

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**Nuovi copoliesteri multiblocco bio-based per applicazioni
biomedicali: correlazioni proprietà-struttura**

Elaborato in:

FONDAMENTI DI CHIMICA E BIOCHIMICA

Relatore:

Prof.ssa Nadia Lotti

Presentata da:

Giada Maioli

Correlatore:

Dott.ssa Martina Fabbri

Dott.ssa Michela Costa

Dott.ssa Michelina Soccio

Sessione II

Anno Accademico 2014-2015

INDICE

Capitolo 1: Introduzione

1.1	I biomateriali	1
1.1.1	Classificazione	2
1.1.1.1	Metalli	2
1.1.1.2	Ceramici	3
1.1.1.3	Tessuti biologici	4
1.1.1.4	Compositi	4
1.1.1.5	Polimeri	4
1.2	Biomateriali polimerici	5
1.2.1	Caratteristiche dei polimeri	5
1.2.2	Meccanismi di polimerizzazione	7
1.2.2.1	Struttura	8
1.2.2.2	Classificazione	10
1.2.3	Lavorazione dei polimeri	13
1.2.4	Copolimeri	14
1.3	Poliesteri alifatici	16
1.3.1	Strategie di sintesi	17
1.3.2	Proprietà fisiche	18
1.3.3	Cristallinità	19
1.3.4	Proprietà termiche	22
1.3.5	Massa e peso molecolare	23
1.3.6	Biodegradazione dei materiali polimerici	25
1.3.7	Poliesteri alifatici per uso biomedicale	27
1.4	L'ingegneria tissutale	31
1.4.1	Scaffolds	33
1.4.2	Molecole segnale	35
1.4.3	Il ruolo dei materiali polimerici nell'ingegneria tissutale	36
1.5	Sistemi a rilascio controllato di farmaci	37
1.5.1	Tipologie di sistemi a rilascio controllato	39

Capitolo 2: Scopo della tesi	41
---	-----------

Capitolo 3: Materiali e metodi

3.1	Sintesi di polimeri OH-terminati e copolimeri ad elevato peso molecolare...44	
3.1.1	Sintesi di poli (propilene cicloesandicarbossilato) a basso peso molecolare (PPCE-OH)	44
3.1.2	Sintesi di poli (propilene/neopentilglicole azelato) a basso peso molecolare (P(PAzmNAzm)-OH)	46
3.1.3	Purificazione dei polimeri a basso peso molecolare	46
3.2	Sintesi di copolimeri ad alto peso molecolare	47
3.3	Caratterizzazione molecolare	48
3.3.1	Risonanza magnetica nucleare (NMR)	48
3.3.2	Cromatografia a permeazione su gel (GPC)	51
3.4	Caratterizzazione termica	53
3.4.1	Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	53
3.4.2	Termogravimetria (TGA)	55
3.5	Analisi della fase cristallina	56
3.5.1	Diffrazione a raggi X	56
3.6	Caratterizzazione meccanica	58
3.6.1	Misure tensione-deformazione	58
3.7	Studi di degradazione idrolitica	60

Capitolo 4: Risultati e discussioni

4.1	Caratterizzazione dei polimeri a basso peso molecolare	61
4.1.1	Caratterizzazione molecolare	61
4.1.2	Caratterizzazione termica	64
4.2	Caratterizzazione dei polimeri ottenuti per estensione di catena	65
4.2.1	Caratterizzazione molecolare	65
4.2	Caratterizzazione termica	67
4.2	Caratterizzazione meccanica	72
4.3	Degradazione idrolitica	74

Capitolo 5: Conclusioni	76
--------------------------------------	-----------

Bibliografia 78

Ringraziamenti 80

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 I BIOMATERIALI

Nel corso degli ultimi anni in ambito medico e chirurgico si ricorre con sempre maggiore frequenza all'impiego di 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.

La definizione di biomateriale sulla quale attualmente esiste il più ampio consenso è quella stabilita nel corso della *II International consensus conference on biomaterials*, tenutasi a Chester (Gran Bretagna) nel 1991: "*Si definisce biomateriale un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici al fine di valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo*".

I biomateriali operano in ambiente fisiologico, generalmente caratterizzato da una notevole attività chimica e da un elevato intervallo di sollecitazioni meccaniche. I biomateriali sono in diretto contatto con i fluidi biologici, tra i quali acqua, ioni in soluzione, enzimi, proteine e cellule. Le condizioni chimico-fisiche (pH, temperatura) sono pressoché costanti nel tempo e influenzano la progettazione di un biomateriale (**Figura 1.1**). Data l'importanza rivestita da questi nuovi materiali si è reso necessario garantire il rispetto di determinati standard per i prodotti commerciali, che tengano in considerazione gli aspetti biologici, meccanici e chimici al fine di garantire la salute del paziente.

La compatibilità può essere suddivisa in tre aspetti principali:

- **Compatibilità morfologica**: aspetto che riguarda le interfacce dimensionali, relative a geometria e masse. Un dispositivo impiantabile deve avere forma e dimensione tali da essere inseribile al posto del tessuto naturale ed interfacciarsi geometricamente con l'ambiente circostante.

- **Compatibilità funzionale:** aspetto che riguarda il ruolo svolto dal dispositivo rispetto al ruolo atteso. Deve rispondere al maggior numero di caratteristiche funzionali possibili tra quelle richieste.
- **Biocompatibilità:** definita come la capacità di un materiale di non provocare da parte del sistema vivente nel quale è impiegato un insieme di reazioni sfavorevoli tali da pregiudicare la possibilità di utilizzarlo per tutto il tempo previsto.

Molto spesso nella progettazione di un dispositivo occorre tenere in considerazione tali aspetti, che purtroppo non sono quasi mai noti in termini quantitativi a causa dell'interazione dinamica con l'organismo. La compatibilità nel suo complesso conduce al problema dell'affidabilità. È infatti indispensabile che un dispositivo medico sia affidabile in quanto molte volte la sua manutenzione o riparazione è praticamente impossibile.

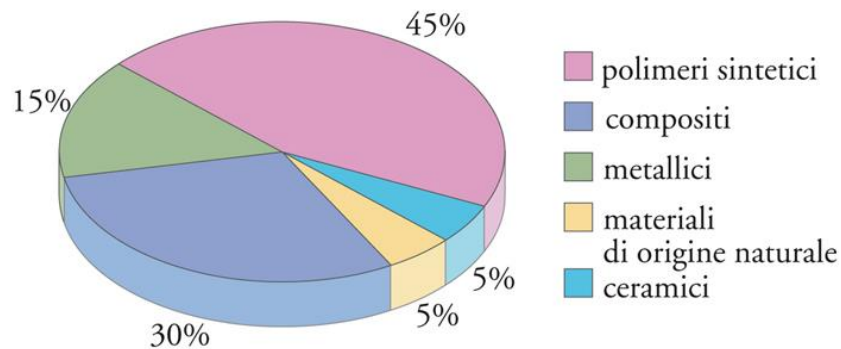


Figura 1.1- Uso di biomateriali in ambito biomedico.

1.1.1 Classificazione

1.1.1.1 Metalli

I biomateriali metallici sono caratterizzati dalla proprietà di sopportare carichi tensili elevati e trovano largo impiego come materiali da costruzione per manufatti medici come strumentario chirurgico, protesi ortopediche e dentali, mezzi di osteosintesi (**Figura 1.2**).

La realizzazione di leghe metalliche permette di gestire carichi estremamente elevati anche di tipo dinamico, al contrario di altri biomateriali quali ceramici e polimeri.

Tipici esempi di biomateriali impiegati in presenza di carichi elevati sono le endoprotesi d'anca e di ginocchio, placche metalliche, viti, chiodi, impianti dentali.

Diversamente, alcuni altri impieghi non necessitano il supporto di carichi, come valvole, gabbie, pacemaker cardiaci, fili conduttivi.

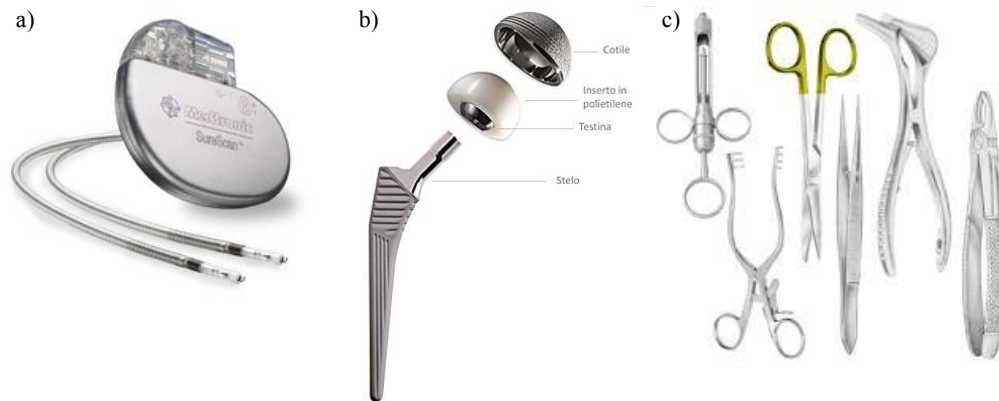


Figura 1.2- a) Pacemaker cardiaco. b) Protesi d'anca. c) Strumenti chirurgici.

1.1.1.2 Ceramiche

I materiali ceramici sono definibili come combinazioni di materiali inorganici non metallici (ossidi, siliciuri, carburi) e materiali inorganici metallici. Generalmente sono caratterizzati da fragilità alla frattura, per cui vengono impiegati per applicazioni biomediche atte alla realizzazione di dispositivi per la sostituzione funzionale di tessuti duri. Tipiche applicazioni riguardano il settore ortopedico (protesi articolari) e nel settore odontoiatrico (implantologia e denti artificiali) (**Figura 1.3**). Infine, è stata sviluppata una particolare bioceramica, il carbonio pirolitico, impiegata nella realizzazione di protesi valvolari cardiache.

Il principale vantaggio di questi materiali è la somiglianza delle proprietà fisiche con quelle presentate dal tessuto osseo: durezza, fragilità, bioinerzia e/o bioattività. Tra le loro caratteristiche si pongono anche resistenza al calore, isolamento elettrico, buona resistenza a carichi di compressione.



Figura 1.3 – Denti artificiali in materiale ceramico.

1.1.1.3 Tessuti biologici

Attualmente, l'impiego dei materiali di origine biologica è limitato, e avviene solamente dopo accurata eliminazione delle tracce cellulari responsabili della vitalità del materiale.

I quattro diversi tipi di tessuto biologico (epiteliale, connettivo, muscolare e nervoso), riconducibili alla classe dei materiali compositi, si differenziano dagli altri materiali quali i polimeri, i ceramici ed i metalli perché sono viventi, cioè costituiti da cellule che nel loro ciclo vitale consentono la continua ricostruzione dei tessuti.

I materiali biologici che presentano maggior interesse nel settore dei biomateriali sono i tessuti connettivi. Generalmente si differenziano in tessuti duri mineralizzati, quali ossa e denti, e tessuti molli, costituiti in gran parte di collagene ed elastina.

1.1.1.4 Compositi

I materiali compositi hanno proprietà che 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.

1.1.1.5 Polimeri

I materiali polimerici sono caratterizzati da un elevato peso molecolare e risultano dall'unione tramite legame chimico tra una o più molecole semplici, dette monomeri. Possono essere di origine naturale o sintetica. Verranno trattati separatamente nel capitolo successivo.

1.2 BIOMATERIALI POLIMERICI

1.2.1 Caratteristiche dei polimeri

I materiali polimerici hanno vaste applicazioni e nella maggior parte dei casi sono insostituibili anche nella vita di tutti i giorni.

