza di potenziale tra la goccia di soluzione polimerica ed il collettore, di norma collegato a terra.

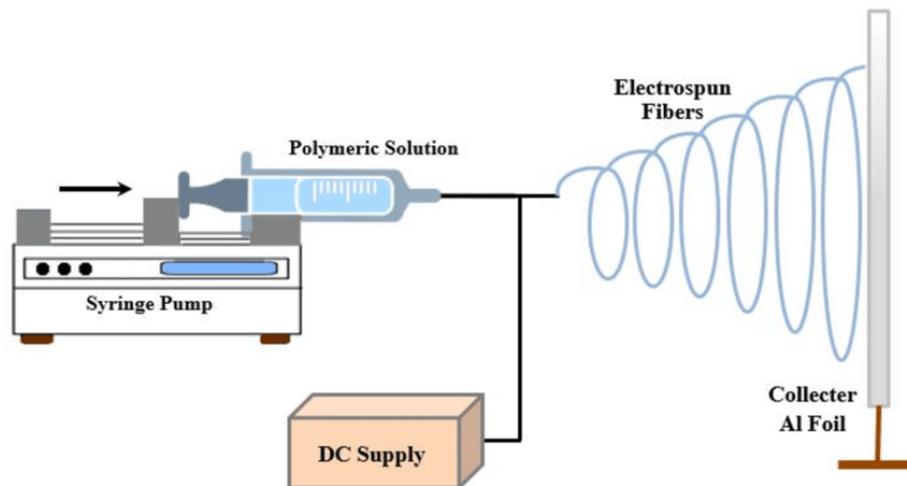


Figura 3.12: Componenti della strumentazione per elettrofilatura

A questo punto, il processo di elettrofilatura si può suddividere in cinque fasi:

- 1) Generazione della goccia: lo stantuffo della siringa viene mosso dal pistone a velocità predefinita per generare una goccia. Quando il generatore viene azionato, per azione della differenza di potenziale, il fluido in corrispondenza dell'ago subisce un aumento della carica superficiale positiva, e di conseguenza la goccia di soluzione si inizia a deformare senza però staccarsi dall'ago: in questa fase la tensione superficiale è ancora la forza prevalente.
- 2) Formazione cono di Taylor: a mano a mano che le cariche positive si accumulano, la deformazione diventa evidente e la goccia assume la caratteristica forma a cono di Taylor.
- 3) Formazione del getto: quando la forza di repulsione elettrostatica supera la tensione superficiale si ha la formazione di un getto polimerico nel verso del campo elettrico esterno, diretto verso il collettore.
- 4) Elongazione del segmento: inizialmente l'andamento del getto polimerico si mantiene coerente con la direzione del campo elettrico applicato. Lo stiramento e l'assottigliamento del filamento che si verificano in questa fase sono dovuti non solo all'evaporazione del solvente ma anche alle repulsioni elettrostatiche tra le cariche positive all'interno del getto. Tuttavia, superato un certo punto, il filamento è caratterizzato da una forte instabilità, e la repulsione fra le particelle positive fa sì che il filamento non mantenga più un andamento lineare, ma vada allargandosi, disegnando la forma di una spirale mentre si avvicina al collettore (Figura 3.13).
- 5) Deposito della fibra: se i parametri che regolano il processo sono stati impostati correttamente, una volta che il filamento ha raggiunto il collettore, il solvente è completamente

evaporato. Inoltre, essendo il collettore collegato a terra, le cariche trasportate durante la fase di volo percorrono il circuito fino a massa, lasciando lo scaffold completamente scarico.

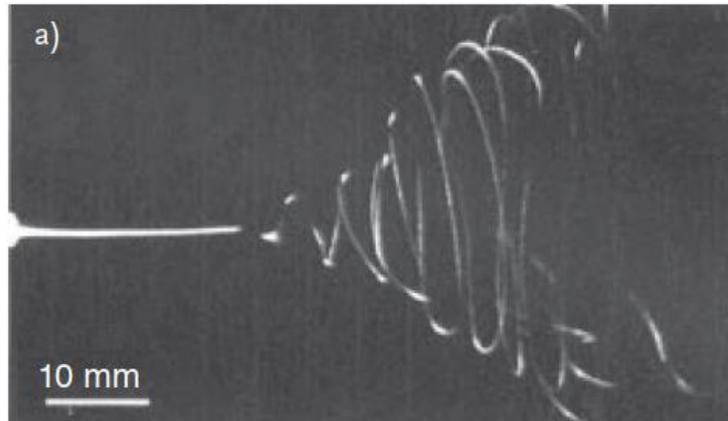


Figura 3.13: Formazione del cono di Taylor a partire dalla punta dell'ago.

Per la realizzazione degli *scaffold* oggetto del presente lavoro di Tesi, è stato impiegato un generatore di tensione ad alto voltaggio ( $\pm 30\text{KV}$ , 5mA) SVH150, Alintel Power Electronics (Italia), mantenuto ad un potenziale di 20 KV, una siringa dotata di ago di diametro 0.8 mm, una pompa per infusione KDS200, KD Scientific Inc. (USA), che mantiene un flusso costante con velocità di 0.03 ml/min, ed un collettore metallico in acciaio inossidabile, collegato a terra e posto ad una distanza di 15 cm dalla punta dell'ago. Tale procedura, della durata complessiva di circa 40 minuti, ha permesso di ottenere tappetini di dimensione 15x15 cm.

## 3.4 Caratterizzazione termica

### 3.4.1 Analisi termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica è una tecnica che valuta la variazione di peso di un materiale causata dall'esposizione ad elevate temperature, e permette di ricavare informazioni circa il processo di degradazione termica.

L'analisi prevede che il materiale venga sottoposto ad un riscaldamento controllato, tale da permettere l'individuazione precisa delle temperature caratteristiche di degradazione. La macchina si compone, oltre che di un sistema di riscaldamento programmabile, di una bilancia (su cui viene posto un crogiolo porta-campione), posta all'interno di una cella mantenuta in atmosfera inerte di azoto (Figura 3.14).

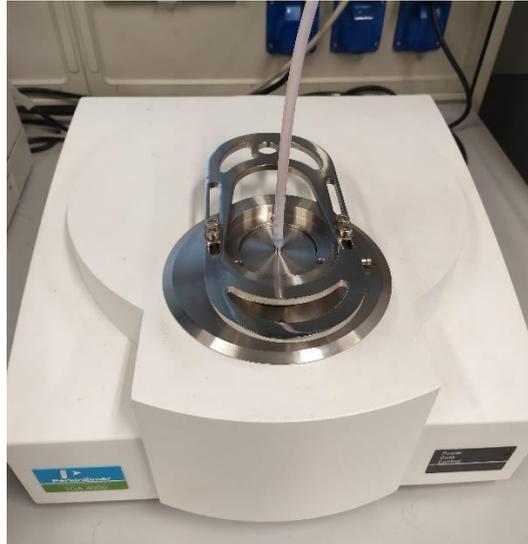


Figura 3.14: Bilancia termogravimetrica PerkinElmer TGA 4000

La bilancia registra in tempo reale la perdita di peso gravimetrico che il polimero subisce durante il riscaldamento controllato, la quale viene rappresentata graficamente dal software sotto forma di termogramma. Dall'analisi di questo grafico, mostrato in Figura 3.15, è solitamente possibile individuare due temperature specifiche:

- $T_{\text{onset}}$ : la temperatura in corrispondenza della quale il polimero inizia a perdere peso, dunque a degradarsi; è la temperatura che in nessun caso deve essere superata durante le successive lavorazioni del materiale;
- $T_{\text{max}}$ : la temperatura di massima velocità di perdita di peso, corrispondente al punto di minimo della derivata prima del termogramma.

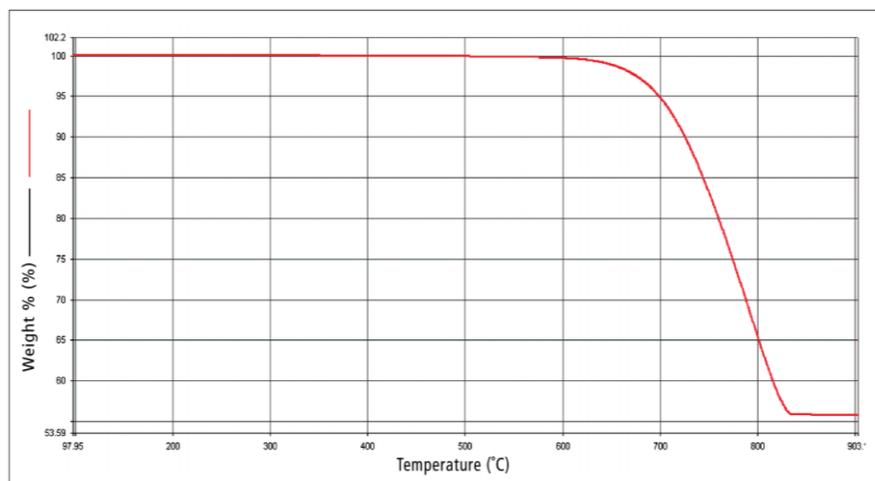


Figura 3.15: Esempio di termogramma

Le curve TGA sono state ottenute usando la bilancia termogravimetrica PerkinElmer TGA 4000. L'analisi è stata effettuata a partire da circa 5 mg di materiale, in un range di temperature compreso tra 40 e 800° C, e con velocità di riscaldamento pari a 10° C/min. Infine, le prove sono state condotte in atmosfera di azoto.

### 3.4.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

La calorimetria a scansione differenziale è una tecnica che permette lo studio delle proprietà termodinamiche di un polimero, delle temperature in corrispondenza delle quali avvengono transizioni termiche, quali la temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) e la temperatura di fusione ( $T_m$ ), ed i calori associati a tali passaggi di fase (rispettivamente  $\Delta C_p$  e  $\Delta H_m$ ). La strumentazione si compone di un calorimetro, che dispone di un vano in cui sono presenti due alloggiamenti (Figura 3.16): in uno sarà posto un capsulino di alluminio contenente il polimero, mentre nel secondo verrà collocato un capsulino vuoto, con funzione di riferimento. I due alloggiamenti costituiscono dei microcalorimetri, che vengono mantenuti in atmosfera inerte durante tutta la durata della prova.

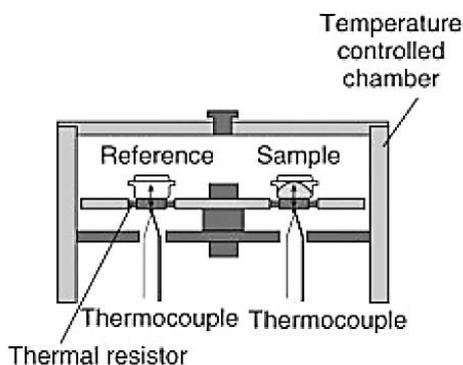


Figura 3.16: Schema degli alloggiamenti per il campione ed il riferimento in un calorimetro.

Il principio di funzionamento si basa sulla misura della differenza di flusso termico che intercorre tra il campione ed il riferimento, quando vengono sottoposti allo stesso programma termico. Durante la scansione, se non si verificano transizioni di fase, campione e riferimento rimangono alla stessa temperatura; viceversa, se si verificano degli squilibri termici, questi vengono rilevati dalle termoresistenze, che forniscono o sottraggono energia ai microcalorimetri al fine di riportare campione e riferimento alla medesima temperatura.

Il software associato allo strumento rappresenta l'andamento del calore fornito in funzione della temperatura, in cui è possibile visualizzare sia fenomeni endotermici che esotermici, ciascuno associato ad una specifica transizione termica (Figura 3.17).

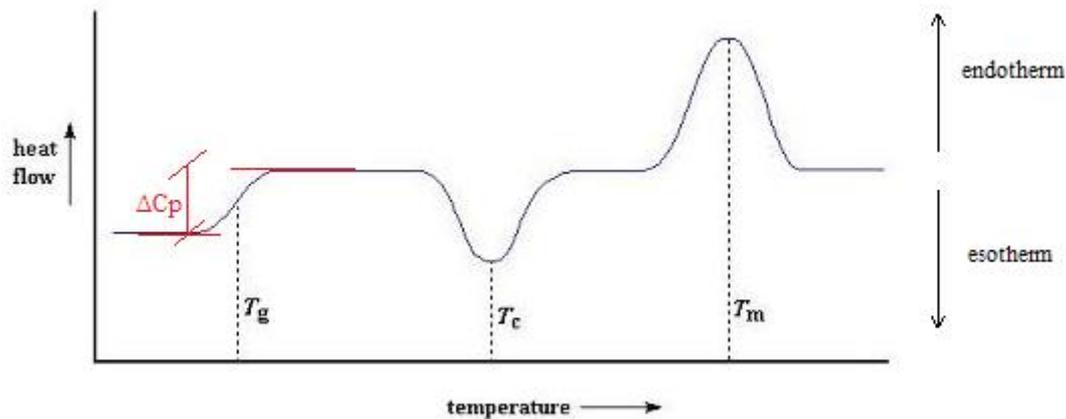


Figura 3.17: Esempio di curva ottenuta mediante analisi DSC

Variazioni endotermiche si verificano in corrispondenza della transizione vetrosa e della fusione, mentre un esempio di processo esotermico è la cristallizzazione in scansione. Più in dettaglio, Più in dettaglio, la  $T_g$  si manifesta come una variazione endotermica della linea di base ed il suo valore è determinato in corrispondenza della metà della variazione di calore specifico associata alla transizione. L'entità della variazione di calore specifico associata 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 relazione:

$$\Delta c_p = \frac{dQ}{dT}$$

dove  $dQ/dt$  è il flusso di calore, mentre  $dT/dt$  è la velocità di scansione.

