

ALMA MATER STUDIORUM-UNIVERSITA' DI BOLOGNA
SEDE DI CESENA
SECONDA FACOLTA' DI INGEGNERIA CON SEDE A CESENA
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**STUDIO DI BIODEGRADABILITA' E
BIOCOMPATIBILITA'
DI NUOVI COPOLIESTERI ALIFATICI
PER IL RILASCIO CONTROLLATO DI FARMACI**

Elaborato in:
FONDAMENTI DI CHIMICA

Relatore:
Prof.ssa Nadia Lotti

Presentata da:
Giulia Guidotti

Correlatore:
Ing. Matteo Gigli

Sessione seconda
Anno Accademico 2011-2012

INDICE

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	5
1.1 Drug release	5
1.1.1 Meccanismi di rilascio controllato	7
1.1.2 Sistemi a rilascio controllato	8
1.1.3 Stent	10
1.1.4 Microparticelle	11
1.1.4.1 Sistemi bioerodibili e biodegradabili	13
1.1.4.2 Idrogeli	14
1.1.5 Nanovettori	16
1.1.6 Drug release nel pancreas	17
1.2 Materiali	18
1.2.1 Biomateriali	18
1.2.2 Biomateriali polimerici	21
1.2.2.1 Struttura	25
1.2.2.2 Classificazione	27
1.2.2.3 Degradazione	30
1.2.2.4 Lavorazione	31
1.2.3 Poliesteri alifatici	33
1.2.3.1 Sintesi	33
1.2.3.2 Proprietà fisiche	35
1.2.3.3 Cristallinità	36
1.2.3.4 Proprietà termiche	38
1.2.3.5 Massa e peso molecolare	39
1.2.3.6 Biodegradazione	41
1.2.3.7 Poliesteri alifatici per uso biomedico	43
1.2.4 Copolimeri	47
1.2.4.1 Copolimeri statistici	49
1.2.4.2 Copolimeri a blocchi	52

CAPITOLO 2: SCOPO DELLA TESI 55

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI 59

3.1 Sintesi	59
3.2 Caratterizzazione	62
3.2.1 Caratterizzazione molecolare	62
3.2.1.1 Risonanza magnetica nucleare (NMR)	62
3.2.2.2 Cromatografia a permeazione su gel (GPC) .	65
3.2.2 Caratterizzazione termica	67
3.2.2.1 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	67
3.2.2.2 Termogravimetria (TGA)	70
3.2.3 Analisi della fase cristallina	71
3.2.3.1 Diffrazione a Raggi X	71
3.2.4 Caratterizzazione meccanica	72
3.2.4.1 Misure stress-strain	72
3.2.5 Misura dell'angolo di contatto	74
3.2.6 Studi di degradazione	76
3.2.7 Analisi morfologica dei film	77
3.2.8 Studio di rilascio di una molecola modello	78
3.2.9 Test di biocompatibilità	78
3.2.9.1 Colture cellulari	79
3.2.9.2 Saggio di vitalità cellulare	79
3.2.9.3 Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM)	79

CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE 81

4.1 Sintesi e caratterizzazione molecolare	81
4.2 Caratterizzazione termica e diffrattometrica	83
4.3 Misure di bagnabilità	88
4.4 Prove meccaniche	88

4.5 Studi di biodegradazione	90
4.6 Rilascio di FITC	95
4.7 Test di biocompatibilità	97

CAPITOLO 5: CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

FUTURE	99
---------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA	101
---------------------------	------------

RINGRAZIAMENTI	105
-----------------------------	------------

CAPITOLO 1:

INTRODUZIONE

1.1 DRUG RELEASE

Negli ultimi anni, lo sviluppo di numerosi farmaci studiati per innescare e guidare svariati processi cellulari, ha comportato l'esigenza di disporre di sistemi a rilascio controllato del principio attivo, sensibili e capaci di rispondere direttamente agli stimoli patologici. Dispositivi dalle dimensioni nanometriche possono massimizzare l'efficienza dei trattamenti terapeutici, in quanto in grado di individuare ed isolare rapidamente, all'interno dell'organismo, la patologia, e di agire senza intervenire sulle cellule ed i tessuti sani (come accade ad esempio durante la chemioterapia), a tutto vantaggio del paziente.

Uno dei maggiori inconvenienti della convenzionale somministrazione di farmaci è infatti legato alla distribuzione del farmaco stesso in tutto il corpo, la quale si verifica in maniera più o meno indiscriminata ed incontrollata attraverso la circolazione sanguigna: la quantità desiderata di farmaco non è quindi sempre in grado di raggiungere i siti recettoriali specifici localizzati sulle cellule bersaglio. Ciò può rendere necessario l'impiego di dosi maggiori, con rischio di tossicità. Soprattutto nel caso di farmaci a breve emivita, per poter mantenere un adeguato livello terapeutico nell'organo prescelto, è indispensabile l'utilizzo di trattamenti ripetuti, che si traducono in un andamento della concentrazione del farmaco nel plasma di tipo pulsatile, con indesiderate punte di massimo anche oltre i limiti di tossicità, e gole di minimo le quali possono scendere al di sotto del livello ottimale.

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

- Mantenere costante l'azione del farmaco conservando, per l'intera durata di un intervallo di tempo predeterminato, la concentrazione desiderata nell'organismo, riducendo nel contempo gli effetti collaterali associati ad

un modello cinetico del tipo "dente di sega", caratteristico di iniezioni successive;

- Localizzare spazialmente l'azione del farmaco, limitandola alla zona (tessuto o organo) che necessita del trattamento;
- Specificare ulteriormente il target d'azione (a livello del tipo di cellula) del farmaco per mezzo di vettori o derivatizzazioni chimiche;
- Proteggere sostanze bioattive che hanno emivita molto breve e garantirne la stabilità;
- Creare condizioni riproducibili, prevedibili e controllabili di rilascio per periodi di tempo più o meno lunghi.

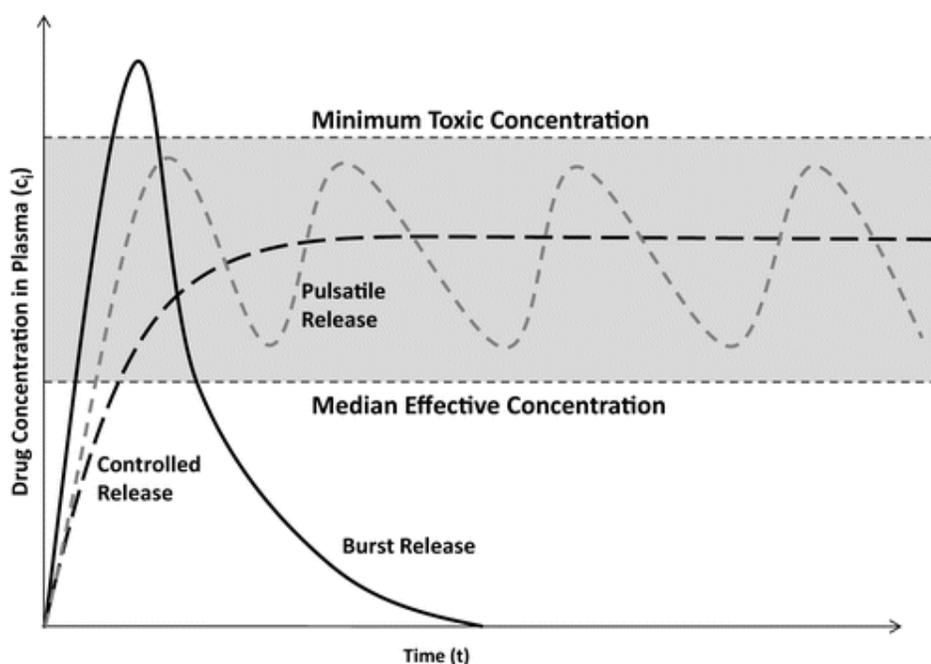


Figura 1.1 Andamento della concentrazione del farmaco nei tessuti dopo l'assunzione secondo la tecnica tradizionale e mediante rilascio controllato

Risulta così evidente come, agendo sulla distribuzione spaziale e temporale del farmaco, si possano risolvere problemi legati alle tradizionali forme di dosaggio, quali scarsa efficacia della terapia, possibili effetti collaterali, elevato numero di assunzioni di farmaco richieste dal trattamento e disagi per il paziente.

Una vasta classe di farmaci può usufruire dei benefici dei sistemi a rilascio controllato, tra cui chemioterapici, immunosoppressori, agenti antiinfiammatori, antibiotici, oppiacei, steroidi, ormoni, anestetici, vaccini.

Recentemente, il bisogno di sviluppare nuovi sistemi di rilascio controllato si è intensificato, di pari passo con l'avanzamento della ricerca nel settore dei farmaci peptidici e l'emergere della terapia genica, candidandoli come possibili protagonisti della prossima generazione di farmaci.

1.1.1 MECCANISMI DI RILASCIO CONTROLLATO

Dato l'alto numero di variabili in gioco, tra cui la tipologia del farmaco, la quantità da somministrare, il sito d'azione, la durata della terapia, la stabilità delle molecole attive, ecc., è necessario che i sistemi a rilascio controllato forniscano un range di utilizzo molto ampio, presentando diverse cinetiche di rilascio che rispettino le necessità di somministrazione in determinate fasi temporali, e varie meccaniche di rilascio, al fine di permettere la distribuzione del farmaco nei tessuti che necessitano del trattamento.

Le possibili tecniche di rilascio sono le seguenti (figura 1.2):

- Profilo I: rilascio convenzionale, ritardato, non costante;
- Profilo II: rilascio di ordine zero in cui la concentrazione è mantenuta al livello ottimale per gli effetti terapeutici. Questo ed il profilo precedente sono, ad oggi, i più comuni;
- Profilo III: rilascio ritardato seguito da rilascio costante. Utile per il rilascio di agenti attivi che devono svolgere la loro azione durante la notte;
- Profilo IV: rilascio impulsivo ritardato. Anch'esso valido per un'azione notturna, o per il rilascio di ormoni, la cui somministrazione deve essere effettuata una singola volta e non gradualmente;
- Profilo V: rilascio impulsivo periodico, utilizzato per somministrazioni a distanze temporali costanti.

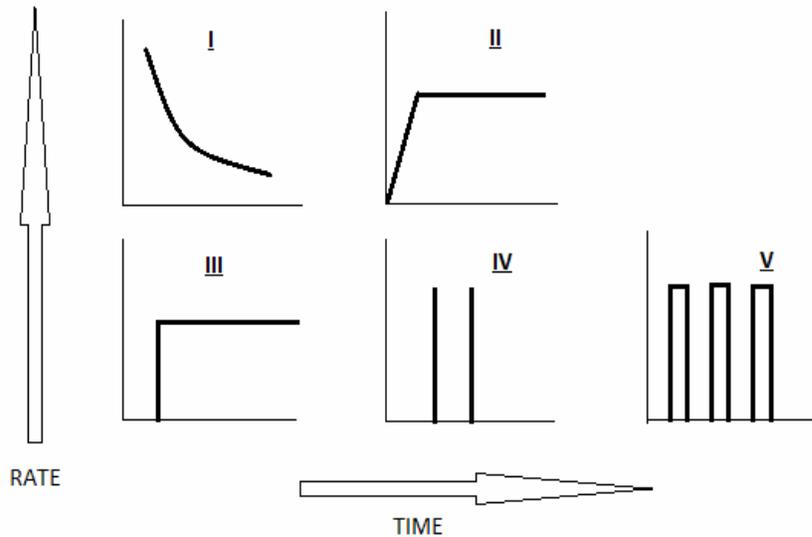


Figura 1.2 Cinetiche di rilascio controllato

1.1.2 SISTEMI A RILASCIO CONTROLLATO

Alternativamente alla descrizione presentata nel precedente paragrafo, i sistemi di trasporto possono essere sottoposti a classificazione a seconda del meccanismo di controllo del rilascio (figura 1.3):

- Sistemi a diffusione controllata
 - a. Mediante serbatoio (sistemi a membrana);
 - b. Mediante matrice (sistemi monolitici);
- Sistemi controllati chimicamente
 - a. Sistemi bioerodibili e biodegradabili;
 - b. Sistemi a catena pendente;
- Sistemi attivati da solvente
 - a. Sistemi controllati osmoticamente;
 - b. Sistemi controllati mediante rigonfiamento;
- Sistemi a rilascio modulato.

Occorre sottolineare che in realtà, molti apparati risultano una combinazione di due o più meccanismi tra quelli sopraelencati.

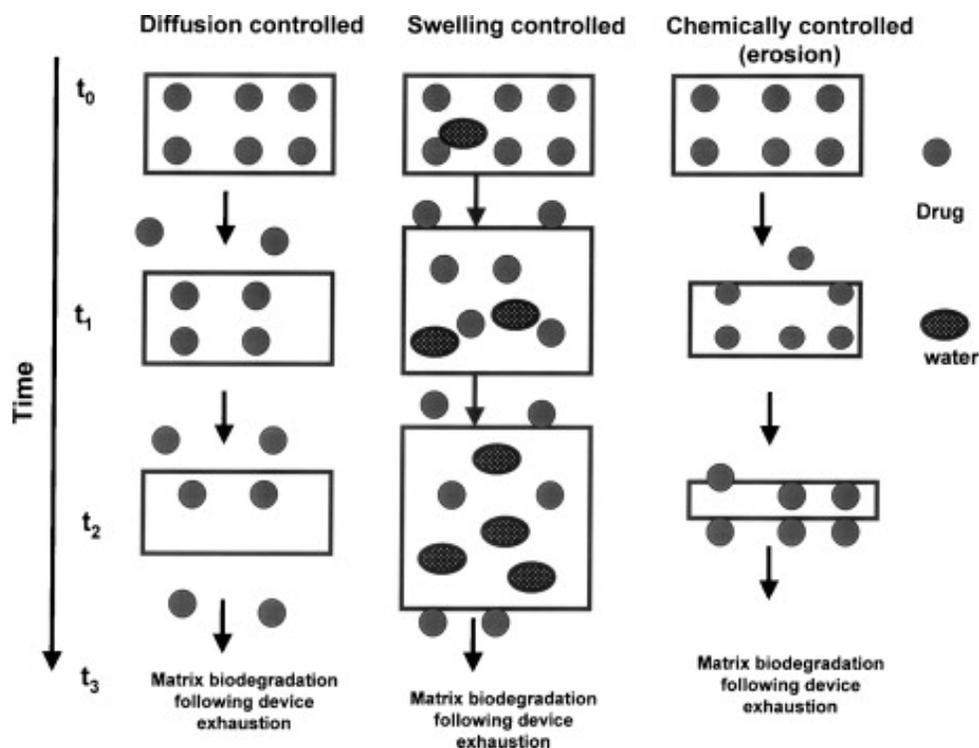


Figura 1.3 Schema di alcuni meccanismi diffusionali

Sistemi a diffusione controllata: sfruttano il meccanismo di diffusione del farmaco attraverso il polimero, il quale subirà degradazione una volta terminato il proprio compito; si suddividono in sistemi a serbatoio e a matrice. I primi, cavi, sono formati da un nucleo interno di farmaco circondato da una membrana polimerica, ed il trasporto avviene tipicamente secondo meccanismi di diffusione, con cinetica tipicamente di ordine zero, finché il farmaco si trova in alta concentrazione all'interno della membrana. Nel secondo tipo di sistemi il farmaco è dissolto (o disperso) uniformemente in una matrice polimerica, è presente una cinetica di rilascio del primo ordine con alto tasso di diffusione all'inizio, ed una successiva decrescita con l'aumento del percorso di diffusione ed in seguito alla diminuzione dell'area della matrice.

Sistemi controllati chimicamente: il rilascio ha luogo in ambiente acquoso, dove il polimero si degrada a causa della presenza di legami labili idroliticamente o enzimaticamente, che coinvolgono la superficie o il bulk. Ciò da una parte evita la necessità di una rimozione chirurgica, ma dall'altra richiede che i prodotti della degradazione non provochino reazioni tossiche o cancerogene, condizione non sempre facile da ottenere. Nei sistemi a catena pendente la molecola del farmaco è

legata chimicamente al polimero e viene rilasciata mediante una scissione idrolitica o enzimatica, con velocità proporzionale a quella con cui i legami vengono rotti dall'azione dell'acqua o delle proteine, consentendo al farmaco di agire su uno specifico tipo di cellule o tessuti.

Sistemi attivati dal solvente: gli idrogeli sono particolari macromolecole a struttura reticolata create in modo da formare una maglia aggrovigliata che funge da matrice per l'intrappolamento di farmaci. Quando tali molecole vengono a contatto con un solvente compatibile termodinamicamente, le catene polimeriche si rilassano (in particolar modo quando la temperatura di transizione vetrosa è inferiore a quella dell'ambiente circostante), permettendo un flusso di acqua verso l'interno e la diffusione del farmaco verso l'esterno.

Sistemi a rilascio modulato: il rilascio in questo caso viene controllato da stimoli esterni quali la temperatura, il pH, campi elettrici e magnetici, radiazioni elettromagnetiche, raggi UV, ecc.

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

1.1.3 STENT

Essi sono costituiti da strutture solide impiantabili, le quali oltre a svolgere una funzione meccanica (nel caso dello *stent* ad esempio si tratta dell'apertura di un canale parzialmente o completamente ostruito), possono contenere al loro interno anche farmaci o agenti antinfiammatori da rilasciare una volta a contatto con l'organismo, in modo da indirizzare la cura, localizzandola nel solo tessuto interessato. Le più comuni tecniche di preparazione consistono nello scioglimento di polimero e farmaco nello stesso solvente in modo da ottenere una soluzione omogenea; in seguito all'evaporazione del solvente si ottiene un polimero, contenente al suo interno molecole di farmaco, il quale può essere lavorato mediante stampaggio a compressione per ottenere la forma desiderata. Nei casi in cui il solvente rischia di alterare le proprietà del farmaco si ricorre direttamente all'estrusione. Un'innovazione nell'ambito dei dispositivi impiantabili è stata la

creazione di *stent* riassorbibili di materiale polimerico i quali, dopo un periodo di tempo di qualche mese, vengono completamente degradati dall'organismo ospite, prevenendo così l'esigenza di un ulteriore intervento chirurgico di asportazione. Impianti di questo tipo si sono rivelati efficaci, per esempio, nella cura di malattie della retina e nel trattamento di stenosi tracheali refrattarie ai trattamenti tradizionali.

1.1.4 MICROPARTICELLE

Per evitare problemi relativi all'inserimento invasivo di impianti, sono stati studiati sistemi di microparticelle iniettabili dalle dimensioni massime di 250 μm . Ad oggi vengono utilizzate numerose tecniche di microincapsulazione, in base alla natura e al peso molecolare del polimero, alla natura e alla solubilità del farmaco da intrappolare, alla destinazione d'uso e alla durata della terapia, con lo scopo di mantenere la stabilità e l'attività del farmaco sia durante la creazione delle particelle, che durante il trasporto in ambiente biologico.

Tra le più comuni figurano:

- Emulsione: si tratta essenzialmente di un processo O/W (oil-in-water) in cui il polimero viene prima disciolto in solvente organico volatile, solitamente diclorometano (DCM), ed in un secondo momento viene aggiunto il farmaco in modo da creare un'emulsione; quest'ultima deve essere poi rimossa o per mezzo di un processo di estrazione o con semplice evaporazione, al fine di ottenere delle goccioline solide che andranno lavate, raccolte e asciugate, giungendo così al prodotto finito (figura 1.4). Occorre tenere presente, al fine di ottenere le dimensioni desiderate, che il diametro di tali particelle cresce all'aumentare della concentrazione del polimero e in situazioni termiche estreme (sia bassa che alta T); la forte dipendenza dalla temperatura e dalla viscosità risultano i problemi da tenere in considerazione nell'impiego di questa tecnica. Essa però si rivela ideale per incapsulare sostanze liposolubili come per esempio gli steroidi, mentre per sostanze idrosolubili come peptidi, proteine e vaccini, si preferisce una tecnica W/O (water-in-oil).

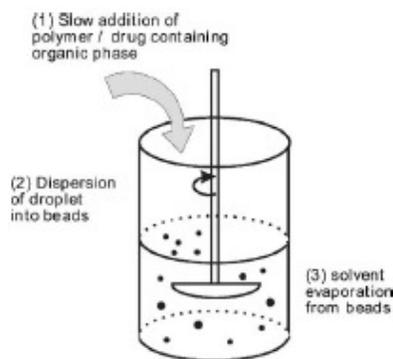


Figura 1.4 Descrizione della tecnica dell'emulsione

- Separazione di fase: consiste nel diminuire la solubilità del polimero mediante l'aggiunta di un terzo componente alla soluzione organica; ad un certo punto del processo si possono distinguere due fasi separate, una più densa composta dal polimero e l'altra più liquida, in sospensione, povera di materiale polimerico. Il farmaco che era disperso o dissolto nella soluzione polimerica risulta così rivestito dal polimero. Il vantaggio della presente tecnica rispetto alla precedente è quello di permettere di incapsulare farmaci sia liposolubili che idrosolubili, mentre lo svantaggio è legato alla necessità di grandi quantitativi di solvente organico (che risulta difficile da separare dalle microparticelle ottenute).
- Spray a secco: a differenza delle precedenti, tale metodologia risulta molto rapida, conveniente e facile, in quanto dipendente in minore misura dalla solubilità sia del polimero che del farmaco. La tecnica consiste nella sospensione o dissoluzione in solvente dei farmaci che si desiderano incapsulare, a seconda che siano idrosolubili o meno, e nella loro successiva nebulizzazione sotto forma di spray a secco, con lo scopo di ottenere particelle di dimensioni minori di 5 μm .

Per quanto concerne le applicazioni, le microparticelle vengono utilizzate con successo per somministrazioni a bassa frequenza e di piccole quantità di farmaci, sia quelli nocivi se assunti in dosi troppo elevate, sia quelli insolubili che, dato il loro scarso assorbimento, richiederebbero dosi molto massicce per poter essere efficaci. La possibilità di adesione, da parte delle microsfeere, ai tessuti interessati, permette inoltre una somministrazione continua e regolare nel tempo anche con dosi moderate.

Esistono due principali categorie di microparticelle, distinguibili in base alla modalità di rilascio della sostanza in esse contenuta: quelle che vanno incontro ad erosione o biodegradazione e gli idrogeli.

1.1.4.1 Sistemi bioerodibili e biodegradabili

In sistemi di questo tipo il principio attivo viene confinato all'interno di un materiale polimerico; il farmaco può veicolare attraverso la microparticella per raggiungere i siti di destinazione come conseguenza di un processo di diffusione verso l'esterno oppure a causa dell'erosione della particella, definita come la disintegrazione fisica del polimero dovuta a degradazione dello stesso. Infatti, a seguito della penetrazione dell'acqua nel rivestimento o nella matrice polimerica, si ha la scissione di vari legami nelle catene, con conseguente abbassamento del peso molecolare.

Se il principio attivo è disperso all'interno di una matrice polimerica può venire rilasciato sia a seguito dell'erosione del polimero nel quale è immerso, sia per effetto di un processo diffusivo, attraverso la matrice, verso la soluzione esterna; se invece è incapsulato risulta più significativo il fenomeno diffusivo rispetto all'erosione, poiché nello strato di rivestimento non sono disperse molecole di principio attivo, ed il rilascio per erosione è possibile solo quando quest'ultima arriva ad interessare gli strati più interni, a ridosso del farmaco incapsulato. La predominanza di un meccanismo sull'altro deriva da proprietà del polimero, quali l'idrofilicità, la flessibilità, la velocità di degradazione, il peso molecolare, la cristallinità, la geometria della particella e la porosità della matrice/rivestimento; la cinetica del rilascio risulta influenzata anche dalle caratteristiche del farmaco stesso, e principalmente dal suo peso molecolare, dalla sua solubilità in acqua e dalla sua distribuzione all'interno della matrice. Devono poi anche essere prese in considerazione le caratteristiche del mezzo esterno, quali la temperatura ed il pH.

1.1.4.2 Idrogeli

Gli idrogeli sono particolari polimeri reticolati idrofilici ad elevata affinità con l'acqua (sono in grado di assorbirne, nel loro reticolo, dal 10-20% fino a migliaia di volte il loro peso asciutto), ma che non vanno incontro a dissolvimento grazie alla loro struttura chimico-fisica. Per il loro alto contenuto di acqua e per l'elevata biocompatibilità, queste sostanze sono molto indicate per utilizzi biomedici, con applicazioni nell'ingegneria tissutale e rilascio controllato di farmaci.

Quando un idrogel asciutto comincia ad assorbire acqua, le prime molecole che entrano nella matrice idratano i gruppi più polari ed idrofilici, con conseguente rigonfiamento del polimero, tale da consentire l'esposizione all'acqua dei gruppi più idrofobici; a questo punto altra acqua entra nella struttura a causa di forze osmotiche, le quali a loro volta vengono ostacolate dai legami covalenti, fino al raggiungimento di un equilibrio. L'acqua che entra va a riempire gli spazi tra le catene oppure il centro di larghi pori e, se l'idrogel è biodegradabile, quest'ultimo inizierà a disintegrarsi e dissolversi con velocità legata alla sua composizione chimica (figura 1.5).

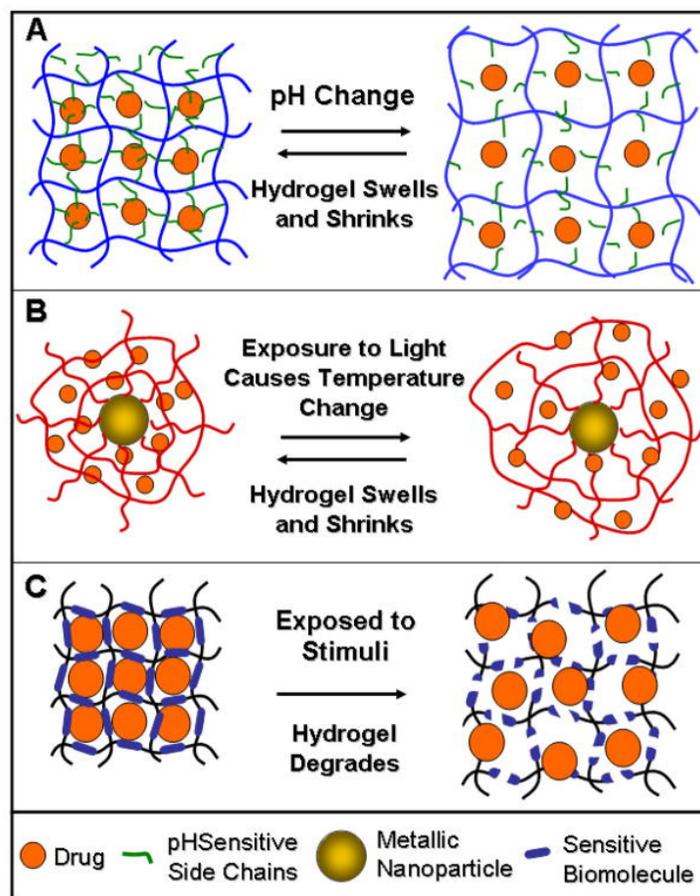


Figura 1.5 (a) idrogeli sensibili alle variazioni di pH, (b) idrogeli sensibili alle variazioni di temperatura, (c) idrogeli sensibili alla presenza di biomolecole

Per quanto riguarda le principali applicazioni, oltre alla possibilità di realizzare scaffold vascolarizzati nell'ambito dell'ingegneria tissutale, gli idrogeli si rivelano materiali ideali per il trasporto ed il rilascio controllato di farmaci nell'organismo, grazie alla possibilità di modularne le proprietà fisico-chimiche quali la permeabilità (in casi di rilascio modulato), i tempi di reazione (per il rilascio pulsatile), le caratteristiche superficiali (rivestimenti in PEG per il rilascio immediato), la biodegradabilità (per applicazioni in cui è richiesta assorbibilità), siti di riconoscimento posti sulla superficie (qualora vi fosse necessità di bioadesione o rilascio mirato) e la porosità (nel caso di trasporto di farmaci dalle dimensioni molecolari più o meno elevate).