Pongono comunque un problema ambientale, legato alla rinnovabilità delle loro fonti e al loro riciclo e smaltimento, infatti la maggior parte dei materiali polimerici derivano da fonti fossili non rinnovabili. Inoltre, la maggior parte dei polimeri non risulta facilmente attaccabile da parte dei microrganismi in tempi ragionevoli e ciò ha causato un veloce aggravamento del problema di inquinamento da materie plastiche che interessa tutti gli ecosistemi.

I polimeri possono essere classificati in due principali categorie a seconda della loro origine:

- **naturali**: sono presenti in natura, come cellulosa, proteine, acidi nucleici;
- **sintetici**: ottenuti cioè per sintesi chimica dai monomeri.

Un polimero è costituito da catene più o meno lunghe, lineari o variamente ramificate, in cui il monomero o i monomeri costituiscono l'unità ripetitiva che si ripete centinaia o migliaia di volte lungo la catena polimerica.

Il processo di polimerizzazione permette di combinare tra loro i monomeri giungendo alla formazione di nuove molecole, il cui appellativo può rispecchiare il **grado di polimerizzazione** raggiunto: si parla di dimeri, trimeri, tetrameri 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.

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 differenti di monomero.

Struttura, massa molecolare, velocità di degradazione, proprietà termiche, grado di cristallinità sono le caratteristiche che contribuiscono a determinare, in maggior misura, le proprietà di un generico polimero (**Figura 1.4**).

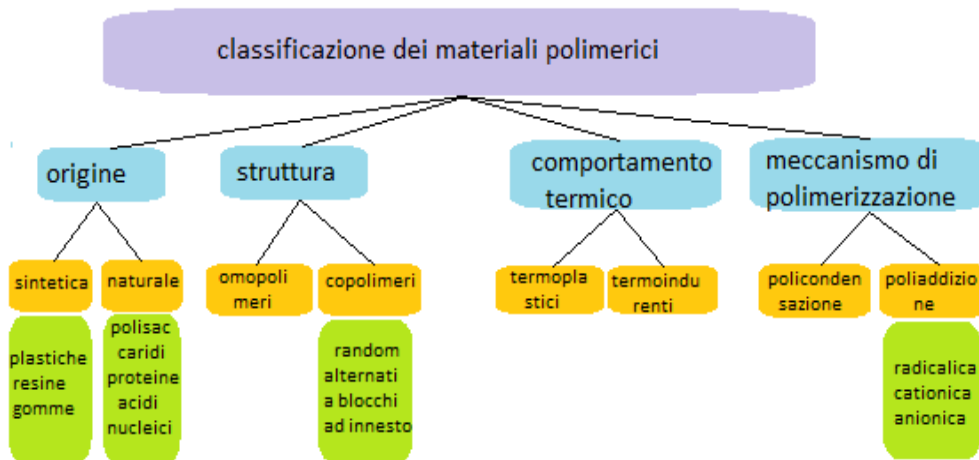


Figura 1.4 - Classificazione dei materiali polimerici.

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.

1.2.2 Meccanismi di polimerizzazione

I materiali polimerici vengono ottenuti mediante polimerizzazione, un processo che prevede l'unione di più molecole monomeriche. Generalmente i monomeri sono ottenuti da petrolio, carbone e gas naturale. Di recente, tuttavia, è cresciuto sempre più l'interesse per la valorizzazione della biomassa non alimentare e degli scarti industriali. La ricerca accademica ed industriale mira dunque sempre più alla preparazione di polimeri *bio-based*, cioè ottenuti da fonti rinnovabili, in sostituzione ai tradizionali polimeri sintetici derivati da petrolio.

Le macromolecole sono costituite dalla ripetizione di semplici unità strutturali tenute insieme da legami chimici primari (covalente, ionico), e nel suo complesso il polimero risulta formato da macromolecole unite da legami chimici secondari (forze di Van der Waals, interazioni dipolo-dipolo).

Esistono due diversi processi di polimerizzazione: poliaddizione e policondensazione.

La **poliaddizione** è possibile quando la molecola del monomero contiene legami coniugati fra gli atomi di carbonio. Infatti, attraverso la rottura di un doppio legame è possibile rendere attivo il monomero, il quale a sua volta si addiziona ad altri monomeri fino a quando, attraverso la disattivazione, la macromolecola diventa stabile. Le tre fasi del processo di poliaddizione si chiamano:

- 1) fase di inizio;
- 2) fase di accrescimento;
- 3) fase di terminazione.

La reazione può iniziare per mezzo del calore, della luce o di una sostanza chimica appositamente additivata al monomero, chiamata iniziatore. L'iniziatore può essere un radicale libero (polimerizzazione radicalica), un carbocatione (polimerizzazione cationica) oppure un carboanione (polimerizzazione anionica).

Le caratteristiche della poliaddizione sono la totale assenza di sottoprodotti di reazione, il rapido accrescimento del peso molecolare delle catene, la presenza di monomero nel prodotto di reazione, la cui concentrazione diminuisce progressivamente durante il progredire della reazione. Infatti, il prodotto della poliaddizione è un limitato numero di catene polimeriche di elevatissimo peso molecolare e parziale residuo monomero.

La **policondensazione** prevede la reazione tra due monomeri mediante liberazione di prodotti secondari quali acqua, metanolo, cloruro di sodio, acido cloridrico. La

presenza di sottoprodotti di reazione può essere importante quando la reazione di polimerizzazione deve avvenire, almeno nella sua fase finale, all'interno dell'organismo o comunque in un ambiente che non deve essere contaminato da tali prodotti secondari. Inoltre, i policondensati hanno una velocità di reazione più lenta rispetto ai polimeri di poliaddizione, ma che coinvolge tutta la massa di sostanze reagenti. Infatti, tutte le molecole presenti possono reagire contemporaneamente e i monomeri si esauriscono fin dalle prime fasi della polimerizzazione. La rimozione dei sottoprodotti dal mezzo di reazione permette quindi di spostare la reazione verso i prodotti, appunto, diminuendo il tempo necessario alla reazione ed aumentando la resa finale.

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 1.5**).

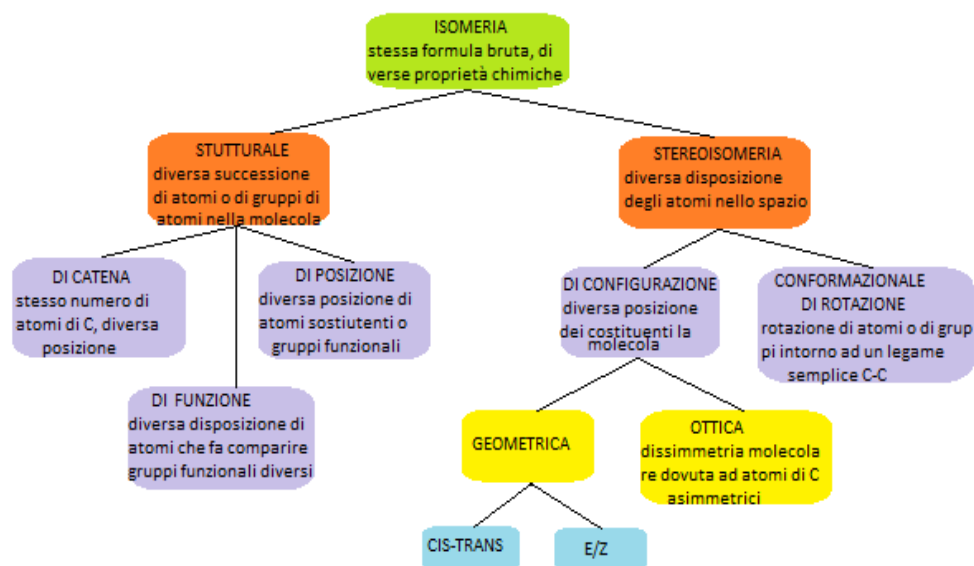


Figura 1.5 - Diverse tipologie di isomeria.

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 1.6**, relativamente alla configurazione molecolare: lineare, ramificata e reticolata.

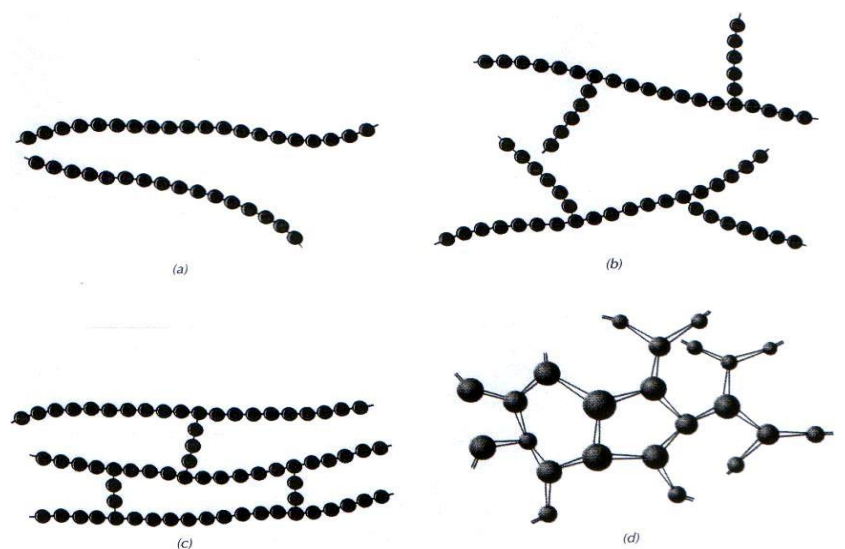


Figura 1.6 - Strutture macromolecolari dei polimeri: a) lineare, b) ramificata, c) e d) reticolata

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;

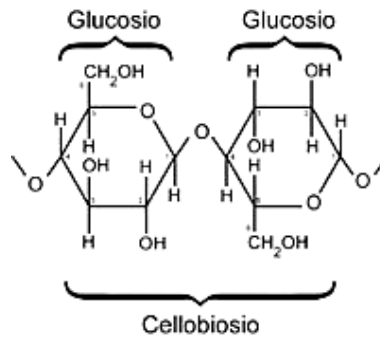


Figura 1.7 - Struttura della cellulosa.

- 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;

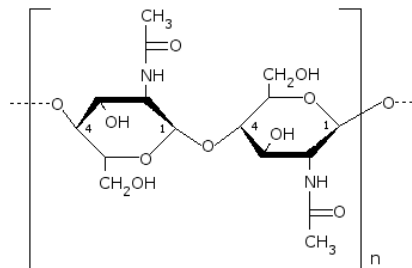


Figura 1.8 - Struttura della chitina.

- 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'albume 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 1.9 - 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 rilascio controllato di farmaci;

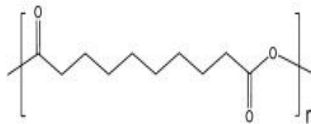


Figura 1.10 - Esempio di polianidride.

- 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;

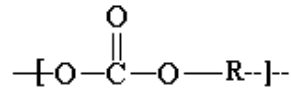


Figura 1.11 - Acido carbonico, unità strutturale dei policarbonati alifatici.

- Poliammidi: 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 1.12 - 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.

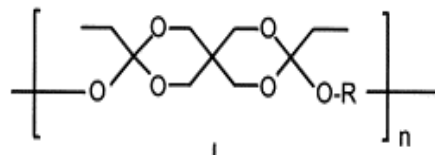


Figura 1.13 - Esempio di poliortoestere.

1.2.3 Lavorazione dei polimeri

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 o barre. Questi ultimi possono essere lavorati con macchine utensili mediante i tradizionali metodi di asportazione di truciolo, 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 1.14**.