Per quanto riguarda invece la fusione, essa si presenta nel tracciato come un picco endotermico; la  $T_m$  corrisponde all'ascissa di tale picco, mentre l'area sottesa rappresenta il calore di fusione  $\Delta H_m$ , che sarà tanto più grande quanto più alto è il grado di cristallinità del materiale. Il rapporto tra quest'ultima grandezza e il calore di fusione del polimero completamente cristallino costituisce il grado di cristallinità.

Viceversa, il fenomeno di cristallizzazione si presenta come un picco esotermico; anche in questo caso la  $T_c$  corrisponde all'ascissa di tale picco, mentre l'area sottesa rappresenta il calore di cristallizzazione  $\Delta H_c$ . Questo fenomeno avviene solo se il materiale, nella finestra di

temperature compresa tra  $T_g$  e  $T_m$ , dispone di energia sufficiente per riarrangiarsi e cristallizzare.

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.

Il programma termico a cui sono stati sottoposti i campioni ed il riferimento è il seguente:

- prima scansione: riscaldamento veloce da  $-70^\circ\text{C}$  a  $210^\circ\text{C}$  con velocità di scansione di  $20^\circ\text{C}/\text{min}$ , isoterma della durata di 3 min (per dare tempo a tutto il materiale di fondere), raffreddamento rapido (alla velocità di  $-100^\circ\text{C}/\text{min}$ ) fino a  $-70^\circ\text{C}$  e successiva isoterma della durata di 15 min (per dare tempo a tutto il materiale di raggiungere la temperatura desiderata);
- seconda scansione: riscaldamento nelle medesime condizioni di temperatura e velocità in seguito a raffreddamento veloce.

### **3.5 Analisi diffrattometrica a Raggi X**

L'analisi diffrattometrica a Raggi X ad alto angolo (WAXS) è una tecnica non distruttiva in grado di fornire informazioni su strutture e fasi cristalline, orientamento dei cristalli, distanza tra piani reticolari e conformazione della cella elementare, grazie all'interferenza costruttiva di Raggi X monocromatici su campioni semicristallini.

Gli elementi di cui si compone la strumentazione sono un tubo a raggi X, un goniometro, lenti collimatrici, un tavolino portacampione ed un rivelatore. Più in dettaglio, i Raggi X vengono generati in un tubo a raggi catodici, che viene riscaldato per produrre elettroni; questi, tramite l'applicazione di una differenza di potenziale, vengono accelerati verso un bersaglio (solitamente metallico) che vanno infine a colpire. Se gli elettroni hanno energia sufficiente per rimuovere gli elettroni del guscio interno del materiale bersaglio, vengono prodotti i Raggi X caratteristici. Seguono poi filtri monocromatori e lenti collimatrici, grazie alle quali il fascio è diretto verso la superficie del campione. A questo punto, se la struttura del campione mostra un certo ordine, i Raggi X incidenti (con angolo  $\theta$ ) possono essere diffratti, come mostrato in Figura 3.18, anche se il Raggio X inferiore copre una distanza maggiore rispetto a quello superiore. Questa differenza di fase è detta "differenza di percorso" ( $\tau$ ). Nel caso in cui, però, tale differenza di percorso corrisponda ad un multiplo ( $n$ ) della lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) dei Raggi X incidenti, allora si ha un'interferenza costruttiva, ovvero le onde si sommano in modo coerente producendo un segnale di intensità misurabile.

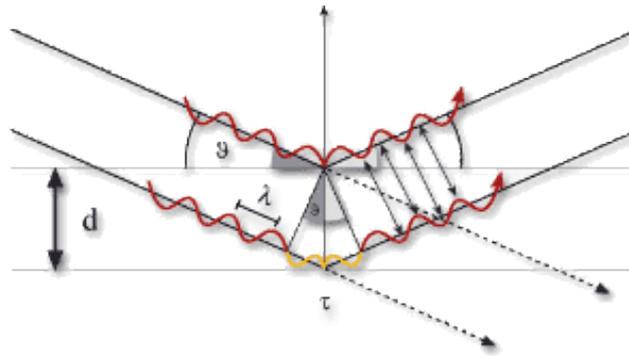


Figura 3.18: Traiettorie dei raggi X incidenti nel caso di materiale cristallino

A questo punto, applicando la legge di Bragg:

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

Si può ottenere il valore  $d$  corrispondente alla distanza reticolare.

Osservando un tipico diffrattogramma (Figura 3.19), si possono notare i picchi di diffrazione in corrispondenza delle porzioni cristalline del materiale, sovrapposti ad un andamento a campana, che invece è rappresentativo della fase amorfa, sempre presente. Tramite il software, inoltre, è possibile calcolare l'area delle porzioni cristalline, della fase amorfa e l'area totale, e dunque anche il grado di cristallinità del materiale in esame ( $X_c$ ), dato dal rapporto tra l'area di diffrazione cristallina  $A_c$  (sottesa ai picchi) e l'area totale del profilo di diffrazione  $A_T$ , considerando lo scattering non coerente.

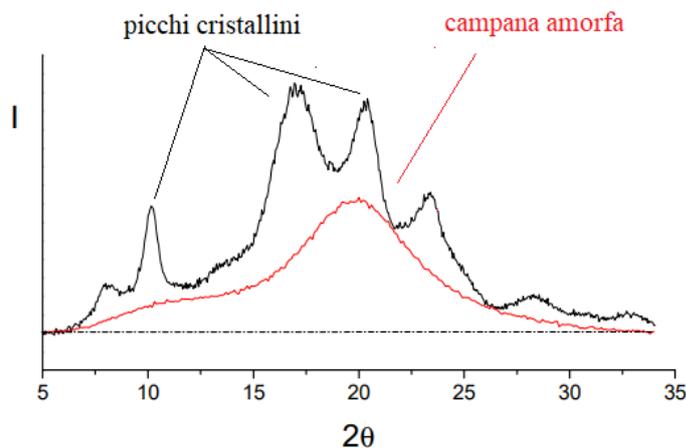


Figura 3.19: Esempio di diffrattogramma

I pattern di diffrazione a Raggi X dei film e degli *scaffold* polimerici sono stati ottenuti per mezzo di un diffrattometro PANalytical X'PertPro che utilizza la lunghezza d'onda del rame ( $\lambda = 0.15418$  nm), dotato di un detector allo stato solido X'Celerator. I dati sono stati acquisiti nell'intervallo  $2\theta$  da  $5^\circ$  a  $60^\circ$  con passo  $0.1^\circ$ , e tempo di conteggio pari a 100 secondi per punto.

### 3.6 Misure di bagnabilità su film

La misura della bagnabilità di un materiale viene effettuata mediante analisi dell'angolo di contatto (*water contact angle* o WCA), una tecnica che permette di determinare quanto la superficie di un materiale risulti idrofilica o idrofobica, sulla base del comportamento di goccia d'acqua depositata sulla superficie del campione. I film polimerici, di dimensione 2·2 cm, sono stati preventivamente lavati con una soluzione acquosa contenente metanolo al 70% (v/v), al fine di eliminare eventuali residui ed impurità presenti sul campione, e lasciati asciugare sotto cappa per una notte prima di procedere con la misura.

Lo strumento utilizzato (Figura 3.20) è un analizzatore di forma di goccia (Drop Shape Analysis, Kruss DSA30S) costituito da una siringa, posta in un apposito sistema dosatore controllato elettronicamente, una sorgente luminosa, una telecamera digitale dotata di zoom ottico con funzione di rilevatore, un tavolino porta oggetti ed un software per l'acquisizione e l'estrapolazione del profilo della goccia. L'analisi viene condotta depositando 5 gocce di acqua distillata, del volume di 4  $\mu$ l ciascuna, su porzioni diverse del film polimerico, alla velocità di 100  $\mu$ l/min. Una volta iniettata, la goccia, opportunamente zoomata e messa a fuoco, può essere visualizzata sullo schermo del computer. A questo punto, applicando il metodo delle tangenti, è possibile ottenere una misura del valore dell'angolo di contatto, definito come l'angolo tra la direzione del piano del materiale e la tangente formata dal profilo della goccia di liquido nel punto di contatto. Se la goccia resta particolarmente compatta, tale da condividere la minor superficie possibile con il materiale, allora il materiale analizzato sarà idrofobico, e l'angolo misurato sarà maggiore  $90^\circ$ . Al contrario, se la goccia si tenderà ad espandersi sulla superficie, indice di una maggiore idrofilicità, l'angolo registrato sarà minore di  $90^\circ$ .

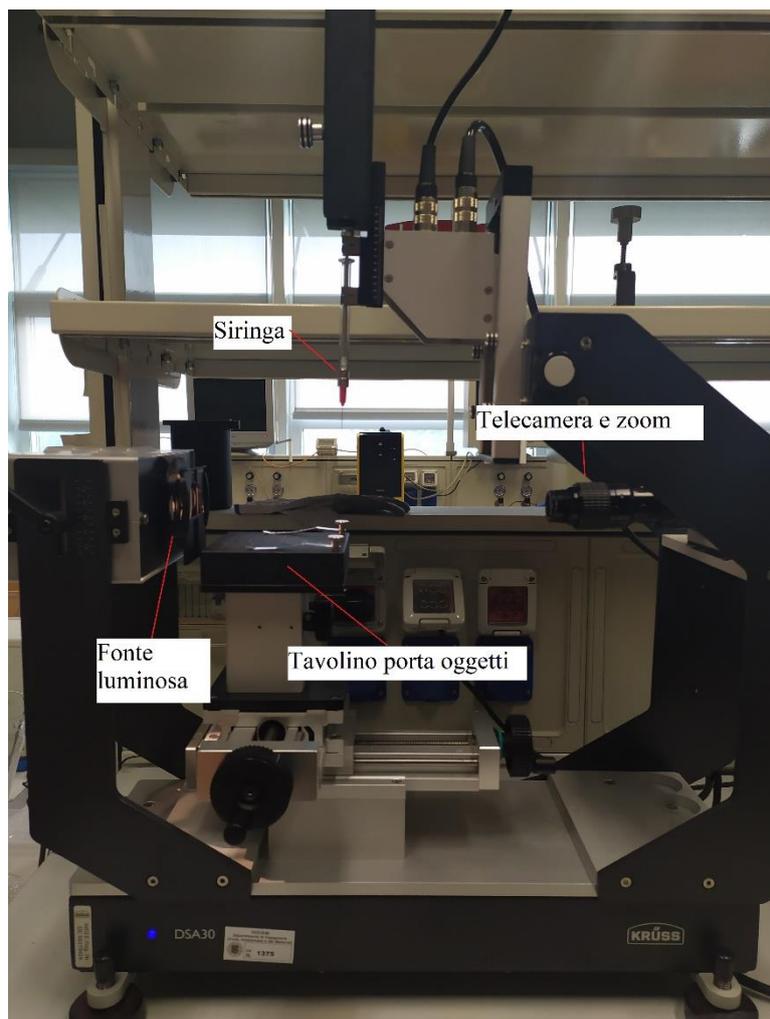


Figura 3.20: Strumentazione per la misura dell'angolo di contatto

### 3.7 Caratterizzazione morfologica degli *scaffold*

Il microscopio a scansione elettronica è uno strumento utilizzato per ottenere informazioni sulla morfologia superficiale di un campione, attraverso una tecnica non distruttiva. A differenza del microscopio ottico, che utilizza fotoni luminosi come sorgente di radiazioni, il SEM sfrutta gli elettroni. Queste particelle hanno infatti una lunghezza d'onda molto inferiore a quella dei fotoni, che consente di indagare il campione in profondità e di avere in uscita delle immagini dalla risoluzione più elevata. Più in dettaglio, si irradia la superficie del campione con il fascio elettronico, emesso da una sorgente mobile che punto per punto va ad irradiare l'intero campione, e opportunamente indirizzato mediante un sistema di focalizzazione; l'interazione tra gli elettroni ed il materiale causa l'emissione di diverse particelle, tra cui elettroni secondari,

che vengono opportunamente raccolti e convertiti in un'immagine in bianco e nero ad elevata risoluzione e profondità di campo.