1.1.5 NANOVETTORI

Il concetto di nanoparticella emerse negli anni '70 come substrato per il trasporto di farmaci e vaccini contro il cancro; da quel momento lo sviluppo delle nanotecnologie in ambito biomedico ha permesso la messa a punto di sistemi di vettori che veicolano farmaci e/o agenti diagnostici, piccole molecole, proteine, acidi nucleici in essi incapsulati e che ne consentono il rilascio per lunghi periodi di tempo.

I nanovettori sono particelle di dimensioni comprese tra 1 e 100 nm, in grado idealmente di viaggiare nei vasi sanguigni e di rilasciare il farmaco nel solo sito desiderato quale, per esempio, un tumore (caratterizzato da endoteli altamente permeabili e da scarso drenaggio linfatico). La dimensione così ridotta è imposta dalla necessità, da parte del vettore, di poter viaggiare anche nei capillari senza il pericolo di ostruirli, poter penetrare all'interno delle cellule e nello stesso tempo di essere sufficientemente grande da poter superare le difese immunitarie dell'organismo; inoltre, queste particelle sono caratterizzate da un prolungato tempo di circolazione dal momento che non vengono né catturate dal fegato né escrete a livello renale.

L'elevato rapporto superficie/volume dei nanovettori consente di legare chimicamente diversi gruppi funzionali come agenti diagnostici e terapeutici, e una tale versatilità permette di creare sistemi capaci di riconoscere il sito bersaglio dove è in atto la patologia, visualizzando e monitorando contemporaneamente la risposta del trattamento farmacologico.

Le tecniche di preparazione sono molto simili a quelle adoperate nel caso delle microparticelle e le più comuni comprendono l'emulsione, sia oil-in-water che water-in-oil e nanoprecipitazione, in cui polimero e farmaco vengono disciolti in acetone e portati in soluzione acquosa: in seguito ad evaporazione a bassa pressione si ottengono le particelle polimeriche contenenti il farmaco al loro interno. In questo modo si possono anche creare nanovettori in grado di rispondere a stimoli esterni sia di tipo chimico, quali variazioni di pH, che di tipo fisico, come cambiamenti di temperatura, radiazioni luminose, campi elettromagnetici, ultrasuoni.

Come per le microparticelle, esistono due categorie di nanovettori: quelli che vanno incontro a biodegradazione con conseguente diffusione della sostanza contenuta al loro interno (può verificarsi anche la presenza contemporanea di

diffusione ed erosione), e la categoria composta da nanogel, i quali per poter diffondere le molecole vanno incontro a rigonfiamento (“swelling”).

1.1.6 DRUG RELEASE NEL PANCREAS

Il pancreas ha la funzione endocrina di controllare la concentrazione di glucosio nel sangue attraverso la secrezione di insulina. Nei pazienti diabetici tale funzione è compromessa e, di conseguenza, il livello di glucosio aumenta oltre il normale valore; un controllo grossolano di tale concentrazione si ottiene attraverso la frequente somministrazione di insulina mediante iniezioni, anche se, la protrazione di tale metodologia comporta un’elevata possibilità, a lungo termine, di incorrere in complicanze come cecità, problemi cardiaci ed epatici. Sono state quindi studiate varie strategie per ottenere un controllo migliore e più accurato della glicemia: vengono comunemente utilizzate, ad esempio, pompe impiantabili, le cui maggiori complicazioni sono dovute ad ostruzioni del catetere causate dall’adesione dei tessuti del paziente. Un’alternativa è rappresentata da matrici a rilascio controllato di insulina, in materiale polimerico come ad esempio il vinilacetato di etilene (EVA), che tuttavia presentano il limite di non poter essere ricaricate dopo l’uso.

Microparticelle e nanoparticelle potrebbero risultare una soluzione al problema, grazie alla possibilità di adoperare, per la loro fabbricazione, matrici che utilizzano, come stimolo esterno al quale rispondere, proprio le fluttuazioni del livello di insulina nel sangue.

Passi in avanti sono stati fatti anche nel trattamento dell’insufficienza pancreatica esocrina (EPI), cioè una mancanza di enzimi digestivi secreti dal pancreas, associata spesso a malattie come la fibrosi cistica e la pancreatite cronica, che porta a cattiva digestione, cattivo assorbimento di grassi, proteine e vitamine liposolubili fino, nei casi più gravi, alla malnutrizione. Circa il 90% dei pazienti affetti dal presente disturbo vengono sottoposti ad una terapia di ripristino degli enzimi pancreatici; in questo ambito è stata recentemente approvata dalla FDA una nuova formulazione di capsule a rilascio controllato di pancrealipasi, le quali favoriscono un maggiore assorbimento di grassi in pazienti di età compresa tra i 7 e gli 11 anni in un contesto di buona tollerabilità da parte dell’organismo.

Una delle sfide più grandi resta invece la possibilità di combattere i tumori al pancreas attraverso meccanismi di rilascio controllato, in un organo dove la chemioterapia, somministrata per via endovenosa, risulta spesso vana dal momento che i tessuti interessati non vanno incontro ad angiogenesi, come accade per le altre parti del corpo ma, al contrario, sono caratterizzati da bassa vascolarizzazione. Attraverso l'utilizzo di liposomi e nanoparticelle (che garantiscono protezione del farmaco da una prematura degradazione, maggiore solubilità, continuità di somministrazione, minore tossicità per l'organismo ed una ridotta resistenza al farmaco stesso) per veicolare il farmaco o altre molecole come RNA, molecole inibitrici e anticorpi, si potrebbe pervenire ad una soluzione; tuttavia la stabilità di tali particelle, e la loro possibilità di giungere alla destinazione desiderata, restano ancora problematiche.

1.2 MATERIALI

1.2.1 BIOMATERIALI

Nel corso degli ultimi anni la medicina e la chirurgia stanno facendo sempre più ricorso a materiali estranei all'organismo al fine di ripristinare o sostituire una funzione fisiologica tramite sostituzione di organi o tessuti danneggiati. A questo scopo vengono investite molte risorse nella ricerca di nuovi biomateriali modellabili a seconda delle singole esigenze legate alla varietà di patologie e tessuti coinvolti.

I biomateriali possono essere suddivisi in cinque categorie a seconda delle caratteristiche che ne rendono conveniente l'uso in applicazioni mediche specifiche:

- Metalli: impiegati largamente come materiali da costruzione per dispositivi biomedici, trovano anche applicazione nella fabbricazione di strumenti chirurgici, protesi ortopediche, dentali e mezzi di osteosintesi. Grazie alle loro proprietà meccaniche, quali elevato modulo elastico, resistenza allo snervamento, duttilità e alta resistenza alla fatica meccanica, si prestano bene alla sostituzione di tessuti duri quali ossa e denti, prevenendo la rottura fragile e garantendo ottima funzionalità in applicazioni in cui sono previsti cicli di carico.

Alcuni esempi sono rappresentati da ferro, cromo, cobalto, nichel, titanio, tantalio, tungsteno e molibdeno; data la tossicità di parte di essi (dovuta alla loro corrosione in ambienti fisiologici con conseguente perdita di materiale), possono essere prodotte leghe, anche se quantità troppo elevate all'interno dell'organismo risultano comunque dannose.



Figura 1.6 Protesi d'anca tra le applicazioni dei biomateriali metallici

- Ceramics: definibili come combinazioni di materiali inorganici non metallici (ossidi, siliciuri, carburi...) e metallici, ne sono esempio l'allumina, l'ossido di magnesio e la silice, sali ionici, come cloruro di sodio e magnesio, e le strutture del carbonio come grafite, diamante e carbonio pirolitico. Come biomateriali, i ceramici hanno ricevuto attenzione grazie a proprietà altamente desiderabili per applicazioni nei settori ortopedico, odontoiatrico, otorinolaringoiatrico e cardiocircolatorio, ove vengono adottati solitamente per la sostituzione funzionale dei tessuti duri; il loro principale vantaggio è infatti la somiglianza con il tessuto osseo, per quanto concerne le proprietà fisiche: durezza, fragilità, bioinerzia e/o bioattività. Tra le loro caratteristiche occorre tenere conto anche la resistenza al calore, isolamento elettrico, buona resistenza a carichi di compressione e facile corrosione in ambiente fisiologico.



Figura 1.7 Capsule dentarie in materiale ceramico

- Biologici: materiali di origine sia animale che umana, il cui uso è possibile solo previa devitalizzazione, cioè eliminazione delle tracce cellulari responsabili della vitalità del materiale. Per i materiali costituiti da tessuti molli, il principale impiego è nel settore cardiovascolare per protesi valvolari e di vasi sanguigni, mentre per quanto riguarda i tessuti duri il maggiore utilizzo si è avuto in ambito ortopedico per riempimenti di cavità dovute a difetti ossei o ad asportazioni di tumori. I materiali connettivi sono la classe di tessuti biologici risultata di maggiore interesse; appartengono a tale categoria ossa, cartilagini, sangue, endoteli e linfa.

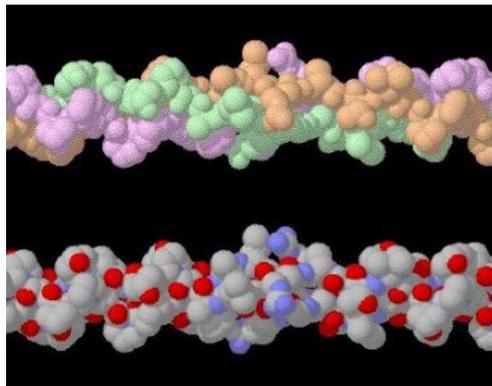


Figura 1.8 Fibre di collagene in una ricostruzione virtuale

- Compositi: con tale accezione si identificano materiali le cui proprietà possono essere modulate in ragione della destinazione d'uso e nei quali la distinzione di fase è percettibile solo su scala microscopica. I singoli costituenti, a seconda della loro funzione, prendono il nome di matrice e rinforzo; la prima è costituita da una fase continua e omogenea con il compito di racchiudere il rinforzo garantendone la giusta dispersione

all'interno del composito, mentre il secondo, che si presenta in fase dispersa, ha la funzione di assicurare rigidità e resistenza meccanica, assumendo su di sé la maggior parte del carico esterno. La presenza di peculiarità non ottenibili mediante l'uso di materiali omogenei ne determina l'adozione in applicazioni specifiche, quali rivestimenti in carbonio (per aumentare la biocompatibilità di impianti meccanici), rinforzi (per potenziare le proprietà meccaniche dei polimeri), riempimenti di cavità dentali in odontoiatria e rinforzi per il cemento osseo.

Tabella 1.1
Classi di materiali impiegati nel settore biomedico

Materiali	Vantaggi	Svantaggi	Campi d'applicazione
Biologici vene, pericardio, valvole cardiache	Ottima biocompatibilità	Scarsa affidabilità, difficoltà di trattamento e conservazione	Protesi vascolari e valvolari, rivestimenti
Ceramici ossidi di alluminio, alluminati di Calcio, ossidi di Titanio, Carbonio	Buona biocompatibilità, inerzia chimica, resistenza alla compressione ed alla corrosione	Bassa affidabilità meccanica, fragilità, difficile lavorabilità	Protesi d'anca e dentali, dispositivi percutanei
Compositi metalli rivestiti con ceramici, matrici rinforzate con fibre	Buona biocompatibilità, inerzia chimica, buone caratteristiche meccaniche, resistenza alla corrosione	Scarsa coesione tra i componenti, difficile lavorabilità	Protesi valvolari cardiache, protesi di ginocchio
Metalli 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
Polimeri siliconi, poliuretani, polietilene, acrilati, fluorurati, poliesteri	Tenaci, bassa densità, facile lavorabilità	Bassa resistenza meccanica, degradazione nel tempo	Suture, cateteri, drenaggi, protesi cardiovascolari, cementi per ossa

1.2.2 BIOMATERIALI POLIMERICI

Con il termine polimeri si intendono tutti i composti organici le cui molecole derivano dall'unione, mediante legame chimico omopolare, di due o più unità strutturali a basso peso molecolare, i monomeri.

Tramite un processo di polimerizzazione, attraverso cui vari monomeri vengono combinati tra loro, si giunge alla formazione di nuove molecole, il cui appellativo può rispecchiare il grado di polimerizzazione raggiunto: si può quindi parlare di dimeri, trimeri, tetrameri, ecc. a seconda che il polimero sia costituito rispettivamente da due, tre, quattro o più monomeri. Nel caso in cui esso raggiunga un peso molecolare maggiore di 5000 Dalton si parla di macromolecola (o alto polimero).

In alternativa viene utilizzata un'altra denominazione, basata sulla natura dei costituenti: con i termini omopolimero e copolimero si indicano molecole polimeriche originate rispettivamente dall'unione di uno o più tipi di monomero. Struttura, massa molecolare, polimerizzazione, degradazione, proprietà termiche, grado di cristallinità e procedure di lavorazione sono le caratteristiche che contribuiscono a determinare, in maggior misura, le proprietà di un generico polimero.

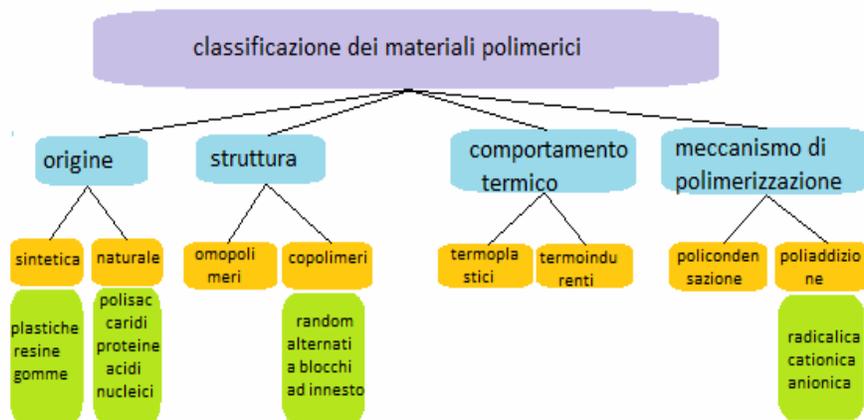


Figura 1.9 Classificazione dei materiali polimerici

I polimeri presentano numerosi vantaggi rispetto alle classi di materiali precedentemente trattate, in primo luogo perché mediante opportune procedure di sintesi si possono ottenere polimeri sintetici con una struttura molto simile a quella dei polimeri naturali contenuti nei tessuti biologici (quali il collagene); ne consegue quindi un'ottima biocompatibilità, caratteristica cruciale in ambito biomedico.

Oltre al suddetto, i principali vantaggi correlati all'utilizzo di tali biomateriali sono:

- Estesa variabilità in composizione, tale da decretare proprietà fisico-meccaniche idonee alla destinazione d'uso prevista;
- Bassi coefficienti d'attrito, quindi buona resistenza all'usura;
- Facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture complesse;
- Possibilità di apportare modifiche superficiali di natura chimico-fisica senza alterare le masse interne;
- Possibilità di costruire con essi capsule o superfici operanti quali vettori di cellule e biomolecole.

Le proprietà sopra elencate sono identificative della struttura molecolare del polimero, nonché dei processi chimico-fisici cui è stato sottoposto, e pertanto caratterizzano gli attributi ultimi del dispositivo creato. Allo stato attuale i materiali polimerici sono adottati (nonostante la presenza di alcuni svantaggi, quali il possibile rilascio di sostanze tossiche nell'organismo, la facilità di assorbimento di acqua e biomolecole dall'ambiente circostante anche quando non richiesto e le scarse proprietà meccaniche, peraltro alterate da processi di sterilizzazione) nella produzione di numerosissimi dispositivi, tra cui suture, placche, viti, chiodi e tutte le strutture bioassorbibili, strumenti per il controllo dei fluidi corporei, valvole cardiache, protesi vascolari, organi bioartificiali, rivestimenti per sensori, per dispositivi elettronici impiantabili e per lenti a contatto ed intraoculari, oltre che nell'ambito della rigenerazione tissutale.

Tabella 1.2
Panoramica delle principali applicazioni di materiali polimerici per uso biomedico

Polimero	Sigla	Principali applicazioni
Acido poliglicolico	PGA	Strutture biodegradabili, placche e chiodi intramidollari, placche di frattura biodegradabili
Acido polilattico	PLA	Placche e chiodi intramidollari, legamenti artificiali, placche di frattura biodegradabili, somministrazione controllata di farmaci
Copolimeri Butadiene-Stirene	BS	Articoli monouso, imballaggi
Copolimeri Stirene-Acrilonitrile	SAN	Aspiratori per sangue, componenti di emodializzatori
Poliacrilonitrile	PAN	Membrane per emodialisi
Poliammidi	-	Suture
Policarbonato	PC	Membrane per ossigenatori ed emodialisi, linee ematiche
Polidrossietilmetacrilato	PHEMA	Lenti a contatto, legamenti artificiali
Polietilene	PE	Film, imballaggi, cateteri, tubi, connettori, somministrazione controllata di farmaci
Polietilene (PM>2000000)	UHMW PE	Superfici articolari, fibre per compositi, placche ortopediche, rivestimenti steli femorali
Polietilentereftalato	PET	Protesi vascolari, anelli di sutura, suture, passaggi transcutanei, componenti di protesi valvolari, componenti di assistenza cardiaca
Polimetilmetacrilato	PMMA	Cemento osseo, lenti a contatto e intraoculari, membrane per emodialisi, materiali dentari
Polipropilene	PP	Imballaggi sterili, siringhe, connettori, membrane per ossigenatori
Polisolfone	PSU	Membrane per ossigenatori ed emodialisi
Politetrafluoretilene	PTFE	Protesi vascolari, componenti di protesi valvolari
Poliuretani	PURs	Cateteri, cannule, tubi endotracheali
Polivinilcloruro	PVC	Sacche per sangue, guanti monouso
Siliconi	-	Cateteri, drenaggi, pelle artificiale

1.2.2.1 Struttura

L'orientazione tridimensionale delle molecole del polimero è una caratteristica che condiziona le proprietà del materiale esaminato. Si parla di isomeria strutturale o stereoisomeria quando composti chimici con identica composizione, e quindi stessa formula bruta, presentano struttura differente, e di conseguenza proprietà chimiche differenti, data la possibilità di diversi legami tra le molecole (figura 1.10).

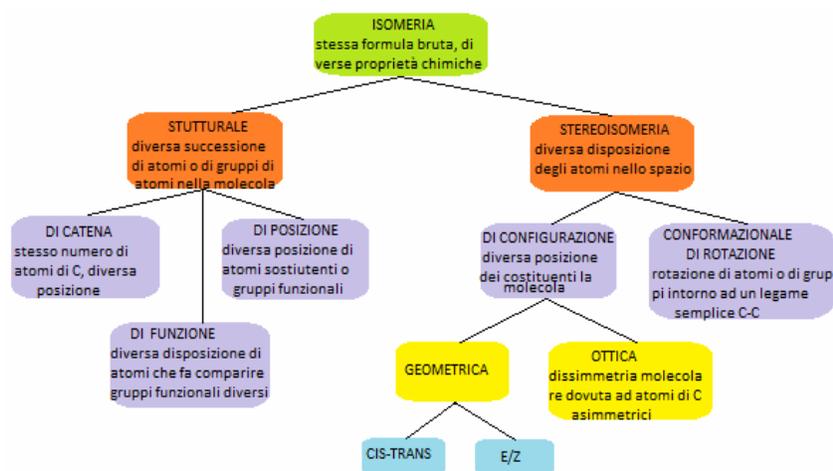


Figura 1.10 Diverse tipologie di isomeria.

Tenendo in considerazione che un polimero nel suo complesso è formato da macromolecole articolate in monomeri legati covalentemente, ed unite tra loro mediante legami chimici secondari (come ad esempio forze di Van der Waals e interazioni dipolo-dipolo), e che talvolta sono presenti anche catene trasversali con il compito di collegare tra loro le varie macromolecole, si possono distinguere tre tipi di struttura, mostrate in figura 1.11, relativamente alla configurazione molecolare: lineare, ramificata e reticolata.

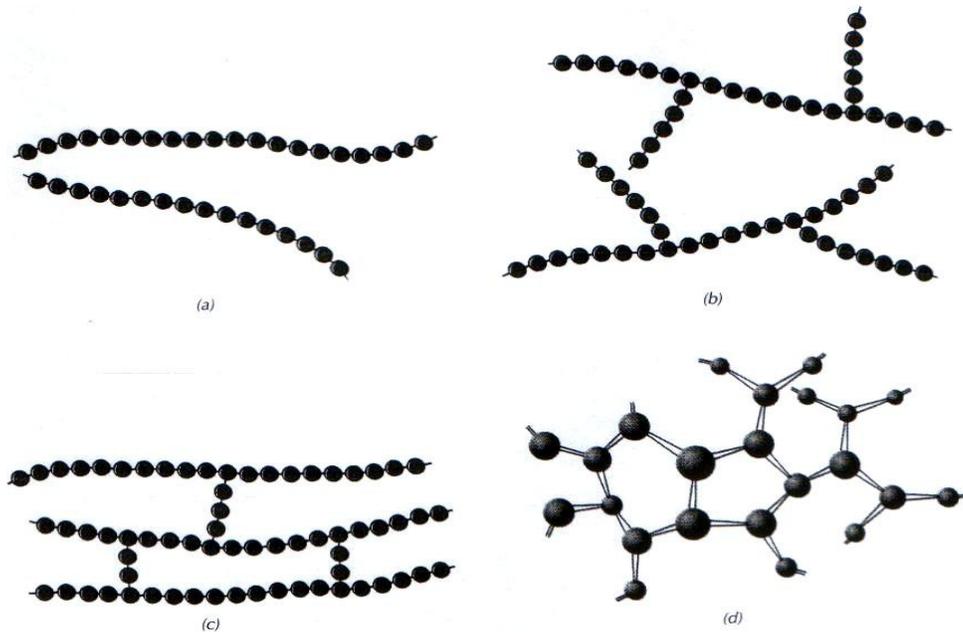


Figura 1.11

Strutture macromolecolari dei polimeri: a) lineare, b) ramificata, c) e d) reticolata

I polimeri con struttura lineare sono articolati in un groviglio di lunghe macromolecole filiformi, la cui linearità è imputabile alla successione delle unità strutturali costituenti; in quelli a struttura ramificata, nonostante l'andamento lineare, si notano ramificazioni laterali, pur rimanendo distinguibili le singole macromolecole le une dalle altre. I polimeri a catena lineare e ramificata hanno proprietà meccaniche inferiori a quelli a catena reticolata: infatti le catene dei primi sono legate fra loro da legami deboli che, in caso di sollecitazioni, consentono lo scorrimento viscoso delle catene le une rispetto alle altre. Va comunque sottolineato che la conformazione lineare gode di proprietà meccaniche inferiori rispetto a quella ramificata, dal momento che quest'ultima, a causa degli impedimenti fisici intrinseci alla sua struttura, riscontra maggiore difficoltà di scorrimento. Infine, il terzo caso comprende tutti i polimeri considerabili come un'unica grande macromolecola reticolata, costituita dalle diverse macromolecole unite tra loro con catene trasversali; fra queste catene si generano dei veri e propri ponti con legami covalenti tali per cui non è possibile il verificarsi di scorrimento viscoso.

1.2.2.2 Classificazione

I polimeri studiati per applicazioni biomediche sono sia di origine naturale, che di origine sintetica. Per quanto riguarda i primi, quelli che rivestono un ruolo di maggiore importanza sono:

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

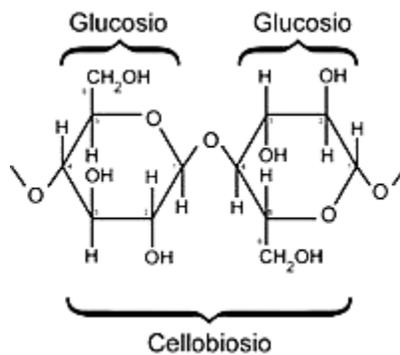


Figura 1.12 Struttura della cellulosa

- Chitina: è uno dei principali componenti dell'esoscheletro di insetti e alcuni artropodi, della parete cellulare di funghi e batteri. Un suo derivato, il chitosano, presenta un'alta biocompatibilità in vivo, ed è considerato un potenziale materiale per la realizzazione di scaffold per la ricostruzione di ossa, cartilagini e pelle;

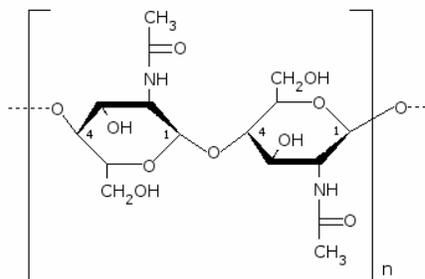


Figura 1.13 Struttura della chitina

- Proteine come collagene (la più importante del corpo umano, presente in pelle, tendini, vasi sanguigni, ossa, membrane cellulari, con funzione di sostegno), fibrina (derivante dal fibrinogeno, svolge un ruolo

fondamentale nella coagulazione sanguigna), gelatina (ottenuta dai tessuti connettivi animali) e albumina (proteina del plasma, contenuta anche nel latte e nell'albumina dell'uovo) vengono utilizzate in ingegneria tissutale per la ricostruzione sia di ossa e cartilagini che di tessuti molli. Questo è possibile grazie alla loro elevata biocompatibilità e alla possibilità di crescita cellulare sulle loro superfici, anche se la difficile lavorabilità e la diversa velocità di degradazione, variabile da paziente a paziente, costituiscono dei limiti al loro impiego.