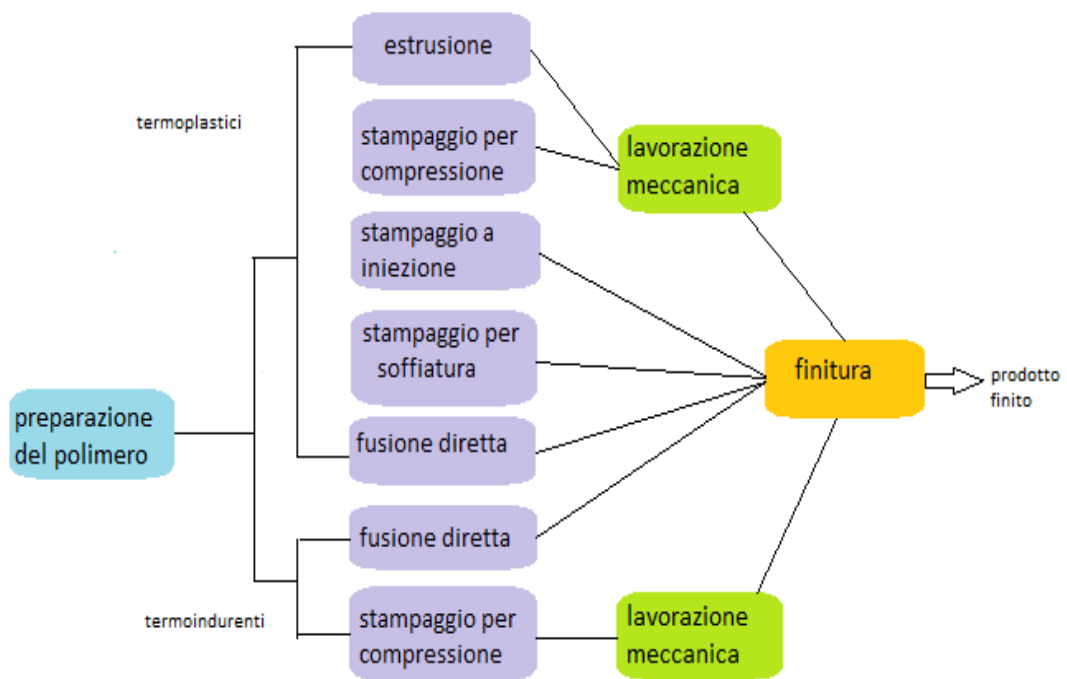


Figura 1.14 - Fasi della lavorazione dei materiali polimerici.

In generale, i polimeri termoplastici vengono riscaldati fino al rammollimento e quindi modellati prima che raffreddino. 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: prevede l'utilizzo di una lastra preformata, e la successiva applicazione di pressione spinge la resina preriscaldata contro le pareti dello stampo.
- 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. 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 l'applicazione di vuoto.

Un ulteriore metodo di lavorazione dei materiali polimerici è l'estrusione, cioè l'operazione di compattamento e fusione 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).

1.2.4 Copolimeri

I copolimeri prevedono l'inserimento di un secondo monomero nella catena principale di un polimero, consentendo di modulare molte proprietà di grande valore

applicativo, anche con modeste quantità del secondo componente. La disposizione del secondo monomero rispetto al primo, la sua concentrazione relativa, l'influenza del secondo componente sul processo di sintesi e sulla struttura finale della macromolecola, sono aspetti che hanno implicazioni a livello di meccanismo di reazione, assetto delle catene nello stato solido, influenzando significativamente sulle proprietà fisiche e chimiche del copolimero [1]

La definizione completa della struttura di un copolimero richiede la determinazione di diversi parametri e la possibilità di poterli calcolare sulla base di modelli cinetici o statistici che consentono di descrivere i processi di concatenamento delle unità monomeriche e la loro distribuzione nelle catene.

Occorre conoscere:

- 1) La composizione, cioè il quantitativo relativo del monomero A e B, e la distribuzione delle composizioni.
- 2) La tipologia delle unità ripetitive derivanti da A e B nella catena, rispetto alle caratteristiche intrinseche del monomero.
- 3) L'ordine di incorporazione di A relativamente a B, che comporta la formazione di sequenze monomeriche di diversa lunghezza e la loro distribuzione.
- 4) La dimensione delle catene (pesi molecolari) e la loro distribuzione.
- 5) La misura diretta delle costanti di velocità di propagazione e di terminazione da cui sono derivabili le grandezze di cui al punto precedente.
- 6) La presenza di ramificazioni, ciclizzazioni o reticolazioni, risultanti da processi non controllati.

I copolimeri sono classificabili in 4 grandi gruppi:

- 1) **Copolimeri statistici o random**, aventi una distribuzione casuale dei monomeri secondo le leggi della distribuzione statistica di Markov del 1° ordine.



- 2) **Copolimeri a blocchi**, in cui esistono lunghe sequenze lineari di un monomero o di entrambi.



- 3) **Copolimeri alternati**, con distribuzione regolarmente alternata dei comonomeri.

temperatura di lavorazione, li rende particolarmente idonei nell'ambito del rilascio controllato di farmaci, vaccini, peptidi, proteine e altri composti di natura biologica, i quali risentono negativamente delle alte temperature [2].

1.3.1 Strategie di 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)**.

Per quanto riguarda la prima, si tratta di un meccanismo a stadi in cui vengono impiegati come reagenti dioli e diacidi oppure un acido idrossilico, al fine di ottenere polimeri ad alto peso molecolare; la formazione del legame chimico tra i monomeri comporta l'eliminazione di piccole molecole come ad esempio acqua, ammoniaca e acidi inorganici, identificate come prodotti secondari. Condizione necessaria affinché tale meccanismo abbia luogo è la presenza, tra i due monomeri coinvolti nella formazione del legame, di altrettanti gruppi funzionali che possano interagire tra loro. Le problematiche principali relative alla policondensazione sono legate alle alte temperature e ai lunghi tempi di reazione, alla necessità di rimuovere costantemente i prodotti secondari di reazione e di avere sempre un preciso bilanciamento stechiometrico tra gruppi acidi e gruppi ossidrilici. Risulta inoltre necessario ottenere strutture con elevato peso molecolare per garantire buone proprietà meccaniche, condizione spesso difficile da raggiungere data l'elevata volatilità dei monomeri e la presenza di reazioni collaterali. Un approccio sintetico relativamente nuovo prevede la realizzazione mediante policondensazione di poliesteri a basso peso molecolare (5000-10000 Da) che presentano un'alta percentuale di gruppi terminali ossidrilici, i quali vengono fatti reagire successivamente con un estensore di catena, generalmente un isocianato a doppia funzionalità, che per formazione di un legame uretanico con gli idrossili terminali del poliestere permette un veloce accrescimento della lunghezza delle catene e quindi del peso molecolare. I polimeri così ottenuti vengono chiamati poli(esteri uretani) (PEU), proprio per la presenza del legame uretanico tra due catene di poliestere, e presentano proprietà intermedie tra queste due categorie di polimeri.

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 [3]. La ROP di lattoni costituisce il metodo classico 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 (**Figura 1.16**). 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.

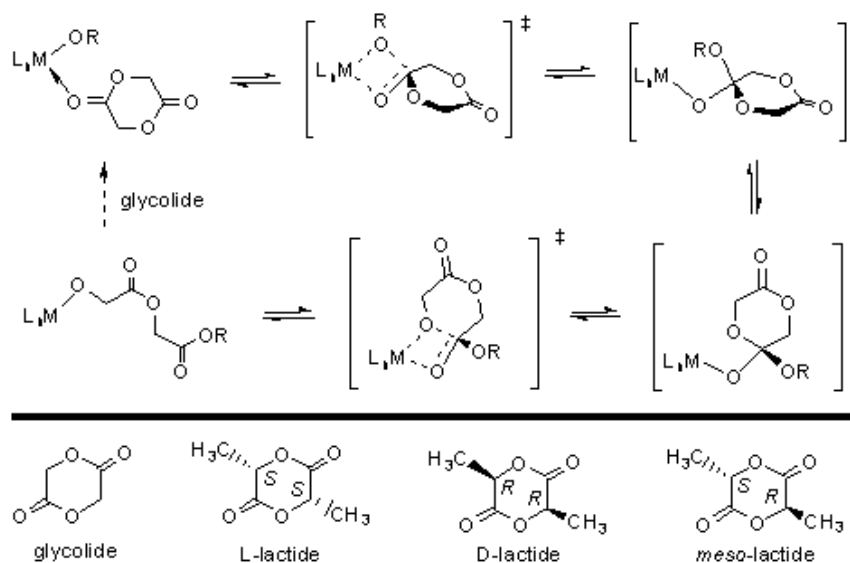


Figura 1.16 - ROP del lattide.

1.3.2 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 ramificazioni è associato ad un abbassamento della viscosità allo stato fuso.

Le proprietà del polimero sono inoltre 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 proprietà migliorate.

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 intervallo 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.

1.3.3 Cristallinità

Lo stato cristallino di un materiale è la disposizione geometricamente ordinata degli atomi costituenti entro la cella elementare. Il grado di cristallinità è 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: 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 1.17**).

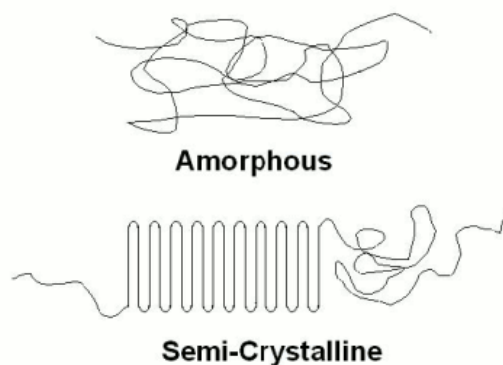


Figura 1.17 – Struttura amorfa e cristallina di materiale polimerico.

Nessun polimero è completamente cristallino: in genere i polimeri sono materiali semicristallini, cioè in cui si possono distinguere zone cristalline e zone amorfe. Il grado di cristallinità varia da zero a poche unità in molti polimeri, specie con monomeri fortemente asimmetrici, fortemente ramificati o con frequenti legami trasversali, mentre raggiunge percentuali elevatissime nei polimeri a struttura lineare non ramificata. Inoltre il grado di cristallinità dipende dalla storia meccanica e termica del materiale. Infatti, soprattutto nel caso di lunghe catene lineari, lavorazioni quali la laminazione, lo stiro e l'estrusione, specialmente se effettuate a temperature opportune, tendono a orientare le molecole favorendo la formazione di regioni cristalline.

In generale, un maggior grado di cristallinità determina un maggior impacchettamento delle macromolecole con conseguente aumento della densità. Inoltre si ha un aumento delle proprietà meccaniche come la rigidità e, soprattutto

ad alte temperature, un minor coefficiente di attrito e quindi migliore resistenza all'usura, maggiore durezza, maggiore resistenza all'aggressione ambientale e maggiore resistenza al *creep*.

I polimeri amorfi risultano spesso trasparenti. Questo perché i polimeri sono materiali che non assorbono la radiazione di luce visibile; nel caso che il materiale non sia omogeneo (materiale semicristallino) i fenomeni di riflessione e rifrazione su ciascuno delle superfici delle diverse fasi presenti all'interno del materiale deviano i raggi secondo diverse direzioni. Un polimero puramente amorfo quindi è sempre trasparente perché omogeneo, mentre un polimero semicristallino sarà tendenzialmente opaco a causa della presenza contemporanea di zone amorphe e zone cristalline con indici di rifrazione differenti. Potrebbe comunque risultare trasparente se le dimensioni della luce dispersa fossero inferiori alla lunghezza d'onda della luce incidente.