Il microscopio elettronico (Figura 3.21) è costituito da un cannone elettronico che emette un fascio di elettroni primari, un sistema per il vuoto spinto, una serie di lenti elettromagnetiche che concentrano gli elettroni sul campione, un sistema per scansione che indirizza gli elettroni sull'asse ottico del sistema, alcuni deflettori, una lente obiettivo, un rivelatore di segnale, un sistema di trasduzione e amplificazione, ed infine da un monitor che permette di visualizzare le immagini.



Figura 3.26: Componenti di un microscopio elettronico a scansione SEM

Per quanto riguarda la preparazione dei campioni, essi vengono montati su un apposito supporto (*stub*) di materiale conduttore (in genere alluminio) ed incollati con un materiale adesivo (pasta di argento o nastro biadesivo di grafite). Nel caso di materiali non conduttori, essi vengono sottoposti ad un processo di ricoprimento con un sottile strato di materiale conduttore, generalmente oro (metallizzazione dei campioni). Lo strumento utilizzato per l'analisi è un microscopio da tavolo Phenom. Le immagini SEM sono state acquisite a partire da campioni elettrofilati metallizzati con oro, e l'analisi d'immagine è stata effettuata con GIMP 2.8, dotato di un software di acquisizione e analisi di immagine (EDAX Genesis).

### 3.8 Caratterizzazione meccanica

I test di caratterizzazione meccanica vengono impiegati per studiare le risposte del materiale a diversi tipi di sollecitazione.

Lo strumento utilizzato (Figura 3.27) si compone di una *traversa superiore*, che può muoversi sia verso l'alto (per prove a trazione) sia verso il basso (per prove a compressione), e a cui è collegata una *cella di carico*. Sono inoltre presenti due *afferraggi* uno superiore e uno inferiore, in corrispondenza dei quali viene fissato il campione da analizzare. È inoltre presente un software, che registra in tempo reale il valore di tensione e di deformazione a cui è sottoposto il provino.

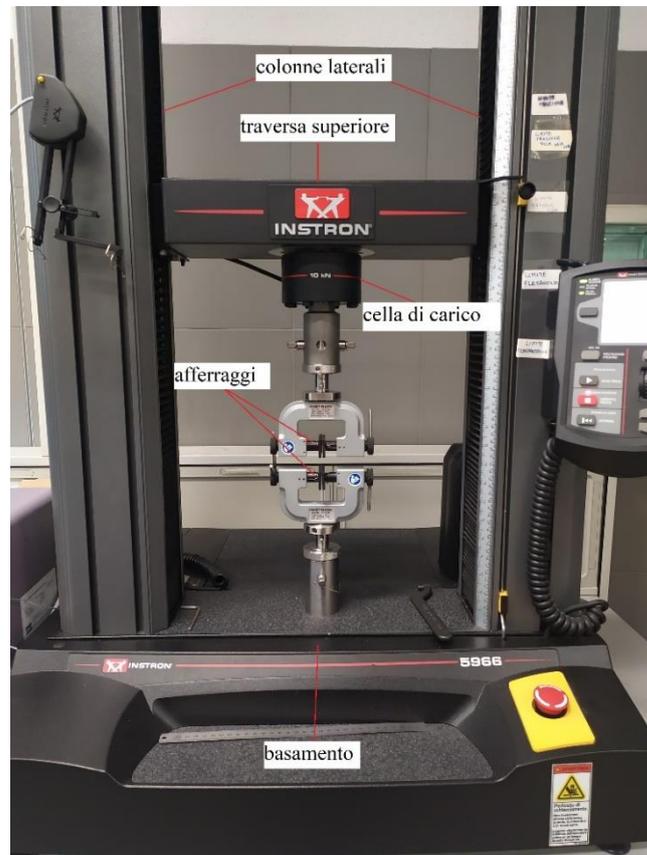


Figura 3.22: Dinamometro Instron utilizzato per le prove a trazione

In particolare, l'allungamento ( $\epsilon$ ) è dato dal rapporto tra la variazione di lunghezza del provino ( $\Delta l$ ) e la sua lunghezza utile iniziale ( $l_i$ ):

$$\epsilon = \frac{\Delta l}{l_i}$$

mentre il valore di tensione ( $\sigma$ ), misurato in MPa, si calcola dal rapporto tra la forza esercitata dalla cella di carico ( $F$ ) e l'area di applicazione di tale forza ( $A$ ):

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

A partire da questi dati è possibile rappresentare graficamente l'andamento della tensione ( $\sigma$ ) in funzione della deformazione percentuale ( $\epsilon\%$ ), che prende il nome di diagramma  $\sigma$ - $\epsilon$ . Un esempio di diagramma  $\sigma$ - $\epsilon$  è riportato in Figura 3.23. Dallo studio di questa curva, si possono individuare alcuni tratti caratteristici: di norma è sempre presente, anche se molto breve, un tratto iniziale lineare, in corrispondenza del quale il materiale presenta un comportamento elastico. All'interno di questo limitato intervallo di deformazioni, il materiale può tornare alla sua condizione iniziale non appena viene rilasciato il carico. Inoltre, in questo tratto, il materiale segue la legge di Hooke:

$$\sigma = E * \epsilon$$

dove la costante di proporzionalità  $E$  prende il nome di modulo elastico, o modulo di Young, il cui valore corrisponde, per definizione, alla pendenza del tratto iniziale rettilineo della curva sforzo-deformazione.

Proseguendo lungo la curva, si raggiunge un valore di tensione, detto di snervamento ( $\sigma_{sn}$ ), oltre il quale il materiale risulta irreversibilmente deformato, ed anche dopo la rimozione del carico non ritorna più alla sua lunghezza iniziale. La curva poi prosegue, fino a raggiungere un valore massimo di carico, detto anche punto di rottura ( $\sigma_u, \sigma_{max}$ ). Dopo questo punto, la curva inizia ad abbassarsi, fino al punto in cui il materiale cede definitivamente.

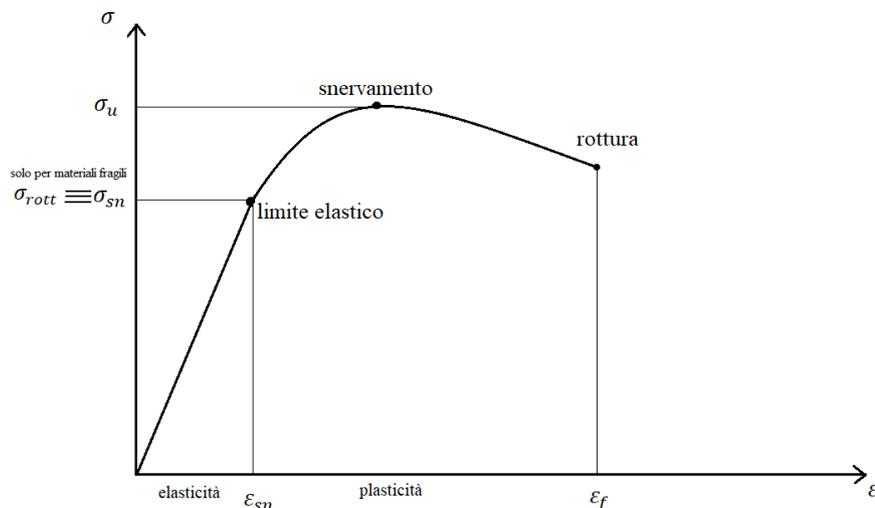


Figura 3.23: Esempio di curva sforzo-deformazione  $\sigma$ - $\epsilon$

Mentre per i materiali fragili è proprio la  $\sigma_{rott}$  (che in questo caso coincide con il limite elastico) il limite ultimo del mantenimento delle prestazioni meccaniche del materiale, nel caso dei materiali elasto-plastici tale limite è definito dalla  $\sigma_u$ , anche se per operare in campo puramente elastico è bene tenersi sotto la  $\sigma_{sn}$ .

Infine, dalla misura dell'area sottesa alla curva  $\sigma$ - $\varepsilon$  è possibile ottenere informazioni sulla tenacità del materiale, direttamente proporzionale all'energia necessaria per rompere il materiale.

Nel presente lavoro di Tesi sono state effettuate prove a trazione, al fine di valutare il modulo elastico  $E$ , la tensione a rottura  $\sigma_B$  e l'allungamento a rottura  $\varepsilon_B$ .

Le curve  $\sigma$ - $\varepsilon$  sono state ottenute utilizzando la macchina di prova Instron 4465 con cella di carico a 10 kN. I polimeri, sotto forma di film e *scaffold* elettrofilati delle dimensioni di 5x50 mm, sono stati fissati alla base rigida ed alla traversa mobile dello strumento attraverso appositi afferraggi, in modo tale da mantenere un tratto utile di lunghezza pari a 20 mm. Lo spessore è stato calcolato come media della misura effettuata su cinque punti diversi del campione, mediante un micrometro. Le prove, ripetute su 8 provini diversi, sono state effettuate a temperatura ambiente con una velocità costante dell'attuatore di 10 mm/min. Il valore del modulo elastico ( $E$ ) è stato calcolato come media delle pendenze dei grafici  $\sigma$ - $\varepsilon$  ricavati dalle singole prove.

### **3.9 Studi di degradazione enzimatica**

Al fine di studiare il comportamento dei polimeri oggetto della presente Tesi in condizioni fisiologiche, ed in particolare la loro velocità di degradazione, sono state condotte delle prove di degradazione enzimatica, il cui scopo è quello di simulare l'attacco che il materiale potrebbe ricevere all'interno del corpo umano.

Gli esperimenti di degradazione enzimatica sono stati condotti in condizioni di temperatura e pH fisiologici, su porzioni di scaffold di circa 10 mg dei campioni PBS e P(BSBDTDP), in presenza di tripsina. L'enzima è stato aggiunto ad una soluzione tampone (pH 7.4) in concentrazione pari a 500  $\mu$ g/ml. I campioni sono stati inizialmente pesati e inseriti in provette contenenti una quantità di soluzione acquosa tamponata tale che all'interno di ogni provetta fosse presente una quantità di tripsina pari a 2.5  $\mu$ g/mg di campione. Sono stati poi mantenuti in agitazione (70 rpm) in incubatore (Julabo SW22) ad una temperatura costante di 37 °C per periodi di tempo variabili, fino ad un massimo di tre settimane, provvedendo a cambiare la soluzione enzimatica quotidianamente, per garantire la piena attività dell'enzima.

A distanze di tempo prefissate, i campioni sono stati rimossi in triplicato dalla soluzione, lavati con acqua distillata, centrifugati e lasciati ad asciugare fino al raggiungimento di un peso costante. Il peso residuo percentuale è stato calcolato a partire dalla seguente relazione:

$$m_{res}(\%) = 100 - [(m_{in} - m)/m_{in} \cdot 100]$$

Dove  $m$  è il peso del campione misurato dopo il processo di degradazione mentre  $m_{in}$  è il peso iniziale. Sono state realizzate dieci provette in duplicato, per un totale di 20 campioni.

### 3.10 Prove di biocompatibilità

Gli studi di biocompatibilità *in vitro* sono stati condotti presso i laboratori di Interazioni Cellule e Nanomateriali dell'Università degli studi di Pavia.

#### 3.10.1 Coltura cellulare

La linea cellulare di fibroblasti murini, NIH-3T3 (CRL1658), è stata ottenuta dalla American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Le cellule NIH-3T3 sono state coltivate nel terreno di coltura Dulbecco Eagle's medium (DMEM) a cui è stato aggiunto glucosio (Invitrogen), in quantità pari a 4,5 g/L, integrato con siero di vitello bovino al 10% (Sigma-Aldrich) e con l'1% p/v di l-glutammina (Lonza). Tale linea cellulare è stata incubata a 37 ° C in atmosfera contenente il 5% di CO<sub>2</sub> e regolarmente tripsinizzata quando veniva raggiunta la confluenza; le cellule raccolte sono state poi contate e seminate in pozzetti.

Prima della semina cellulare, gli *scaffold* sono stati tagliati in pezzi di forma rotonda (area 2 cm<sup>2</sup>, spessore di circa 80 μm), montati su supporti CellCrown da 24 pozzetti (Scaffdex, Tampere, Finlandia) per evitare che galleggiasse nel terreno di coltura cellulare, e inseriti in piastre da 24 pozzetti. Tali *scaffold* sono stati poi sterilizzati con EtOH 96% per 15 minuti, quindi trattati con EtOH 70% per altri 15 minuti, lavati due volte in tampone fosfato (PBS) per 10 minuti, assemblati in una piastra da 24 pozzetti e lasciati in incubazione per una notte in PBS contenente 1% di penicillina/streptomina alla luce UV. A questo punto, gli *scaffold* sterilizzati sono stati incubati con terreno di coltura privo di siero (DMEM) a 37 ° C per 2 ore prima della semina cellulare.

#### 3.10.2 Studi di proliferazione cellulare

Le cellule NIH-3T3 sono state coltivate su *scaffold* sterilizzati realizzati in: (i) PBS, (ii) P (BSBDTD), e (iii) su piastre di coltura di tessuto plastico (TCPS), utilizzate come controllo

interno. In breve, il giorno 0 è stata versata una goccia di sospensione cellulare contenente  $5.0 \times 10^4$  cellule sulla parte superiore di ciascuno *scaffold*. Dopo 30 minuti, è stato aggiunto 1 mL di terreno di coltura cellulare a ciascun pozzetto (tale terreno è stato cambiato ogni 2 giorni durante l'intera durata della prova).