Figura 1.14 Fibrina

La categoria dei polimeri sintetici comprende numerosi materiali, tra cui i poliesteri alifatici, che verranno ampiamente trattati in seguito, ma anche:

- Polianidridi: idroliticamente instabili, si degradano nel giro di qualche giorno o qualche settimana se alifatiche, mentre se aromatiche i tempi si allungano fino a raggiungere molti mesi o addirittura anni. Per questa ragione costituiscono uno dei materiali più studiati nell'ambito del *drug release*;

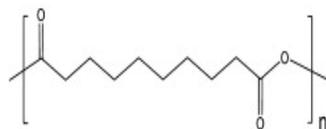


Figura 1.15 Esempio di polianidride

- Policarbonati alifatici: si distinguono principalmente per la loro struttura molecolare estremamente ordinata e cristallina. Questa caratteristica li rende estremamente tenaci e resistenti ad azioni meccaniche come il graffio, la perforazione e l'abrasione; inoltre la possibilità di sterilizzarli in

autoclave ne ha permesso l'impiego per la fabbricazione di strumenti cardiocirurgici e per dialisi;

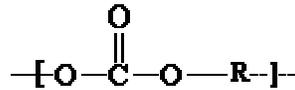


Figura 1.16 Acido carbonico, unità strutturale dei policarbonati alifatici

- Poli(ammidi): sono polimeri caratterizzati da legami molto stabili idroliticamente, che vengono erosi solo in presenza di enzimi. Rappresentano una classe molto interessante di materiali data la possibilità di modularne le sequenze di amminoacidi, anche se il loro utilizzo risulta limitato dalla non ottimale biocompatibilità;

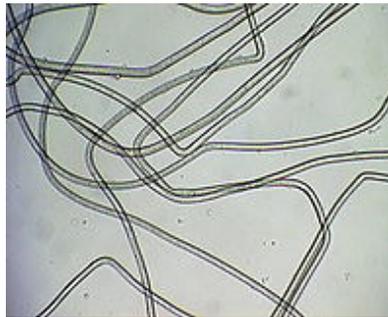


Figura 1.17 Poliammide vista al microscopio

- Poli(ortoesteri): si tratta di polimeri amorfi e idrofobi, adatti alla realizzazione di matrici per il rilascio controllato di farmaci in quanto degradano solo superficialmente e tendono a diventare sottili senza però sgretolarsi; non si sono invece rivelati ideali per altri tipi di applicazioni, data la loro elevata velocità di degradazione.

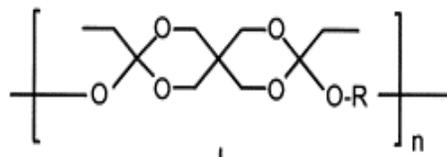


Figura 1.18 Esempio di poliortoestere

1.2.2.3 Degradazione

Una delle caratteristiche più interessanti dei materiali polimerici è sicuramente quella di poter essere degradati dall'organismo fino anche alla dissoluzione totale, senza lasciare tracce nel sito d'impianto e senza rilasciare sostanze nocive per l'organismo stesso.

Dal punto di vista del materiale, la degradazione consiste in una graduale alterazione chimica della struttura, dovuta alla rottura di legami appartenenti alla catena principale o a gruppi laterali, che ne modifica profondamente anche le caratteristiche fisiche; tale processo può essere artificialmente indotto ad un tempo specifico dopo l'inserimento dell'impianto, oppure può innescarsi fin dal primo contatto con i fluidi corporei, proseguendo poi con una velocità definita dalle condizioni in cui il materiale si trova.

Gli effetti responsabili della degradazione polimerica sono distinguibili in:

- Effetti chimici: rotture casuali delle catene e rottura di legami chimici con formazione di prodotti secondari rientrano in tale classe;
- Effetti della sterilizzazione: necessaria al fine di evitare infezioni imputabili a microrganismi patogeni e saprofiti, le modalità attraverso cui tale processo si attua variano in funzione del polimero in analisi. Il metodo di sterilizzazione, più dispendioso in termini economici ma con minori rischi di degradazione, prevede l'uso di agenti chimici quali gas o soluzioni a basse temperature;
- Effetti meccano-chimici: sollecitazioni meccaniche, statiche o cicliche, possono indurre la frammentazione del polimero ed il conseguente rilascio di residui e particelle con elevato rapporto superficie-volume, entrambi contribuenti alla biodegradazione;
- Effetti dell'ambiente biologico: l'aggressività dell'ambiente biologico nei confronti dei polimeri, dimostrata dalla velocità variabile con cui ivi si deteriorano, è dovuta a ioni (in particolare lo ione OH^-) ed all'ossigeno disciolto. Alla biodegradazione ossidativa si affiancano anche l'enzimatica e l'idrolitica.

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

destinazione d'uso desiderati: è necessario infatti utilizzare un materiale facilmente degradabile nel caso, ad esempio, di suture.

1.2.2.4. Lavorazione

Il primo passo nella fabbricazione di un dispositivo costituito da materiale polimerico è la produzione del polimero stesso, il quale in genere viene fornito in soluzione, in polveri, in grani oppure, nel caso di polimeri termoindurenti, anche in fogli, barre, ecc. Questi ultimi possono essere lavorati con macchine utensili mediante i tradizionali metodi di asportazione di truciolo (gli stessi utilizzati per i metalli), ponendo particolare attenzione a non scaldare il materiale durante la lavorazione, al fine di non comprometterne stabilità dimensionale e proprietà meccaniche.

I principali processi con cui vengono prodotti i dispositivi polimerici sono schematizzati in figura 1.19.

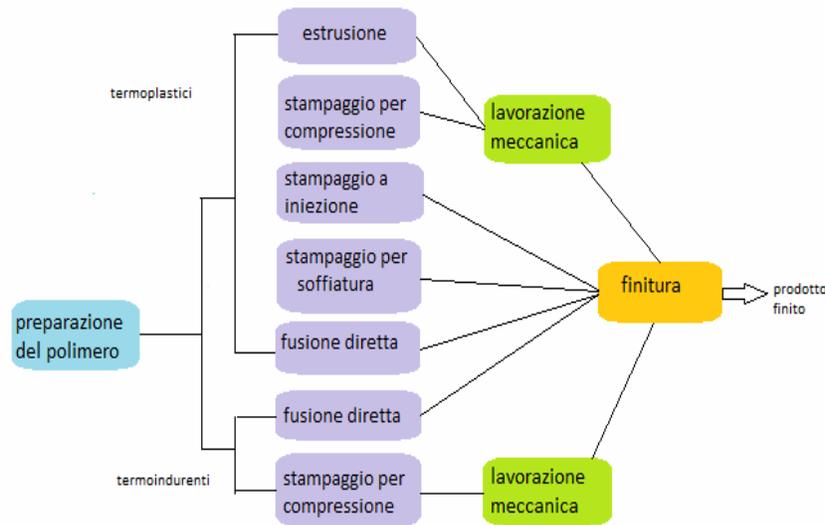


Figura 1.19 Fasi della lavorazione dei materiali polimerici

In genere i polimeri termoplastici vengono riscaldati fino al rammollimento e quindi rimodellati prima che raffreddino, mentre per quanto riguarda i termoindurenti, si adotta un processo che sfrutta una reazione chimica tramite la quale le catene polimeriche vengono legate fra loro in modo da formare una rete tridimensionale. La polimerizzazione finale è ottenuta grazie a calore e pressione, oppure per azioni catalitiche. Una delle tecniche maggiormente utilizzata è lo

stampaggio, ovvero un metodo di formatura per mezzo di uno stampo, il quale si può contraddistinguere in tre tipologie: a compressione, ad iniezione o per soffiatura.

- Stampaggio a compressione: la forma più generale prevede l'utilizzo di una lastra preformata, e la successiva applicazione di pressione spinge la resina preriscaldata contro le pareti dello stampo; continuando il riscaldamento si giunge alla completa reticolazione della resina termoindurente.
- Stampaggio ad iniezione: i granuli di materia plastica vengono caricati sulla superficie di una vite roteante che li spinge verso lo stampo; la rotazione della vite forza contro le pareti riscaldate del cilindro i granuli, provocandone la fusione a causa del calore di compressione e dell'attrito. Il processo si arresta quando la giusta quantità di materia plastica arriva allo stampo posto al termine della vite; quest'ultimo viene poi raffreddato o reticolato. I vantaggi riscontrati con questo processo sono l'elevata velocità di produzione, l'alta qualità dei pezzi ottenuti, la complessità di forma che si può raggiungere ed una buona finitura superficiale.
- Stampaggio per soffiatura: consente di ottenere da una preforma di tipo semplice (in genere lastre o film), una forma complessa e di grandi dimensioni, mantenendo il polimero a temperatura tale da avere la fluidità richiesta. Il processo consiste nel posizionare la plastica preriscaldata all'interno di uno stampo caldo e comprimerla contro le pareti insufflando aria compressa. Analogamente, nella termoformatura, un foglio di materia plastica riscaldata viene forzato contro le pareti di uno stampo in seguito a pressione, solitamente ottenuta mediante il vuoto.

Una variante dello stampaggio per soffiatura è lo stampaggio o formatura sottovuoto: questa tecnica consiste nel riscaldamento di una piastra di polimero e la sua successiva adesione allo stampo mediante il vuoto.

Un ulteriore metodo di lavorazione dei materiali polimerici è l'estrusione, cioè l'operazione di compattamento e fusione (o rammollimento) di un materiale plastico, seguita dalla forzatura del materiale stesso in modo continuo, per mezzo di viti elicoidali, in una matrice di forma negativa rispetto a quella desiderata. Il pezzo deve essere successivamente portato al di sotto della sua temperatura di transizione vetrosa, con un sistema di insufflazione ad aria o ad acqua, in modo da

assicurarne la stabilità dimensionale. L'estrusione è anche utilizzata per mescolare intimamente alla massa del polimero gli additivi o il secondo componente di una *blend* ed eventualmente per far avvenire reazioni chimiche (estrusione reattiva).

1.2.3 POLIESTERI ALIFATICI

I poliesteri, polimeri identificati dal ricorrere dell'unità funzionale esterea nella catena carboniosa, si differenziano in aromatici e alifatici in relazione alla presenza o meno di anelli aromatici all'interno della struttura. 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 in suture chirurgiche. Inoltre tale classe è la più intensamente studiata in termini di meccanismi di degradazione e relazioni struttura-proprietà.

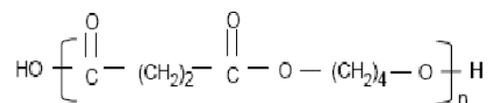


Figura 1.20 Struttura del PBS (Polibutilensuccinato), un poliestere alifatico

1.2.3.1 Sintesi

Definito polimerizzazione il processo di preparazione dei polimeri mediante l'unione di più molecole di monomero, per quanto concerne i poliesteri alifatici si distinguono due diversi tipi di polimerizzazione: la policondensazione e la polimerizzazione ad apertura di anello (ROP).

Nella prima, facente uso di dioli e diacidi (o acidi derivati) o idrossiacidi quali reagenti, la formazione del legame chimico tra monomeri porta all'eliminazione di piccole molecole semplici, quali acqua, ammoniaca e acidi inorganici, identificate come prodotti secondari. Condizione necessaria affinché tale meccanismo a stadi abbia luogo è la presenza, tra i due monomeri coinvolti nella formazione del legame, di altrettanti gruppi funzionali in grado di interagire tra loro. Considerando che i materiali policondensati acquisiscono le loro proprietà d'impiego al raggiungimento di un peso molecolare dell'ordine di 10000-20000 e che tale processo di polimerizzazione, oltre ad attuarsi con relativa lentezza, tende a limitare il grado di polimerizzazione del polimero finale, sono state ideate

reazioni chimiche che, partendo da poliesteri a basso peso molecolare, consentano di limitare l'eccessiva produzione di sostanze secondarie. Anche agendo sulla diminuzione della temperatura di lavoro e dei tempi di reazione (i quali sono causa di reazioni secondarie quali la racemizzazione), si può giungere ad una risoluzione del problema.

La ROP di lattoni, diesteri ciclici ed acetali chetonici ciclici rappresenta un metodo alternativo per la sintesi di polimeri ad elevata massa molecolare rispettando miti condizioni di reazione. Si tratta di una poliaddizione che, potendo essere condotta in presenza di limitate reazioni secondarie, agevola il controllo di proprietà quali il peso molecolare e la sua distribuzione, o la presenza di opportuni gruppi funzionali terminali. La metodologia, concretizzata nella scissione di legame delle strutture ad anello al fine di ottenere una molecola lineare contenente un gruppo estereo, fu originariamente indagata, in riferimento ai lattoni, da Carothers. La ROP di lattoni costituisce il metodo standard per la produzione di poliesteri biocompatibili e biodegradabili. I lattoni sono ambidentati, pertanto la polimerizzazione, come evidenziato in letteratura, può procedere attraverso due tipi di scissione. Dati termodinamici rilevati dalla polimerizzazione di lattoni di piccole e medie dimensioni hanno evidenziato come tale processo sia guidato dalla variazione negativa di entalpia; in particolare, la presenza di sostituenti nell'anello carbonioso causa un innalzamento del carattere esotermico della reazione, potendo quest'ultima essere controllata previo utilizzo di iniziatori quali composti organometallici (ossidi, carbossilasi o alcossidi). I prodotti a più elevato peso molecolare sono stati ottenuti mediante ROP anionica e coordinativa.

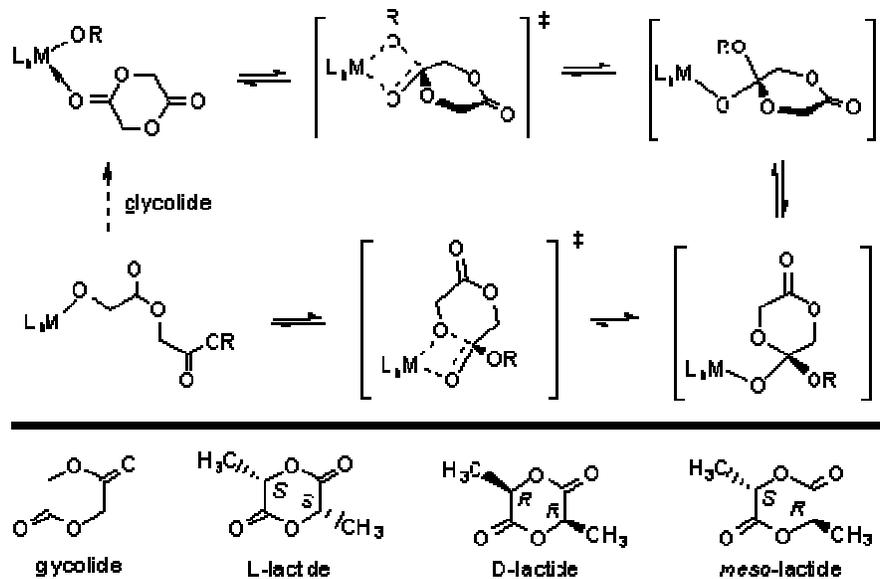


Figura 1.21 ROP del Lattide

1.2.3.2 Proprietà fisiche

La composizione delle unità ripetitive, la presenza di gruppi polari, la flessibilità delle catene costituenti, il grado di ramificazione, la massa molecolare, così come la cristallinità e l'orientazione, sono tra i principali fattori che concorrono a determinare le proprietà fisiche dei poliesteri alifatici. Ramificazioni a catena corta, ad esempio, tendono a ridurre la cristallinità del polimero, mentre l'allungamento progressivo di queste è associato ad un abbassamento della viscosità allo stato fuso.

Le proprietà del polimero sono peraltro modulabili mediante miscelazione, copolimerizzazione ed alterazione dell'architettura macromolecolare. Il primo di tali metodi, spesso riferito come *blending*, ha destato notevole interesse per la possibilità di sintesi di nuovi materiali con migliori proprietà.

La copolimerizzazione è una procedura in grado di condizionare fortemente le proprietà fisiche, quali la cristallinità e la temperatura di fusione (T_m). Copolimeri di acido lattico e glicolico, ad esclusione di campioni a basso peso molecolare, sono caratterizzati da una T_g maggiore della temperatura corporea.

Sebbene tale aspetto, unitamente alla natura cristallina dei suddetti copolimeri, limiti la loro applicabilità nella produzione di impianti biomedici, l'introduzione di unità biodegradabili etere-estere nello scheletro carbonioso coadiuva la sintesi

di materiali più flessibili. La copolimerizzazione a blocchi rappresenta un'altra possibilità di preparazione di polimeri innovativi, biodegradabili ed altamente flessibili: i copolimeri a blocchi detengono infatti proprietà uniche, modulabili in un range che si estende da plastiche rigide ad elastomeri, per la combinazione della natura identificativa di entrambi gli omopolimeri.

Infine, un esempio di alterazione della conformazione macromolecolare consiste nella sostituzione, nella catena alifatica, di un idrogeno con un gruppo alchilico. Il plausibile ostacolo del sostituito, così come la formazione, in fase di sintesi e in corrispondenza ai carboni sostituiti, di centri asimmetrici con formazione di racemi, potrebbe in tal caso condurre alla riduzione del carattere cristallino del polimero.

1.2.3.3 Cristallinità

Definiti lo stato cristallino ed il grado di cristallinità rispettivamente come la disposizione geometricamente ordinata degli atomi costituenti entro la cella elementare ed il rapporto percentuale del peso di sostanza in forma cristallina rispetto al peso totale, i poliesteri, ed i polimeri in generale, sono identificabili come strutture a due fasi, l'una amorfa e l'altra cristallina.

Lo stato amorfo, che seppure in percentuali variabili (più elevate in corrispondenza di strutture ramificate e reticolate) risulta sempre presente, è indicativo del mantenimento, da parte del polimero allo stato solido, di una struttura disordinata caratteristica dello stato fuso. La lunghezza delle molecole favorisce, infatti, una complessa distribuzione spaziale, passibile di distensioni elastiche e scorrimenti viscosi, responsabile delle proprietà viscoelastiche.

La componente cristallina, di solito più frequente in presenza di catene lineari e chimicamente e spazialmente regolari, è caratterizzata da piccola estensione e coinvolgimento di un numero limitato di catene, in grado di ordinarsi e cristallizzare grazie all'elevato peso molecolare dei poliesteri.

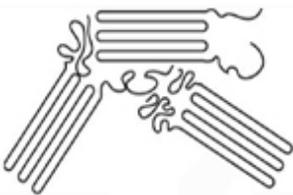


Figura 1.22 Esempio di fasi cristallina e amorfa

Il grado di cristallinità, dipendente dalla storia termica e meccanica della sostanza e valutabile per mezzo di misure di densità, diagramma di diffrazione ai raggi X, dello spettro infrarosso e di misure calorimetriche, assume pertanto valori molto bassi per quanto concerne il maggior numero dei casi, in particolar modo se si tratta di poliesteri caratterizzati da strutture ramificate o reticolate e presenza di monomeri asimmetrici, fino a raggiungere percentuali altissime in presenza di strutture lineari. In quest' ultimo caso, i polimeri sono caratterizzati da maggior densità (originata da un aumentato impacchettamento delle macromolecole), crescenti rigidità, durezza, resistenza all'usura, all'aggressione ambientale ed al *creep*. Poiché la cristallinità, funzione della struttura e della temperatura, nonché della velocità con cui si verificano variazioni di quest'ultima, condiziona le proprietà meccaniche, sono stati ideati processi che apportino migliorie a queste ultime (come ad esempio la filatura) e classificazioni fondate sull'alterazione conformale delle sostanze in relazione alla somministrazione di calore.

Si definiscono pertanto:

- Termoplastici: i poliesteri, aventi struttura lineare o ramificata, tra le cui macromolecole si nota la sola presenza di legami secondari, aventi bassa resistenza termica e suscettibili, in seguito a graduale incremento termico, di un progressivo rammollimento privo di trasformazioni chimiche. Essi risultano pertanto modellabili plasticamente, in opportuni intervalli di temperatura, un numero pressoché illimitato di volte.
- Termoindurenti: i poliesteri, a struttura reticolata, nei quali la somministrazione di calore induce un iniziale rammollimento che consente la formatura, cui segue il completamento della polimerizzazione iniziata in fase industriale. L'elevata reticolazione raggiunta implica l'irreversibile durezza e rigidità della sostanza, impedendone la successiva modellazione plastica.

Tabella 1.3 Esempi di polimeri termoplastici e termoindurenti

Termoplastici	Termoindurenti
Poliammidi	Poliesteri insaturi
Policarbonato	Poliuretani
Polivinilcloruro	Polivinildenfluoruro
Polietilentereftelato (PET)	Resine alchidiche
Polipropilene	Resina epossica
Polistirene	Resine alliliche

1.2.3.4 Proprietà termiche

L'aumento di temperatura, origine di alterazioni chimiche dovute alla rottura di legami e possibile formazione di prodotti volatili, modifica le proprietà fisiche dei poliesteri. Tale aspetto, in relazione all'applicazione della sostanza in dispositivi medici, richiede la valutazione del comportamento a temperature di funzionamento (la corporea varia tra 35°C e 41°C) superiori a quella ambiente.

Analizzando l'andamento del modulo elastico di un polimero in funzione della temperatura (figura 1.24) è possibile individuare due temperature caratteristiche:

- *Temperatura di transizione vetrosa (T_g)*: soglia termica alla quale si riscontra il passaggio dallo stato vetroso, in cui il materiale è rigido e fragile, allo stato gommoso, in cui risulta elastico, duttile e malleabile. La T_g dipende da molteplici fattori: la presenza di forti legami intermolecolari tra le catene ne determina infatti un aumento, la flessibilità (maggiore nel caso di legami semplici tra monomeri) una diminuzione; le materie termoplastiche presentano T_g inferiore alle termoindurenti.
- *Temperatura di fusione (T_m)*: identificativa del punto di fusione termodinamico della porzione cristallina, delimita inferiormente l'intervallo termico entro il quale il polimero si presenta allo stato fuso. Essa acquisisce maggior rilievo nei poliesteri cristallini, indicativamente stabili fino al suo raggiungimento, e tende ad assumere valori maggiori in presenza di elevato grado di cristallinità. Nel caso di poliesteri amorfi l'assenza di struttura cristallina impone l'adozione di una nuova accezione: la *temperatura di rammollimento (T_r)* che stabilisce la soglia

termica alla quale si concretizza il passaggio dallo stato gommoso a quello liquido.

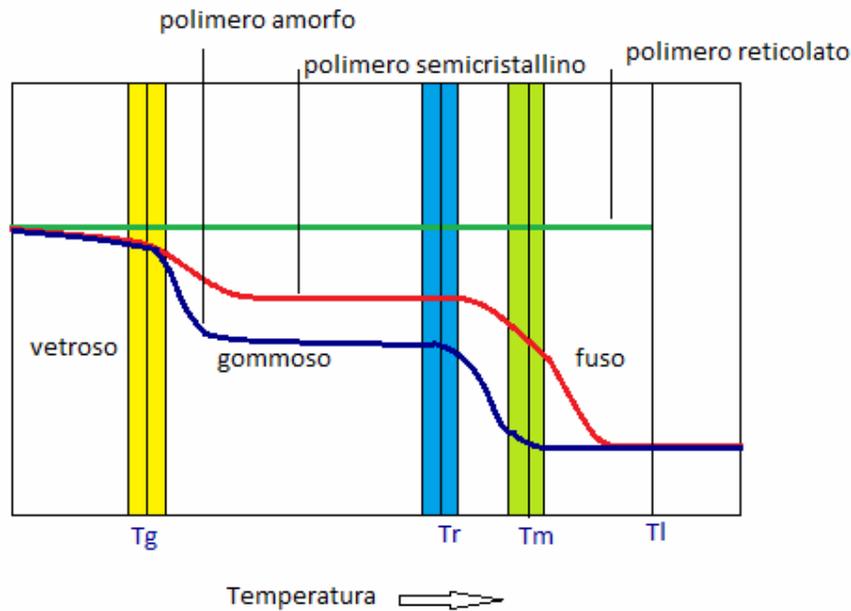


Figura 1.23 Andamento del modulo di elasticità, in funzione della temperatura, per polimeri a differente struttura.

1.2.3.5 Massa e peso molecolare

La massa molecolare di un polimero è generalmente espressa ricorrendo al grado di polimerizzazione: nel caso di omopolimeri esso è calcolabile mediante rapporto tra le masse molecolari della sostanza e dell'unità strutturale, mentre nel caso di copolimeri il rapporto precedente è calcolato considerando una massa media dell'unità strutturale. A causa della complessità con cui i meccanismi di polimerizzazione operano, la massa di un polimero è ripartita tra macromolecole aventi grado di polimerizzazione, e quindi massa molecolare, diversi.

Risulta pertanto indispensabile analizzare statisticamente la determinazione delle masse molecolari, individuando valori medi e funzioni che le caratterizzino e ne descrivano adeguatamente la distribuzione.

Applicando la definizione di peso molecolare all'*i*-esima frazione di un campione non uniforme, in cui sono collocate N_i moli di peso molecolare M_i e massa complessiva W_i , il peso molecolare medio del campione è dato da

$$\bar{M}_n = \sum W_i / \sum N_i .$$

Definita la frazione numerica (detta anche molare o molecolare) n_i della specie i -esima il rapporto tra il numero di moli di una certa sostanza e il numero totale di moli presenti nel campione

$$n_i = N_i / \sum N_i$$

il peso molecolare medio numerico è esprimibile come:

$$\bar{M}_n = \sum n_i M_i.$$

Con analogo ragionamento si giunge a formulare il grado di polimerizzazione medio numerico:

$$\bar{X}_n = \sum n_i X_i .$$

Valutato l'ampio intervallo di variabilità, sebbene il peso molecolare ed il grado di polimerizzazione siano proprietà discrete, risulta conveniente considerarli quali proprietà continue. In tal caso essi sono riformulabili come segue:

$$\bar{M}_n = \int M \cdot n(M) \cdot dM$$

$$\bar{X}_n = \int X \cdot n(X) \cdot dX$$

Tali equazioni evidenziano come il valore medio della massa molecolare sia dato dalla somma dei valori assunti dalla proprietà nelle diverse specie, ciascuno moltiplicato per un opportuno peso statistico (individuabile come la frazione di molecole in cui la proprietà assume un valore specifico o come la probabilità che, analizzate un certo numero di molecole, la proprietà assuma in esse un dato valore). Le caratteristiche di ogni peso statistico, esemplificate per la frazione numerica, sono:

$$0 \leq n_i \leq 1$$

$$\sum n_i = 1$$

Nell'ipotesi di proprietà continua, le sommatorie sono sostituibili con integrali ed il peso statistico è ottenibile come prodotto della funzione di distribuzione della proprietà per l'incremento infinitesimo della proprietà stessa.