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: poliesteri a struttura lineare o ramificata, con bassa resistenza termica e buona capacità di resistenza ai cicli termici in opportuni intervalli di temperatura mostrando un rammollimento privo di trasformazioni chimici. Risultano pertanto modellabili plasticamente un numero pressoché illimitato di volte.
- termoindurenti: poliesteri a struttura reticolata, nei quali la somministrazione di calore inizialmente ne consente la formatura per un primo rammollimento, a cui segue il completamento della polimerizzazione attraverso trasformazioni chimiche che implicano l'irreversibilità nelle proprietà di durezza e rigidità della sostanza, impedendone una successiva modellazione plastica. I termoindurenti presentano generalmente migliori caratteristiche meccaniche rispetto ai termoplastici, a causa del *cross-linking* tridimensionale, e resistono meglio ad elevate temperature (sotto il punto di fusione). Presentano inoltre temperature di transizione vetrosa più alte.

1.3.4 Proprietà termiche

Analizzando l'andamento del modulo elastico di un polimero in funzione della temperatura è possibile individuare delle temperature caratteristiche (**Figura 1.18**):

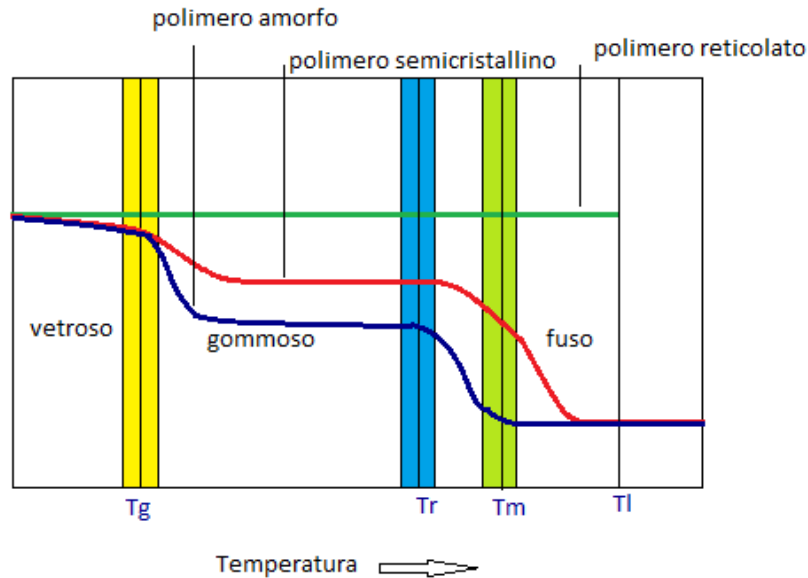


Figura 1.18 - Andamento del modulo di elasticità, in funzione della temperatura, per polimeri a differente struttura (polimero amorfo, polimero semicristallino e polimero reticolato).

- 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, quali la presenza di forti legami intermolecolari tra le catene che ne determina un aumento, mentre 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.

- Temperatura limite di stabilità chimica (T_L): massima temperatura oltre la quale il polimero perde la sua struttura ed ogni tipo di caratteristica meccanica.
- Temperatura di rammollimento (T_r): che stabilisce la soglia termica alla quale si concretizza il passaggio dallo stato gommoso a quello liquido; rappresenta l'analogo della T_m per i materiali amorfi.

1.3.5 Massa e peso molecolare

La maggior parte dei sistemi polimerici non presentano uniformità per quanto riguarda massa, forma e dimensione. Solo alcune sostanze di origine naturale, per esempio le proteine globulari, presentano caratteristiche di uniformità. Da ciò deriva la necessità di affrontare il problema delle masse molecolari in termini statistici, definendo dei valori medi e individuando le funzioni che ne descrivono la distribuzione (**Figura 1.19**).

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 polidispersità, definito come:

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

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 D vale 2. Valori del grado di polidispersità inferiori e superiori

a questo identificano, rispettivamente, distribuzione dei pesi molecolari strette e larghe.

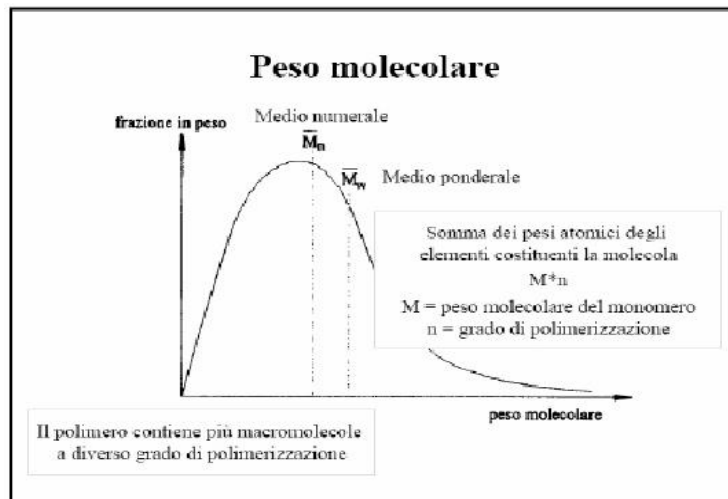


Figura 1.19 – Grafico del peso molecolare in funzione della frazione in peso.

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.

1.3.6 Biodegradazione dei materiali polimerici

Il corpo umano è un ambiente acquoso altamente aggressivo, la cui temperatura è stabilizzata a 37°C ed il cui pH è mantenuto ad un valore medio pari a 7,4. I materiali impiantati sono soggetti a processi di degradazione sia passivi che attivi. La soluzione salina presente nel corpo umano è, infatti, un eccellente elettrolita che facilita i meccanismi di corrosione elettrochimica e di idrolisi. Nei tessuti, inoltre, sono presenti numerose molecole e cellule che hanno la capacità di catalizzare determinate reazioni chimiche o di isolare, attaccare e distruggere rapidamente i corpi estranei. Per cui, la biodegradazione avviene mediante due modalità: erosione di *bulk* (idrolitica) ed erosione superficiale (enzimatica) (**Figura 1.20**). La differenza di queste due modalità riguarda il volume di campione interessato dal fenomeno: nel primo caso si ha perdita di massa nell'intero volume, poiché l'acqua penetra più rapidamente del processo erosivo, mentre nel secondo caso vengono interessate

solamente le porzioni esterne, perché 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.

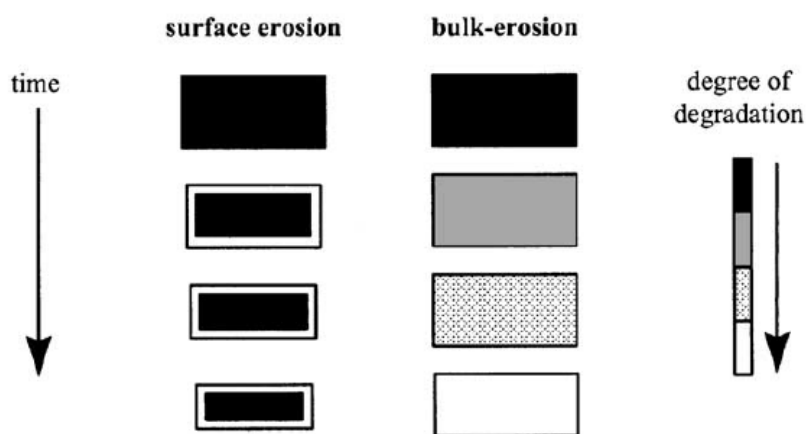


Figura 1.20 - Meccanismi di degradazione: superficiale e di *bulk*.

E' 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.

1.3.7 Poliesteri alifatici per uso biomedicale

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

- Acido poliglicolico (PGA): 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 rapida degradazione in vivo mediante idrolisi comporta una notevole perdita di prestazioni meccaniche dopo 1-2 mesi e perdita quasi totale di peso in 6-12 mesi, mentre nel corpo umano avviene la frammentazione in glicina (successivamente secreta attraverso l'urina o convertita in diossido di carbonio e acqua tramite il ciclo dell'acido citrico). Questo permette l'impiego di tale polimero, generalmente copolimerizzato, come materiale per suture chirurgiche, le quali 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.

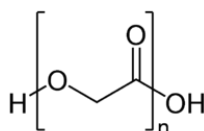


Figura 1.21 - Unità monomerica del PGA.

- Acido polilattico (PLA): derivante dalla policondensazione dell'acido lattico o dalla ROP del dimero ciclico lattato, 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. 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 rigidità. 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.

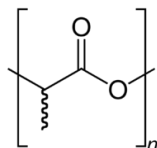


Figura 1.22 - Unità monomerica del PLA.

- Poli (ϵ -caprolattone) (PCL): sintetizzato 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. A temperatura ambiente si trova nello stato gommoso e presenta un'elevata elongazione finale (>700%), caratteristiche che 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.

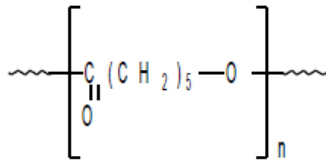


Figura 1.23 - Struttura del PCL.

- Acido polilattico-co-glicolico (PLGA): 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 Tg 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, microsfeere e microcapsule è impiegato per dispositivi a rilascio controllato di farmaci, farmaci chemioterapici, antibiotici, proteine, analgesici, antinfiammatori, molecole di RNA [4]. 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.

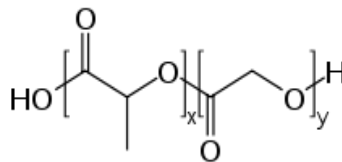


Figura 1.24 - Unità monomerica del PLGA.

1.4 L'INGEGNERIA TISSUTALE

L'ingegneria tissutale, attualmente, ricopre un ruolo fondamentale nella medicina rigenerativa.

Il primo tentativo ufficiale di definire l'ingegneria tissutale si è verificato durante il *1st Tissue Engineering Symposium*, tenutosi nel 1988 in California, come *“l'applicazione dei principi e dei metodi dell'ingegneria e delle scienze della vita per comprendere a fondo la relazione che esiste tra struttura e funzione nei tessuti viventi normali e patologici, per lo sviluppo di sostituti biologici che possano ripristinare, mantenere e migliorare la funzione tissutale”*. La necessità era quella di inquadrare una nuova tendenza della ricerca medica e coordinare i molti progressi già raggiunti nelle più svariate aree scientifiche, per trasferirne i frutti alla pratica clinica. Questa grande operazione vide scienze come l'ingegneria, la chimica, la fisica, la biologia, le biotecnologie e la medicina confrontarsi ed impegnarsi in un approccio multidisciplinare all'ingegneria dei tessuti. La nuova strategia, infatti, consisteva nell'avvalersi di cellule viventi (e/o loro prodotti) e di supporti innovativi, per sviluppare sostituti tissutali bioattivi in alternativa agli impianti inerti. Lo sviluppo di questa biotecnologia apre la strada a nuove possibilità di cura e a una migliore qualità della vita dei pazienti [5].

Gli studi nell'ambito dell'ingegneria tissutale, sono realizzati perseguendo parallelamente lo sviluppo di una sempre maggiore varietà di costrutti ingegnerizzati e la considerazione delle qualità funzionali e meccaniche che questi devono possedere per adempiere le funzioni e soddisfare gli intenti proposti. Primo fra tutti superare i limiti dei trattamenti convenzionali di trapianto d'organo e impianto protesico. Infatti, i trapianti sono tra le terapie più sofisticate e economicamente onerose, ma allo stesso tempo risultano complicate sotto altri aspetti, quali una significativa insufficienza di donatori e la necessità che i soggetti trapiantati vengano sottoposti cronicamente a regimi terapeutici immunosoppressivi, i quali aumentano eventuali effetti collaterali. La prospettiva finale è non dover far più ricorso al trapianto di organi, consentendo ai tessuti danneggiati o malati di rigenerare se stessi [6].