La vitalità cellulare sui diversi *scaffold* è stata valutata al giorno 1 e al giorno 5 utilizzando un saggio quantitativo a base di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazolio bromuro (MTT; Sigma-Aldrich) (secondo le istruzioni del produttore). In particolare, dopo ciascun prelievo gli *scaffold* contenenti le cellule NIH-3T3 sono stati trasferiti in una piastra da 24 pozzetti e il terreno di coltura è stato sostituito con 500  $\mu$ L di terreno DMEM, a cui sono stati aggiunti 50  $\mu$ L di MTT (5 mg/mL). Gli *scaffold* sono stati quindi incubati per 4 ore a 37 ° C in un incubatore in atmosfera contenente il 5% di CO<sub>2</sub>. I cristalli di formazano, che si formano a seguito dell'interazione tra la soluzione contenente MTT e le cellule vive, sono stati quindi sciolti in isopropanolo 1: 1 v/v-0,04 m HCl. Sono state preparate delle aliquote dal volume di 100  $\mu$ L, la cui l'assorbanza è stata misurata a 565 nm da un lettore di micropiastre (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

La velocità di proliferazione cellulare, definita come l'incremento del rapporto tra il numero di cellule nei giorni 1 e 5 rispetto al numero di cellule seminate al giorno zero ( $5,0 \times 10^4$  cellule / *scaffold*), è stata valutata attraverso una curva standard di vitalità cellulare. Per quanto riguarda l'analisi statistica, le differenze tra i due gruppi sono state valutate mediante analisi ANOVA. Per confronti multipli è stato invece eseguito il test di Bonferroni. È stata attribuita significatività statistica per  $p \leq 0,05$ . Tutti i calcoli sono stati effettuati mediante il software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA).

# CAPITOLO 4

## RISULTATI E DISCUSSIONE

A temperatura ambiente, il poli(butilene succinato) PBS si presenta come solido semicristallino di colore giallo chiaro, mentre il copolimero poli(butilene succinato/ditiodipropionato) P(BSBDTDP) è un solido semicristallino di colore ambrato (Figura 4.1). In entrambi i casi la colorazione è dovuta alla presenza del catalizzatore (TBT). Infatti, dopo purificazione, i materiali diventano bianchi, ed assumono una forma a “fiocchi”. Gli *scaffold* ottenuti per elettrofilatura si presentano come solidi porosi bianchi e abbastanza flessibili.



*Figura 4.1. PBS appena scaricato dal reattore.*

I due materiali oggetto della presente Tesi risultano caratterizzati da una buona solubilità in cloroformio, utilizzato per la purificazione, ed esafluoro-isopropanolo solvente impiegato invece per preparare le soluzioni da elettrofilare.

### **4.1 Caratterizzazione molecolare**

#### **4.1.1 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)**

La struttura chimica del PBS e del copolimero P(BSBDTDP) sono state verificate, mentre la composizione molare di quest'ultimo determinata, tramite spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare  $^1\text{H-NMR}$ . Gli spettri ottenuti, riportati rispettivamente in Figura 4.2 e 4.3, sono risultati coerenti con la struttura prevista, permettendo di escludere la presenza di reazioni secondarie durante la polimerizzazione.

Infatti, nel caso del PBS, lo spettro mostra, oltre ai segnali del solvente a  $\delta$  7.25 ppm e del riferimento a  $\delta$  0 ppm, i segnali caratteristici del polimero: a  $\delta$  4.19 ppm e a  $\delta$  1.70 ppm sono registrati i segnali dei protoni metilenici della sub-unità glicolica, rispettivamente *b* (tripletto) e *c* (multipletto), mentre a  $\delta$  2.61 ppm si trova il singoletto assegnabile agli idrogeni della sub-unità acida, *a*.

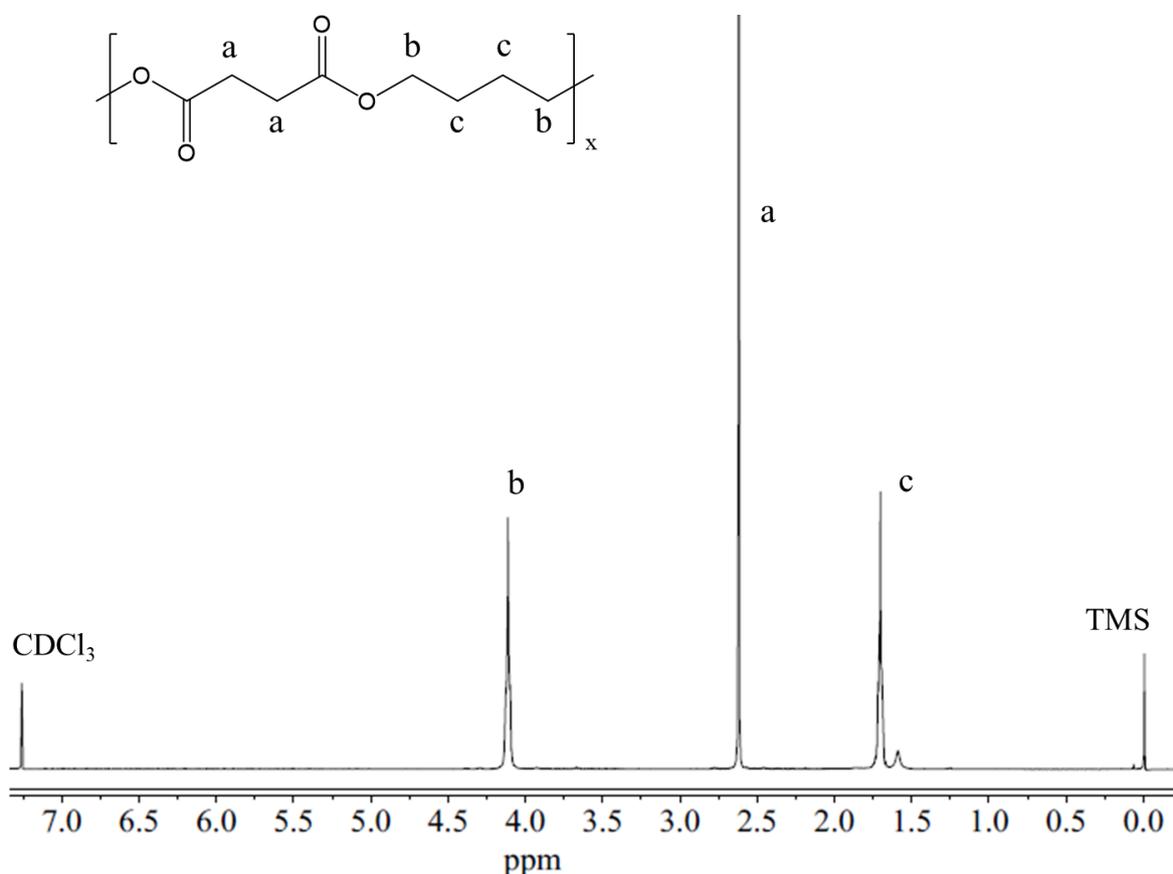


Figura 4.2. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del PBS con attribuzione dei picchi.

Per quanto riguarda il copolimero, invece, oltre ai segnali del solvente ( $\delta$  7.25 ppm) e del riferimento ( $\delta$  0 ppm), si possono notare sia il singoletto *a* ( $\delta$  2.61 ppm) della sub-unità succinica, il tripletto *b* ed il multipletto *c*, relativi ai protoni metilenici della sub-unità glicolica, collocati rispettivamente a  $\delta$  4.19 ppm e a  $\delta$  1.70 ppm, ed i due tripletti *d* ed *e*, visibili a  $\delta$  2.91 ppm e a  $\delta$  2.73 ppm, relativi alla sub-unità ditiodipropionica.

Inoltre, a partire dall'intensità relativa dei segnali *a* ed *e*, relativi alle due sub-unità acide, è stato possibile calcolare anche la composizione effettiva del copolimero, che è risultata corrispondente a quella di alimentazione (Tabella 4.1), ad indicare una reattività molto simile dei due diacidi.

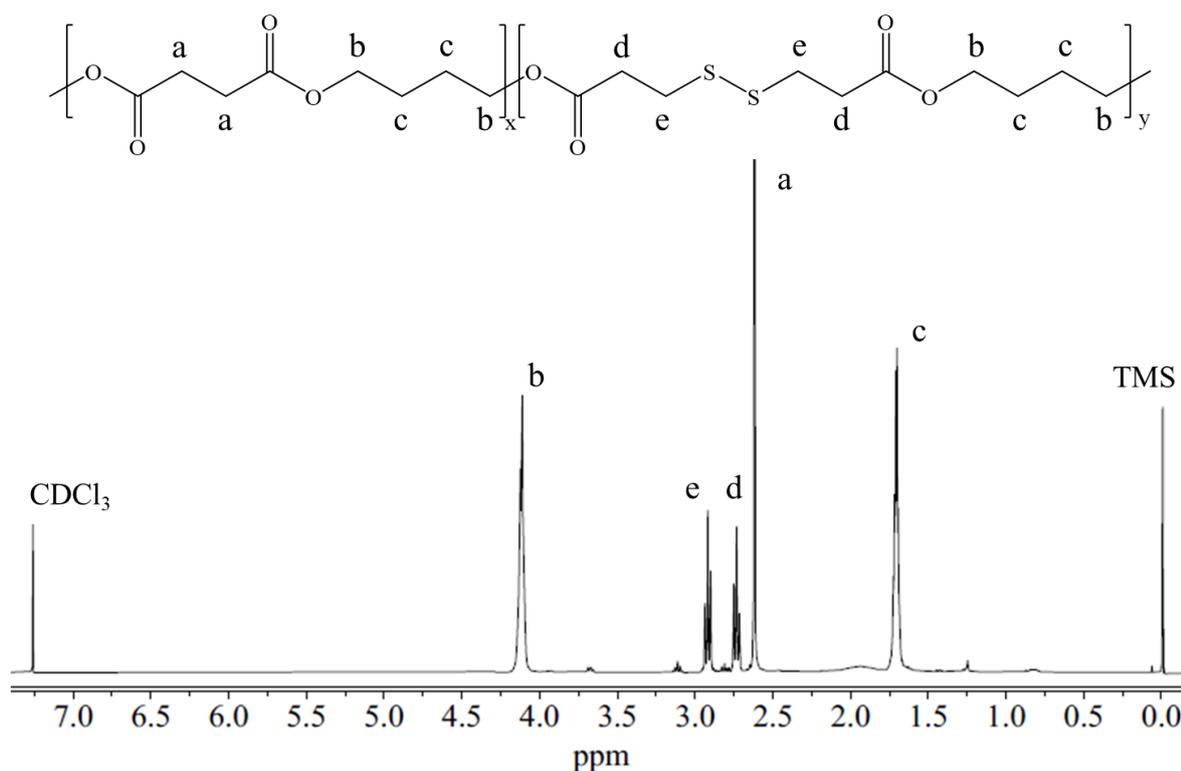


Figura 4.3. Spettro <sup>1</sup>H-NMR del copolimero P(BSBDTDP) con attribuzione dei picchi.

I dati relativi alla caratterizzazione molecolare, effettuata tramite GPC, sono riportati in Tabella 4.1: come si può notare, tanto l'omopolimero quanto il copolimero presentano pesi molecolari relativamente elevati e comparabili, con indici di polidispersità D caratteristici dei poliesteri ottenuti per policondensazione in massa, ad ulteriore conferma del buon controllo sul processo di sintesi.

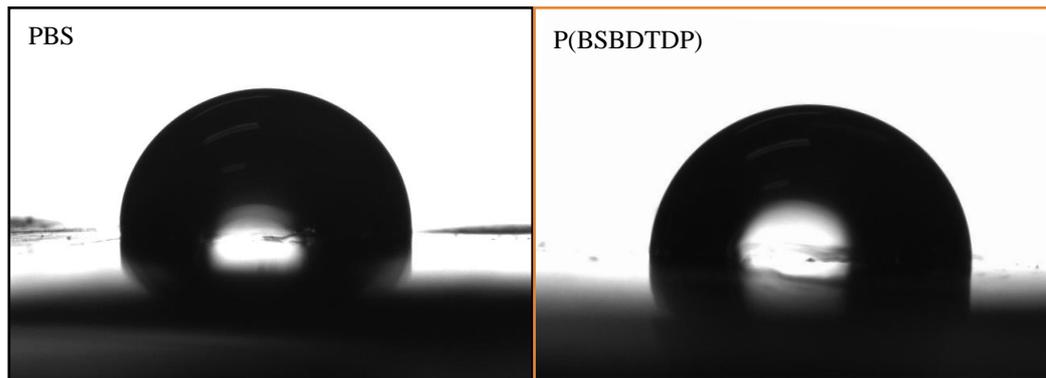
Tabella 4.1. Dati di caratterizzazione molecolare (<sup>1</sup>H-NMR e GPC) e di angolo di contatto sui campioni PBS e P(BSBDTDP).