Considerando come peso statistico la frazione ponderale w_i , rapporto tra il peso molecolare M_i ed il peso del campione:

$$w_i = (N_i M_i) / \sum N_i M_i$$

in cui N_i è il numero di moli con massa molecolare M_i , il peso molecolare medio ponderale risulta essere:

$$\bar{M}_w = \sum w_i M_i .$$

Il grado di polidispersività, definito come:

$$I_d = \bar{M}_w / \bar{M}_n$$

è un parametro adottato quale indice pratico dell'ampiezza della distribuzione dei pesi molecolari. Sebbene il limite teorico inferiore per esso previsto sia 1, gli esiti sperimentali nell'ambito dei polimeri sintetici, mostrano che solo la polimerizzazione anionica consente di ottenere valori inferiori a 1.1, mentre nella maggioranza dei casi I_d vale 2. Valori del grado di polidispersività inferiori e superiori a questo identificano, rispettivamente, distribuzione dei pesi molecolari strette e larghe. Nelle applicazioni biomediche peso molecolare elevato e una distribuzione relativamente stretta, garanti di buone proprietà meccaniche e bassa dispersione della distribuzione dei pesi molecolari, costituiscono, unitamente all'assenza di monomero residuo potenzialmente tossico, requisiti importanti.

1.2.3.6 Biodegradazione

La biodegradabilità dei poliesteri dipende principalmente dalla struttura della catena principale: il requisito necessario è la presenza di legami idrolizzabili e/o ossidabili nella catena, per i poliesteri soprattutto il legame estereo.

Tali meccanismi di degradazione variano in funzione della posizione dell'impianto all'interno dell'organismo, del tipo di tessuto con cui sono a contatto, della risposta del sistema immunitario e delle condizioni generali dell'organismo ospite (età, stato di salute, farmaci assunti), nonché delle caratteristiche fisico-chimiche del materiale stesso. Essi si attuano attraverso due modalità: erosione di *bulk* (idrolitica) ed erosione superficiale (enzimatica) (figura 1.25). I due casi si distinguono in relazione al volume del campione interessato dal fenomeno: nel primo la perdita di massa riguarda l'intero volume, poiché la penetrazione dell'acqua risulta più rapida del processo erosivo, mentre nel secondo solo le porzioni più esterne, dal momento che la velocità di penetrazione dell'acqua è comparabile a quella di erosione. Quest'ultima risulta preferibile, poiché più facilmente controllabile, anche se non sempre possibile da ottenere in

quanto molti polimeri non sono sufficientemente idrofobi da evitare che l'acqua penetri all'interno e degradi il materiale più velocemente di quanto vengano erosi gli strati superficiali. La degradazione può essere monitorata attraverso misurazione delle variazioni di peso molecolare, derivanti dalla scissione dei legami, o di perdita di peso, imputabile al passaggio in soluzione di molecole a basso peso molecolare. La degradazione si concretizza in modifiche morfologiche e topologiche, rilevabili al SEM, formazione di prodotti di degradazione ed alterazione delle proprietà meccaniche.

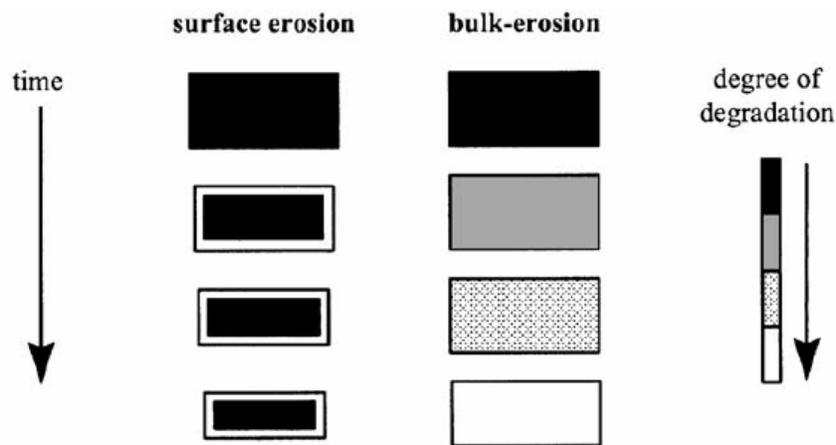


Figura 1.25 Meccanismi di degradazione: superficiale e di *bulk*

Oltre ai meccanismi, è importante considerare anche la velocità a cui la biodegradazione avviene: essa dipende, oltre che dal tipo di unità ripetitiva, composizione e lunghezza della sequenza, geometria, peso molecolare, area superficiale esposta e presenza di additivi, da quattro fattori fondamentali che intervengono sia nel caso di degradazione idrolitica che enzimatica:

- T_m : maggiore risulta la differenza tra la temperatura di esercizio (nel corpo umano tipicamente 37°C) e quella di fusione del materiale, minore sarà la biodegradabilità. Questo perché in vicinanza della T_m le catene polimeriche presentano elevata mobilità e di conseguenza sono più facilmente attaccabili. Stesso discorso vale nel caso della T_g : operando al di sopra di tale temperatura le catene risultano più mobili e quindi la velocità di biodegradazione aumenta;
- Grado di cristallinità: un aumento della cristallinità del polimero causa una diminuzione della sua velocità di biodegradazione. Infatti, la fase amorfa è

la prima ad essere aggredita perché la porzione cristallina, dato l'elevato grado di ordine ed impacchettamento delle catene rende quest'ultime meno accessibili;

- Grado di perfezione dei cristalli: a parità di grado di cristallinità, cristalliti piccoli, e contenenti difetti, vengono degradati più facilmente rispetto a strutture maggiormente impacchettate e più pure;
- Idrofilicità: maggiore è la bagnabilità della superficie polimerica, più alta è la velocità di degradazione.

Tabella 1.4 Fattori strutturali e metodi di controllo della degradazione

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

1.2.3.7 Poliesteri alifatici per uso biomedico

Di seguito sono riportati i poliesteri più usati in campo biomedico:

- **Acido poliglicolico (PGA)**: sintetizzato per la prima volta nel 1893 quando, nonostante la sua elevata instabilità idrolitica, venne riconosciuto come materiale potenziale per la lavorazione in fibre, e successivamente messo in commercio nel 1970, esso rappresenta il più semplice poliestere lineare alifatico. Il PGA può essere ottenuto con le più comuni tecniche di fabbricazione come estrusione, iniezione e stampaggio a compressione, le quali ne influenzano anche proprietà e degradabilità; è un polimero avente T_m e T_g poste rispettivamente negli intervalli 220-226°C e 35-40°C e struttura semicristallina (45-55% di cristallinità). La sua rapida degradazione *in vivo*, la quale comporta una notevole perdita di prestazioni meccaniche dopo 1-2 mesi se sottoposto ad idrolisi, perdita quasi totale di peso in 6-12 mesi e nel corpo umano frammentazione in glicina (successivamente secreta attraverso l'urina o convertita in diossido

di carbonio e acqua tramite il ciclo dell'acido citrico), determina l'uso di tale polimero, generalmente copolimerizzato, come materiale per suture chirurgiche. Le suture realizzate in PGA hanno gradualmente sostituito le precedenti, in collagene, per la miglior compatibilità tissutale del polimero, idonee proprietà meccaniche (elevata flessibilità, resistenza meccanica) e prevedibile biodegradazione. Recenti studi nell'ambito dell'ingegneria tissutale si sono focalizzati sull'utilizzo del PGA come materiale di riempimento o per la fabbricazione di scaffold destinati alla rigenerazione di tessuti ossei, intestinali, linfatici, spinali, oltre a cartilagini, tendini e denti. Alcune limitazioni nell'uso di tale materiale sono legate alla solubilità in pochi e costosi solventi organici, all'elevata temperatura di fusione e sensibilità all'umidità, alla perdita, in seguito alla degradazione, di proprietà meccaniche ed al rilascio di acido glicolico: quest'ultimo, nonostante sia riassorbibile fino ad alte concentrazioni da parte dell'organismo, potrebbe causare una rilevante risposta infiammatoria nei tessuti interessati.

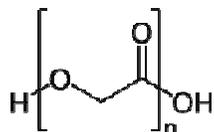


Figura 1.26 Unità monomerica del PGA

- **Acido polilattico (PLA):** derivante dalla policondensazione dell'acido lattico o dalla ROP del dimero ciclico lattato, è un polimero che presenta due isomeri ottici, L e D; fermentato, l'acido lattico è per il 99,5% in forma L-isomero e per lo 0,5% in forma D-isomero. La polimerizzazione del lattide verso polimeri ricchi di L-isomero porta ad ottenere prodotti cristallini, mentre risultano amorfi quelli contenenti più del 15% di D-isomero. Le proprietà variano a seconda dell'isomeria: il PDLLA 50:50, caratterizzato da una distribuzione random di unità L e D, è amorfo, con basso carico a rottura, elevata deformabilità e tempi di degradazione relativamente brevi, mentre il PLLA, semicristallino (le cui T_m e T_g sono comprese tra 175-178°C e 60-65°C), è caratterizzato da resistenza a trazione e compressione, bassa deformazione a rottura e modulo elastico

tale da renderlo adatto per applicazioni che richiedono resistenza ai carichi. Il PLLA ha struttura lineare e possiede un gruppo metile che lo rende più amorfo e idrofobico del PGA, con conseguente aumento della solubilità in solventi organici come cloroformio, cloruro di metilene, metanolo, etanolo, benzene, acetone, DMF, ecc. Ottenibile tramite stampaggio a iniezione, estrusione, soffiaggio e termoformatura, venne studiato per la prima volta come possibile materiale per il rilascio controllato di farmaci nel 1971, anche grazie alle sue eccellenti proprietà di biodegradabilità e biocompatibilità. Tali proprietà ne hanno sancito l'utilizzo in sistemi a rilascio controllato di farmaci, in ingegneria tissutale, come materiale per suture, fissaggio ortopedico e fabbricazione di scaffold (per la rigenerazione di ossa, cartilagini, tendini, nervi e vasi sanguigni). Rigidezza, ridotta stabilità termica ed elevati costi limitano il suo sviluppo quale generica plastica, nonostante la possibilità di rimpiazzo dei tradizionali materiali a base di petrolio. Notevoli sforzi della ricerca sono volti a diminuirne la rigidezza. Sono state proposte varie strategie e ad oggi l'opzione più plausibile sembra la sintesi di copolimeri mediante introduzione di componenti flessibili nella struttura del PLLA.

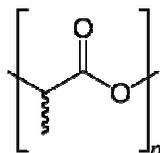


Figura 1.27 Unità monomerica del PLA

- **Poli (ϵ -caprolattone) (PCL):** originariamente sintetizzato da Carothers mediante ROP dell'estere ciclico ϵ -caprolattone, è un polimero idrofobico e semicristallino, con T_m e T_g prossime, rispettivamente, a 59-64°C e -60°C. Il fatto che a temperatura ambiente si trovi nello stato gommoso e l'elevata elongazione finale (>700%) giustificano l'impiego del PCL ad elevato peso molecolare come additivo, presente generalmente in quota maggioritaria, in molti sistemi polimerici. Connotato da proprietà uniche di solubilità nei confronti degli altri polimeri (risulta infatti solubile in tetraidrofurano, cloroformio, cloruro di metile, tetracloruro di carbonio, benzene, toluene, 2-nitropropano e parzialmente solubile in acetone, 2-

butanone, etil acetato, acetonitrile e dimetil fumarato), permeabilità a molteplici sostanze, un elevato potenziale osteoinduttivo, buone proprietà meccaniche e basso rilascio di prodotti dannosi per l'organismo, il PCL è stato oggetto di studio per lo sviluppo di sistemi a rilascio controllato impiantabili e a lungo termine. La degradazione di tale polimero si attua in due fasi, in maniera simile al PLA (scissione random di gruppi esteri e successiva perdita di peso tramite la diffusione di unità monomeriche dal volume), anche se ciò avviene con tempistiche di circa 2 anni, quindi superiori rispetto a quelle dei poli (α -idrossiacidi); per tale ragione sono stati sintetizzati copolimeri i quali, riducendo il grado di cristallizzazione del PCL, ne consentono l'aumento della velocità di degradazione. Altre possibili applicazioni sono nell'ambito dell'ingegneria tissutale, per la realizzazione di *scaffold* impiegati per la rigenerazione di ossa, legamenti, cartilagini, pelle, tessuto vascolare e nervoso.

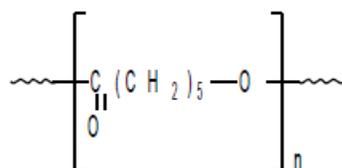


Figura 1.28 PCL

- **Acido polilattico-co-glicolico (PLGA):** si tratta di un copolimero statistico ottenuto mediante copolimerizzazione dei dimeri ciclici dell'acido glicolico e lattico con il proposito di modulare le proprietà dei due omopolimeri. Spesso identificato tramite il rapporto tra i monomeri usati, il PLGA, nelle sue diverse forme, tende ad essere amorfo più che cristallino, con una T_g compresa tra 40-60°C. Solubile in molti solventi comuni, differentemente dagli omopolimeri costituenti, il PLGA degrada a una velocità direttamente proporzionale al contenuto di acido glicolico. Utilizzato per la prima volta nel 1974 come materiale per suture, oggi trova varie applicazioni anche grazie alla modulabilità delle sue proprietà: ad esempio in forma di nanosfere, nanofibre, microsfele e microcapsule è impiegato per dispositivi a rilascio controllato di farmaci, farmaci chemioterapici, antibiotici, proteine, analgesici, antinfiammatori, molecole di RNA. Buoni risultati si sono ottenuti anche in ambito dell'ingegneria

tissutale in quanto il PLGA presenta buone proprietà di adesione e proliferazione cellulare: per questo motivo gli *scaffold* ottenuti da questo materiale mediante per esempio sinterizzazione, elettrospinning, stampaggio, o loro combinazioni, risultano particolarmente funzionali. I problemi legati all'impiego di tale polimero risultano però la difficoltà di modulazione della velocità di degradazione e l'elevata acidità dei prodotti risultanti da quest'ultima.

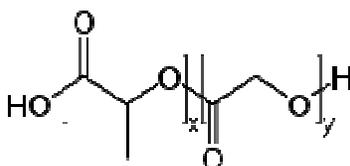


Figura 1.29 Unità monomerica del PLGA

1.2.4 COPOLIMERI

Tutti i copolimeri, molecole polimeriche contenenti due o più unità monomeriche differenti, così come i copoliesteri, sono composti connotati da proprietà chimico-fisiche altamente modulabili, le quali ne determinano una grande variabilità applicativa. L'introduzione del secondo monomero, la sua disposizione rispetto al primo, la sua concentrazione relativa nonché la sua influenza sul processo di sintesi e sulla struttura polimerica che ne deriva, sono infatti variabili condizionanti il meccanismo di reazione e l'assetto delle catene allo stato solido.

La descrizione dei processi di concatenamento e distribuzione intracatena delle unità monomeriche, resa possibile dalla presenza di modelli cinetici e statistici (teoria della copolimerizzazione) idonei alla definizione ed al calcolo di opportuni parametri, rende possibile la descrizione completa della struttura di un copolimero. A tal fine è necessario avere nozione di:

- Composizione, vale a dire la concentrazione relativa dei monomeri A e B, e distribuzione delle composizioni;
- Tipologie delle unità ripetitive create nella catena dai due monomeri, valutate rispetto alle caratteristiche intrinseche del monomero (disposizioni testa-coda, creazione di strutture isometriche nei monomeri polifunzionali o eventuali arrangiamenti);

- Ordine di incorporazione di A rispetto a B, il quale determina l'insorgere di sequenze di diversa lunghezza, e le modalità con cui queste ultime si distribuiscono;
- Pesi molecolari delle catene e loro distribuzione statistica, determinabili previa misura sperimentale delle costanti di velocità di accrescimento e terminazione;
- Presenza di processi non controllati che diano origine a ramificazioni, ciclizzazioni o reticolazioni indesiderate.

I copolimeri sono classificabili in quattro diverse tipologie, connotate da difficoltà di sintesi, caratterizzazione e rilievo industriale eterogenei:

- Copolimeri statistici o random, nei quali le unità monomeriche assumono collocazioni casuali nella catena principale;

ABAABABBBABBA

- Copolimeri alternati, in cui i monomeri sono regolarmente alternati nella catena;

ABABABABABABA

- Copolimeri a segmenti (o a blocchi), in cui è evidenziabile una distribuzione regolarmente alternata dei comonomeri;

AAAABBBBAABBA

- Copolimeri ad innesto, in cui un solo tipo di monomero costituisce la catena principale, dalla quale si dipartono ramificazioni formate dall'altra unità.

B
B
B
AAAAAAAAAAAAA
B
B
B

1.2.4.1 Copolimeri statistici

La descrizione della composizione di un copolimero statistico, ottenuto mediante meccanismi di poliaddizione radicalica, ionica o di coordinazione, nota la concentrazione iniziale dei monomeri nel mezzo di reazione, costituì una problematica centrale della teoria della copolimerizzazione. La composizione del prodotto è infatti funzione del tempo, poiché la variazione di reattività dei monomeri durante il processo di copolimerizzazione induce una permanente discordanza tra la composizione del mezzo di reazione e quella copolimero. Ne deriva che quest'ultima, in relazione ad una specifica miscela di alimentazione, ha carattere istantaneo ed è definibile come l'esito di conversioni infinitesime di monomeri.

Differentemente da quanto affermato per gli omopolimeri, la possibile presenza di molteplici fasi amorfe e cristalline determina l'individuazione di altrettanti processi, quindi temperature, di transizione vetrosa e fusione.

La transizione vetrosa, caratteristica della fase amorfa e variabile in maniera monotona con la composizione, si palesa ad una temperatura intermedia a quelle dei due omopolimeri, T_{gA} e T_{gB} . L'andamento di T_g in funzione della composizione polimerica può essere formulato analiticamente ricorrendo all'equazione di Fox:

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

in cui w_A e w_B rappresentano le frazioni in peso dei rispettivi monomeri, ovvero alla più recente equazione di Couchman, adottata anche nel caso di andamenti regolari di T_g :

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

in cui k denota il rapporto tra gli incrementi di calore specifico alla transizione vetrosa degli omopolimeri.

Le due equazioni, solidali nel delineare un andamento monotono crescente di T_g al variare della composizione, non sembrano validare regolarmente le evidenze sperimentali: alcuni copolimeri evidenziano infatti un massimo o un minimo di T_g a composizioni intermedie.

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

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

essendo T_{gAB} la T_g del copolimero ad unità A e B alternate, T_{gAA} e T_{gBB} le T_g degli omopolimeri w_{AA} , w_{AB} e w_{BB} le frazioni in peso delle rispettive diadi. Adottando tale formulazione, estesa in studi successivi anche alla considerazione di triadi, si è giunti ad un buon compromesso tra previsioni ed evidenze sperimentali.

Con riferimento alla capacità di cristallizzazione di un copolimero, è prevedibile che essa sia alterata dall'introduzione, nella catena omopolimerica (A), di un'unità strutturalmente e chimicamente differente (B). Il comportamento di cristallizzazione del copolimero si complica qualora entrambe le unità monomeriche possano cristallizzare.

In termini generali, le unità B possono: essere completamente escluse dal reticolo cristallino o entrarne a far parte sia in condizioni di equilibrio che in forma di difetto; nel primo caso entrambe le fasi cristalline risultano pure.

Per i copolimeri statistici, con riferimento alla teoria di Flory per la fusione all'equilibrio, la temperatura di fusione T_m è fornita da:

$$1 / T_m - 1 / T_m^\circ = - (R/\Delta H_u) * \ln X_A$$

dove T_m° è la temperatura di fusione di equilibrio dell'omopolimero cristallizzabile (A), ΔH_u è l'entalpia di fusione per unità ripetitiva di A nel cristallo perfetto e X_A è la frazione molare di A nel copolimero.

La precedente equazione prevede che la temperatura di fusione del copolimero a distribuzione statistica sia indipendente dalla natura del comonomero B, posto che esso sia effettivamente escluso dal reticolo cristallino. Inoltre, poichè la T_m° sperimentale si riferisce alla scomparsa di sequenze di A più brevi di quanto richiesto dalla teoria di fusione all'equilibrio dinamico, i copolimeri, seppure cristallizzati accuratamente, manifestano T_m° inferiori al valore teorico previsto e tale scarto è crescente in corrispondenza ad un aumentato contenuto di co-unità B. L'effetto della lunghezza delle sequenze cristallizzabili è contemplato dalla successiva equazione di Baur:

$$1/T_{m,co}^\circ = 1/T_m^\circ - (R/\Delta H_m^\circ) (\ln x_C - 2x_C (1 - x_C))$$

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

Qualora i copolimeri statistici mostrino co-cristallizzazione, vale a dire sostituzione isomorfa delle unità comonomeriche, essi, diversamente da quanto riportato in precedenza, assumono un elevato grado di cristallinità in tutto il campo di composizione. La sostituzione isomorfa, in relazione alla similarità della struttura cristallina dei due omopolimeri, porta a due distinti esiti:

- Il copolimero prodotto è connotato da una fase cristallina i cui parametri variano gradualmente con la composizione da quelli di un omopolimero a quelli dell'altro qualora questi ultimi presentino una struttura cristallina molto simile;
- In presenza di strutture cristalline differenti si parla di isodimorfismo ed esiste una composizione precisa in corrispondenza alla quale il copolimero passa da una struttura cristallina all'altra. I parametri del reticolo cristallino, per la presenza di unità estranee, sono alterati rispetto a quelli del corrispondente omopolimero.

In entrambi i casi l'andamento della T_m° si discosterà dal valore predetto per copolimeri a fase cristallina pura.

I modelli di esclusione di Baur e quello di inclusione del comonomero nella fase cristallina del componente cristallizzabile di Sanchez-Eby sono stati recentemente unificati da Wendling e Suter il cui modello, definita la concentrazione del comonomero B nel cristallo formato dalle unità A come

$$X_{CB}^{eq} = \frac{X_B e^{-\varepsilon/RT}}{1 - X_B + X_B e^{-\varepsilon/RT}}$$

può essere formulato come

$$\frac{1}{T_m^{\circ}} - \frac{1}{T_m(X_B)} = \frac{R}{\Delta H_m^{\circ}} \left[\ln(1 - X_B + X_B e^{-\varepsilon/RT}) - \left\langle \frac{\varepsilon}{S} \right\rangle^{-1} \right]$$

dove T_m° e ΔH_m° rappresentano la temperatura di fusione di equilibrio ed il calore di fusione dell'omopolimero cristallizzabile (A), X_B è la frazione molare di B nel copolimero, X_{CB} quella del comonomero B nel cocristallo, ε l'energia libera media di Gibbs di difetto e $\left\langle \frac{\varepsilon}{S} \right\rangle$ la lunghezza media delle sequenze cristallizzabili.

A partire da esso, per $X_{CB} = X_B$ si ricade nel modello di inclusione, mentre per $X_{CB} = 0$ ($\epsilon \rightarrow 0$) in quello di Baur.

1.2.4.2 Copolimeri a blocchi

Tra le numerose strutture copolimeriche progettate è possibile menzionare:

- Di-blocchi: A_m-B_n . I blocchi possono contenere gruppi terminali o gruppi di giunzione ed il secondo blocco può includere un terzo monomero C (A_m-B-C) con distribuzione casuale, alternata, ecc;
- Tri-blocchi: $A_m-B_n-A_m$, $A_m-B_n-A_q$, $A_m-B_n-C_q$, semplificazioni di copolimeri contenenti tre blocchi distribuiti come da rappresentazione;
- Multi-blocchi, copolimeri segmentati: $A_m-B_n-A_m-B_q$ - A_m-B_q ;
- Copolimeri a di-blocchi ripetuti: $(A_m-B_n)_x$;
- Copolimeri a blocchi sovrapposti, o overlapped, $A_m-(A_x, B_y)-B_n$;
- Copolimeri a stella, multibraccia collegate da un'unità di giunzione, considerabili come un caso particolare di copolimeri ad innesto.

I copolimeri a blocchi sono sintetizzabili mediante:

- Creazione di centri attivi (radicalici, anionici, cationici) su di una catena polimerica la quale può successivamente indurre la polimerizzazione di un secondo monomero;
- Condensazione tra gruppi funzionali terminali del polimero o prepolimero:



Ricorrendo all'uso di monomeri dienici, vinilici non polari, esteri, eteri o solfuri ciclici è possibile, seguendo la via delineata da M.Szwarc, sintetizzare copolimeri a sequenze ben definite e con pesi molecolari, struttura e composizione desiderate.

La produzione di copolimeri a blocchi con iniziatori anionici è conseguibile mediante:

- Successiva polimerizzazione di monomeri;
- Polimerizzazione del secondo monomero con un prepolimero funzionalizzato dal primo monomero;
- Adozione di reazioni di accoppiamento tra terminali reagenti e un composto reattivo che diviene sito di giunzione;

- Impiego di iniziatori bifunzionali.

Blocchi cristallizzabili e non cristallizzabili di sequenze A e B, costituenti i copolimeri, portano alla rispettiva formazione, in seguito a una segregazione/separazione di fase, di domini cristallini e microdomini amorfi. Il metodo di preparazione del campione, unitamente alle caratteristiche molecolari del copolimero a blocchi, determina la morfologia e quindi le transizioni termiche dei sistemi multifasici microsegregati così formati.

I copolimeri, in relazione alla natura cristallizzabile dei blocchi costituenti, sono pertanto distinguibili in:

- *Blocchi non cristallizzabili.* Nell'ipotesi teorica che la separazione di fase induca la formazione di microdomini nettamente distinti, ad ogni fase amorfa corrisponde una transizione vetrosa correlabile alla T_g del corrispondente omopolimero. La formazione di domini separati origina interazioni tra microfasi distinte, imputabili all'esigua estensione dei domini ed alla continuità della catena nell'interfaccia tra essi, responsabili di spostamenti e variazioni di intensità e ampiezza delle transizioni termiche caratteristiche. In presenza di volume interfacciale cospicuo e di una vera e propria interfase, alla T_g delle due microfasi si affianca una transizione vetrosa, collocata a temperatura intermedia tra esse, che può divenire la principale transizione termica.
- *Blocchi cristallizzabili.* I domini cristallini, generati dalla segregazione di fase, possono dar luogo a strutture organizzate con arrangiamento periodico o prive di organizzazione. Nell'eventualità in cui entrambi i blocchi siano cristallizzabili, il primo a cristallizzare genera le restrizioni steriche cui il secondo si adatta per il conseguimento della morfologia finale. In presenza di un solo blocco cristallizzabile (A), invece, se il componente amorfo (B) vetrifica prima della cristallizzazione di A, questa può risultare inibita. L'uso di solventi che solvatino selettivamente uno dei due blocchi condiziona la morfologia del copolimero finale. Poliuretani e poliesteri "segmentati" sono esempi di copolimeri a multi-blocchi che danno origine a microdomini cristallini dispersi in una fase amorfa, articolata in segmenti flessibili e in una frazione di componente rigido incapace di cristallizzare.