L'organo artificiale è il dispositivo che meglio rappresenta la classe delle apparecchiature mediche in relazione ai problemi di progettazione. Nel progettare un

organo artificiale si ha come obiettivo quello di realizzare un dispositivo capace di replicare le funzioni di un organo o di un tessuto di origine naturale. Ciò evidentemente riduce i gradi di libertà del progetto, in quanto le specifiche funzionali, cioè le prestazioni, sono fissate abbastanza rigidamente. Inoltre, se, come auspicabile, l'organo artificiale deve essere in grado di sostituire fisicamente l'organo naturale, anche gli ingombri, la forma, le interfacce, le masse e le altre proprietà fisiche sono da mantenere invariate. Globalmente quindi il progettista ha una grande quantità di vincoli [7].

L'ingegneria tissutale vede l'impiego di tre differenti supporti:

- **cellule**: adatte al tipo di tessuto che si vuole rigenerare. Le cellule impiegate possono essere di vario tipo:
 - autologhe: prelevate dallo stesso individuo su cui sarà eseguito l'impianto. Questo tipo di cellule abbatte drasticamente i problemi di rigetto e di trasmissione di malattie;
 - allogeniche: provenienti da un donatore della stessa specie;
 - xenogeniche: ottenute da un donatore di un'altra specie;
- **scaffold**: fornisce un supporto tridimensionale alle cellule. Materiali, struttura e forma sono scelti a seconda della specifica applicazione;
- **molecole segnale**: fattori di crescita e proteine di adesione che trasmettono alle cellule lo stimolo per colonizzare e diffondere all'interno dei materiali. L'utilizzo di molecole segnale permette di condurre colture cellulari dinamiche, ovvero sollecitare cellule in coltura mediante l'applicazione di stimoli biofisici controllati e riproducibili.

Lo sviluppo dei nuovi biomateriali attraverso tecniche di ingegneria tissutale (**Figura 1.25**), studia come ottenere le condizioni per la rigenerazione quando il corpo umano stesso non possiede il potenziale per ricostituire il tessuto. Ciò avviene usando sostituti biologici viventi attraverso la selezione, l'espansione e la modulazione delle cellule progenitrici in combinazione con materiali che supportino e guidino la rigenerazione. Le cellule capaci di iniziare e sostenere il processo vengono attivate attraverso segnali biologici come fattori di crescita o geni, in modo tale da generare nuovi e funzionali tessuti del tipo richiesto. Si possono ingegnerizzare, inoltre, le matrici che circondano i materiali per facilitare la crescita delle cellule ottenendo una rigenerazione in siti ossei o cartilaginei [8].

Le cellule staminali hanno ricevuto attenzione come potenziali risorse dell'ingegneria tissutale. La ricerca nel campo della biologia cellulare ha sviluppato metodi che consentono di prelevare cellule staminali embrionali, cellule progenitrici o cellule già specializzate, e successivamente utilizzarle nella riparazione di lesioni e nella rigenerazione di tessuti mediante coltura su *scaffolds*. Alcuni tessuti ingegnerizzati, come quelli dell'epidermide e della cartilagine vengono attualmente impiegati in clinica, altri, tra cui l'osso, i tendini, i legamenti, le pareti vascolari e gli epiteli, sono ancora in una fase di specializzazione, benché l'applicazione clinica sia vicina. A titolo di esempio, si può citare la cute artificiale, che permette il trattamento di lesioni cutanee e specialmente delle ustioni profonde.

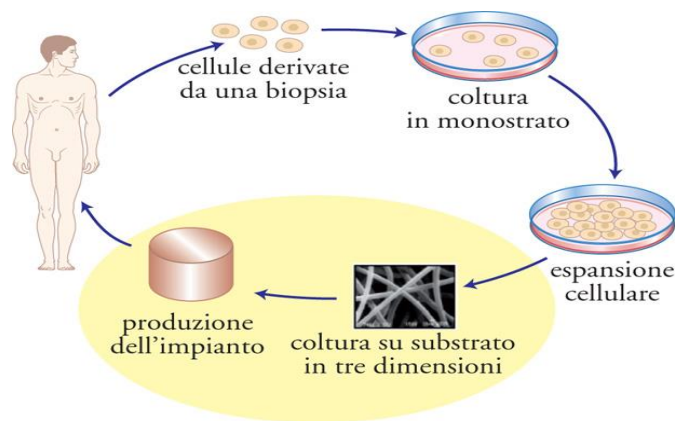


Figura 1.25 - Processo di creazione di un impianto per ingegneria tissutale.

1.4.1 Scaffolds

La realizzazione di un tessuto ingegnerizzato comincia dalla progettazione e costruzione di un costrutto a struttura tridimensionale, noto con il nome di *scaffold*, che faccia da substrato alla crescita delle cellule che daranno origine al nuovo tessuto.

Le caratteristiche peculiari che un biomateriale deve presentare per questa applicazione si possono riassumere come segue:

- 1) essere biodegradabile e biocompatibile, possedere proprietà fisiche e meccaniche confrontabili con quelle del tessuto da sostituire;
- 2) produrre cataboliti atossici e promuovere l'adesione e la proliferazione cellulare;

3) essere riconoscibile dalle cellule tessutali e dagli enzimi della matrice extracellulare (ECM);

4) essere angiogenico e suturabile, nonché caratterizzato da bassa trombogenicità ed immunogenicità.

Gli *scaffolds* non sono dunque supporti meccanici passivi, ma partecipano attivamente alla ricostruzione dei tessuti (**Figura 1.26**). Provvedono alla stabilità meccanica della struttura, necessaria per l'organizzazione tridimensionale delle cellule che si devono sviluppare fino alla formazione del tessuto. Durante questa operazione, il materiale polimerico viene assorbito dalle cellule ospiti con una velocità di degradazione uguale a quella di biosintesi cellulare.

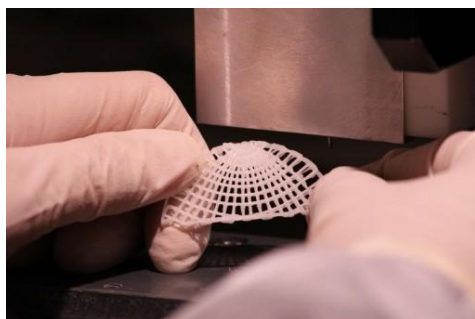


Figura 1.26 - Scaffold utilizzato in ingegneria tissutale in materiale polimerico

I requisiti che questi supporti devono possedere sono:

- porosità elevata e tridimensionale attraverso una rete di pori interconnessi che permettono la crescita cellulare, il trasporto dei nutrienti e l'eliminazione dei cataboliti, evitando la formazione di zone non vascolarizzate;
- velocità di degradazione e riassorbimento controllabile e proporzionale alla crescita del tessuto;
- superficie chimicamente adatta all'adesione, proliferazione e differenziazione cellulare;
- proprietà meccaniche il più possibile simili a quelle dei tessuti che si trovano nel sito d'impianto;
- riproducibilità in forme e dimensioni differenti;
- diametro dei pori opportuno (compreso tra 200 e 500 μm).

Queste proprietà dipendono da due livelli di organizzazione del materiale che compone lo *scaffold*:

- livello microscopico: le proprietà chimiche superficiali determinano l'adesione, la proliferazione cellulare e l'interazione con le proteine che regolano la risposta immunitaria dell'organismo, per cui si richiede un buon rapporto di area di superficie/volume;
- livello macroscopico: le proprietà strutturali nel complesso determinano le risposte meccaniche, quali elasticità, resistenza alla compressione, capacità di trasmettere carichi.

Uno dei fattori più importanti da tenere in considerazione è, quindi, il materiale utilizzato per produrre i costrutti. In base al tipo di tessuto da ricreare e delle sue applicazioni specifiche, verranno utilizzati materiali differenti. La caratteristica principale dei materiali da utilizzare sono la biocompatibilità, in modo tale da non provocare una risposta indesiderata dell'organismo, e la biodegradabilità, in modo da garantire il riassorbimento simultaneamente alla crescita cellulare, per essere quindi gradualmente sostituiti dai nuovi tessuti in un tempo di degradazione ragionevole, senza rilasciare prodotti tossici per l'organismo.

1.4.2 Molecole segnale

Per favorire la rigenerazione del tessuto non è sufficiente solamente la corretta interazione tra cellule e supporti, ma è fondamentale fornire alle cellule stesse opportuni segnali che ne regolino la differenziazione, la migrazione e la proliferazione. Questi segnali sono comunemente rappresentati da fattori di crescita, particolari peptidi che, legandosi con i recettori transmembrana specifici della cellula bersaglio, forniscono l'informazione necessaria al nucleo per indurre un certo tipo di risposta. Tipicamente, questi polipeptidi esibiscono un range d'azione limitato, dovuto al difficoltoso processo di diffusione attraverso la matrice cellulare. L'ingegneria tissutale ha sviluppato strategie distinte per trasportarli: l'immobilizzazione chimica all'interno di una matrice degradabile e l'incapsulamento fisico all'interno di una membrana. Entrambi i metodi si basano su diffusione e rilascio nel tessuto circostante in maniera programmata, a loro volta facilitati dall'impiego di supporti tridimensionali degradabili, che consentono un alto livello di controllo sulla distribuzione del segnale [9].

1.4.3 Il ruolo dei materiali polimerici nell'ingegneria tissutale

Le ottime caratteristiche di biocompatibilità e la possibilità di immobilizzare cellule e biomolecole all'interno della matrice, permettono un ampio impiego dei materiali polimerici in ingegneria tissutale.

Numerosi polimeri sintetici, tra cui l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PLG) e l'acido poli(DL-lattico-co-glicolico) (PLGA) sono stati utilizzati per la produzione di *scaffolds*. Tutti i materiali hanno dimostrato una buona possibilità di controllo della degradazione attraverso la variazione della composizione chimica e la fabbricazione con architettura prestabilita, ma presentano contemporaneamente svantaggi per la ridotta bioattività. Inoltre, i processi degradativi del PLA e del PLGA producono diossido di carbonio, che abbassa localmente il valore del pH, portando alla necrosi di parti di tessuto [10].

La ricerca si è quindi spostata verso l'uso di polimeri naturali, per definizione biocompatibili, nonché biologicamente attivi, in grado di promuovere la crescita e la specializzazione cellulare, come collagene e proteoglicani. Gli svantaggi presentati da questi materiali consistono principalmente nella difficoltà di riprodurre esattamente la struttura desiderata. Inoltre, generalmente presentano basse proprietà meccaniche, che ne impediscono l'uso in molti settori, soprattutto quello ortopedico. Vista l'impossibilità di mantenere accettabili simultaneamente tutte le proprietà richieste da parte di un singolo omopolimero, si sono sviluppati materiali copolimerici che permettono, mediante l'inserimento di percentuali variabili di differenti unità monomeriche, di modulare alcune caratteristiche, come cristallinità, idrofilicità, velocità di degradazione, proprietà meccaniche. Inoltre, tali polimeri, essendo di natura sintetica, garantiscono l'uniformità e la riproducibilità dei prodotti ottenuti [11].

I materiali polimerici attualmente più studiati sono i poliesteri, i poli(ortoesteri), le polianidridi, e le poliammidi. In ambiti più specifici, come ad esempio l'ingegneria tissutale delle ossa, sono allo studio sistemi a base di poli(propilene fumarato) (PPF) e di poliidrossialcanoati (PHA), per le loro caratteristiche di rigidità e trasmissibilità dei carichi.

1.5 SISTEMI A RILASCIO CONTROLLATO DI FARMACI

Negli ultimi trent'anni la ricerca nel settore farmaceutico ha focalizzato l'attenzione sullo sviluppo di formulazioni in grado di liberare il farmaco nell'organismo in quantità e velocità controllata.