	BS feed (mol %)	BS (mol %)	M <sub>n</sub> (g/mol)	D	WCA (°)
PBS	100	100	50000	2.1	92 ± 3
P(BSBDTDP)	70	70	42500	2.2	95 ± 2

Prima delle successive caratterizzazioni, entrambi i campioni sono stati sottoposti a pressofusione, al fine di ottenere film polimerici, e ad elettrofilatura, per ottenere tappetini nanofibrosi, secondo le procedure riportate nel Capitolo 3.

## 4.2 Misure di bagnabilità

In Tabella 4.1 sono riportati i valori di angolo di contatto ottenuti per i film, realizzati per pressofusione, di PBS e del copolimero P(BSBDTDP): è possibile notare come la copolimerizzazione non abbia comportato una significativa variazione dell'angolo di contatto, che rimane in entrambi i casi superiore ai 90°. Tale risultato evidenzia una simile idrofobicità e quindi una scarsa bagnabilità di entrambi i poliesteri oggetto di studio.



*Figura 4.4. Immagini dell'angolo di contatto per i due campioni PBS (riquadro nero) e P(BSBDTDP) (riquadro arancione).*

## 4.3 Caratterizzazione Termica

La caratterizzazione termica dei materiali sotto forma di film e di tappetini elettrofilati è stata condotta mediante analisi termogravimetrica (TGA) e calorimetrica a scansione differenziale (DSC).

### 4.3.1 Analisi Termogravimetrica (TGA)

Tramite analisi termogravimetrica (TGA), condotta in atmosfera inerte di azoto, sono state determinate le temperature di decomposizione termica, corrispondenti all'inizio della perdita di peso ( $T_{id}$ ) e di massima velocità di degradazione ( $T_{max}$ ). La conoscenza di questi dati è fondamentale poiché consente di processare il materiale senza incorrere in problemi legati a processi di degradazione termica.

Le curve TGA dei film e dei tappetini studiati, ottenuti a partire da PBS e da P(BSBDTDP), sono riportate in Figura 4.5, mentre le temperature corrispondenti all'inizio della degradazione e alla velocità di massima perdita di peso sono raccolte in Tabella 4.2. I risultati ottenuti evidenziano una buona stabilità termica di entrambi i materiali oggetto della presente Tesi, in

quanto in tutti i casi i materiali iniziano la loro decomposizione al di sopra dei 300 °C. Tuttavia, come indicato dai valori di  $T_{id}$ , l'introduzione della subunità ditiodipropionica nella catena polimerica principale fa sì che il processo di degradazione termica cominci a temperatura più bassa, suggerendo che in questa fase i processi degradativi coinvolgano principalmente i legami S-C e S-S, non presenti nel PBS.

Inoltre, per quanto riguarda la differenza tra film e scaffold, sia nel caso dell'omopolimero PBS che del copolimero P(BSBDTDP), i tappetini elettrofilati mostrano una stabilità termica di pochi gradi inferiore, sia per quanto riguarda la  $T_{id}$  che la  $T_{max}$ , probabilmente a causa del particolare tipo di processing attraverso cui sono state ottenute le fibre, ma in ogni caso elevata e comparabile.

Per quanto riguarda il profilo di degradazione, in tutti i materiali oggetto di studio la perdita di peso avviene in un unico step, ed il peso residuo al termine della prova risulta praticamente nullo.

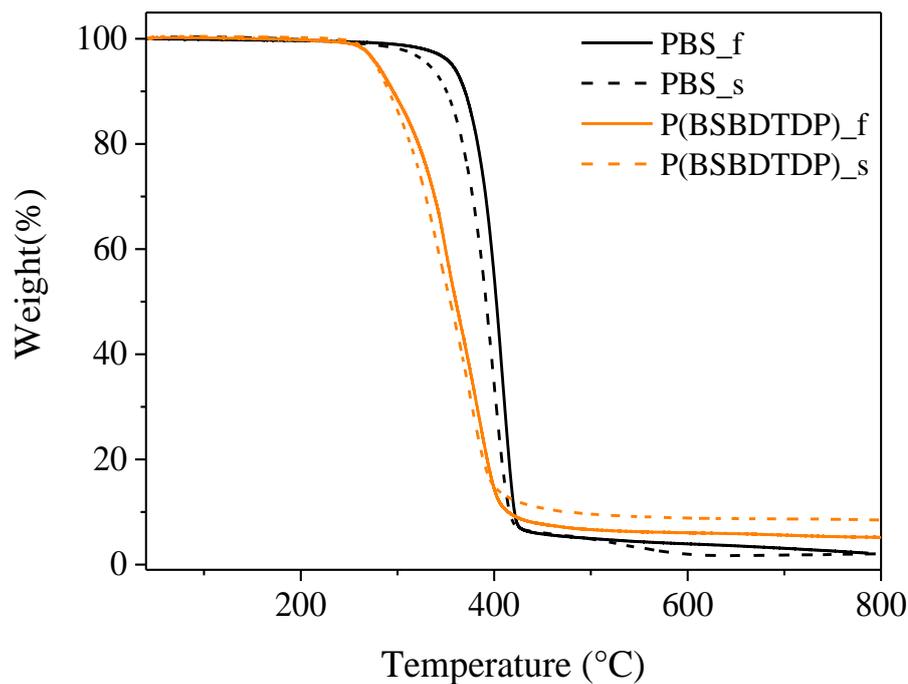


Figura 4.5. Curve termogravimetriche dei campioni PBS e P(BSBDTDP) in forma di film (linea continua) e scaffold (linea tratteggiata) (in atmosfera di azoto, velocità di riscaldamento 10 deg/min).

Tabella 4.2. Dati di caratterizzazione termica (TGA e DSC) e strutturale (WAXS) dei materiali in forma di film e di tappetini elettrofilati.

	T <sub>id</sub> °C	T <sub>max</sub> °C	I scan				II scan						X <sub>c</sub> %
			T <sub>g</sub> °C	ΔC <sub>p</sub> J/g°C	T <sub>m</sub> °C	ΔH <sub>m</sub> J/g	T <sub>g</sub> °C	ΔC <sub>p</sub> J/g°C	T <sub>c</sub> °C	ΔH <sub>c</sub> J/g	T <sub>m</sub> °C	ΔH <sub>m</sub> J/g	
PBS_f	385	407	-35	0.118	114	57	-35	0.122	-	-	114	51	46
P(BSBDTDP)_f	310	389	-38	0.156	80	36	-38	0.235	4	6	80	28	36
PBS_s	363	398	-34	0.088	114	63	-34	0.125	-	-	114	50	51
P(BSBDTDP)_s	306	375	-37	0.169	80	36	-37	0.166	-	-	80	24	40

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

In Tabella 4.2 sono riportati i dati di prima e seconda scansione per i film ottenuti per pressofusione e per i tappetini ottenuti mediante elettrofilatura dei due materiali oggetto della presente Tesi, mentre in Figura 4.6 sono riportate le relative curve calorimetriche (I e II scan). In prima scansione il campione PBS, sia in forma di film (Figura 4.6A) che di *scaffold* (Figura 4.6B), risulta semicristallino: la corrispondente curva calorimetrica è infatti caratterizzata da una variazione endotermica della linea di base associata alla transizione vetrosa, caratteristica della porzione amorfa del materiale, al di sotto di temperatura ambiente ( $T_g = -32/-35$  °C), seguita da un picco endotermico a più alta temperatura, relativo alla fusione della porzione cristallina ( $T_m = 114$  °C).

Le curve DSC del copolimero, sia in forma di film (Figura 4.6A) che di *scaffold* (Figura 4.6B), sono anch'esse tipiche di un materiale semicristallino, con  $T_g$  anche in questo caso al di sotto di temperatura ambiente, leggermente minore di quella del PBS, e con temperatura di fusione di oltre 30 gradi inferiore rispetto a quella del PBS (80 °C vs. 114 °C), per effetto della copolimerizzazione. Infatti, la presenza della co-unità ditiodipropionica va a diminuire la capacità di cristallizzazione del PBS e porta anche alla formazione di cristalli meno perfetti, andando ad incidere non solo sulla posizione del picco di fusione, ma anche sulla sua intensità. Come si può notare (Tabella 4.2), entrambi i campioni P(BSBDTDP), sia film che *scaffold*, presentano un valore di  $\Delta H_m$  minore di quello dell'omopolimero, con un picco di fusione multiplo, che può essere ascritto a processi di fusione/ricristallizzazione di cristalli con basso

grado di perfezione, che generalmente si sviluppano nei sistemi copolimerici a causa dell'effetto di disturbo delle co-unità nel processo di cristallizzazione. Sono infatti presenti molteplici picchi nel range di temperature compreso tra 40 °C e 61 °C, legati alla fusione dei cristalli meno perfetti, ed un altro, più intenso e ben delineato a temperatura pari a 80°C, corrispondente alla fusione dei cristalli più perfetti. Contemporaneamente, si osserva un aumento della frazione di fase amorfa evidenziato da un aumento dell'altezza del gradino della transizione vetrosa (aumento dei valori di  $\Delta c_p$ ).

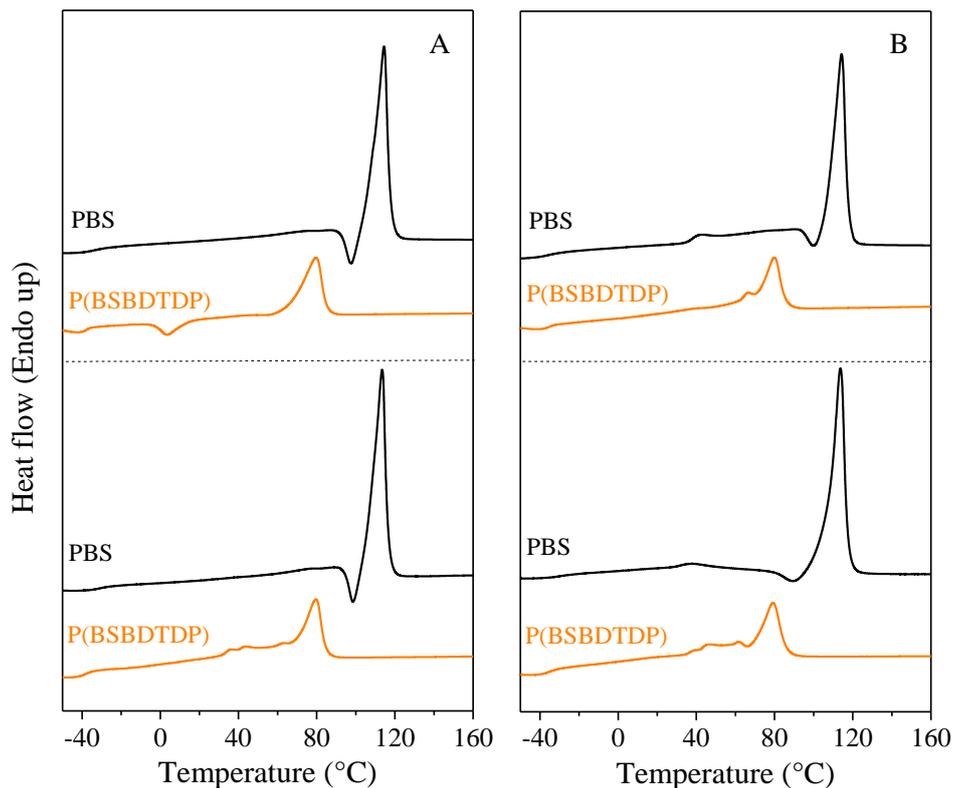


Figura 4.6. Curve DSC di I (in basso) e II scan dopo rapido raffreddamento dal fuso (in alto) del PBS e del copolimero P(BSBDTDP) in forma di A) film; B) scaffold.

Come noto, un materiale parzialmente cristallino mostra generalmente un comportamento diverso rispetto al suo analogo completamente amorfo. Nonostante i risultati contrastanti riportati in letteratura, si ritiene che la cristallinità agisca come punti di reticolazione fisici, provocando un aumento dei valori di  $T_g$ , ed è dunque opportuno esaminare il fenomeno in totale assenza di cristallinità. A tale scopo, tutti i campioni sono stati sottoposti a raffreddamento rapido (quenching) dal fuso. Le relative curve DSC e i corrispondenti dati sono rispettivamente mostrati nella Figura 4.6 e raccolti nella Tabella 4.2. Per entrambi i campioni, non si osservano apprezzabili differenze tra le curve di I e II scansione ad indicare l'inefficacia del quenching.

Sostanzialmente la velocità di raffreddamento dello strumento è risultata inferiore alla intrinseca velocità di cristallizzazione dei due campioni.