CAPITOLO 2:

SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni gli studi di farmacologia molecolare hanno portato alla scoperta di un gran numero di nuovi agenti terapeutici, il cui impiego clinico è tuttavia spesso condizionato da un'emivita plasmatica breve, da assenza di specificità recettoriale, da tossicità acuta ed effetti collaterali. Uno dei maggiori inconvenienti nella somministrazione convenzionale di farmaci è legato alla distribuzione del farmaco in tutto il corpo del paziente, che si realizza in maniera più o meno indiscriminata ed incontrollata attraverso il circolo sanguigno. La quantità desiderata di farmaco non è quindi in grado di raggiungere i siti recettoriali specifici localizzati sulle cellule bersaglio, in quanto penalizzata dalla perdita in compartimenti che nulla o poco hanno a che fare con l'effetto terapeutico del farmaco. Ciò può indurre all'utilizzazione di dosi maggiori, con rischio di tossicità. Soprattutto per farmaci a breve emivita, per poter mantenere un adeguato livello terapeutico nell'organo prescelto, si richiede l'impiego di trattamenti ripetuti; ma in questo caso la concentrazione plasmatica del farmaco segue un tipico andamento pulsato, con indesiderate punte di massimo che possono superare i limiti di tossicità, e gole di minimo che possono scendere al di sotto del livello ottimale. In conseguenza degli svantaggi posseduti da una forma di dosaggio convenzionale, i sistemi a rilascio controllato hanno assunto durante gli anni un ruolo sempre più importante nella somministrazione di farmaci. Durante quest'ultima decade l'interesse è stato rivolto prevalentemente alla formulazione di sistemi di rilascio con caratteristiche di bioerosione e/o biodegradazione, aventi l'indubbio vantaggio, rispetto alle formulazioni basate su polimeri non biodegradabili, di ovviare al fastidioso inconveniente della rimozione del sistema di rilascio alla fine del processo di cessione. Tra i principali materiali bioerodibili e/o biodegradabili utilizzati nella preparazione di sistemi di rilascio a microsfele, si ritrovano l'acido poliglicolico, l'acido polilattico ed i loro copolimeri, unici approvati dalla *Food and Drug Administration* per la realizzazione di dispositivi biomedicali.

In tale contesto si inserisce il presente lavoro di Tesi, avente come obiettivo la sintesi e caratterizzazione di nuovi materiali per la realizzazione di microsfere per il rilascio controllato di farmaci per la cura di patologie del pancreas.

Una valida alternativa a PLA e PGA può essere rappresentata dal polibutilencicloesandicarbossilato (PBCE), la cui struttura contiene un anello alifatico che conferisce al materiale buona stabilità termica, un alto punto di fusione e buone proprietà meccaniche; per contro, il materiale presenta per l'applicazione prevista una rigidità eccessiva ed è caratterizzato da tempi di degradazione troppo lunghi. Come noto, le proprietà non soddisfacenti di un polimero possono essere migliorate, senza alterare sensibilmente quella già buone e senza incrementi significativi nei costi, per copolimerizzazione. Tale strategia permette inoltre di modulare le proprietà finali del materiale agendo sul tipo, quantità e distribuzione delle unità comonomeriche lungo la catena. Per ridurre sia i tempi di degradazione che la rigidità del PBCE, si è proceduto all'inserimento nella sua catena polimerica di legami eteri, i quali ci si aspetta contribuiscano ad abbassare la cristallinità del polimero, aumentandone al contempo l'idrofilicità. Avendo previsto l'utilizzo di questi nuovi materiali in ambito biomedicale, è stato inoltre necessario verificarne la biocompatibilità ed effettuare prove di rilascio di una molecola modello.

La ricerca si è articolata nelle seguenti fasi:

- preliminare analisi bibliografica per conoscere gli sviluppi più recenti sull'argomento trattato;
- sintesi di copolimeri statistici $P(BCE_xBDG_y)$ a diversa composizione e dell'omopolimero PBCE per necessità di confronto, mediante policondensazione in massa allo stato fuso;
- stampaggio di film sottili mediante pressofusione;
- caratterizzazione molecolare dei campioni sintetizzati per mezzo di risonanza magnetica nucleare (NMR) per la verifica della struttura chimica e di cromatografia a permeazione su gel (GPC) per la stima del peso molecolare;
- caratterizzazione termica mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC) per studiare le transizioni termiche e analisi termogravimetrica (TGA) per verificare il campo di stabilità dei polimeri;

- analisi diffrattometrica a raggi X per ottenere informazioni sulla fase cristallina;
- caratterizzazione meccanica attraverso prove di trazione;
- misure di angolo di contatto per conoscere la bagnabilità dei campioni;
- studi di biodegradabilità idrolitica ed enzimatica (con una lipasi proveniente da “hog” pancreas) in tampone fosfato dei film, per studiarne i tempi di degradazione;
- caratterizzazione dei film parzialmente degradati;
- studi di rilascio di una molecola modello;
- prove di biocompatibilità;
- analisi dei risultati ottenuti ed estrapolazione di correlazioni proprietà-struttura.

CAPITOLO 3:

MATERIALI E METODI

3.1 SINTESI

Il presente lavoro di tesi è stato svolto presso i laboratori del Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale e dei Materiali dell'Università di Bologna.

Gli omopolimeri di riferimento ed i copolimeri sono stati sintetizzati tramite policondensazione in massa a due stadi. Durante il primo stadio, condotto alla temperatura di 190 C° sotto flusso controllato di azoto, hanno luogo le reazioni di esterificazione diretta, con eliminazione di specie a basso peso molecolare, nel caso in esame acqua, al fine di spostare l'equilibrio della reazione verso i prodotti. Nel secondo stadio, che inizia quando almeno il 90% dell'acqua teorica si è raccolta tramite distillazione nella trappola, avvengono le reazioni di transesterificazione, con la formazione di catene polimeriche ad elevato peso molecolare. Durante questo stadio, la temperatura viene alzata a 250 °C, per poi rimanere costante fino al termine della reazione. Per favorire la distillazione del glicole in eccesso viene applicato il vuoto fino ad un massimo di 0,5 mbar.

La strumentazione per la sintesi si compone di un reattore in vetro a tre colli che viene immerso in un bagno contenente una miscela di sali inorganici che garantiscono una temperatura uniforme e costante lungo tutto il corso della reazione, un agitatore meccanico con misuratore di *torque* e una pompa da vuoto (Figura 3.1).

Il sistema che garantisce l'agitazione dei reagenti è formato da un albero motore su cui sono attaccati degli estensimetri che misurano il momento torcente necessario a mantenere costante la rotazione delle pale: esse incontrano maggiore resistenza al procedere della polimerizzazione, a causa dell'aumento della viscosità del fluido dovuta all'incremento di peso molecolare del polimero.

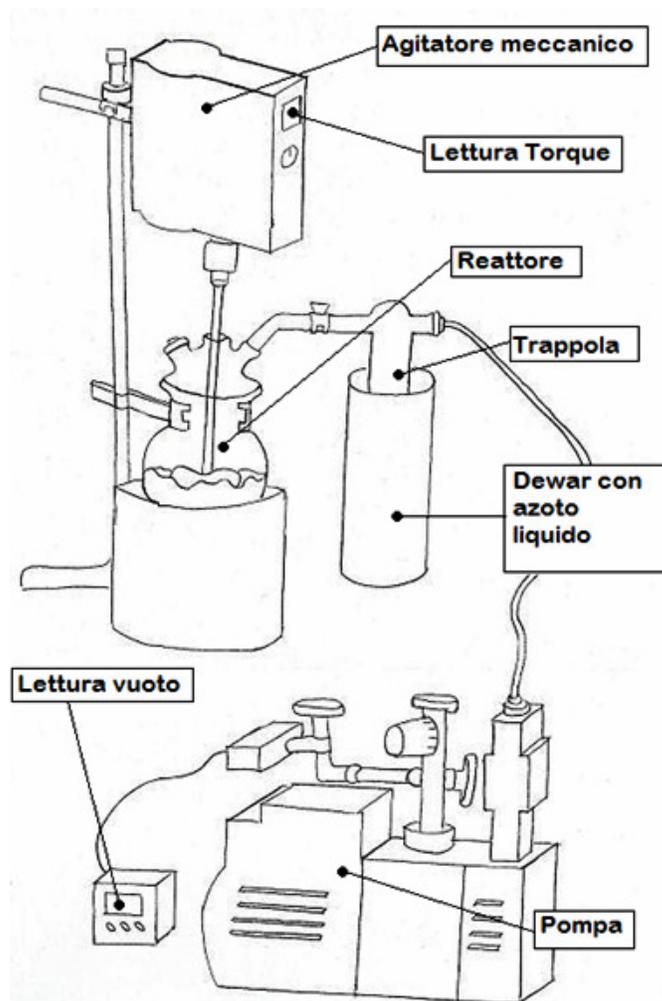
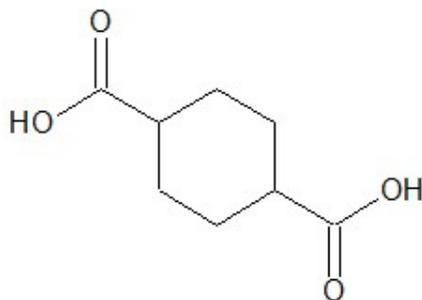


Figura 3.1. Schema dell'apparecchiatura per la polimerizzazione

In tutte le reazioni effettuate è stato impiegato un eccesso di diolo del 20%. Tale modo di procedere risponde alla necessità di avere al termine della prima fase oligomeri contenenti gruppi funzionali preferenzialmente di tipo -OH, che reagiscono facilmente nel secondo stadio. Il catalizzatore utilizzato è titanio tetrabutossido (TBOT) in quantità pari a 150 ppm di titanio. Per ogni reazione sono stati ottenuti circa 100 g di prodotto.

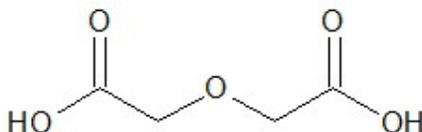
Le strutture chimiche dei reagenti utilizzati sono riportate di seguito:



acido 1,4-trans-cicloesandicarbossilico $C_6H_{10}(CO_2H)_2$



1,4 butandiolo $HOCH_2CH_2CH_2CH_2OH$



acido diglicolico $O(CH_2COOH)_2$

La preparazione dei campioni sotto forma di film sottili è effettuata tramite pressofusione, utilizzando una pressa con piastre in alluminio raffreddate ad acqua (Carver Laboratory Press). Il polimero è inserito tra due strati di teflon con in mezzo una maschera di alluminio teflonato per garantire uno spessore uniforme dei film (circa 0,2 mm).

La temperatura impostata per ciascuna prova è superiore di 40 °C alla T_m del polimero utilizzato. Una volta fuso, il materiale subisce l'effetto della pressione applicata (circa 1,5 MPa) per 2 minuti; successivamente le piastre, mantenute in

pressione, vengono raffreddate con acqua a 10 °C per circa 20 minuti, in modo da garantire una veloce solidificazione del campione nella nuova forma.

3.2 CARATTERIZZAZIONE

3.2.1 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

3.2.1.1 Risonanza magnetica nucleare (NMR)

La risonanza magnetica nucleare è una tecnica utilizzata per determinare la struttura chimica dei materiali. Viene sfruttato il principio secondo cui i nuclei di alcuni elementi, se sottoposti ad un campo magnetico esterno intenso e stazionario, si orientano nella stessa direzione di tale campo.

Questo fenomeno è osservabile solo se l'atomo possiede spin non intero: in tal caso i nuclei, ruotando, danno origine ad un campo magnetico elementare μ che li rende simili a piccoli magneti (essendo i nuclei composti da cariche elettriche, sono assimilabili a delle spire percorse da corrente). Gli atomi usati tipicamente sono ^1H e ^{13}C (spin 1/2).

Quando un nucleo dotato di spin viene immerso in un campo magnetico, esso, come l'ago di una bussola, è sottoposto ad una coppia di forze che lo fanno ruotare al fine di allinearlo col campo esterno. Per un nucleo con spin 1/2, sono due gli orientamenti permessi: uno parallelo al campo (bassa energia) e uno antiparallelo (alta energia) (Figura 3.2).

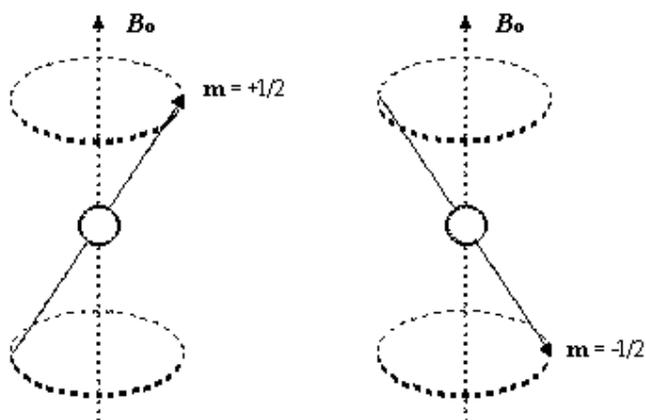


Figura 3.2 Possibili orientamenti dei nuclei in presenza di campo magnetico

Il passaggio di un nucleo da una possibile orientazione all'altra è possibile tramite l'assorbimento (o l'emissione) di una quantità di energia pari a

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

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

Il segnale NMR di un certo nucleo risulta spostato nello spettro a frequenze più alte o più basse a seconda del suo intorno chimico; ciò accade perché gli elettroni sono particelle cariche e, in quanto tali, se immersi in un campo magnetico B_0 si muovono generando, in opposizione ad esso, un piccolo campo magnetico opposto e secondario (Figura 3.3). Questo schermo il nucleo dalla piena forza del campo applicato e tanto più grande è la densità elettronica, tanto maggiore sarà la schermatura, in modo che i nuclei che si trovano in un intorno ricco di elettroni sentiranno un campo magnetico più basso, e quindi subiranno la transizione ad una frequenza applicata più bassa, rispetto ai nuclei situati in intorni poveri di elettroni.

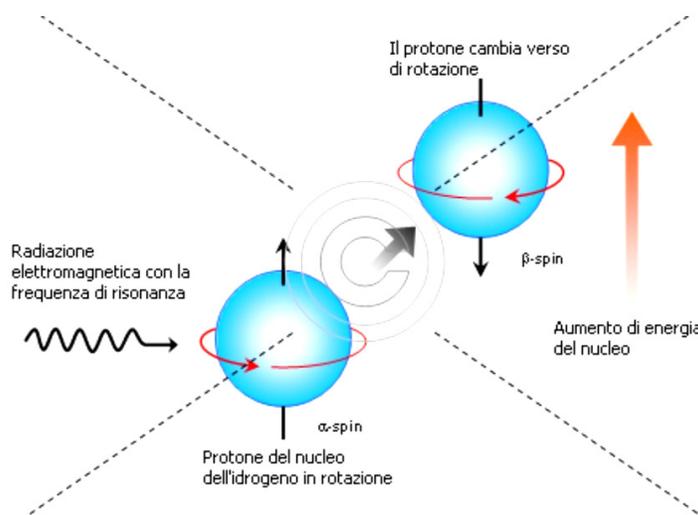


Figura 3.3 Principio di funzionamento della NMR

Lo spostamento risultante nel segnale NMR per un dato nucleo è detto spostamento chimico; in generale, protoni o carboni adiacenti ad atomi elettronegativi risultano deschermati e di conseguenza avvertono un campo magnetico applicato più intenso, subiscono transizione a frequenze maggiori e, nello spettro, si trovano ad uno spostamento chimico più alto. Lo spostamento chimico assoluto risulta tanto maggiore quanto più grande è il campo applicato, quindi strumenti diversi fornirebbero spostamenti chimici assoluti diversi in rapporto all'intensità del loro campo magnetico. Per questo si preferisce utilizzare lo spostamento chimico relativo δ definito dall'equazione:

$$\delta(ppm) = \frac{\nu_r - \nu}{\nu_r} * 10^6$$

Tipicamente per il nucleo dell'atomo ^1H e per gran parte delle molecole organiche δ è compreso nell'intervallo tra 0 e 10 ppm.

L'analisi sul nucleo ^{13}C è possibile, ma vista la bassa quantità di tale isotopo presente in natura (il 99,89% è ^{12}C) solo pochi atomi di carbonio si orienterebbero, riducendo il rapporto segnale rumore.

In uno spettro ^1H -NMR, ad atomi di idrogeno con intorni chimici (reticoli) diversi corrispondono picchi diversi; considerando l'area sottesa da ogni picco, valutandola in termini relativi (in termini assoluti perde di valore dato che varia a seconda della concentrazione della soluzione) risulta possibile determinare il rapporto tra i vari tipi di atomi di idrogeno presenti. L'area di un picco è infatti

indipendente dalla struttura a cui è legato l'atomo di idrogeno in quanto legato unicamente alla frequenza con cui tale atomo è ripetuto all'interno della molecola. Dividendo poi l'area di ogni picco per il numero di idrogeni a cui corrisponde, si ottengono valori perfettamente confrontabili con quelli dati dalla formula chimica del polimero analizzato.

Gli spettri sono stati ottenuti usando uno spettrometro NMR Varian XL-400. Le soluzioni sono state preparate sciogliendo circa 10 mg di polimero in cloroformio deuterato (0.03%); come standard interno è stato utilizzato il tetrametilsilano. Gli spettri della spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ sono stati acquisiti a temperatura ambiente con concentrazione dei polimeri pari al 0.5 wt% (con tempo di rilassamento pari a 0 secondi, tempo di acquisizione di 1 secondo per 100 ripetizioni).

Gli spettri $^{13}\text{C-NMR}$ sono stati ottenuti utilizzando una concentrazione dei polimeri pari al 10 wt% (con tempo di rilassamento pari a 1 secondo, tempo di acquisizione di 1 secondo per 700 ripetizioni).

3.2.1.2 Cromatografia a permeazione su gel (GPC)

La cromatografia di permeazione su gel (GPC) è una tecnica di separazione fisica che consente di determinare la distribuzione di peso molecolare in un polimero. Il metodo di analisi dei campioni si basa sulla creazione di curve di taratura attraverso standard di polimeri a peso noto e ad una successiva analisi per il confronto.

Lo strumento è costituito da una pompa volumetrica, una colonna riempita di particelle porose (polistirene reticolato con divinilbenzene) ed un rivelatore, come illustrato in Figura 3.4.

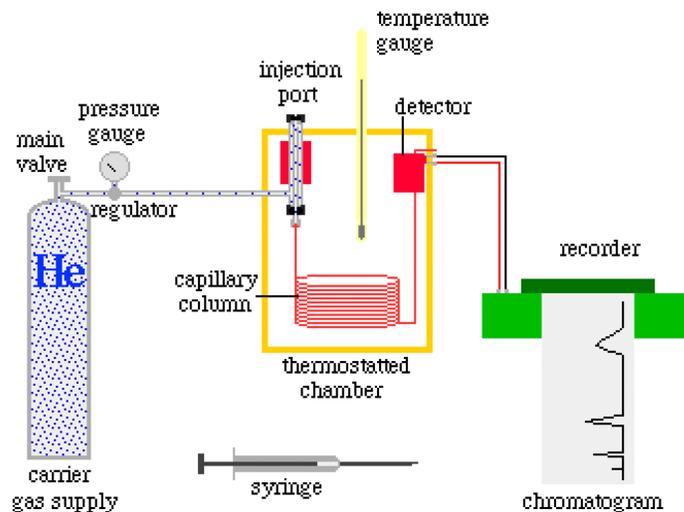


Figura 3.4 Schematizzazione del cromatografo

La separazione dei diversi pesi molecolari è dovuta al fatto che le molecole più grandi non penetrano nei pori, limitandosi ad aggirare i corpi di riempimento, le molecole più piccole invece riescono ad entrare nei suddetti pori, dove il liquido scorre più lentamente; di conseguenza le molecole ad alto peso molecolare usciranno in tempi brevi, quelle a basso peso molecolare impiegheranno invece più tempo.

Durante la scansione in colonna viene fatto circolare un solvente con portata volumetrica costante. I campioni da analizzare vengono sciolti nello stesso solvente circolante in colonna, filtrati (attraverso l'utilizzo di un'apposita siringa al fine di eliminare eventuali particelle non solubili che potrebbero ostruire i pori) e quindi iniettati (Figura 3.5).

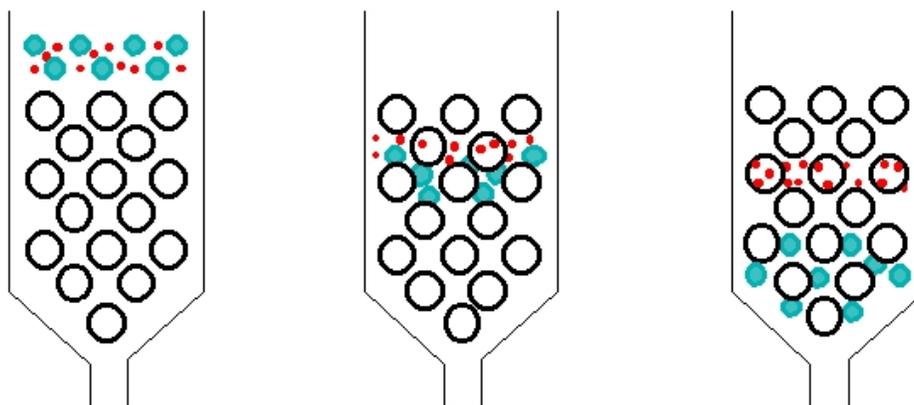


Figura 3.5 Schematizzazione della separazione molecolare

La soluzione che esce dalla colonna viene analizzata da un sensore che fornisce, istante per istante, un segnale la cui intensità è proporzionale alla concentrazione del soluto. Il risultato dell'analisi è un grafico che riporta l'andamento dell'intensità del segnale in funzione del tempo; per convertire i tempi in pesi molecolari è necessario fare riferimento alle curve di taratura, ottenute analizzando campioni standard di peso molecolare noto.

Le misure di GPC sono state ottenute a 30 °C con un cromatografo HP Series 1100 HPLC per mezzo di una colonna PL gel 5 μ Mini MIX-C (rapporto lunghezza/diametro in mm interno 250/4.6). I cromatogrammi sono stati registrati con HP Chemstation versione A.05.04 ed elaborati con GPC Calculator 7.6 software sviluppato dalla General Electric Company. Come eluente è stato usato cloroformio (flusso in colonna 0.3 mL/min). Le soluzioni utilizzate erano tutte caratterizzate da una concentrazione di polimero pari a 2 mg/ml. Per costruire la curva di taratura sono stati impiegati vari standard di polistirene con peso molecolare variabile tra 2000 e 100000, usando una curva del terzo ordine.

3.2.2. CARATTERIZZAZIONE TERMICA

3.2.2.1. Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

La calorimetria differenziale a scansione è una tecnica usata per studiare le transizioni termiche dei materiali e determinarne le proprietà termodinamiche, in particolare temperatura di transizione vetrosa, punto di fusione e calore di fusione. Il principio di base di questa tecnica consiste nel ricavare informazioni sul materiale riscaldandolo o raffreddandolo in maniera controllata; in particolare il DSC si basa sulla misura della differenza di flusso termico tra il campione in esame e uno di riferimento, mentre i due sono vincolati ad una temperatura variabile definita da un programma prestabilito.

Le misure sono state condotte con un DSC7 Perkin-Elmer fornito di accessori per il raffreddamento al di sotto di 0 °C e calibrato con standard ad elevata purezza, quali indio e cicloesano. La strumentazione, schematizzata in figura 3.6, consiste di due piatti dedicati all'alloggiamento di altrettante capsule, contenenti una il campione, in quantità di 10 mg, una il riferimento, nel nostro caso una capsula vuota. Le celle calorimetriche che contengono le capsule costituiscono

microcalorimetri, mantenuti in atmosfera di azoto inerte durante le misure. Le due celle sono sottoposte allo stesso programma termico: in assenza di transizioni di fase campione e riferimento sono alla stessa temperatura; al contrario, in caso di variazioni di fase, si crea uno squilibrio termico, che viene letto da termoresistenze. Queste consentono di controllare la potenza elettrica fornita ai microcalorimetri: tale flusso di energia è predisposto al fine di annullare la differenza di temperatura tra campione e riferimento. Il computer interfacciato allo strumento consente sia di impostare il programma, sia di rilevare ed elaborare i dati.

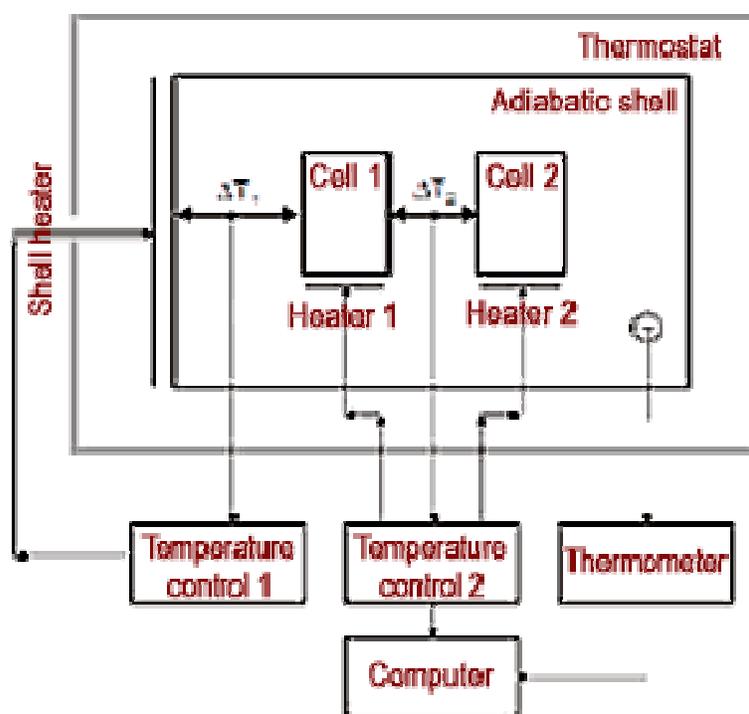


Figura 3.6 Schematizzazione apparecchiatura DSC

La temperatura di transizione vetrosa (T_g) è un parametro, caratteristico dei solidi polimerici, rappresentante la soglia termica alla quale si verifica il passaggio dallo stato rigido-vetroso ad uno liquido viscoso/gommoso. Per un polimero amorfo il passaggio da stato vetroso a gommoso non avviene in modo netto, bensì si manifesta come una variazione endoterma della linea di base; il valore di T_g è determinato in corrispondenza della metà della variazione di calore specifico associata alla transizione (Figura 3.7).