In commercio esistono numerose formulazioni farmaceutiche che garantiscono un rilascio ritardato, o mediante le quali la velocità e la durata della liberazione del principio attivo possono essere programmate. Tali formulazioni sono definite sistemi a rilascio controllato del farmaco (*drug delivery systems*). Questi dispositivi presentano dimensioni micro e nanometriche, e permettono di massimizzare l'efficienza dei trattamenti terapeutici, in quanto garantiscono il raggiungimento specifico del sito da trattare e un'azione mirata senza intervenire su cellule e tessuti sani, a vantaggio del paziente, implementando l'efficacia e riducendo la tossicità della terapia medica.

La farmacocinetica è una disciplina medica che studia quantitativamente come una molecola viene assorbita, distribuita, metabolizzata ed escreta dopo l'assunzione. Lo studio dell'andamento nel tempo della concentrazione di farmaco e dei suoi metaboliti in fluidi, tessuti ed escreti dell'organismo permette di scegliere la dose, la via e la forma di somministrazione migliore per ottenere l'effetto desiderato. Il rilascio controllato di una molecola rappresenta una nuova prospettiva terapeutica per la somministrazione alternativa di farmaci, soprattutto in malati cronici in cui si manifesta la necessità di dosi elevate e costanti di uno specifico medicinale, le quali spesso presentano numerosi effetti collaterali derivanti dal loro utilizzo prolungato.

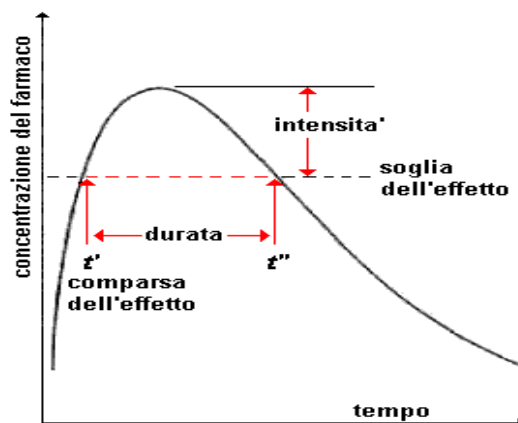


Figura 1.27 – Diagramma dei rapporti tra parametri farmacodinamici e concentrazioni tissutali di una sostanza assunta per via orale.

Soprattutto nel caso di farmaci con emivita breve è indispensabile l'utilizzo di trattamenti ripetuti per mantenere un adeguato livello terapeutico nell'organo prescelto, che si traducono in un aumento di tipo pulsatile della concentrazione del farmaco nel plasma, 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 (**Figura 1.27**).

La tecnologia del rilascio controllato (**Figura 1.28**) pone come obiettivo l'eliminazione di questi problemi mediante l'utilizzo di sistemi, generalmente polimerici, che consentono di:

- 1) mantenere costante l'azione del farmaco, conservando per un determinato intervallo di tempo la concentrazione desiderata nel corpo umano, riducendo contemporaneamente gli effetti collaterali associati ad un modello cinetico ad iniezioni successive;
- 2) localizzare spazialmente l'azione del farmaco, limitandola alla zona che necessita del trattamento;
- 3) specificare il target d'azione del farmaco mediante l'utilizzo di vettori o derivatizzazioni chimiche;
- 4) creare condizioni per il rilascio riproducibili, prevedibili e controllabili.

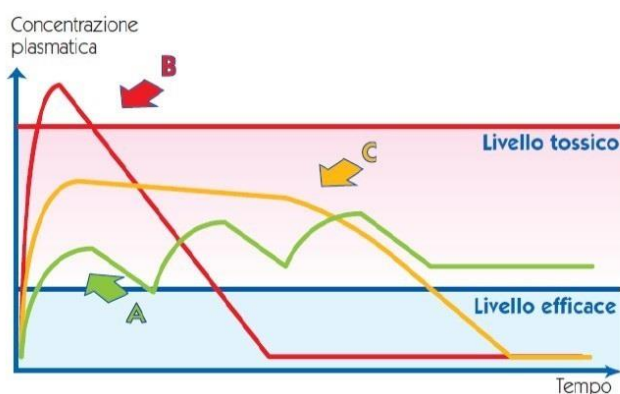


Figura 1.28 – A) somministrazioni ripetute di compresse a rilascio convenzionale; B) superamento della dose tossica conseguente la somministrazione di una compressa a rilascio convenzionale; C) somministrazione di una compressa a rilascio prolungato.

Risulta così evidente come, agendo sulla distribuzione spaziale e temporale del farmaco, si possono 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, ormoni steroidei, anestetici e 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 [12].

1.5.1 Tipologie di sistemi a rilascio controllato

I sistemi di trasporto possono essere classificati a seconda del meccanismo alla base del rilascio come:

- **Sistemi a diffusione controllata:** sfruttano il meccanismo di diffusione del farmaco attraverso il polimero, che sarà biodegradato una volta assolto il proprio compito. Generalmente si utilizzano sistemi a serbatoio cavi in cui un nucleo interno di farmaco è circondato da una membrana polimerica. Il trasporto avviene tipicamente secondo meccanismi di diffusione, con cinetica tipicamente di ordine zero fintantoché il farmaco si mantiene in alta concentrazione all'interno della membrana. Una seconda tipologia prevede che il farmaco sia dissolto uniformemente in una matrice polimerica. Questa modalità presenta una cinetica di primo ordine, in cui si ha un alto tasso di diffusione inizialmente, che decresce a causa dell'aumento del percorso di diffusione e alla diminuzione di area all'aumentare del processo.
- **Sistemi controllati chimicamente:** il rilascio ha luogo in ambiente acquoso, dove il polimero si degrada a seguito della rottura per via idrolitica o enzimatica delle catene sia superficiali che del *bulk*. Ciò evita la necessità di una successiva rimozione chirurgica, ma allo stesso tempo occorre essere certi che i prodotti di degradazione non provochino reazioni tossiche o cancerogene all'organismo ospite, condizione abbastanza difficile da raggiungere. Nei sistemi a catena pendente la molecola del farmaco è legata chimicamente al polimero e viene rilasciata da una scissione idrolitica o enzimatica. La velocità di rilascio è legata alla velocità 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 idrogel sono particolari macromolecole a struttura reticolare create in modo da formare una maglia aggrovigliata che

funge da matrice per l'intrappolamento di farmaci. Quando questi idrogel vengono a contatto con un solvente compatibile termodinamicamente, le catene polimeriche si rilassano, permettendo un flusso di acqua verso l'interno e la diffusione verso l'esterno del farmaco.

- **Sistemi a rilascio modulato**: in questi sistemi il rilascio è controllato da stimoli esterni quali temperatura, pH, campi elettrici, campi magnetici, radiazione elettromagnetica, raggi UV, ecc. [13]

CAPITOLO 2

SCOPO DELLA TESI

Il recente sviluppo di scienze emergenti in ambito biomedicale, quali ingegneria tissutale e rilascio controllato di farmaci, ha posto i ricercatori di fronte a nuove sfide e nuove esigenze.

In particolare, i materiali impiegati devono rispondere a diversi requisiti, alcuni di carattere generale, tra cui biocompatibilità e biodegradabilità, e altri specifici di ciascuna applicazione, come ad esempio proprietà chimico/fisiche e meccaniche adeguate.

Tra le differenti classi di materiali, i polimeri sono senza dubbio quelli più comunemente impiegati, grazie soprattutto alla loro versatilità e facile lavorabilità, che ne consentono l'adattamento a diverse condizioni operative.

Per applicazioni di breve durata, in cui cioè viene richiesta una pronta degradazione del polimero al termine della vita utile, con rilascio di metaboliti non tossici per l'organismo, i poliesteri alifatici rivestono un'importanza cruciale. La presenza del legame estereo rende infatti questi polimeri suscettibili di idrolisi in condizioni fisiologiche; inoltre, risultano interessanti e promettenti grazie alle buone proprietà meccaniche, al costo relativamente contenuto delle materie prime e alla semplicità del processo di sintesi.

Come già illustrato nel capitolo introduttivo, i poliesteri alifatici più utilizzati in ambito biomedicale, grazie anche all'approvazione da parte della *Food and Drug Administration (FDA)* per applicazioni a contatto con il corpo umano, sono l'acido polilattico, l'acido poliglicolico, il policaprolattone e i loro copolimeri.

Questi, però, non risultano sempre ottimali, per cui si rende necessaria la realizzazione di materiali con proprietà differenti e ottimizzate per ciascuna tipologia di impiego.

In tale contesto si inserisce il presente lavoro di Tesi, che ha visto la sintesi e la caratterizzazione di nuovi poliesteri alifatici per usi biomedicali.

Una valida alternativa ai sopra citati poliesteri può essere rappresentata dal poli(propilene 1,4-cicloesandicarbossilato) (PPCE), 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 una rigidità eccessiva ed è caratterizzato da tempi di degradazione piuttosto lunghi. Come noto, le proprietà non soddisfacenti di un polimero possono essere migliorate attraverso copolimerizzazione. L'inserimento lungo la catena macromolecolare di unità comonomeriche presenta però alcuni svantaggi, tra cui un notevole abbassamento del punto di fusione.

Per superare tali problematiche si è pensato di adottare una particolare strategia di sintesi che prevede la realizzazione di prepolimeri a basso peso, successivamente combinati insieme tramite l'impiego di un estensore di catena (nel caso in esame un diisocianato), per ottenere un polimero con caratteristiche migliorate rispetto al materiale di partenza. La contemporanea presenza di segmenti differenti, di cui uno cosiddetto *hard* e l'altro *soft*, consente infatti di combinare una buona cristallinità e rigidità e un elevato punto di fusione garantiti dal segmento *hard*, con l'elasticità e flessibilità del segmento *soft*.

Come segmento *hard* è stato scelto il PPCE, mentre come segmento *soft* sono stati presi in esame due copolimeri statistici poli(propilene azelato/neopentilglicole azelato) (P(PA z_m NA z_n)) a diversa composizione molare.

Occorre sottolineare che praticamente tutti i monomeri impiegati nella sintesi, ossia il propandiolo, l'acido 1,4-cicloesandicarbossilico e l'acido azelaico, sono ottenibili non solo da risorse fossili, ma anche da fonti rinnovabili, permettendo così la realizzazione di poliesteri *bio-based*.

L'attività di ricerca qui illustrata si è articolata nelle seguenti fasi:

- preliminare ricerca bibliografica per focalizzare gli sviluppi recenti sull'argomento trattato;
- sintesi tramite policondensazione in massa degli oligomeri PPCE-OH, P(PA z_m NA z_n)-OH e loro purificazione;
- verifica della struttura chimica e della quantità di gruppi terminali ossidrilici tramite risonanza magnetica nucleare (NMR);
- sintesi dei copolimeri multiblocco tramite estensione di catena in presenza di esametilene diisocianato (HDI);
- caratterizzazione molecolare dei polimeri ottenuti mediante NMR e cromatografia a permeazione su gel (GPC);
- stampaggio in film sottili dei polimeri sintetizzati mediante pressofusione;

- caratterizzazione termica mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC) e analisi termogravimetrica (TGA);
- analisi diffrattometrica a raggi X;
- caratterizzazione meccanica dei campioni mediante prove a trazione;
- studi di biodegradabilità idrolitica in condizioni fisiologiche;
- analisi dei risultati ottenuti ed estrapolazione di correlazioni proprietà-struttura.