Nel caso del copolimero in forma di film è possibile notare, alla temperatura di 4 °C, un fenomeno esotermico di cristallizzazione: questo comportamento è tipico dei materiali che, durante la scansione calorimetrica, sono in grado di cristallizzare nella finestra di temperatura tra  $T_g$  e  $T_m$  e poi fondono a temperatura più alta ( $T_m$ ). Tuttavia, il calore associato a tale picco  $\Delta H_c$  è molto inferiore rispetto a quello di fusione  $\Delta H_m$ , ad indicare come anche in questo caso il materiale, dopo rapido *quench* dal fuso, è comunque in grado di cristallizzare durante il raffreddamento.

#### 4.4 Caratterizzazione strutturale

Per studiare l'origine delle endoterme evidenziate tramite analisi calorimetrica, e quindi determinare il tipo di fasi ordinate presenti nei polimeri in esame, si è ricorso all'analisi diffrattometrica ai raggi X ad alto angolo (WAXS). I diagrammi di diffrazione dei film e degli scaffold del PBS e del copolimero P(BSBDTDP) sono riportati in Figura 4.7.

I profili dei film sono tipici di materiali semicristallini e contengono alcuni riflessi ben definiti, caratteristici della porzione ordinata del materiale, sovrapposti a una linea di base a campana, dovuta alla frazione di materiale amorfo. Si può osservare come gli spettri dei due materiali presentino un profilo molto simile, ad indicare lo stesso tipo di struttura cristallina, ovvero il reticolo cristallino caratteristico della fase  $\alpha$  del PBS: infatti si possono notare chiaramente i due riflessi collocati a  $2\theta = 19^\circ$  e  $2\theta = 23^\circ$ . La posizione dei riflessi rimane pressoché inalterata e quindi il legame S-S presumibilmente non altera la posizione e la distanza delle catene all'interno delle zone cristalline, ma al contrario, potrebbe trovarsi nelle catene che costituiscono le zone disordinate.

Tuttavia, come risulta evidente dai diffrattogrammi di Figura 4.7, il rapporto tra i riflessi della porzione cristallina e la campana dell'amorfo varia sensibilmente nel copolimero. In particolare, come indicato dai valori di  $X_c$ , calcolati dagli spettri WAXS e riportati in Tabella 4.2, il grado di cristallinità diminuisce per effetto della copolimerizzazione. Tale risultato è in linea con la diminuzione, nel copolimero, dell'entalpia di fusione ( $\Delta H_m$ ), rilevata tramite analisi calorimetrica. Queste considerazioni sono valide per i campioni sotto forma sia di film che di tappetini elettrofilati, anche se in quest'ultimo caso, i valori di cristallinità sono risultati maggiori rispetto a quelli calcolati per i rispettivi film, probabilmente a causa del processo di

elettrofilatura, che prevede il passaggio del polimero da solvente ed uno stiramento delle fibre per opera di una differenza di potenziale.

È interessante notare, nel caso del copolimero, un'inversione di intensità relativa dei due picchi: mentre nel film il riflesso più intenso è quello a  $2\theta = 23^\circ$ , in linea con quanto osservato per l'omopolimero, nello *scaffold* il riflesso a  $2\theta = 19^\circ$  risulta quello più pronunciato. La ragione di questo comportamento potrebbe essere ascritta ad una parziale distorsione del reticolo, in relazione ad un diverso orientamento della cella cristallina rispetto al portacampione quando il materiale è in forma di film o di *scaffold*. Si ricorda, infatti, che durante il processo di elettrofilatura il materiale viene sottoposto ad un notevole stiramento, che potrebbe alterare la cella cristallina.

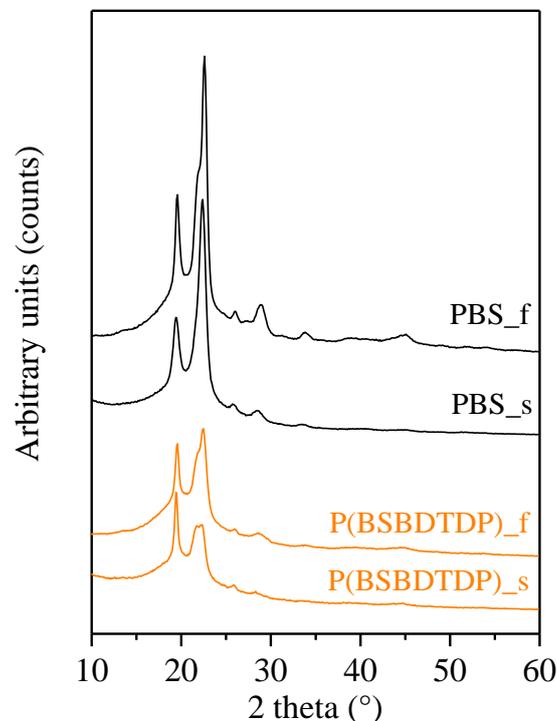


Figura 4.7. Profili diffrattometrici dei campioni PBS e P(BSBDTDP) in forma di film e scaffold ottenuti attraverso analisi WAXS.

## 4.5 Caratterizzazione morfologica

Al fine di caratterizzare dal punto di vista morfologico i tappetini ottenuti per elettrofilatura, sono state effettuate analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM).

La Figura 4.8 riporta le immagini SEM dei due tappetini elettrofilati, ottenuti a partire dall'omopolimero PBS e dal copolimero P(BSBDTDP) con relativa distribuzione delle dimensioni delle fibre.

Come si può notare (Figura 4.8), in entrambi i casi è stato possibile realizzare tappetini elettrofilati omogenei, caratterizzati da fibre cilindriche lisce, prive di difetti e orientate in maniera casuale. L'assenza di *beads* e difetti 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. Nel caso del PBS, la membrana è un intreccio di filamenti di dimensioni piuttosto diverse, variabili nel range 150-900 nm, mentre nel tappetino P(BSBDTDP) la dimensione delle fibre varia nel range 400-2500 nm: la distribuzione risulta dunque più ampia che nel caso del PBS, e le dimensioni dei diametri sono più elevate.

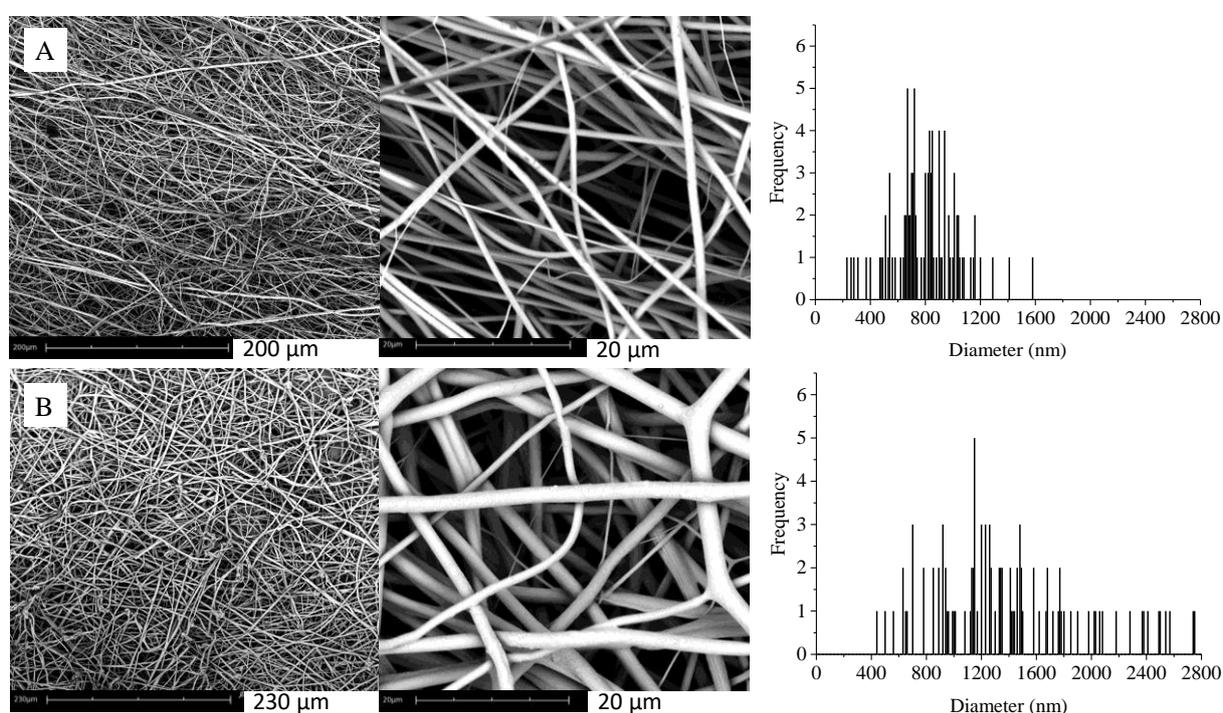


Figura 4.8. Immagini SEM dei tappetini elettrofilati di A) PBS e B) P(BSBDTDP) e relativa distribuzione delle dimensioni delle fibre.

## 4.6 Caratterizzazione meccanica

Le misure meccaniche *stress-strain* sono state eseguite su striscioline di film e di *scaffold* di forma 50 x 5 mm, allungando un provino di forma rettangolare a velocità costante, e misurando la variazione dello sforzo in funzione della deformazione.

In Figura 4.9 sono rappresentate le curve sforzo-deformazione, mentre in Tabella 4.3 sono raccolti i valori di modulo elastico (E), di sforzo a rottura ( $\sigma_b$ ) e deformazione a rottura ( $\epsilon_b$ ).

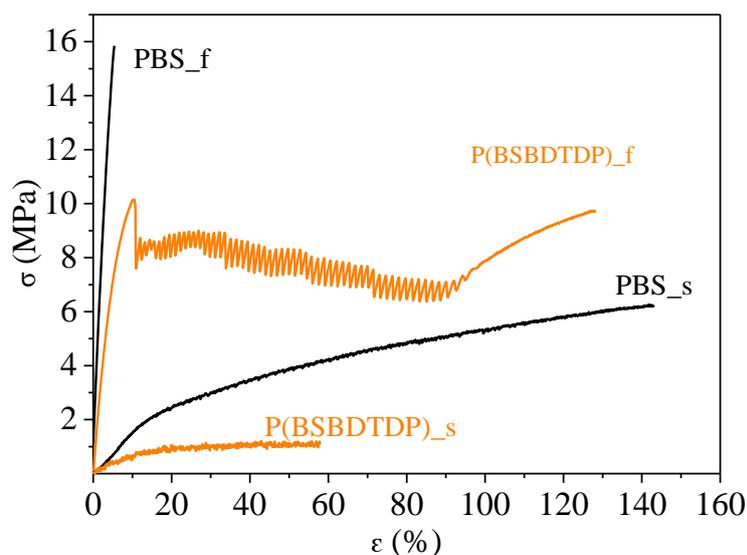


Figura 4.9. Grafico sforzo-deformazione dei film e dei campioni elettrofilati a partire da PBS e P(BSBDTDP)

Tabella 4.3. Dati di caratterizzazione meccanica dei film e dei campioni elettrofilati a partire da PBS e P(BSBDTDP)

	E (MPa)	$\sigma_B$ (MPa)	$\varepsilon_B$ (%)
PBS_f	301 ± 25	16 ± 2	5 ± 1
P(BSBDTDP)_f	181 ± 16	11 ± 1	125 ± 5
PBS_s	20 ± 3	6 ± 1	151 ± 7
P(BSBDTDP)_s	12 ± 3	1.2 ± 0.2	47 ± 6

Come si può notare (Figura 4.9 e Tabella 4.3), i campioni sotto forma di film mostrano valori di tensione a rottura ( $\sigma_b$ ) simili comparabili, a conferma del fatto che la copolimerizzazione non ha inciso negativamente sulla buona resistenza a trazione del PBS. Il modulo elastico (E) si dimezza per effetto della copolimerizzazione. Tali risultati sono in linea con i dati termici e diffrattometrici precedentemente analizzati (Tabella 4.2): entrambi i materiali, infatti, sono caratterizzati da simile  $T_g$ , sono entrambi semicristallini, benchè il copolimero presenti un minore grado di cristallinità. Per quanto riguarda l'allungamento a rottura, invece, esso risulta maggiore nel caso del film realizzato a partire dal copolimero P(BSBDTDP) rispetto al film di solo PBS (125 vs. 5%): questo comportamento può essere spiegato sulla base del minore grado di cristallinità del copolimero, che ha permesso di ottenere un materiale più tenace. Se si osserva la curva  $\sigma$ - $\varepsilon$  del film P(BSBDTDP), inoltre, in seguito allo snervamento (che avviene in

corrispondenza di  $\sigma = 10.2 \text{ MPa}$  e  $\varepsilon = 10\%$ ), si possono notare dei salti nel valore della tensione, attribuibili a snervamenti successivi di piccole porzioni del film, che si verificano fino quasi al punto di rottura. Questo andamento, molto diverso rispetto a quello del PBS, che si rompe in maniera fragile dopo un allungamento del solo 5%, conferma la maggiore tenacità del copolimero.