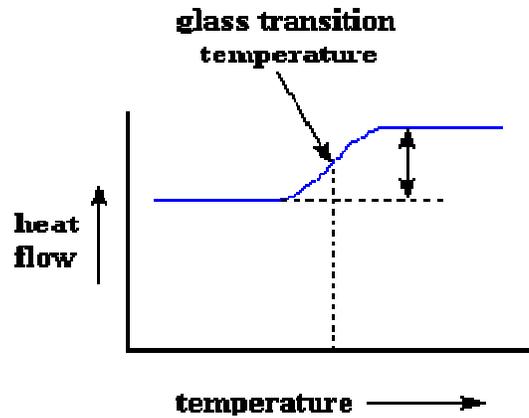


Figura 3.7 Calcolo della T_g

L'entità della variazione di calore specifico associato alla transizione vetrosa, proporzionale alla componente amorfa del materiale, è pari alla distanza verticale tra le linee di base estrapolate alla T_g :

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

La temperatura di fusione (T_m) è la temperatura a cui avviene il passaggio da solido a liquido; nel tracciato DSC si presenta come un picco endotermico.

Il valore della T_m si riferisce all'ascissa del picco, mentre l'area sottesa da esso corrisponde al calore di fusione ΔH_m [J/g], il quale è proporzionale alla cristallinità del polimero; il rapporto tra quest'ultima grandezza ed il calore di fusione del polimero completamente cristallino costituisce il grado di cristallinità (Figura 3.8).

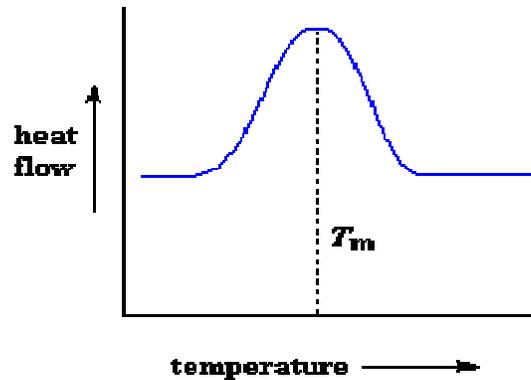


Figura 3.8 Calcolo della T_m

La procedura generale delle scansioni è stata la seguente:

- 1° scansione: riscaldamento ad una velocità di 20 °C/min da -65 °C a T_m+40 °C, isoterma di 3 minuti, raffreddamento rapido (100 °C/min) fino a -65 °C;
- 2° scansione: riscaldamento in analoghe condizioni di temperatura e velocità in seguito al raffreddamento veloce della fase precedente
- 3° scansione: analogo riscaldamento, seguito da un'isoterma della durata di 3 minuti, e da raffreddamento, a 5 °C/min, fino ad una temperatura di -10 °C.

3.2.2.2 Termogravimetria (TGA)

L'analisi termogravimetrica di un campione permette di ottenere informazioni sia sulla cinetica del processo di decomposizione che sulla stabilità termica del materiale. Tali informazioni sono di fondamentale importanza per definire il valore di temperatura che non deve essere oltrepassato nel trattamento del polimero, per non incorrere nella sua degradazione. La tecnica consiste nella determinazione delle variazioni di peso del campione quando è sottoposto ad un graduale aumento di temperatura, in atmosfera controllata (N_2 , O_2 , aria); i cambiamenti di peso sono dovuti a perdite di sostanze volatili in seguito a processi fisici o chimici che modificano la natura del composto: nel caso dei polimeri i prodotti di decomposizione saranno CO_2 e acqua. La curva

termogravimetrica per un polimero ha l'andamento tipico illustrato in Figura 3.9. Nella presente tesi verranno considerate la temperatura a cui corrisponde la perdita di peso pari al 5% ($T_{5\%loss}$) e la temperatura corrispondente alla massima velocità di perdita di peso (T_{max}).

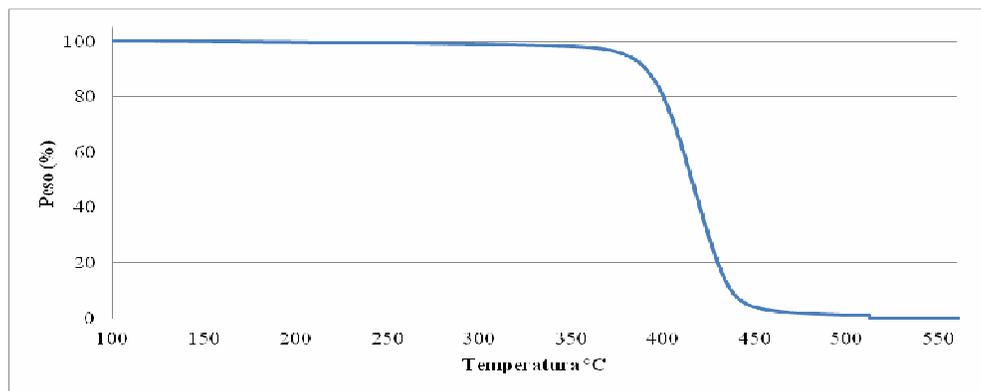


Figura 3.9 Curva termogravimetrica

Le prove sono state condotte in atmosfera di azoto su campioni di 5 mg, riscaldati alla velocità di 10 °C/min nell'intervallo di temperature 60-850 °C, utilizzando la bilancia termogravimetrica PerkinElmer TGA 4000.

3.2.3 ANALISI DELLA FASE CRISTALLINA

3.2.3.1 Diffrazione a Raggi X

La diffrazione a raggi X è la principale tecnica utilizzata per determinare la struttura ed il grado di cristallinità dei materiali. La cristallografia permette infatti la determinazione della distanza di legame, tipo di legame (semplice o multiplo), studi di transizione di fase, polimorfismo e possibili arrangiamenti spaziali.

Il principio di funzionamento di tale tecnica si basa sulla legge di Bragg (figura 3.10):

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

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

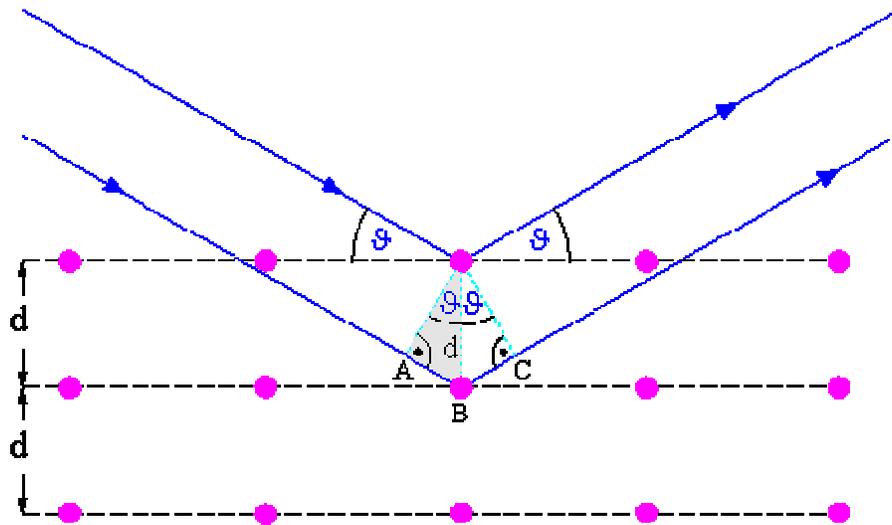


Figura 3.10 Legge di Bragg

I pattern di diffrazione a raggi X dei film polimerici sono stati effettuati utilizzando un diffrattometro PANalytical X'PertPro equipaggiato con un detettore allo stato solido X'Celerator che utilizza la lunghezza d'onda del rame ($\lambda = 0.15418 \text{ nm}$). I dati sono stati acquisiti nell'intervallo 2θ da 5 a 60° con passo 0.10° . Gli indici di cristallinità χ_c sono stati calcolati in base ai profili XRD dal rapporto tra l'area di diffrazione cristallina (A_C) e l'area totale del profilo di diffrazione (A_T), $\chi_c = A_C / A_T$. L'area di diffrazione cristallina è stata ottenuta sottraendo all'area totale la parte amorfa, modellata come picco a campana sulla linea di base; lo scattering non coerente è stato preso in considerazione.

3.2.4 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA

3.2.4.1 Misure stress-strain

Le misure di resistenza meccanica vengono utilizzate per studiare il comportamento dei materiali polimerici in presenza di sollecitazioni di diverso tipo.

Nelle prove tensili si definisce *stress* (tensione) il rapporto tra lo sforzo normale e l'area della sezione del provino a riposo:

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

lo *strain* (deformazione) viene invece definito come l'allungamento del provino, rapportato alla lunghezza iniziale:

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

Durante la prova si misura il valore dell'allungamento in funzione del carico applicato. I risultati vengono trasportati su un diagramma che presenta in ascissa ε e in ordinata σ , ottenendo la curva sforzo-deformazione, caratteristica del materiale. Un andamento tipico è mostrato nella Figura 3.11.

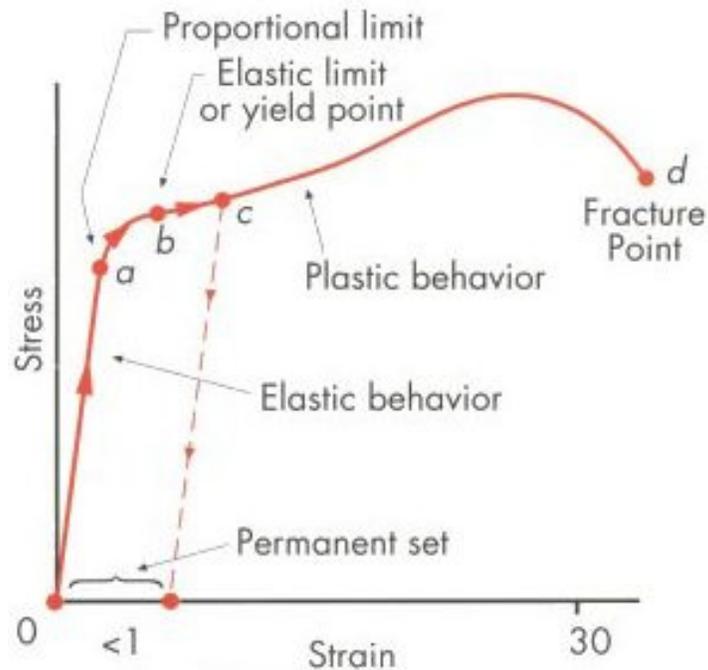


Figura 3.11 Curva sforzo/deformazione

La prima parte di questa curva è sempre lineare: il materiale segue dunque, fino ad un certo carico, la legge di Hooke

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

in cui la costante di proporzionalità E è il modulo elastico di Young, il quale corrisponde alla pendenza del tratto iniziale rettilineo della curva sforzo-deformazione.

All'aumentare della deformazione si arriva ad un punto, detto di snervamento, in cui la deformazione permane anche una volta rimosso il carico; tale comportamento è dovuto allo scorrimento dei piani reticolari: il materiale ha subito una deformazione permanente e si è entrati così nel campo plastico.

Dall'area sottesa alla curva è possibile inoltre valutare la tenacità, che è una misura dell'energia necessaria per rompere il materiale.

E' necessario ricordare che i dati ottenuti risentono, oltre che del materiale utilizzato nel test, anche delle condizioni ambientali, quali temperatura e umidità, e delle condizioni sperimentali, come velocità di scorrimento, forma e dimensioni dei provini.

Le prove meccaniche sono state condotte utilizzando un dinamometro Instron 4465 con cella di carico 100 N. Lo strumento è costituito principalmente da una struttura rigida di base e una traversa mobile posta nella parte superiore. I polimeri, sotto forma di striscioline dalle dimensioni di 5 x 40 mm, vengono fissati tramite agganci, l'applicazione del carico è effettuata tramite il movimento verso l'alto della struttura superiore; la forza impressa è misurata dalla cella di carico, mentre l'allungamento viene determinato in base alla distanza percorsa dalla traversa mobile. Le prove sono state condotte a temperatura ambiente con velocità pari a 5 mm/min e per ogni campione sono state effettuate misure su 5 provini diversi. Il modulo elastico, calcolato dalla pendenza del tratto iniziale della curva sforzo-deformazione ottenuta, è stato riportato come valore medio delle 6 prove.

3.2.5 MISURA DELL'ANGOLO DI CONTATTO

Le misure di angolo di contatto sono generalmente utilizzate per determinare la bagnabilità di una superficie, dove per angolo di contatto si intende una grandezza termodinamica descritta dall'angolo formato dall'incontro di un solido con la tangente formata dal profilo della goccia del liquido nel punto di contatto (Figura 3.12).

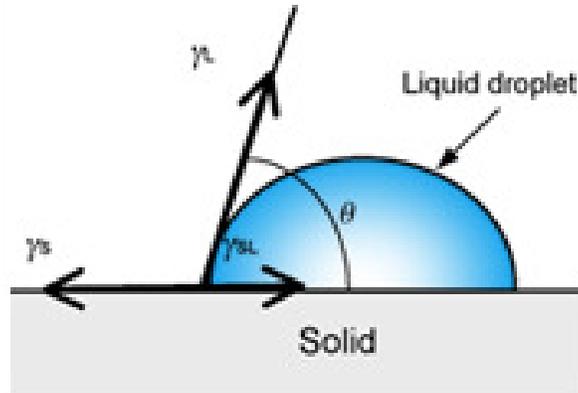


Figura 3.12 Angolo di contatto

L'angolo di contatto, tenendo conto di queste ipotesi, corrisponde alla grandezza termodinamica che minimizza l'energia libera superficiale del sistema, ed è fisicamente descritto dalla legge di Young, la quale corrisponde al bilancio delle forze orizzontali agenti su una goccia di volume trascurabile deposta su una superficie ideale:

$$\gamma_s = \gamma_L \cos\theta + \gamma_{SL}$$

Per convenzione si definiscono idrofobiche le superfici aventi un angolo di contatto con l'acqua maggiore di 90 gradi, idrofiliche le superfici con angoli minori di 90 gradi.

Le misure dell'angolo di contatto sono state effettuate mediante lo strumento Krüss DSA30S – Drop Shape Analysis, il quale è formato da un banco ottico costituito da una sorgente di luce ad intensità regolabile, una telecamera digitale dotata di zoom ottico con funzione di rivelatore, e da un piatto portacampione mobile interposto tra le due; sopra al portacampione è installato un sistema dosatore del liquido comandato elettronicamente. La telecamera è interfacciata con un software in grado di acquisire ed analizzare l'immagine.

Il software gestisce algoritmi che, tramite il calcolo ad approssimazioni successive, è in grado di ottenere il profilo della goccia che meglio si adatta al contorno reale ottenuto dall'immagine. Per ogni campione sono state depositate 5 gocce di 4 μL ciascuna, ad una velocità di 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, in punti del provino sempre diversi al fine di evitare il contatto con superfici già bagnate. I dati di angolo di contatto per ogni provino sono espressi come valori medi \pm deviazione standard. Le prove sono state condotte alla temperatura di 25 °C in condizioni di umidità relativa pari al 38%.

3.2.6 STUDI DI DEGRADAZIONE

Sia le prove di degradazione enzimatica che quelle idrolitiche permettono di testare il comportamento del polimero in ambienti che simulano l'ambiente corporeo. Queste prove sono state effettuate per verificare la velocità di degradazione in un ambiente simile a quello biologico. Gli esperimenti di degradazione idrolitica sono stati condotti, in condizioni di temperatura e pH fisiologici, su film 10x35mm di circa 25 mg dei diversi copolimeri. I campioni sono stati inizialmente essiccati e pesati, successivamente sono stati inseriti in provette contenenti circa 7 ml di soluzione acquosa tamponata a pH 7.4 con tampone fosfato e sono stati mantenuti ad una temperatura costante di 37 °C per periodi di tempo variabili all'interno di un bagno termostatico con scuotitore (50giri/minuto) (Julabo SW22). La soluzione tampone, cambiata periodicamente per mantenere costante il pH, è stata preparata seguendo la procedura di seguito riportata: in 800ml di acqua distillata, vengono disciolti 8g di NaCl, 0.2g di KCl, 1.44g di Na₂HPO₄ e 0.24g di KH₂PO₄; il pH della soluzione è aggiustato al valore di 7.4 per aggiunta di HCl e il volume finale portato ad 1 litro. Da ultimo la soluzione è sterilizzata in autoclave per evitare la crescita di microorganismi al suo interno.

Per quanto concerne gli studi di degradazione enzimatica, si è operato nelle medesime condizioni (T= 37°C, pH=7.4), in presenza di pancreaticolipasi proveniente da hog pancreas (conservato a -27°C di temperatura al fine di non comprometterne l'efficacia). Tale pancreaticolipasi è infatti caratterizzata da un comportamento molto simile agli enzimi presenti nel pancreas. L'enzima è stato aggiunto alla soluzione tampone in concentrazione pari a 50U/ml. Anche in questo caso la soluzione tampone contenente l'enzima è stata cambiata con frequenza settimanale. Si è infatti verificato dopo tale lasso di tempo l'enzima perde oltre il 30% della sua attività.

Periodicamente i campioni sono stati rimossi dalla soluzione, lavati con acqua distillata ed essiccati sotto vuoto a temperatura ambiente fino a raggiungere un peso costante. I campioni, prelevati in triplicato a diversi tempi di degradazione, sono stati pesati per misurare la perdita di peso. Analisi mediante Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC) sono state condotte per alcuni tempi di degradazione selezionati in modo da essere distribuiti in modo omogeneo lungo tutta la durata dell'esperimento.

3.2.7 ANALISI MORFOLOGICA DEI FILM

Le superfici dei film parzialmente degradati dall'enzima sono state analizzate mediante microscopia elettronica a scansione (SEM). La peculiarità dei microscopi elettronici rispetto a quelli ottici è l'utilizzo di radiazioni provenienti non da fotoni luminosi, bensì da elettroni, i quali sono caratterizzati da una lunghezza d'onda minore; in questo modo si possono ottenere immagini con risoluzione molto più alta (perfino di alcuni ordini di grandezza), e dettagli dalle dimensioni anche inferiori al nanometro.

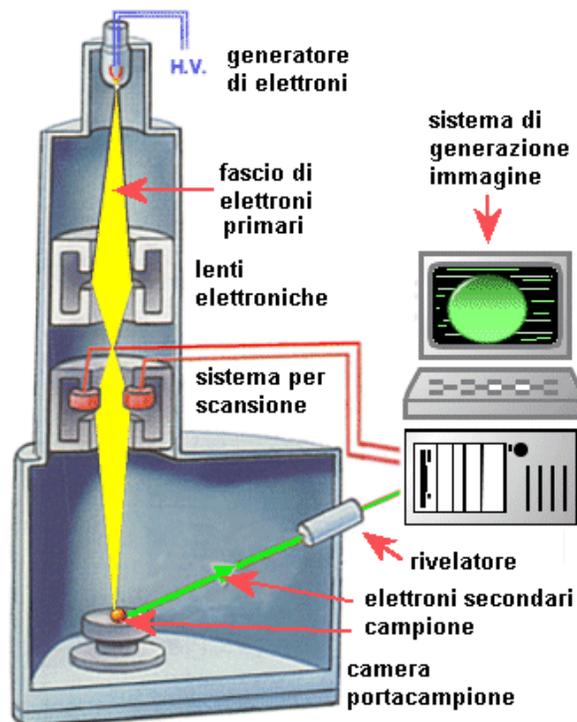


Figura 3.13 Struttura del SEM

Il fascio di elettroni, emesso da una sorgente mobile, viene fatto collimare da alcuni sistemi di lenti verso il campione in questione; questo, una volta irradiato, emette varie particelle, tra cui elettroni secondari, i quali verranno rilevati da un detector e convertiti in impulsi elettrici. Dalla natura e dalla frequenza di tali impulsi si può risalire ad immagini attraverso cui è possibile dedurre informazioni topologiche e morfologiche relative al campione esaminato.

3.2.8 STUDIO DI RILASCIO DI UNA MOLECOLA MODELLO

Per potere valutare il potenziale utilizzo di questi nuovi materiale per la realizzazione di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci, si è studiato il profilo di rilascio di una molecola modello dall'interno dei film polimerici. La molecola modello scelta è l'isotiocianato di fluoresceina (FITC), peso molecolare 389,38g/mol e solubilità in acqua inferiore a 0.1mg/ml.

La dispersione della molecola modello nel polimero è stata realizzata sciogliendo entrambi in diclorometano (DCM) nel seguente rapporto 3mg di FITC per ogni grammo di polimero. La soluzione così ottenuta è stata versata in capsule Petri e lasciata riposare una notte per permettere l'evaporazione del solvente. I film ottenuti sono stati quindi sottoposti a pressofusione nelle seguenti condizioni: il materiale, una volta fuso, è sottoposto ad una pressione di circa 1,5 MPa per 2 minuti; segue un raffreddamento con acqua a 10 °C per circa 20 minuti, in modo da garantire una veloce solidificazione del campione nella nuova forma.

50 mg di film polimerico contenente FITC, vengono immersi in 13 ml di soluzione tampone (0.1M, pH = 7.4) ed incubati nell'agitatore termico Julabo SW22 (T=37°C, frequenza di agitazione di 80 giri al minuto). A tempi prestabiliti si procede quindi al prelievo di aliquote di 300µl di soluzione, e il rilascio della molecola modello è monitorato misurando l'assorbanza della soluzione a 494nm. A tal scopo è stato utilizzato uno spettrofotometro (Cary 1E), ed attraverso una curva di calibrazione è stato possibile ottenere il valore di concentrazione di FITC rilasciata.

3.2.9 TEST DI BIOCOMPATIBILITA'

La biocompatibilità, intesa come capacità di un materiale di indurre, da parte di un sistema vivente, una reazione favorevole alla sua presenza in una specifica applicazione, è una grandezza non misurabile, spesso stabilita mediante verifica di una soddisfacente prestazione clinica. Sancito che la biocompatibilità concerne l'interazione tra materiali e sistema vivente, occorre definire procedure, incentrate sulla risposta del materiale e dell'ospite, che possano fornire supporto nella scelta e nella progettazione di un dispositivo deputato ad una data applicazione clinica. Le procedure normalmente seguite prevedono prove da effettuarsi sia in

laboratorio (*test in-vitro*) che su cavie animali (*test in-vivo*), antecedenti la monitorizzazione clinica.

3.2.9.1 Colture cellulari

Gli esperimenti di vitalità cellulare sono stati condotti utilizzando la linea cellulare INS-1. Le cellule INS-1 sono state coltivate all'interno di un incubatore a CO₂ in un terreno composto da: RPMI 1640 contenente il 5% di siero fetale bovino, piruvato di sodio 1 mM, 2-mercaptoetanololo 50 µM, glutammina 2 mM, HEPES 10 mM, penicillina 100 U/ ml, e streptomycina 100 µg/ml. La cultura è stata quindi trattata con tripsina settimanalmente, e le cellule sono state seminate con una densità di 4 x 10⁴ cellule/cm² prima, e quindi 3 x 10⁶ cellule, in una fiasca da 75-cm² contenente 20 ml di terreno completo. Per gli esperimenti di vitalità, le cellule INS-1 sono state seminate con una densità 1x10⁵ cellule/ml (100 µl) su ciascun tipo di materiale, previamente sterilizzato e depositato in pozzetti di una piastra da 96 e quindi ulteriormente incubate rispettivamente per 24h e 7 giorni.

3.2.9.2 Saggio di vitalità cellulare

Per determinare il numero di cellule vitali adese ad ogni tipo di materiale, si è utilizzata una soluzione di 0,4% trypan blu (Sigma). Alla fine di ogni periodo di incubazione, le cellule adese sono state lavate con PBS, trattate con tripsina per staccarle ed infine messe a contatto con una soluzione di trypan blu in un rapporto 1:1. Infine, le cellule sono state contate al microscopio ottico utilizzando una camera di Burker monouso. Il campione di controllo è rappresentato da cellule adese alla plastica da coltura cellulare. I dati sono stati espressi come percentuale di cellule adese alla plastica da coltura cellulare, che è stato fissato come 100%.

3.2.9.3 Analisi al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)

Per effettuare l'analisi SEM, alla fine di ogni periodo di incubazione (24 ore e 7 giorni), le cellule adese a ciascun tipo di materiale sono state sottoposte al seguente trattamento: fissaggio con una soluzione di glutaraldeide al 2,5% (v/v) (Sigma-Aldrich) in tampone 0,1 M Na-cacodilato (pH 7,2) per 1 ora a 4°C,

lavaggio con tampone Na-cacodilato, e quindi disidratazione a temperatura ambiente in un gradiente di EtOH fino al 100%. I campioni sono stati quindi tenuti in EtOH al 100% per 15 minuti e poi essiccati. Da ultimo, i campioni sono stati rivestiti d'oro mediante tecnica di sputtering e osservati a 2 ingrandimenti, 500x e 1500x, con un microscopio Leica Cambridge Stereoscan 440 (Leica Microsystems, Bensheim, Germania) a 8 kV.

CAPITOLO 4:

RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

Nella Parte Sperimentale sono riportate le condizioni di sintesi dell'omopolimero PBCE e dei copolimeri P(BCE_xBDG_y), dove x e y rappresentano rispettivamente la % in moli di unità comonomeriche BCE e BDG.

A temperatura ambiente tutti i campioni sintetizzati si presentano come solidi semicristallini di colore giallo chiaro e sono caratterizzati da una buona solubilità nei più comuni solventi organici, quali cloroformio, diclorometano e tetracloroetano.

I campioni oggetto della presente Tesi sono riportati in Tabella 4.1.

Tabella 4.1 Dati di caratterizzazione molecolare

Polimeri	M_n	D	BDG (mol %) ¹H-NMR	L_{BCE}	L_{BDG}	b
<i>PBCE</i>	38500	2,0	0	/	/	/
<i>P(BCE70BDG30)</i>	32300	2,3	29,9	3,2	1,4	1,04
<i>P(BCE55BDG45)</i>	39000	2,2	45,2	2,1	2,0	0,98
<i>P(BCE40BDG60)</i>	33600	2,2	60,7	1,7	2,5	1,00

Come si può notare dalla Tabella, tutti i polimeri risultano caratterizzati da pesi molecolari elevati e confrontabili e ciò indica un buon controllo del processo di polimerizzazione. Gli elevati pesi molecolari permettono inoltre di escludere un'influenza di M_n sulle proprietà termiche e meccaniche. La struttura chimica è stata determinata tramite spettroscopia ¹H-NMR (si veda Figura 4.1): in tutti i casi, gli spettri confermano la struttura chimica prevista.. La composizione dei copolimeri è stata calcolata considerando l'area del picco di risonanza dei protoni **1** della subunità cicloesandicarbossilica, collocata a 2.28 ppm, e dei protoni **5** dei gruppi metilenici della subunità diglicolica a 2,24 ppm. Dai dati in Tabella 4.1 si

evince come, per tutti i campioni, la composizione molecolare sia risultata praticamente analoga a quella di alimentazione.