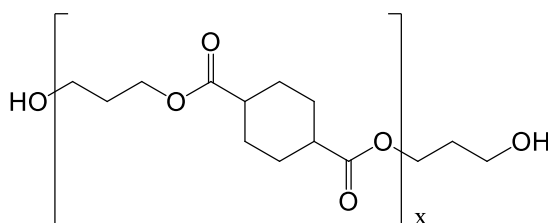
CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 SINTESI DI POLIMERI OH-TERMINATI E COPOLIMERI AD ELEVATO PESO MOLECOLARE

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

3.1.1 Sintesi di poli(propilene cicloesandicarbossilato) a basso peso molecolare (PPCE-OH)



L'omopolimero a basso peso molecolare è stato sintetizzato tramite policondensazione in massa a due stadi, utilizzando come monomeri di partenza acido 1,4-cicloesandicarbossilico (CE) e 1,3-propandiolo (PD), quest'ultimo impiegato in eccesso del 40% per assicurare la formazione preferenziale dei terminali idrossilici. La reazione è catalizzata dal titanio(IV)tetrabutossido (Ti(OBu)₄, TBT), caricato nel sistema di reazione in quantità pari a 150 ppm/grammo di polimero teoricamente ottenibile.

Il primo stadio della reazione è stato condotto alla temperatura di 180°C, sotto flusso controllato di azoto e con un'agitazione di 100 giri al minuto. In questa prima fase hanno luogo le reazioni di esterificazione diretta con successiva eliminazione di specie a basso peso molecolare, nel caso in esame molecole di acqua, allo scopo di spostare l'equilibrio della reazione verso i prodotti. Il secondo stadio ha inizio quando almeno il 90% dell'acqua teorica è raccolta nella trappola di condensazione mediante distillazione. Qui avvengono le reazioni di transesterificazione che, mantenendo i tempi di reazione non molto lunghi, portano alla formazione di

polimeri a basso peso molecolare. Durante questa fase la temperatura viene aumentata di 10°C ogni 30 minuti, fino al raggiungimento di 230°C. Contemporaneamente, la pressione all'interno del reattore viene ridotta fino a 0,09 mbar grazie all'impiego di una pompa da vuoto, al fine di rimuovere, tramite distillazione, l'eccesso di diolo. Una volta raggiunti i valori desiderati di temperatura e pressione, questi vengono mantenuti costanti fino al termine della reazione.

La strumentazione per la sintesi si compone di un reattore in vetro a tre colli, immerso in un bagno di sali inorganici (nitrati e nitriti di potassio e sodio) che garantiscono il mantenimento di una temperatura uniforme e costante (**Figura 3.1**). Il sistema che permette l'agitazione dei reagenti è di tipo meccanico, formato da un albero motore su cui sono posti degli estensimetri per la misura del momento torcente, necessario a mantenere costante la rotazione delle pale. Esse, infatti, a causa dell'aumento della viscosità del fluido, legato all'incremento del peso molecolare, incontrano maggiore resistenza al procedere della polimerizzazione. Temperatura e torque vengono costantemente monitorati durante la reazione.

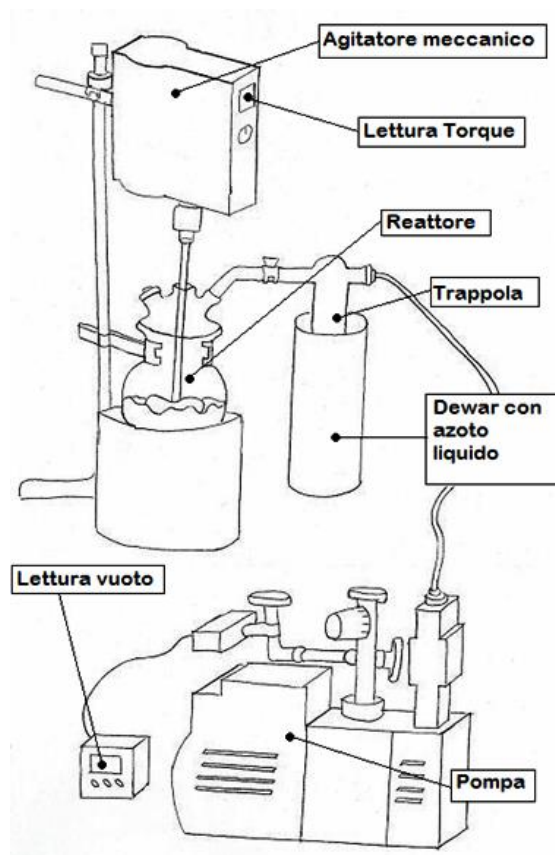
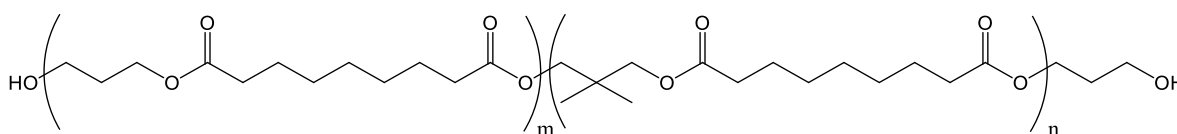


Figura 3.1 – Schema dell'apparecchiatura per la polimerizzazione.

In tutte le reazioni effettuate è stato impiegato un eccesso di diolo del 40%. 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. Per ogni reazione sono stati ottenuti circa 100 g di prodotto.

3.1.2 Sintesi di poli(propilene/neopentilglicole azelato) a basso peso molecolare (P(PAz_mNAz_n)-OH)



Le sintesi sono state eseguite, come nel caso precedente, attraverso una copolicondensazione in massa a due stadi a partire da acido azelaico (AAz), PD (eccesso 40%) e neopentilglicole (NG) (eccesso 40%) nelle stesse condizioni di temperatura e pressione impiegate per il PPCE-OH ed in presenza della stessa concentrazione di TBT. Tutti i reagenti e il catalizzatore sono stati caricati nel reattore di polimerizzazione simultaneamente all'inizio del processo di sintesi.

Sono stati così sintetizzati due copolimeri statistici a diversa composizione molare: in un primo caso è stato impiegato un rapporto molare tra il PD ed l'NG pari a 70:30 (P(PAz70NAz30)-OH), nel secondo invece pari a 85:15 (P(PAz85NAz15)-OH).

3.1.3 Purificazione dei polimeri a basso peso molecolare

Tutti e tre gli omopolimeri idrossil terminati hanno subito un processo di purificazione finalizzato all'eliminazione di eventuali residui monomerici, oligomerici e prodotti indesiderati.

Il processo di purificazione è suddiviso in tre fasi:

1. il polimero allo stato solido è disciolto nella minima quantità di solvente necessaria per la completa dissoluzione del materiale. Nel caso in questione, come solvente è stato impiegato cloroformio;

- la soluzione è stata posta all'interno di uno sgocciolatore e fatta cadere, goccia a goccia, in un becher contenente un eccesso di non-solvente, in questo caso metanolo (**Figura 3.2**). Il polimero in questo modo precipita sul fondo del recipiente di raccolta e può essere recuperato tramite filtrazione;

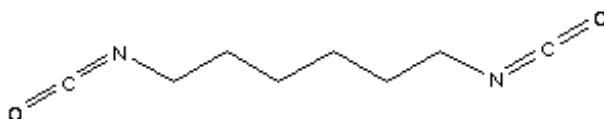


Figura 3.2 - Processo di purificazione dei polimeri sintetizzati.

- il polimero purificato è collocato in una stufa a vuoto, ad una temperatura di 30°C, per il tempo necessario a garantire la completa evaporazione del metanolo residuo.

3.2 SINTESI DI COPOLIMERI AD ALTO PESO MOLECOLARE

Per la sintesi dei copolimeri ad elevato peso molecolare è stato impiegato un estensore di catena: esametilenediisocianato (HDI).



Tale composto contiene due gruppi isocianato alle estremità della catena carboniosa che, reagendo con i gruppi ossidrilici terminali di PCCE-OH e P(PA z mNA z n)-OH,

secondo quanto illustrato in **Figura 3.3**, rendono possibile l'estensione della catena attraverso formazione del legame uretanico.

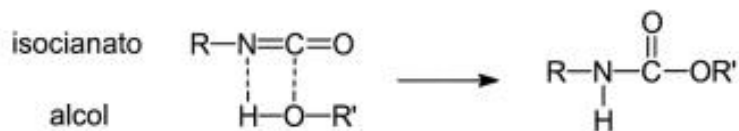


Figura 3.3 - Schema di reazione tra un gruppo isocianato ed un gruppo alcolico.

La reazione è condotta a 160°C ed in assenza di solvente, in reattore in vetro a tre colli, dotato di agitatore meccanico e flusso di azoto. Dopo aver portato a fusione i polimeri di partenza, è stata aggiunta, con l'ausilio di una micropipetta, la quantità di HDI (determinata tramite analisi ¹H-NMR) necessaria affinché gli -OH terminali dei polimeri di partenza reagiscano in rapporto 1:1.

In questo modo si possono ottenere cinque copolimeri differenti, con diversa composizione, ovvero caratterizzati da quantità differenti dei diversi blocchi: PPCE, PPCE₅₀P(PAz70NAz30)₅₀, PPCE₇₀P(PAz70NAz30)₃₀, PPCE₅₀P(Paz85NAz15)₅₀, PPCE₇₀P(Paz85NAz15)₃₀.

3.3 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

3.3.1 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 ¹³C (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 3.4**).

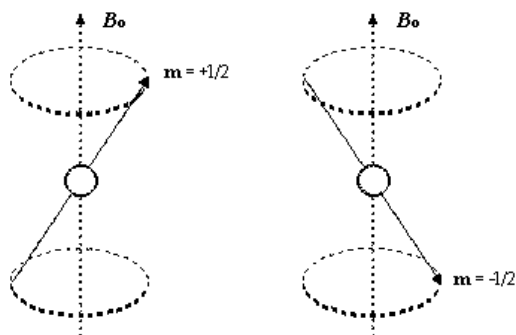


Figura 3.4 - Possibili orientamenti dei nuclei in presenza di campo magnetico.

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 3.5**). Questo schermava 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.

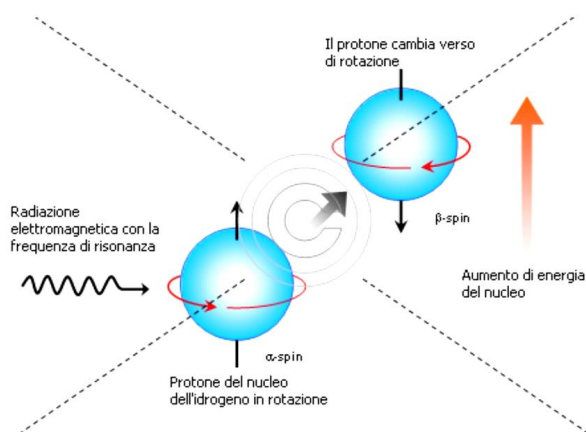


Figura 3.5 - Principio di funzionamento della NMR.

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:

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

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).

3.3.2 Cromatografia a permeazione su gel (GPC)

La cromatografia a permeazione su gel (GPC) è una tecnica di separazione fisica che consente di determinare la distribuzione del peso molecolare in un polimero. Il metodo di analisi dei campioni si basa sull'acquisizione dei segnali del campione e suo confronto con curve di taratura realizzate attraverso standard di polimeri a peso noto. Lo strumento è costituito da una pompa volumetrica, una colonna riempita di particelle porose (polistirene reticolato con divinilbenzene) ed un rivelatore (**Figura 3.6**).

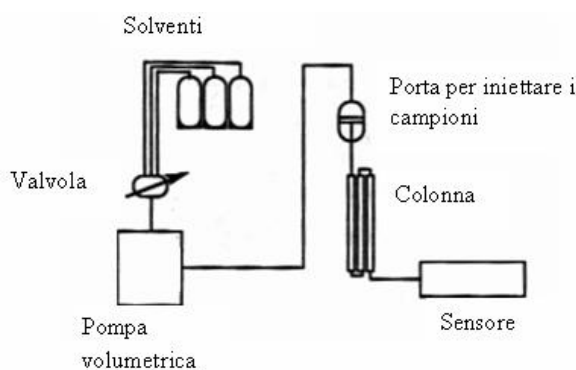


Figura 3.6 - Schematizzazione del cromatografo.