Per quanto riguarda gli *scaffold*, invece, in entrambi i casi si assiste ad una diminuzione del modulo elastico di circa 15 volte rispetto ai film del medesimo materiale, parallelamente ad una diminuzione della tensione a rottura, nel caso del PBS di circa 2.5 volte, mentre nel copolimero di circa 10 volte. Se si osservano i valori di allungamento a rottura, il trend si inverte rispetto a quanto visto per i film: il PBS si allunga di circa il 150% prima di rompersi, mentre il copolimero solo del 47%. Questo comportamento può essere spiegato tenendo conto dell'intrinseca struttura dei tappetini: infatti, se da una parte le fibre sono responsabili di una minore rigidità, dall'altra gli *scaffold* sono intrinsecamente meno resistenti dei film a causa della presenza di un elevato numero di pori, che si traducono in altrettanti difetti quando il materiale viene sottoposto a trazione. Per questo motivo, unitamente ad un grado di cristallinità piuttosto elevato in entrambi i casi, la rottura avviene ad allungamenti minori rispetto ai film. Il comportamento del tappetino ottenuto a partire da PBS, che si rivela in controtendenza rispetto a quanto visto finora, può essere attribuito al fatto che, in questo caso, l'effetto flessibilizzante dell'elettrofilatura prevale sull'effetto della cristallinità. Inoltre, nel caso del PBS, la distribuzione delle dimensioni dei diametri risulta più stretta che nel copolimero: un tappetino più omogeneo è in grado di resistere a sollecitazioni più intense, in quanto le fibre resistono tutte in egual misura alla trazione. Viceversa, se le fibre sono disomogenee, quelle più sottili tenderanno a rompersi prima, compromettendo poi la resistenza dell'intero campione.

## 4.7 Studi di degradazione enzimatica

I tappetini elettrofilati ottenuti a partire dall'omopolimero di riferimento PBS e dal copolimero P(BSBDTDP) sono stati sottoposti a esperimenti di degradazione enzimatica in condizioni fisiologiche (temperatura  $37^\circ\text{C}$  e pH 7.4), in presenza di tripsina. Tali esperimenti sono stati condotti al fine di valutare la tempistica di degradazione di questi materiali in previsione di un loro potenziale utilizzo come biomateriali all'interno dell'organismo.

Lo studio del processo di degradazione ha previsto di sottoporre ogni campione incubato a misure di perdita di peso gravimetrico ad intervalli predeterminati, per un tempo complessivo di 21 giorni. I test sono stati condotti in triplicato. In Figura 4.10 sono riportati gli andamenti

dei pesi residui percentuali dei due campioni in funzione dei giorni di permanenza in soluzione tampone contenente l'enzima.

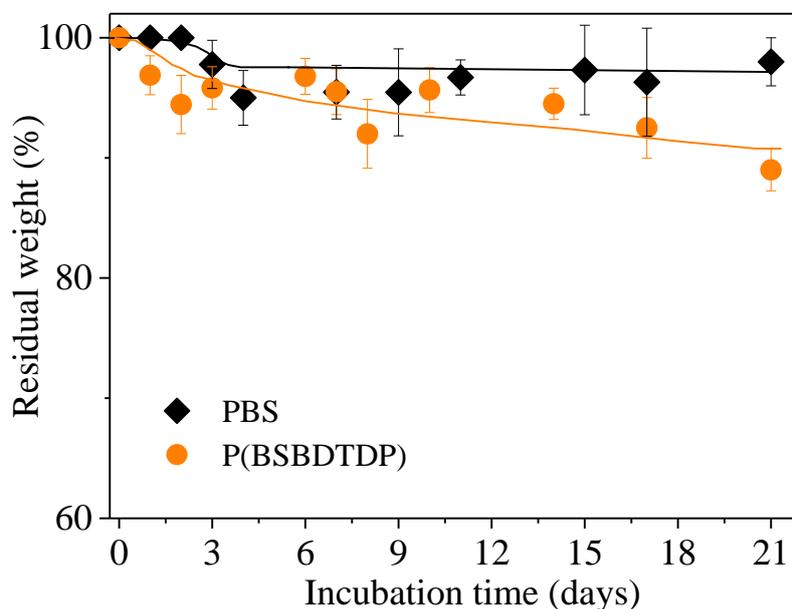


Figura 4.10. Peso residuo percentuale dei campioni elettrofilati a partire da PBS e P(BSBDTDP) in funzione del tempo di incubazione.

Dal grafico riportato in Figura 4.10, si può notare come sia per il PBS che per il P(BSBDTDP) la perdita di peso gravimetrico è molto limitata all'interno della finestra temporale esplorata, anche se il copolimero degrada leggermente più velocemente (10 vs. 3%). Come noto, la perdita di peso è influenzata da diversi fattori, tra cui i più importanti sono il peso molecolare dei campioni, il grado di cristallinità e il grado di perfezione dei cristalli, il valore di temperatura di fusione e l'idrofilicità dei materiali. Più in dettaglio, materiali con peso molecolare più basso, meno cristallini e/o contenenti cristalli meno perfetti e quindi più bassofondenti e più idrofilici degradano più velocemente. Nel presente caso, dunque, potendo escludere un effetto del peso molecolare, in quanto i due materiali sono caratterizzati da valori di  $M_n$  elevati e comparabili (Tabella 4.1), e della scarsa idrofilicità, anche in questo caso molto simile (Tabella 4.1), tale risultato è imputabile al grado di cristallinità, più elevato nel PBS che nel copolimero (Tabella 4.2), e alla  $T_m$  che, sebbene in entrambi i casi sia maggiore di quella a cui sono stati condotti i test, nel campione P(BSBDTDP) è di oltre 30 °C inferiore a quella dell'omopolimero, per effetto della copolimerizzazione.

Questo risultato però non implica necessariamente che i materiali non siano biodegradabili in senso assoluto, caratteristica come abbiamo visto decisamente importante in ambito biomedicale; a più lunghi tempi di degradazione, infatti, il processo di degradazione potrebbe

risultare più evidente. Inoltre, occorre tenere conto del tipo di applicazione per cui il materiale viene studiato: se, ad esempio, si prevede un utilizzo come supporto alla crescita cellulare, occorre che il materiale mantenga la sua integrità strutturale per tutto il tempo necessario alle cellule per aderire, proliferare e creare la loro matrice extracellulare, processo che nel complesso richiede tempi lunghi.

## 4.8 Studi di biocompatibilità

I test di compatibilità *in vitro* sono stati condotti su tappetini elettrofilati ottenuti dall'omopolimero PBS dal copolimero P(BSBDTDP). I campioni sono stati sottoposti a test di vitalità cellulare utilizzando come linea cellulare una popolazione di fibroblasti provenienti da embrione di topo (NIH-3T3), secondo la procedura descritta nel Paragrafo 3.10.

In Figura 4.11 è riportato l'andamento della proliferazione cellulare sui due materiali oggetto del presente studio, preventivamente sterilizzati. I dati sono rappresentati come rapporto fra il numero di cellule vive presenti sugli *scaffold* (calcolate mediante saggio MTT) ed il numero delle cellule seminate al giorno zero ( $5.0 \times 10^4$  cellule/*scaffold*) dopo due diversi tempi di incubazione: 1 e 5 giorni.

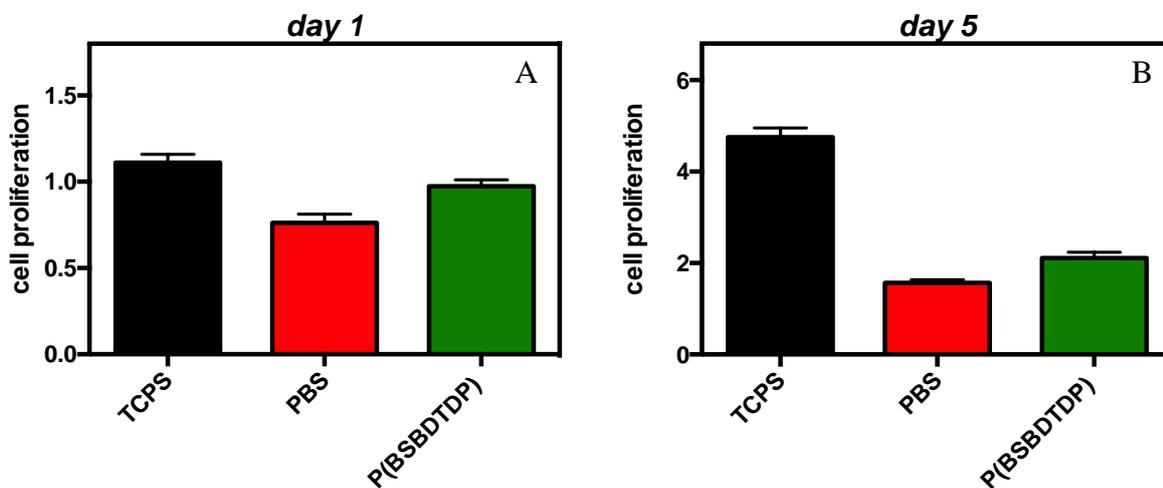


Figura 4.11. Dati di vitalità cellulare sui campioni PBS e P(BSBDTDP) valutata dopo A) 1 giorno e B) 5 giorni ore di incubazione. Cellule coltivate su plastica per coltura cellulare (TCPS) costituiscono il riferimento.

Dopo un giorno di incubazione, è possibile osservare una buona crescita cellulare sia per il PBS che per il copolimero P(BSBDTDP), benché per quest'ultimo la proliferazione sia più elevata (0.7 vs. 1). I dati raccolti dopo 5 giorni mostrano un aumento della proliferazione per entrambi i materiali; anche in questo caso però, le cellule crescono più velocemente sul copolimero (1.5 vs. 2.2). Per entrambi i tempi di incubazione, però, tali valori sono minori rispetto a quelli

osservati per il controllo, probabilmente a causa di alcuni parametri geometrici (dimensione dei pori e delle fibre) e chimici (chimica superficiale e idrofilicità) che possono influire negativamente sulla proliferazione.

Da questi dati preliminari si evince comunque come la copolimerizzazione si sia rivelata efficace per aumentare la biocompatibilità dell'omopolimero PBS, permettendo di ottenere un nuovo materiale ottimo candidato per applicazioni in ambito di ingegneria tissutale.

# CAPITOLO 5

## CONCLUSIONI

Con il progresso scientifico degli ultimi anni, la medicina moderna è andata sempre più affidandosi alla tecnologia per la produzione di farmaci, apparecchiature elettromedicali o protesi. In tutti questi ambiti di applicazione risulta fondamentale l'impiego di materiali che non solo rispondano ai requisiti di biodegradabilità e biocompatibilità, ma soddisfino anche specifiche proprietà meccaniche, dipendenti dal contesto di utilizzo del dispositivo. L'attività di ricerca svolta nel settore dei biomateriali ha portato a designare i polimeri, ed in particolare i poliesteri alifatici, quali materiali migliori per questo scopo, essendo in generale facilmente lavorabili, modulabili in termini di proprietà e soggetti a degradazione idrolitica ed enzimatica. Fra questi, il PLA, il PCL, il PGA ed i loro copolimeri, sono stati da tempo approvati dalla *Food and Drug Administration* per l'utilizzo in campo biomedico, e sono oggi impiegati nella produzione di suture riassorbibili, innesti vascolari, supporti per la rigenerazione dei tessuti e sistemi di rilascio dei farmaci. Solo di recente ha fatto il suo ingresso in questa categoria anche il poli(butilene succinato): questo omopolimero, da diversi anni oggetto di studio del gruppo di ricerca presso il quale è stato svolto il presente lavoro di Tesi, mostra infatti un'elevata stabilità termica e una buona biocompatibilità. Allo stesso tempo, tuttavia, l'elevato grado di cristallinità che lo contraddistingue rende estremamente lenta la sua degradazione all'interno dell'organismo e le proprietà meccaniche che presenta spesso non risultano ottimali in vista di applicazioni nell'ingegneria dei tessuti molli. In questo contesto si è collocato il presente lavoro di Tesi, mirata allo sviluppo e caratterizzazione di un nuovo materiale, il poli(butilene succinato/ditiodipropionato) P(BSBDTDP) che preservi le già buone proprietà del PBS e allo stesso tempo migliori quelle che ne impedirebbero ad un suo possibile impiego nell'ambito dell'ingegneria tissutale del tessuto connettivo. Il materiale sintetizzato è il risultato di una copolimerizzazione, metodo dalla comprovata efficacia per ottenere polimeri con proprietà modulabili in funzione della quantità e della tipologia dei monomeri di partenza. Il comonomero scelto a tale scopo è stato l'acido 3,3-ditiodipropionico, contenente un legame -S-S-: i materiali contenenti questo legame sono oggetto di crescente interesse da parte della comunità scientifica, non solo per la loro biocompatibilità, ma anche per la peculiarità di questo legame di fungere da trigger (rompendosi e riformandosi) in risposta a stimoli esterni come ad esempio cambiamenti di temperatura e di pH. L'introduzione dei legami S-S lungo la catena polimerica del PBS ha permesso di modificare alcune caratteristiche proprie dell'omopolimero,