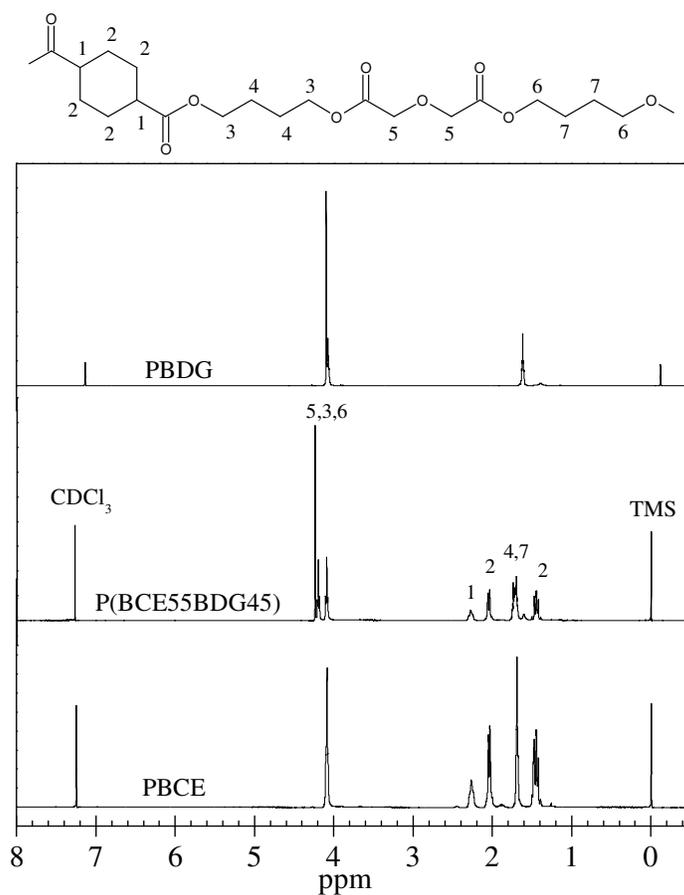


Figura 4.1 Spettro $^1\text{H-NMR}$ con relativa assegnazione dei picchi

Informazioni sulla disposizione delle unità comonomeriche in catena possono essere dedotte dal grado di statisticità b , determinato tramite spettroscopia $^{13}\text{C-NMR}$. In particolare b assume valore uguale ad 1 per i copolimeri statistici, 2 per quelli alternati ed è compreso tra 0 e 1 per quelli a blocchi, in funzione della loro lunghezza. Il calcolo di b , per il quale si è fatto riferimento ai picchi di risonanza dei carboni della subunità butandiolo (**3** e **6**), può essere espresso come:

$$b = P_{CE-DG} + P_{DG-CE} \quad (1)$$

dove P_{CE-DG} e P_{DG-CE} corrispondono rispettivamente alla probabilità di trovare un'unità "cicloesandicarbossilica" accanto ad una "diglicolica" e alla probabilità

di trovare un'unità "diglicolica" accanto ad una "cicloesandicarbossilica". Tali probabilità possono essere espresse nella forma:

$$P_{CE-DG} = \frac{(I_{CE-DG} + I_{DG-CE})/2}{(I_{CE-DG} + I_{DG-CE})/2 + I_{CE-CE}} \quad (2)$$

$$P_{DG-CE} = \frac{(I_{DG-CE} + I_{CE-DG})/2}{(I_{DG-CE} + I_{CE-DG})/2 + I_{DG-DG}} \quad (3)$$

dove I_{CE-DG} , I_{DG-CE} , I_{CE-CE} e I_{DG-DG} sono le intensità integrate dei picchi di risonanza relativi rispettivamente alle sequenze CE-DG, DG-CE, CE-CE, e DG-DG.

La lunghezza dei blocchi è definita come:

$$L_{BS} = 1/P_{CE-D} \quad (4)$$

$$L_{BDG} = 1/P_{DG-CE} \quad (5)$$

La Tabella 4.1 riporta i valori di b ottenuti per tutti i campioni. Esso risulta circa 1, ad ulteriore conferma di come i copolimeri in esame siano effettivamente statistici. Questo valore non sorprende considerate le elevate temperature di reazione e l'impiego di $Ti(OBu)_4$ come catalizzatore: è ben noto, infatti, che tale sostanza favorisce le reazioni di transesterificazione.

I polimeri sono stati poi sottoposti al processo di pressofusione, ottenendo film di spessore compreso tra 0,24 e 0,34 mm. Prima delle successive caratterizzazioni i campioni sono stati mantenuti a temperatura ambiente sotto vuoto per 3 settimane in modo da consentirne la completa cristallizzazione e uniformarne la storia termica.

4.2 CARATTERIZZAZIONE TERMICA E DIFFRATTOMETRICA

La caratterizzazione dei copolimeri è proseguita sottoponendoli alle seguenti analisi:

1. analisi termogravimetrica (TGA);
2. calorimetria differenziale a scansione (DSC);
3. diffrazione ai raggi X (WAXS).

I dati ottenuti sono raccolti in Tabella 4.2.

Tabella 4.2 Dati di caratterizzazione termica

Polimeri	$T_{5\%}$ w.loss (°C)	1 st scan		2 nd scan								
		T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_g (°C)	ΔC_p (J/°C g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_{cc} (°C)	X_c	WCA (°)
<i>PBCE</i>	380	166	33	12	0,065	/	/	167	31	144	42 ± 3	110 ± 2
<i>P(BCE70BDG30)</i>	360	120	24	-15	0,237	/	/	121	22	97	39 ± 3	92 ± 2
<i>P(BCE55BDG45)</i>	353	93	17	-21	0,350	29	4	93	19	60	32 ± 3	87 ± 3
<i>P(BCE40BDG60)</i>	350	42	10	-25	0,511	/	/	/	/	/	19 ± 3	85 ± 1

Le prove termogravimetriche sono state condotte sotto atmosfera di azoto. Dalle rispettive curve è stata determinata la temperatura corrispondente ad una perdita di peso del 5%, riportata in Tabella 4.2.

In tutti i casi la perdita di peso avviene in un unico stadio ed è pari al 100%. Dai dati riportati in tabella si osserva che il PBCE risulta significativamente stabile, mentre per quanto concerne i copolimeri P(BCExBDGy), la stabilità termica risulta dipendente dalla composizione, ed aumenta con il contenuto di unità BCE. Ciò non sorprende se si tiene conto che i poliesteri caratterizzati dalla presenza di anelli alifatici si sono rivelati addirittura più stabili del poliestere aromatico corrispondente, in questo caso poli(butilene tereftalato) (PBT).

Per quanto concerne i copolimeri è comunque da segnalare il fatto che tutti i campioni esaminati sono caratterizzati da una buona stabilità termica, come evidenziato dalle temperature corrispondenti ad una perdita di peso del 5%, $T_{5\%}$, che variano tra 350 e 380°C.

Successivamente i campioni sono stati sottoposti a misure calorimetriche. Il peso molecolare elevato e comparabile di tutti i campioni in esame permette di escludere una sua influenza sulle proprietà termiche.

I dati relativi alle curve calorimetriche ottenute dalla prima scansione sono riportati in Tabella 4.2.

Per quanto concerne l'omopolimero, esso risulta semicristallino, come evidenziato dalla presenza di un cospicuo picco endotermico di fusione, e fonde ad una temperatura significativamente alta, certamente da imputare alla presenza dell'anello alifatico che conferisce alla struttura una rigidità superiore rispetto a quella di una catena alifatica contenente gruppi metilenici. Nei copolimeri, la posizione del picco dipende dalla composizione; inoltre, essi mostrano un'endoterma di fusione più larga rispetto all'omopolimero di riferimento, e questo suggerisce la presenza di cristalliti con un'ampia distribuzione di gradi di perfezione. L'aumento della quantità di comonomero aggiunto alla catena di PBCE porta ad una riduzione del calore di fusione, indicando una diminuzione di cristallinità nei copolimeri rispetto all'omopolimero. In tutti i campioni è presente il fenomeno della transizione vetrosa, nonostante nell'omopolimero risulti meno evidente, data la sua elevata cristallinità.

Al fine di verificare la natura della fase cristallina presente nei copolimeri analizzati è stata eseguita l'analisi a raggi X. I diagrammi di diffrazione dei copolimeri statistici P(BCExBDGy) sono riportati in Figura 4.2, insieme a quello di PBCE, a fini di confronto. Come si può osservare dalla Figura, il diagramma è tipico dei materiali semicristallini, mostrando alcuni riflessi ben evidenti causati dalla parte ordinata del materiale, sovrapposti ad una linea di base a campana dovuta al materiale amorfo. Relativamente ai copolimeri, i diagrammi di diffrazione sono caratterizzati da picchi relativamente intensi in tutto l'intervallo di composizione. Considerando il profilo della curva di ogni campione, si può inoltre dedurre che in ognuno di essi è presente una sola fase cristallina. Gli spettri dei copolimeri mostrano i quattro picchi principali caratteristici della fase del PBCE, agli angoli 2θ 15.0°, 18.1°, 20.7°, 22.6°, e pertanto la fase cristallina che si sviluppa in essi è quella del PBCE.

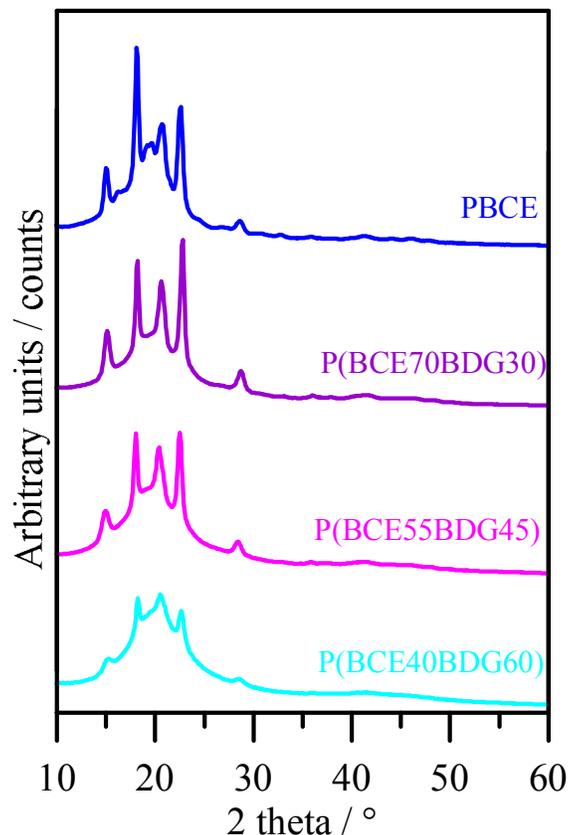


Figura 4.2 Diagrammi di diffrazione dei copolimeri statistici e di PBCE

Per quanto concerne il grado di cristallinità, si osserva una diminuzione solo per contenuti di BDG > 30%; in tutti i casi la posizione dei riflessi non risulta influenzata dalla composizione: ciò porta ad ipotizzare la completa esclusione della co-unità dal reticolo cristallino che si sviluppa. Anche tale risultato era alquanto prevedibile se si considera che le due unità comonomeriche hanno strutture chimiche significativamente diverse.

Al fine di confermare i risultati dell'analisi a raggi X, è stata verificata l'applicabilità dell'equazione di Baur ai dati di T_m relativi ai copolimeri: la loro temperatura di fusione diminuisce regolarmente all'aumentare del contenuto di co-unità BDG. Se si calcola $1/T_{m,co}$ in funzione della composizione, si ha un andamento lineare (dati non mostrati); dalla pendenza e dall'ordinata all'origine di tale retta sono stati estrapolati la temperatura di fusione all'equilibrio e il calore di fusione per il PBCE, pari a 184 °C e 78 J/g, in accordo con i dati in letteratura, ad ulteriore prova della natura statistica dei copolimeri studiati. In conclusione, si può affermare che i risultati ottenuti sono in perfetto accordo con quelli ottenuti dalle misure di diffrazione a raggi X.

Per confermare come la tendenza a cristallizzare del PBCE diminuisca in seguito all'inserimento in catena di co-unità di tipo diverso, sono stati condotti esperimenti di cristallizzazione in condizioni non isoterme.

Come riportato in letteratura, il tempo di semicristallizzazione, ottenibile da misure di cinetica di cristallizzazione in condizioni isoterme, è correlato alla temperatura corrispondente al massimo del picco di cristallizzazione (T_{cc}) ottenuto in condizioni non isoterme; la T_{cc} diminuisce regolarmente con la diminuzione del contenuto di co-unità BCE. Una quantità di unità BDG del 60% (in moli) deprime completamente il processo di cristallizzazione del PBCE nelle condizioni sperimentali adottate. Inoltre, la velocità di cristallizzazione del PBCE diminuisce all'aumentare delle quantità di unità BDG: ciò può essere imputato alla presenza di tali unità che agiscono da ostacoli al regolare impacchettamento delle catene polimeriche del PBCE.

Come noto, il fenomeno della transizione vetrosa di un materiale parzialmente cristallino risulta diverso rispetto a quello del materiale analogo completamente amorfo. Sebbene sull'argomento in letteratura siano riportati risultati contrastanti, è comunemente accettato che la cristallinità agisca come punto di reticolazione in una struttura polimerica, riducendo perciò la mobilità delle catene amorphe e alzando il valore di T_g . Pertanto, nel caso dei copolimeri statistici, per studiare l'influenza della composizione sulla temperatura di transizione vetrosa, il fenomeno deve essere analizzato in assenza di cristallinità: il rapido raffreddamento dallo stato fuso è il metodo comunemente utilizzato per evitare la cristallizzazione e ottenere polimeri completamente amorfi.

Le curve calorimetriche dei campioni PBCE e P(BCE70BDG30) presentano una variazione endoterma della linea di base associata al fenomeno di transizione vetrosa seguita da un picco endotermico di fusione a più alta temperatura, indice della natura semicristallina di questi campioni. Il P(BCE55BDG45) mostra una transizione vetrosa seguita da un picco esotermico e, a temperature più alte, da un picco endotermico. L'entalpia associata al fenomeno di cristallizzazione risulta inferiore rispetto a quello di fusione, indicando che anche questo campione non può essere ottenuto, attraverso raffreddamento veloce, in uno stato completamente amorfo: la curva DSC del campione è dunque tipica di un polimero parzialmente cristallino. Infine il copolimero P(BCE40BDG60) mostra solo il fenomeno della transizione vetrosa a riprova della sua natura amorfa.

Per quanto riguarda l'andamento della temperatura di transizione vetrosa in funzione della composizione, si può osservare che i valori di T_g diminuiscono all'aumentare del contenuto di unità BDG; ciò non sorprende se si tiene conto che i gruppi metilenici presenti nell'unità BDG sono più flessibili, rispetto all'anello alifatico rigido contenute nell'unità BCE.

4.3 MISURE DI BAGNABILITÀ

La misura dell'angolo di contatto fornisce informazioni sull'affinità di un materiale rispetto ad un solvente (in questo caso l'acqua). Per ogni goccia è stato misurato il valore dell'angolo 20 secondi dopo la sua deposizione. La tabella 4.2 riporta i valori per ciascun campione (calcolati sulla media di 5 gocce) con relativa deviazione standard.

Il PBCE è il materiale più idrofobico tra quelli esaminati con un angolo di contatto di 110° , il P(BCE40BDG60) il più idrofilico con 85° , a causa della maggiore quantità di unità BDG (contenenti ossigeni eteri che conferiscono polarità alla struttura). Il copolimero P(BCE70BDG30) può considerarsi idrofobico ($WCA > 90^\circ$), analogamente al PBCE, i restanti copolimeri idrofilici. Si registra inoltre come al variare della composizione, più precisamente all'aumentare della quantità di unità BDG, l'angolo di contatto diminuisca regolarmente, consentendo una facile modulazione della bagnabilità dei materiali. I dati presentano deviazioni standard molto basse, a conferma della validità delle misurazioni effettuate.

4.4 PROVE MECCANICHE

Le proprietà meccaniche dei campioni in forma di film sono state studiate mediante misure sforzo-deformazione, applicando al provino una forza di trazione ad una velocità costante di 5 mm/min, al fine di deformare il provino stesso. La Tabella 4.3 riporta i dati relativi a modulo elastico (E), sforzo a rottura σ_b e deformazione a rottura ϵ_b dei campioni analizzati. Il valore di tali parametri è riportato come valore medio ricavato dall'analisi di 5 provini con relativa deviazione standard.

Tabella 4.3 Valori di modulo elastico, allungamento e sforzo a rottura per PBCE e P(BCExBDGy).

Polimero	E (MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)
<i>PBCE</i>	459 ± 11	33 ± 1	31 ± 11
<i>P(BCE70BDG30)</i>	192 ± 10	15 ± 3	458 ± 8
<i>P(BCE55BDG45)</i>	81 ± 5	7 ± 1	536 ± 32
<i>P(BCE40BDG60)</i>	13 ± 1	2,6 ± 0,5	635 ± 23

Dai dati riportati in tabella si evince come l'omopolimero PBCE sia il più rigido tra i polimeri presi in esame in questa tesi, con un modulo elastico di 459 Mpa, mentre per i copolimeri il valore di E diminuisce regolarmente al diminuire dell'unità BCE, fino ad un minimo relativo al campione P(BCE40BDG60). La deformazione a rottura è caratterizzata da un andamento opposto, con allungamenti che variano dal 31% per il PBCE ad un massimo di 635% per il P(BCE40BDG60). I provini più rigidi si sono dimostrati anche i più fragili, quelli più elastici i più duttili.

Le prove meccaniche di trazione hanno dimostrato come l'introduzione di unità BDG all'interno della catena di PBCE, mediante un processo di copolimerizzazione, cambi in maniera significativa le proprietà meccaniche del copolimero risultante. Il comportamento meccanico dei materiali in esame è certamente da mettere in relazione con:

- la quantità di fase cristallina presente (è noto infatti che le proprietà meccaniche dipendono fortemente dalla morfologia del materiale, intesa come quantità relativa di fase cristallina e di fase amorfa);
- flessibilità della catena.

Tutti i materiali analizzati presentano una fase amorfa mobile (T_g < temperatura ambiente), che conferisce elasticità alla catena e facile deformabilità, ed una fase cristallina che invece è responsabile della rigidità della catena. Il diverso comportamento meccanico riscontrato per i vari copolimeri può essere spiegato anch'esso sulla base dei due fattori sopracitati: flessibilità di catena e cristallinità. La diminuzione del modulo elastico riscontrata nel copolimero contenente il 70%

in moli di unità BCE, è ascrivibile ad un aumento di flessibilità delle catene macromolecolari dovuta alla presenza delle co-unità BDG molto flessibili (il grado di cristallinità di questo campione è infatti analogo a quello dell'omopolimero PBCE); negli altri due casi il comportamento meccanico può essere invece facilmente spiegato sulla base della minore cristallinità presente nei copolimeri. Inoltre, è da sottolineare che tutti i copolimeri esaminati sono caratterizzati da un comportamento elastomerico.

4.5 STUDI DI BIODEGRADAZIONE

I tre copolimeri statistici P(BCExBDG_y) a diversa composizione e l'omopolimero di riferimento PBCE, sono stati sottoposti sia a esperimenti di degradazione idrolitica che ad esperimenti di degradazione enzimatica in presenza di pancrealipase *in vitro* in condizioni fisiologiche di temperatura (37°C) e di pH (7.4). Tali esperimenti vengono condotti al fine di valutare la tempistica di degradazione di questi materiali nell'ottica di utilizzarli come biomateriali all'interno dell'organismo.

Si sono ottenute informazioni relative al decorso del processo di degradazione idrolitica ed enzimatica caratterizzando ciascun campione attraverso:

- la misura della perdita di peso;
- la caratterizzazione delle transizioni termiche mediante DSC;
- la caratterizzazione della superficie dei film mediante SEM.

I test di biodegradazione sono stati condotti, in triplicato, su film polimerici mantenuti in tampone fosfato ed in tampone fosfato contenente pancrealipase per un massimo di 98 giorni.

Di ciascun campione sottoposto a degradazione idrolitica ed enzimatica è stata calcolato il peso residuo percentuale ($m_R\%$) attraverso la seguente equazione:

$$m_R(\%) = 100 - \left(\frac{m_{in} - m_{fin}}{m_{in}} \cdot 100 \right)$$

dove m_{fin} è la massa del campione registrata dopo il processo di degradazione e m_{in} è la massa iniziale del campione.

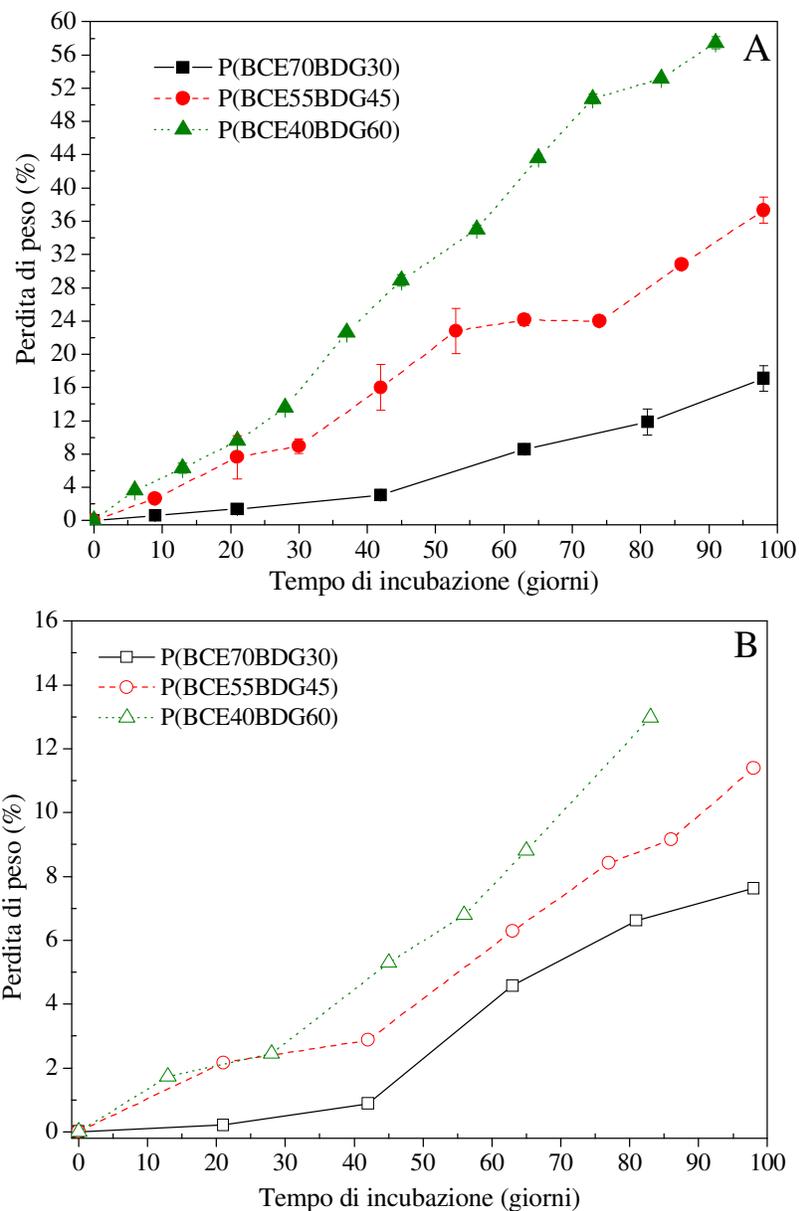


Figura 4.3 Perdita di peso percentuale in funzione del tempo di incubazione in: A) tampone fosfato pH= 7.4 contenente pancrealipase; B) tampone fosfato pH=7.4. Nel caso della degradazione enzimatica (A) nel calcolo della perdita di peso si è tenuto conto anche del contributo dato dalla degradazione idrolitica.

Nella Figura 4.3 sono riportati i pesi percentuali residui ($m_R\%$) dei campioni in funzione dei giorni di permanenza in soluzione tampone.

Come si osserva dagli andamenti riportati nella Figura 4.3 (A e B), la perdita di peso subita dai campioni nel corso della degradazione dipende fortemente dalla composizione del copolimero: maggiore è la quantità di co-unità BDG presente,

maggiore è il calo di peso subito dal campione. La dipendenza della perdita di peso dalla composizione è evidente già a tempi brevi di degradazione e si accentua a tempi lunghi (vedi Figura 4.3 A e B). Al termine degli esperimenti (98 giorni di permanenza in tampone e in tampone contenente l'enzima per tutti i polimeri), il peso residuo del P(BCE70BDG30) è rispettivamente circa 93 e 84%, mentre per l'omopolimero PBCE non si registra una alcuna significativa perdita di peso in entrambi i casi: tale risultato può essere messo in relazione all'elevato grado di cristallinità, al buon livello di perfezione dei cristalli, ed alla alta temperatura di fusione e idrofobicità di questo polimero. Per quanto concerne i copolimeri P(BCE55BDG45) e P(BCE40BDG60), al termine delle prove di degradazione idrolitica ed enzimatica, si è registrato un valore di $m_R\%$ rispettivamente di 89 e 64% per il P(BCE55BDG45) e di 87 e 42% per il P(BCE40BDG60). In generale la perdita di peso gravimetrico si manifesta quando il processo di idrolisi del legame estereo provoca la formazione di oligomeri che hanno un peso molare abbastanza basso da essere solubili in acqua. I dati di Figura 4.3 mostrano, quindi, che nei copolimeri contenenti un maggior contenuto di co-unità BDG il processo di idrolisi genera oligomeri più corti (o più solubili) rispetto agli oligomeri che vengono generati nei copolimeri con più basso contenuto di co-unità BDG, a parità di tempo di degradazione.

I risultati trovati confermano che l'inserimento di co-unità BDG nel reticolo cristallino del PBCE porta ad un significativo aumento della velocità di degradazione. Come noto, sia la velocità di degradazione idrolitica che quella enzimatica dipendono da molteplici fattori tra cui:

- temperatura di fusione
- grado di perfezione dei cristalli
- grado di cristallinità
- idrofilicità

I fattori, tra quelli citati sopra, che spiegano l'andamento osservato sono il grado di cristallinità, il punto di fusione e il grado di perfezione dei cristalli che diminuiscono all'aumentare del contenuto delle co-unità BDG presenti lungo la catena. La più alta velocità di degradazione del copolimero P(BCE70BDG30) rispetto all'omopolimero PBCE può essere invece spiegata sulla base della maggiore idrofilicità del copolimero, e del suo più basso punto di fusione (i due polimeri hanno infatti paragonabile grado di cristallinità).

Infine, in presenza dell'enzima, le perdite di peso risultano più consistenti che nel caso della sola degradazione idrolitica, a parità di campione: ciò non sorprende se si considera che in presenza della pancrealipasi si ha simultaneamente sia degradazione enzimatica che idrolitica.

Dopo il prelievo dalla soluzione tampone e da quella contenente anche l'enzima, i campioni sono stati analizzati mediante DSC, allo scopo di monitorare eventuali cambiamenti nel contenuto di fase cristallina presente durante la permanenza sia in semplice tampone fosfato che in tampone fosfato contenente l'enzima. In Figura 4.4 vengono riportati il calore di fusione normalizzato rispetto al valore iniziale (tempo di incubazione zero) in funzione del tempo di incubazione.

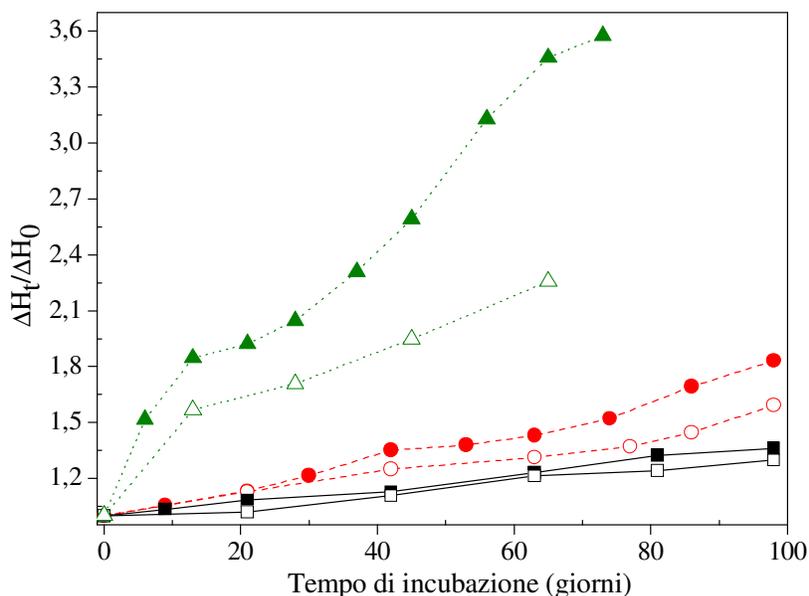


Figura 4.4 Calore di fusione normalizzato in funzione del tempo di incubazione per i copolimeri P(BCExBDGy) in: simboli pieni soluzione enzimatica; simboli vuoti tampone fosfato. Quadrati P(BCE70BDG30); tondi P(BCE55BDG45); triangoli P(BCE40BDG60).

I dati calorimetrici mostrano che tutti i copolimeri, nel corso della degradazione, subiscono delle variazioni morfologiche in termini di rapporto tra fase cristallina e fase amorfa. In particolare è evidente che il ΔH_f , proporzionale alla quantità di fase cristallina sviluppata dalle unità BCE, aumenta per tutti i copolimeri già dopo 10 giorni di permanenza sia in tampone che in soluzione contenente l'enzima. Questi dati dimostrano che la quantità di fase cristallina aumenta dopo 10 giorni di permanenza in tampone a 37°C. È interessante notare come tale aumento sia

particolarmente consistente per il copolimero P(BCE40BDG60) che è quello che mostra la velocità di degradazione più alta.

L'aumento della fase cristallina può essere dovuto a due fenomeni: (1) ricottura (*annealing*) (aumento e perfezionamento della fase cristallina) ad una temperatura compresa tra T_g e T_f e (2) degradazione preferenziale della fase amorfa con conseguente aumento della fase cristallina. È noto infatti che durante la degradazione idrolitica le molecole di acqua entrano preferenzialmente nella fase amorfa la quale è quindi soggetta ad una velocità di degradazione maggiore, rispetto alla fase cristallina, nella quale le molecole sono maggiormente impaccate. È altresì noto che anche l'enzima attacca di preferenza le zone amorphe mobili del materiale. Dall'analisi dei dati riportati in Tabella 4.2 non si può tuttavia escludere che tutti i polimeri subiscano anche un processo di annealing a 37°C, in quanto tale temperatura risulta essere all'interno della finestra di cristallizzazione di tutti i copolimeri.

Da ultimo, la morfologia dei film parzialmente degradati è stata esaminata al SEM (si veda Figura 4.5, dove sono riportate le immagini SEM del copolimero P(BCE55BDG45) non degradato a titolo di esempio e quelle di tutti i campioni sotto studio dopo 98 giorni di incubazione). I film dei campioni non degradati mostrano una superficie liscia priva di difetti. I film dei campioni degradati, al contrario, sono caratterizzati da una superficie ruvida che, nel caso del copolimero P(BCE55BDG45) presenta delle fratture, mentre nel caso del copolimero P(BCE40BDG60) dei veri e propri buchi. Le immagini SEM confermano dunque i risultati ottenuti dalle misure di perdita di peso.

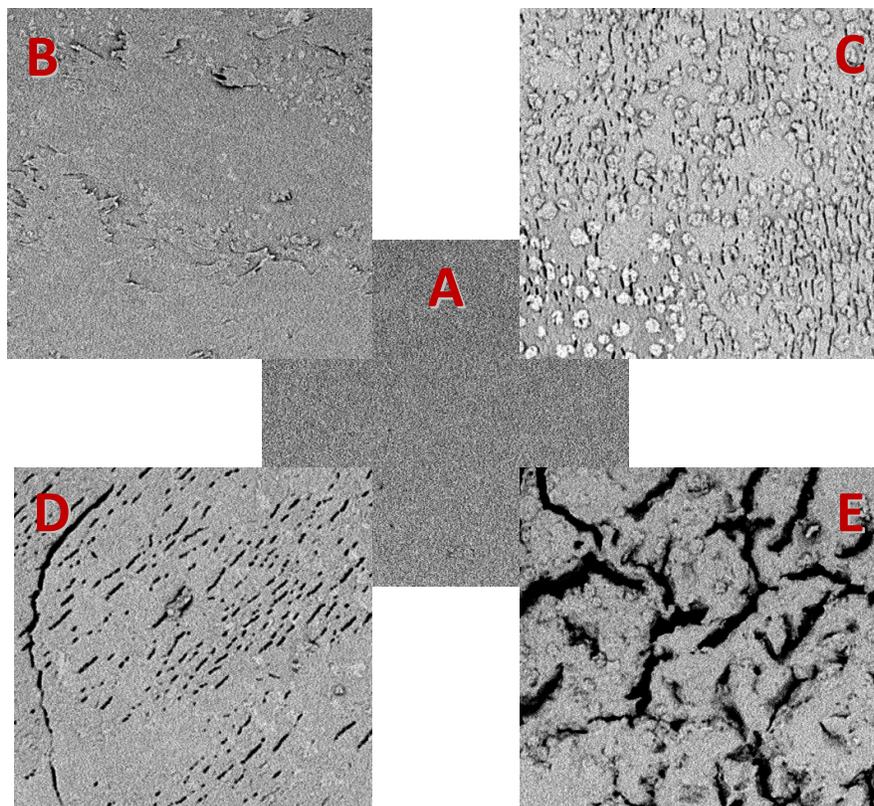


Figura 4.5 Immagini SEM (ingrandimento 1000x). A: P(BCE55BDG45) a T_0 ; B: PBCE; C: P(BCE70BDG30); D: P(BCE70BDG30); E: P(BCE40BDG60). B,C,D,E: campioni dopo 98 giorni di incubazione.

4.6 RILASCIO DI FITC

Tenuto conto che per questo sistema il rilascio della molecola modello dalla matrice polimerica è essenzialmente un processo controllato dalla diffusione, si può senz'altro ritenere che la cinetica di rilascio sia significativamente influenzata dall'idrofilicità del polimero e dalla mobilità delle catene polimeriche. Entrambi i fattori sono infatti determinanti per i processi di assorbimento d'acqua e rilascio del principio attivo. Non sorprende dunque che il PBCE, il polimero più idrofobico tra quelli studiati, sia caratterizzato dalla più lenta cinetica di rilascio (si veda Figura 4.6). I copolimeri, indipendentemente dal contenuto di co-unità butilene diglicolato sono al contrario caratterizzati da una cinetica di rilascio molto più veloce, in ragione del maggiore carattere idrofilico di tali co-unità.

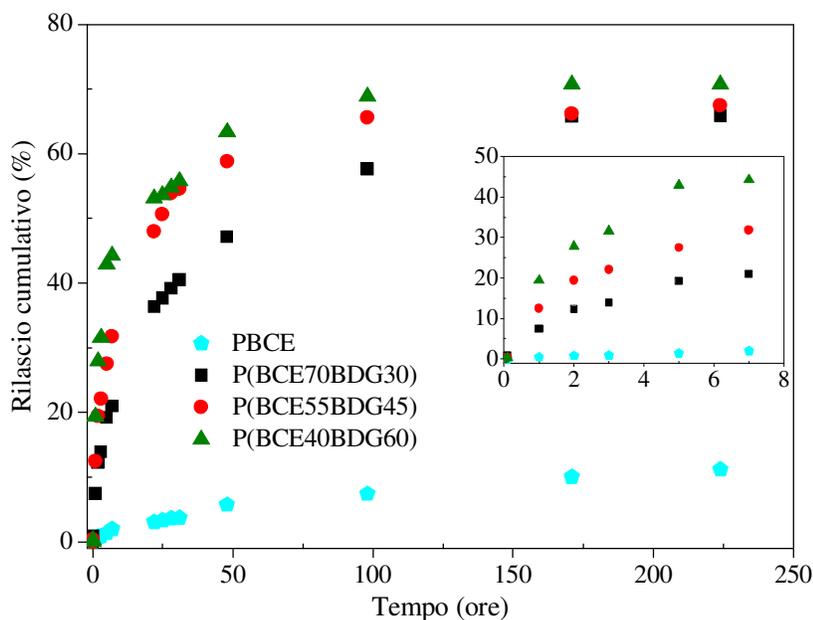


Figura 4.6 Rilascio cumulativo % in funzione del tempo per l'omopolimero PBCE e per i copolimeri statistici P(BCE \times BDG γ).

Come meglio evidenziato dall'insero, la cinetica di rilascio dipende dalla composizione del copolimero: il processo risulta infatti tanto più veloce quanto maggiore il contenuto di co-unità BDG presenti in catena. L'andamento osservato può essere spiegato sulla base del grado di cristallinità e sulla base del grado di perfezione della fase cristallina. Le lamelle cristalline agiscono infatti da barriere, ritardando la diffusione della FITC, perlomeno nella prima fase del processo. Come già detto sopra, grado di cristallinità e grado di perfezione dei cristalli diminuiscono regolarmente all'aumentare del contenuto di co-unità BDG. A tempi più lunghi, in particolare dopo circa 7 giorni, le differenze nella cinetica di rilascio tra i tre copolimeri praticamente si annullano. Tale risultato può essere spiegato ipotizzando un cambiamento nel meccanismo di rilascio, ovvero un passaggio da meccanismo diffusivo a meccanismo di rilascio dovuto all'idrolisi della matrice polimerica. In conclusione, il PBCE si può considerare il materiale più promettente per la realizzazione di dispositivi che debbano rilasciare farmaci per un periodo di tempo superiore alla settimana. I copolimeri al contrario si sono mostrati adatti per la realizzazione di nanovettori per un rilascio in tempi brevissimi del principio attivo.

4.7 TEST DI BIOCOMPATIBILITA'

La figura 4.7 riporta i dati di vitalità ottenuti incubando le cellule INS-1 con ciascuno dei materiali oggetto di studio della presente Tesi dopo opportuna sterilizzazione. I dati sono stati rappresentati come percentuale di sopravvivenza rispetto alle stesse cellule cresciute su plastica da coltura cellulare. Inoltre l'esperimento è stato condotto a due tempi di incubazione: 24 ore e 7 giorni.

Dopo 24 ore di incubazione delle cellule, è osservabile un'adesione cellulare compresa tra il 35-70% rispetto alle cellule depositate su plastica da coltura cellulare. In particolare il copolimero P(BCE40BDG60) presenta la percentuale di adesione più elevata, mentre il copolimero contenente il contenuto più basso di co-unità BDG il valore percentuale più basso.

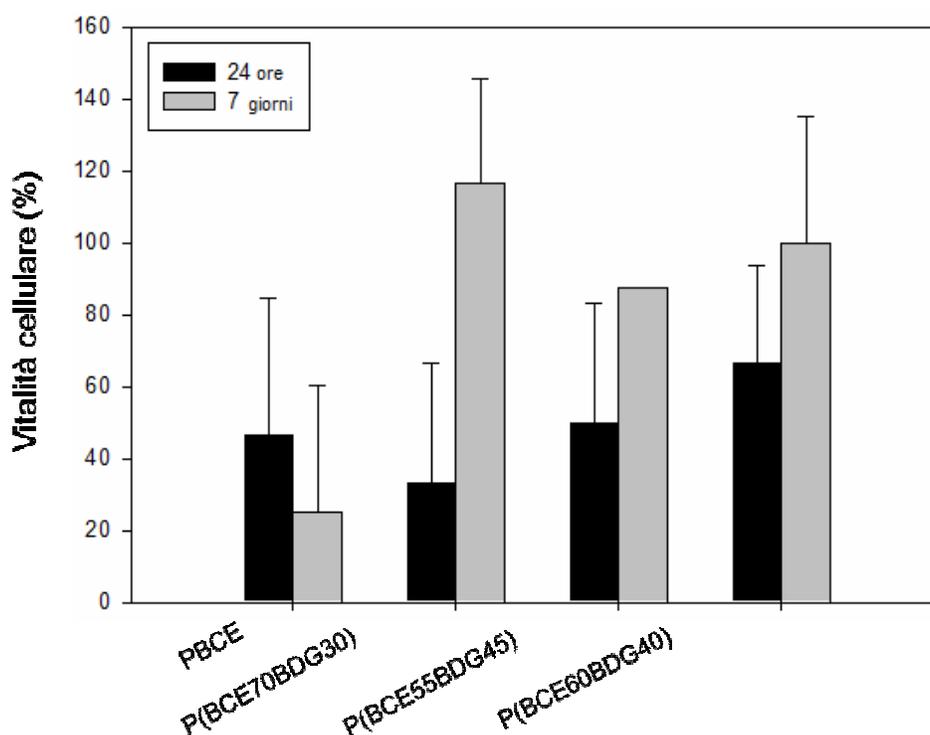


Figura 4.7 Rappresentazione della vitalità cellulare di INS-1 incubate su PBCE e copolimeri P(BCExBDGy) rispettivamente per 24 ore e 7 giorni. La vitalità cellulare è stata espressa in percentuale rispetto alle cellule di controllo il cui valore è stato fissato pari al 100%. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard.

Al contrario i dati proliferativi ottenuti a 7 giorni e sempre paragonati rispetto alle cellule depositate su plastica da coltura cellulare hanno presentato un trend

diverso: il campione P(BCE70BDG30) ha il valore più elevato di vitalità (120%) mentre l'omopolimero PBCE presenta il valore più basso (30%).

In sintesi, sembrerebbe che a 24 ore un aumento nel contenuto di co-unità BDG presenti nel polimero determini una maggiore adesione cellulare, benchè l'omopolimero PBCE risulti addirittura migliore del copolimero P(BCE70BDG30). Dopo 7 giorni, la proliferazione cellulare risulta invece maggiore nei copolimeri rispetto all'omopolimero PBCE.

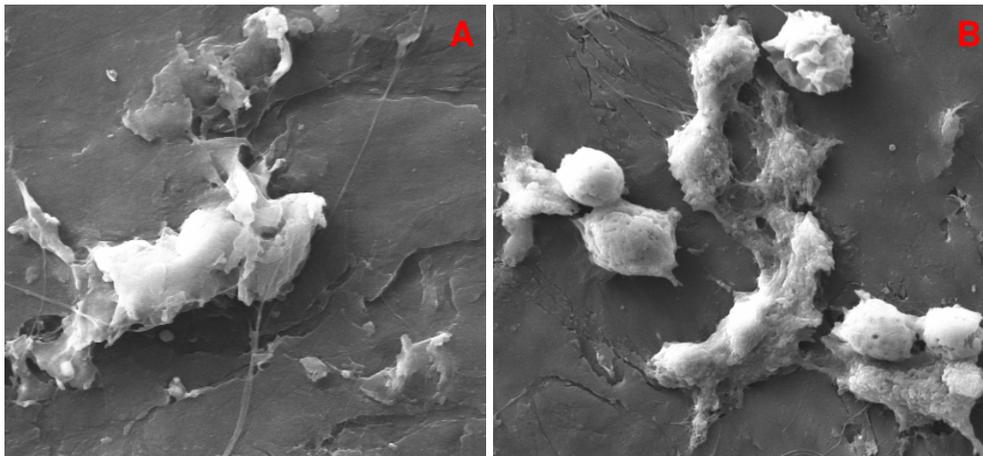


Figura 4.8 Immagini SEM (ingrandimento 1000x) rappresentative della morfologia delle cellule INS-1 coltivate per 7 giorni su: A) PBCE, B) P(BCE55BDG45).

Le immagini al SEM, ottenute dopo 7 giorni di incubazione (Figura 4.8), sembrano non supportare completamente i dati ottenuti con il saggio di vitalità. Infatti, mentre le cellule coltivate su plastica da coltura cellulare formano un monostrato nel quale non sembra possibile distinguerle singolarmente (dati non mostrati), nei campioni oggetto della presente Tesi è possibile osservare solo qualche cellula con morfologia non appiattita ma rotondeggiante, e quindi molto differente da quella delle cellule di controllo. Occorre precisare che questi sono dati preliminari e pertanto soggetti ad errore per una non corretta manipolazione delle cellule.

CAPITOLO 5:

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

I biomateriali sono ormai diventati una componente essenziale per il miglioramento della salute e della qualità della vita. In ambito biomedicale i materiali che hanno suscitato il maggiore interesse sono quelli polimerici, grazie alle loro proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità, facile lavorabilità e compatibilità meccanica con il sito di applicazione. In particolare, per quanto riguarda i sistemi di rilascio con caratteristiche di bioerosione e/o biodegradazione, la classe di polimeri che si è rivelata più idonea è quella dei poliesteri alifatici. Ad oggi però la *Food and Drug Administration* (FDA) ha consentito l'uso dei soli PLA, PGA e loro copolimeri; tali materiali non riescono però a soddisfare completamente l'ampia gamma di richieste. La sintesi di nuovi materiali polimerici, con proprietà modulabili con la composizione chimica, biocompatibili, biodegradabili e i cui prodotti di degradazione non risultino tossici per l'organismo, può aprire nuove prospettive future.

In quest'ambito, il lavoro di ricerca svolto nella seguente Tesi ha portato a notevoli risultati applicativi. In particolare, l'introduzione di unità comonomeriche contenenti un atomo di ossigeno etero lungo la catena polimerica del poli(butilene cicloesandicarbossilato), unitamente alla composizione chimica del copolimero risultante, si sono rivelati uno strumento estremamente efficace nel modulare le proprietà finali del materiale, rendendolo promettente per la realizzazione di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci per la cura di patologie del pancreas. In particolare, la copolimerizzazione ha portato:

- ad un significativo miglioramento delle proprietà meccaniche del materiale finale;
- ad un significativo aumento della velocità di degradazione sia idrolitica che enzimatica, attraverso una riduzione controllata del punto di fusione, del grado di cristallinità ed un aumento dell'idrofilicità del materiale.

Dunque la copolimerizzazione ha consentito di superare i limiti di fragilità e lenta biorisorbibilità dell'omopolimero PBCE, rendendolo potenzialmente adatto per

applicazioni biomedicali, considerata anche la buona compatibilità dei nuovi materiali rispetto le cellule pancreatiche. Da ultimo, tramite test di rilascio di una molecola modello (*Fluorescein Isothiocyanate*, FITC) per lo studio dei profili di diffusione e rilascio di principi attivi, si è potuto appurare che cambiando la composizione del copolimero è possibile ottenere diverse cinetiche di rilascio.

In conclusione, la strategia della copolimerizzazione del PBCE con un polimero contenente atomi di ossigeno eteri si è rivelata vincente: la presenza di tali eteroatomi conferisce al materiale finale idrofilicità e flessibilità.

Tali risultati, seppure incoraggianti, sono preliminari; occorre proseguire le ricerche e acquisire ulteriori informazioni prima di poter procedere con applicazioni in vivo, in particolare, realizzare micro/nano capsule contenenti farmaci per la cura delle patologie del pancreas.

BIBLIOGRAFIA

1. R.Pietrabissa, *“Biomateriali per protesi e organi artificiali”*, Patron Editore, 1996.
2. A.K. Bajpai, Sandeep K. Shukla, Smitha Bhanu, Sanjana Kankane, *“Responsive polymers in controlled drug delivery”*, Progress in Polymeric Science 2008, 33, 1088-1118.
3. Mary Caldorera-Moore, Nicholas A. Peppas, *“Micro and nanotechnologies for intelligent and responsive biomaterial-based medical systems”*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2009, 61, 1391-1401.
4. Lisa Brannon-Peppas, *“Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery”*, International Journal of Pharmaceutics, 1995, 116, 1-9.
5. Omid C. Farokhzad, Robert Langer, *“Impact of Nanotechnology on Drug Delivery”*, Acsnano, Vol 3, No 1.
6. Allan S. Hoffman, *“Hydrogels for biomedical applications”*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, 43, 3-12.
7. Nicholas A. Peppas, J. Zach Hilt, Ali Khademhosseini, Robert Langer, *“Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology”*, Adv. Mater. , 2006, 18, 1345-1360.
8. Lakshmi S. Nair, Cato T. Laurencin, *“Biodegradable polymers as biomaterials”*, Progress in Polymer Science, 2007, 32, 762-798.

9. Gisha E. Luckachan. C. K. S. Pillai, “*Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives*”, J Polym Environ, 2011, 19, 637-676.
10. Michel Vert, “*Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts*”, J Mater Sci: Mater Med, 2009, 20, 437-446.
11. Hajar Seyednejad, Amir H. Ghassemi, cornelus F. van Nostrum, Tina Vermonden, Wim E. Hennink, “*Functional aliphatic polyesters for biomedical and pharmaceutical applications*”, Journal of Controlled Release, 2011, 152, 168-176.
12. Gavin R. Graff *et al.*, “*Efficacy and Tolerability of a New Formulation of Pancrelipase Delayed-Release Capsules in Children Aged 7 to 11 Years With Exocrine Pancreatic Insufficiency and Cystic Fibrosis: A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Two-Period Crossover, Superiority Study*”, Clinical Therapeutics, 2010, 32, n.1.
13. Gavin R. Graff, John McNamara, James Royall, Steven Caras⁴ and Kristin Forssmann, “*Safety and Tolerability of a New Formulation of Pancrelipase Delayed-Release Capsules (CREON) in Children Under Seven Years of Age with Exocrine Pancreatic Insufficiency due to Cystic Fibrosis*”, Clin Drug Investig, 2010, 30, 351-364.
14. Corrado Berti, Annamaria Celli, Paola Marchese, Elisabetta Marianucci, Simone Sullalti, Giancarlo Barbiroli, “*Environmentally Friendly Copolyesters Containing 1,4-Cyclohexane Dicarboxylate Units, 1-Relationships Between Chemical Structure and Thermal Properties*”, Macromolecular Chemistry and Physics, 2010, 211, 1559-1571.

15. Annamaria Celli, Paola Marchese, Simone Sullalti, Corrado Berti, Giancarlo Barbiroli, “*Eco-friendly Poly(butylene 1,4-cyclohexanedicarboxylate): Relationships Between Stereochemistry and Crystallization Behavior*”, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2011, 212, 1524-1534.
16. Corrado Berti, Enrico Binassi, Annamaria Celli, Martino Colonna, Maurizio Fiorini, Paola Marchese, Elisabetta Marianucci, Massimo Gazzano, Francesco Di Credico, Daniel J. Brunelle, “*Poly(1,4-cyclohexylenedimethylene 1,4-cyclohexanedicarboxylate): Influence of Stereochemistry of 1,4-Cyclohexylene Units on the Thermal Properties*”, 2007.
17. M. Soccio, N. Lotti, L. Finelli, M. Gazzano, A. Munari, “*Aliphatic poly(propylene dicarboxylate)s: Effect of chain length on thermal properties and crystallization kinetics*”, *Polymer*, 2007, 48, 3125-3136.
18. Martin Kipping, Franziska Krahl, Artjom Doring, Hans-Jurgen P. Adler, Dirk Kuckling, “*Synthesis and characterization of particles consisting of a biodegradable poly(L-lactide) core and a functional hydrophilic shell*”, *European Polymer Journal*, 2010, 46, 313-323.
19. J. Siepmann, N. Faisant, J. Akiki, J. Richard, J. P. Benoit, “*Effect of the size of biodegradable microparticles on drug release: experiment and theory*”, *Journal of Controlled Release*, 2004, 96, 123-134.
20. Asfari M. , D. Janjic, Meda P. , Li G. , Halban P. A. , Wollheim C. B. “*Costituzione di 2-mercaptoetanolo-dipendenti differenziati secernono insulina linee cellulari*”, *Endocrinology*, 1992, 130, 167 -178.
21. Saino E. , Maliardi V. , Quartarone E. , Fassina L. , Benedetti L. , De Angelis M. G. , Mustarelli P. , Facchini A. , Visai L. , *Tissue Eng, parte A*, 2010, 16, 995-1008.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare la mia relatrice, Prof.ssa Nadia Lotti, per la sua gentilezza, la disponibilità e per avermi dato la possibilità di partecipare ad un'esperienza di laboratorio entusiasmante a cui gli studenti, in particolare dei corsi di laurea triennale, difficilmente hanno modo di accedere. Un grazie al mio correlatore Ing. Matteo Gigli, per avermi seguita con dedizione, passo dopo passo in tutti questi 7 mesi, avermi aiutata e rassicurata tutte le volte che i nervi cominciavano a dare segni di cedimento, soprattutto negli ultimi giorni!

Grazie anche ad Ernesto, che ha condiviso con me questa esperienza e che è venuto a darmi una mano anche dopo aver terminato la sua parte di esperimenti, e a tutti quelli del Dipartimento DICAM che mi hanno fatta sentire a mio agio sin da subito e mi hanno aiutata, Serena prima di tutti. È stato un vero piacere poter lavorare con tutti voi.

Un pensiero particolare va a Stefania e Priska perchè senza di loro questo percorso non sarebbe nemmeno iniziato.

Grazie alle persone squisite con cui da 4 anni ho il piacere di lavorare, e che mi hanno permesso, nonostante la stagione turbolenta, di prendermi i miei tempi da dedicare alla Tesi.

Un grazie ai miei genitori, perchè anche se siamo un po' come cani e gatto, in realtà ci vogliamo bene, alla mia zietta che è sempre e comunque dalla mia parte, ai miei amici, perchè anche se non ci vediamo tutti i giorni, so che posso contare su di loro. Infine un grazie speciale ad Elia, per l'entusiasmo, la carica e la sicurezza che ogni giorno riesce a darmi. Poter condividere con voi questa giornata è sicuramente la migliore ricompensa per tutti i miei sforzi.