come è emerso dai risultati delle caratterizzazioni a cui sono stati sottoposti entrambi i materiali. In primo luogo, la caratterizzazione molecolare ha evidenziato come sia stato possibile ottenere un materiale ad elevato peso molecolare attraverso un buon controllo della sintesi, le misure di angolo di contatto hanno mostrato come l'idrofobicità del materiale sia rimasta pressoché inalterata e l'analisi termogravimetrica ha confermato come la stabilità termica del PBS sia stata mantenuta. Per quanto riguarda invece l'analisi calorimetrica e diffrattometrica, è emerso come attraverso la copolimerizzazione sia stato possibile ridurre la cristallinità del PBS, uno dei principali limiti di questo omopolimero. Entrambi i materiali sono stati poi sottoposti con successo ad elettrofilatura, che ha permesso di ottenere tappetini costituiti da fibre di poco inferiori al micron per quanto riguarda l'omopolimero, leggermente più grandi nel caso del copolimero, in entrambi i casi prive di difetti e di *beads*, a conferma dell'ottima processabilità del nuovo materiale. Per quanto riguarda le proprietà meccaniche dei film polimerici, le prove a trazione hanno mostrato come sia stato possibile diminuire la rigidità del PBS: è stato misurato infatti un dimezzamento del modulo elastico del materiale dopo la copolimerizzazione, ed un aumento notevole sia dell'allungamento a rottura, che passa dal 5 al 125%, che della tenacità. Nel caso degli elettrofilati, invece, il modulo elastico diminuisce notevolmente rispetto al valore misurato per i film, mentre il minore allungamento a rottura del copolimero rispetto al PBS può essere attribuito ad una perdita di prestazioni legata all'ampia distribuzione dei diametri delle fibre copolimeriche. Studi di degradazione enzimatica hanno evidenziato come la velocità di degradazione sia leggermente maggiore per il copolimero, anche in una finestra di tempo piuttosto ridotta, mentre lo studio di biocompatibilità ha riportato un aumento sensibile dell'adesione e della proliferazione di fibroblasti sullo *scaffold* in P(BSBTDTP), rispetto a quello in PBS, a conferma di come sia stato possibile migliorare l'adesione e la proliferazione cellulare del materiale di partenza, già comunque buona.

In conclusione, quindi, i risultati ottenuti si rivelano molto promettenti, e confermano la potenzialità di polimeri contenenti legame S-S nel campo della *soft tissue engineering*.

I prossimi passi prevedono:

- Lo studio di diverse composizioni molari dei due monomeri costituenti, e la valutazione di come queste vadano ad impattare sulle proprietà finali del materiale;
- Studio di biocompatibilità ad ampio spettro, mediante microscopia confocale e studi morfologici, per meglio evidenziare l'effettivo miglioramento della biocompatibilità dato dall'introduzione del legame S-S.

# BIBLIOGRAFIA

1. Hoffman A. S., Lemons J. E., Ratner B. D., Schoen F. J., Yaszemski M. J., *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Elsevier Science & Technology, 2012
2. Williams D. F. *Biomaterials Dictionary*, Liverpool University Press, 1999
3. Migonney V., *Biomaterials*, John Wiley & Sons, 2014
4. Van Krevelen D.W., Te Nijenhuis K., *Properties of Polymers: Their Correlation with Chemical Structure; their Numerical Estimation and Prediction from Additive Group Contributions*, Elsevier Science & Technology 2009
5. Brazel C. S., Rosen S. L., *Fundamental Principles of Polymeric Materials*, John Wiley & Sons, 2012
6. Chanda M., *Plastics Technology Handbook*, CRC Press LLC, 2017
7. Nicholson J. W., *Chemistry of Polymers*, Royal Society of Chemistry, 2006
8. Nguyen T. Q., *Polymer Degradation and Stabilization* in: Keurentjes J., Meyer Th. *Handbook of Polymer Reaction Engineering*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005
9. Pathak, V. M., Navneet, *Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach*, *Bioresources and Bioprocessing* (2017), Vol. 4, No. 15
10. Kumar R., Singh N., Singh R., *An Introduction of Biodegradable Polymers, Modes of Biodegradation and Designing of Biodegradable Polymers*, *Research Journal of Pharmacy and Technology* (2017), Vol. 10, No.2, 625-640
11. Mohan S. K., Srivastava T., *Microbial deterioration and degradation of polymeric materials*, *Journal of Biochemical Technology* (2010), Vol. 2, No.4, 210-215
12. Fakirov S., *Fundamentals of Polymer Science for Engineers*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007
13. Fakirov S., *Biodegradable Polyesters*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015
14. D. S. Kumar, F. Raju, *Biomedical Applications of Polymeric Materials and Composites*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016
15. Domenek S., Ducruet V., *Characteristics and Applications of PLA* in: Avérous L., Kalia S. *Biodegradable and Biobased Polymers for Environmental and Biomedical Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016
16. Dumitriu S., Popa V., *Polymeric Biomaterials: Structure and Function, Volume 1*, CRC Press LLC, 2013

17. C.T. Laurencin, L. S. Nair, B. D. Ulery, *Biomedical Applications of Biodegradable Polymers*, Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics (2016), Vol. 49, No.12, 832-864
18. Carothers W.H., *Chemical Reviews*, 1931.Vol. 8, No. 3, p.353,
19. Ferreira L. P., Moreira A. N., Pinto, de Souza Jr. F.G., *Synthesis of Poly(butylene succinate) Using Metal Catalysts*, Polymer Engineering & Science (2015), Vol. 55, No. 8, 1889-1896
20. Ren L., Wang Y., Ge J., Lu D., Liu Z., *Enzymatic Synthesis of High-Molecular-Weight Poly(butylene succinate) and its Copolymers*, Macromolecular Chemistry and Physics (2015), Vol. 216, No. 6, 636-640
21. Bretz I., Kabasci S., *Succinic Acid: Synthesis of Biobased Polymers* in: Mittal V. *Renewable Polymers: Synthesis, Processing, and Technology*, Wiley-Scrivener, 2011
22. Werpy, T., Petersen, G., *Top value added Chemicals from biomass: Volume 1: Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas*, U.S. Department of Energy, 2004
23. Fabbri M., Gamberini R., Gigli M., Lotti N., Munari A., Rimini B., *Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review*, European Polymer Journal (2016), Vol. 75, 431-460
24. Sisti L., Totaro G., Marchese P., *PBS Makes its Entrance into the Family of Biobased Plastics* in: Avérous L., Kalia S. *Biodegradable and Biobased Polymers for Environmental and Biomedical Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016
25. Xu J., Guo BH., *Review: Poly(butylene succinate) and its copolymers: research, development and industrialization*, Biotechnology Journal (2010), Vol. 5, No.11, 1149-63
26. Shi FH., Wang XQ., Yan Q., Yang G., Zeng J., Zhao JH., *Biodegradation of Poly(Butylene Succinate) in Compost*, Journal of Applied Polymer Science (2005), Vol. 97, No. 6, 2273-2278
27. Finelli L., Gazzano M., Gigli M., Lotti N., Munari A., *Synthesis and characterization of novel poly(butylene succinate)-based copolyesters designed as potential candidates for soft tissue engineering*, Polymer Engineering & Science(2013), Vol. 53, 491-501
28. Fabbri M., Gazzano M., Gamberini R., Gigli M., Lotti N., Munari A., Rimini, B., *Hydrolysable PBS-based poly(ester urethane)s thermoplastic elastomers*, Polymer Degradation and Stability (2014) Vol. 108, 223–231
29. Fabbri M., Gamberini R., Gazzano M., Gigli M., Giordano E., Govoni M., Guidotti G., Lotti N., Munari A., Rimini B., Soccio M., *Novel biocompatible PBS-based random copolymers containing PEG-like sequences for biomedical applications: From drug delivery to tissue engineering*, Polymer Degradation and Stability, (2018), Vol. 153, 53-62

30. Focarete M. L., Gualandi C., Lotti N., Moroni L., Munari A., Saino E., Soccio M., Visai L., *Easily synthesized novel biodegradable copolyesters with adjustable properties for biomedical applications*, *Soft Matter* (2012), Vol. 8, 5466-5476
31. Finelli L., Gazzano M., Gigli M., Lotti N., Munari A., Soccio M., *Reactive blending of poly(butylene succinate) and poly(triethylene succinate): characterization of the copolymers obtained*, *Polymer International* (2012), Vol. 61, 1163-1169
32. Focacerete M., Giordano E., Govoni M., Gualandi C., Lotti N., Munari A., Pasquinelli G., Soccio M., Valente S., *Poly(butylene/diethylene glycol succinate) multiblock copolyester as a candidate biomaterial for soft tissue engineering: solid-state properties, degradability, and biocompatibility*, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* (2012), Vol. 27, 244–264
33. Finelli L., Gazzano M., Gigli M., Lotti N., Munari A., *Novel eco-friendly random copolyesters of poly(butylene succinate) containing ether-linkages*, *Reactive and Functional Polymers*(2012), Vol. 72, 303-310
34. Chen H., van Blitterswijk C., Focacerete M., Gigli M., Gualandi C., Lotti N., Moroni L., Munari A., Truckenmüller R., *Tailoring chemical and physical properties of fibrous scaffolds from block copolyesters containing ether and thio-ether linkages for skeletal differentiation of human mesenchymal stromal cells*, *Biomaterials* (2016), Vol. 76, 261-272
35. Borghi C.A., Costa M., Cristofolini A., Fabbri M., Gamberini R., Gigli M., Giordano E., Govoni M., Lotti N., Munari A., Neretti G., Rimini B., Seri P., *The effect of plasma surface modification on the biodegradation rate and biocompatibility of a poly(butylene succinate)-based copolymer*, *Polymer Degradation and Stability* (2015), Vol. 121, 271-279
36. Bloise N., Bruni G., Chen H., Cristofaro F., Gigli M., Lotti N., Moroni L., Munari A., Visai L., *Influence of nanofiber chemistry and orientation of biodegradable poly(butylene succinate)-based scaffolds on osteoblast differentiation for bone tissue regeneration*, *Nanoscale*(2018), Vol. 10, 8689
37. Chen J., Kong J., Ouyang J., Qiu X., Xing MM., Zhong W., *pH and Reduction Dual-Sensitive Copolymeric micelles for Intracellular Doxorubicin Delivery*, *Biomacromolecules* (2011), Vol. 12, 3601-3611;
38. Chen H., Chen J., Kong J., Liao Z., Xu B.B., Zhang S., *Reduction-responsive amphiphilic star copolymers with long-chain hyperbranched poly( $\epsilon$ -caprolactone) core and disulfide bonds for trigger release of anticancer drugs*, *European Polymer Journal* (2018), Vol. 108, 364-372
39. Li J., Ling L., Sun R., Wong CP., Zhang G., *Self-Healing and Shape Memory Linear Polyurethane Based on Disulfide Linkages with Excellent Mechanical Properties*, *Macromolecular Research* (2018), Vol. 26, 365-373
40. Abdeen A. A., Kilian K. A., Lee J., Silberstein M. N., Yup Kim S., *Mechanochemical functionalization of disulfide linked hydrogels*, *Materials Horizons*(2016) Vol. 3, 447-451

41. Xia Y., Wübbeler J.H., Qi Q., Steinbüchel A., *Employing a Recombinant Strain of Advenella mimigardefordensis for Biotechnical Production of Homopolythioesters from 3,3'-Dithiodipropionic Acid*, Applied and Environmental Microbiology (2012), 3286-3297
42. Takahashi K., Yamanaka S., *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*, Cell (2006), Vol. 126, No. 4, 663-676
43. Hasan A., *Tissue Engineering for Artificial Organs: Regenerative Medicine, Smart Diagnostics and Personalized Medicine*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017
44. Gätzner S., Hansmann J., Hoppensack A., Krzimirski S., Schürlein S., Schwarz T., Schwedhelm I., Schweinlin M., Walles H., *A versatile modular bioreactor platform for Tissue Engineering*, Biotechnology Journal (2017), Vol. 12, No. 2
45. Shakesheff K. M., Drug Delivery Systems in: Lendlein A., Sisson A., *Handbook of Biodegradable Polymers: Isolation, Synthesis, Characterization and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011
46. Bader R. A., Putnam D. A., *Engineering Polymer Systems for Improved Drug Delivery*, John Wiley & Sons, Inc., 2013
47. Amidon G.L., Desai M.P., Labhasetwar V., Levy R.J., Walter E., *The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent*, Pharmaceutical Research (1997), Vol. 14, No.11,1568-73.
48. Conde J., Dolatshahi-Pirouz A., Foroughi J., Mehrali M., Talebian S., Vine K. L., Wade S. J., Wallace G. G., *Biopolymers for Antitumor Implantable Drug Delivery Systems: Recent Advances and Future*, Advanced Materials (2018), Vol. 30, No. 31