Il sistema di funzionamento della GPC prevede di solubilizzare del campione in cloroformio, ed iniettarlo, dopo averlo filtrato, all'interno dello strumento.

La colonna cromatografica per analisi in GPC è generalmente costituita di particelle di polistirene a granulometria differente impaccate in modo tale da generare una porosità controllata. Gli analiti una volta iniettati permeano le porosità della colonna a seconda del loro volume idrodinamico (generalmente correlato al peso molecolare). In funzione della frazione di porosità permeata varierà il tempo di ritenzione. Le molecole più grandi non penetrano nei pori, limitandosi ad aggirare i corpi di riempimento, le molecole più piccole invece riescono ad entrare nei 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 (**Figura 3.7**)

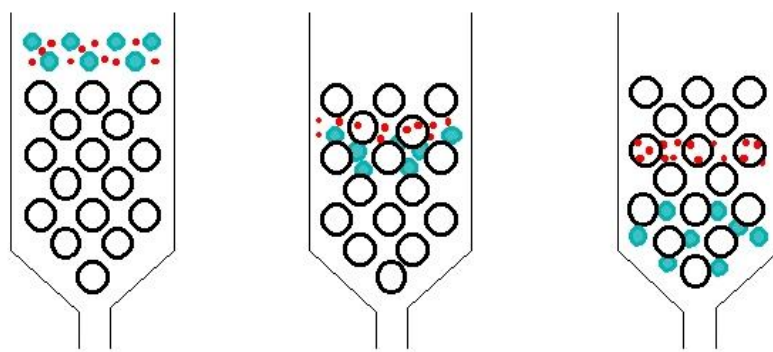


Figura 3.7 - Schematizzazione della separazione molecolare.

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.

3.4 CARATTERIZZAZIONE TERMICA

3.4.1. 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 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. 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 3.8**).

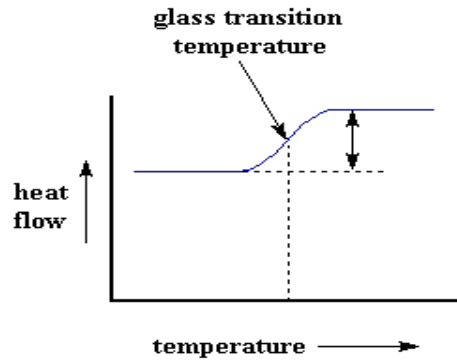


Figura 3.8 - Calcolo della T_g .

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 :

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

dove $(dT/dt)^{-1}$ è la velocità di scansione.

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 3.9**).

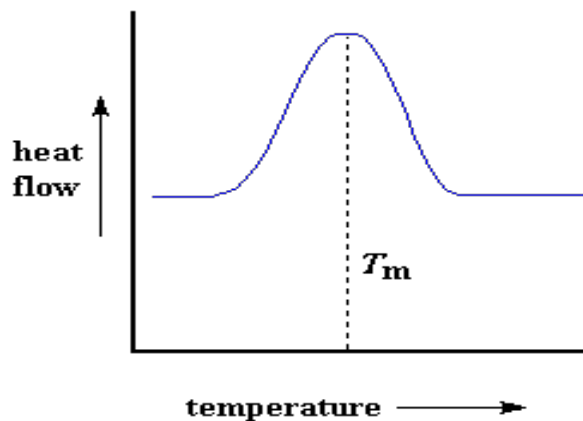


Figura 3.9 - Calcolo della T_m .

La procedura generale delle scansioni è stata la seguente:

- **I 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;
- **II scansione:** riscaldamento in analoghe condizioni di temperatura e velocità in seguito al raffreddamento veloce della fase precedente
- **III 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.

3.4.2 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 3.10**. 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}).

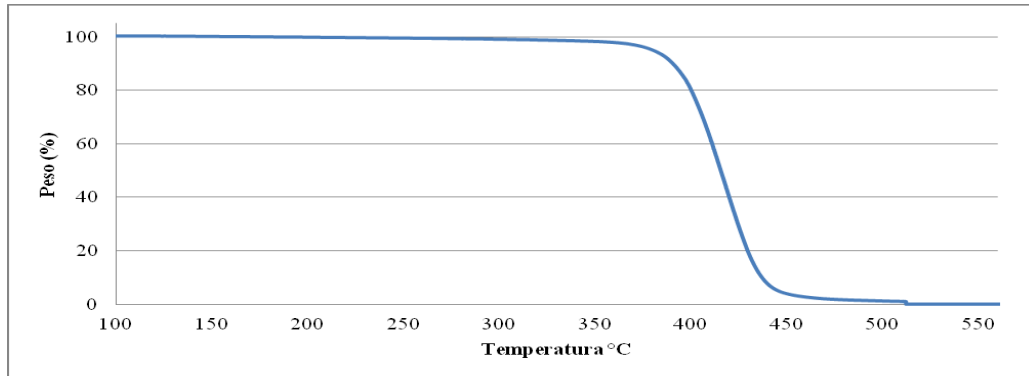


Figura 3.10 - Curva termogravimetrica.

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.

3.5 ANALISI DELLA FASE CRISTALLINA

3.5.1 Diffrazione a Raggi X

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

Il principio di funzionamento di tale tecnica si basa sulla legge di Bragg (**Figura 3.11**):

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

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

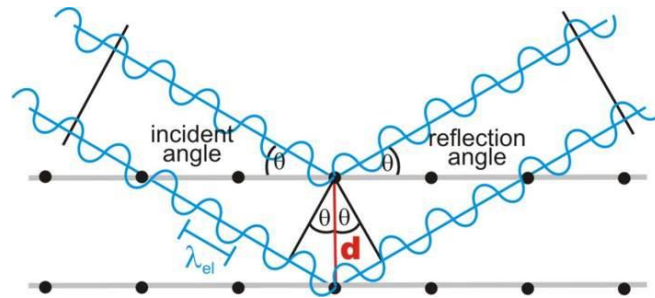


Figura 3.11 - Legge di Bragg.

Attraverso tale analisi, si riescono ad ottenere quindi le seguenti informazioni:

- Determinazione di strutture molecolari
- Studio della dinamica in stato solido
- Analisi del legame chimico
- Studi di transizione di fase e polimorfismo.

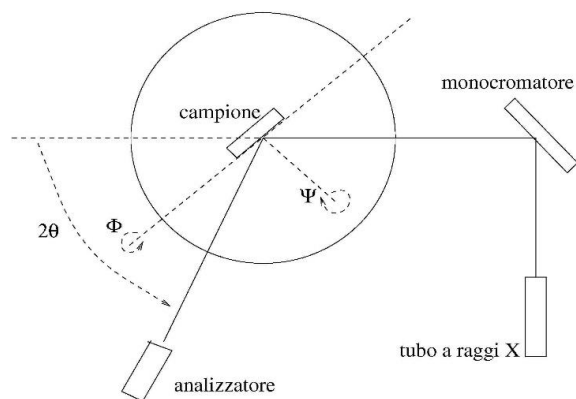


Figura 3.12 – Schema di funzionamento di un diffrattometro.

I pattern di diffrazione a raggi X dei film polimerici sono stati effettuati utilizzando un diffrattometro PANalytical X'PertPro equipaggiato con un rivelatore allo stato

solido X'Celerator che utilizza la lunghezza d'onda del rame ($\lambda = 0.15418 \text{ nm}$) (**Figura 3.12**). 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), $X_C = A_C / A_T$. 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.

3.6 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA

3.6.1 Misure tensione-deformazione

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 tensione il rapporto tra lo sforzo normale e l'area della sezione del provino a riposo:

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

la deformazione viene invece definita 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 3.13**.

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.

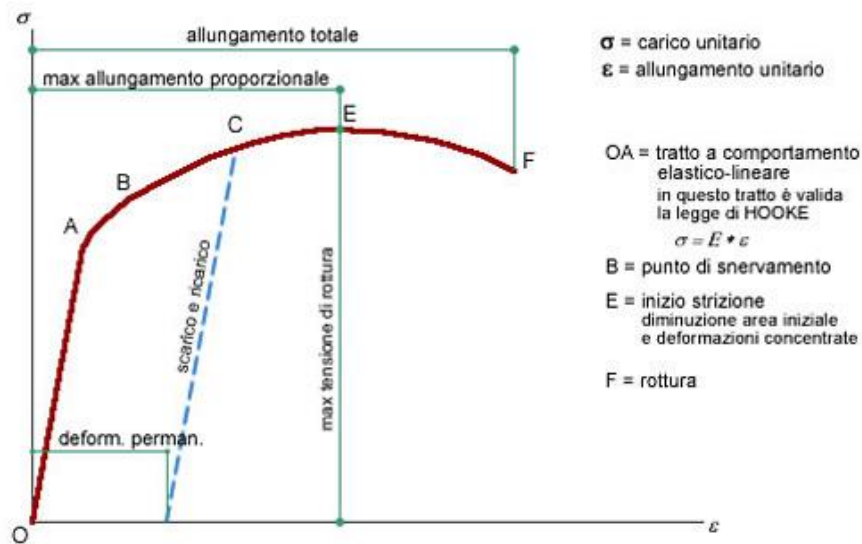


Figura 3.13 - Curva sforzo/deformazione.

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.

3.7 STUDI DI DEGRADAZIONE IDROLITICA

Le prove di degradazione idrolitica permettono di testare il comportamento dei polimeri sintetizzati e la loro velocità di degradazione in ambienti che simulano quello biologico. Gli esperimenti sono condotti, in condizioni di temperatura e pH fisiologici (37°C, pH 7,4), su film 5x40mm dei polimeri in esame.

I campioni sono inizialmente essiccati e pesati, successivamente sono stati inseriti in provette contenenti 8 ml di soluzione acquosa tamponata a pH 7,4 con tampone fosfato e sono stati mantenuti in agitazione all'interno di un bagno termostato ad una temperatura mantenuta costante a 37°C per periodi di tempo variabili. La soluzione tampone, cambiata periodicamente per mantenere costante il pH, è stata preparata seguendo la procedura di seguito riportata: in 800 ml 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 analizzare i cambiamenti provocati dal processo degradativo nel tempo si è stabilito un calendario dei prelievi. Nei giorni fissati è stato prelevato un campione in triplicato.

Il trattamento dopo il prelievo ha previsto:

- lavaggio con acqua distillata per eliminare i sali della soluzione tampone;
- asciugatura del campione con carta assorbente;
- essiccamento sotto vuoto per eliminare l'H₂O residua per 24 h a temperatura ambiente;
- misura del peso finale di ciascun campione;
- misura del peso molecolare medio numerico e ponderale tramite GPC.

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONI

In questo capitolo verranno presentati e discussi i risultati delle prove di caratterizzazione effettuate sui polimeri OH-terminati (PPCE e P(PAz m NAz n)) e sui copolimeri multiblocco PPCE $_x$ P(PAz m NAz n) $_y$, sintetizzati secondo le metodologie descritte nel Capitolo 3; m ed n indicano rispettivamente la percentuale molare di sequenze Az e NAz nei copolimeri P(PAz m NAz n), mentre x e y rappresentano rispettivamente la percentuale in massa di PPCE e P(PAz m NAz n) nei polimeri finali ad elevato peso molecolare.

4.1 CARATTERIZZAZIONE DEI POLIMERI A BASSO PESO MOLECOLARE

4.1.1 Caratterizzazione molecolare

Per tutti i polimeri sintetizzati, la struttura chimica e la composizione effettiva sono state determinate tramite spettroscopia $^1\text{H-NMR}$, mentre il peso molecolare e la distribuzione dei pesi molecolari sono stati misurati tramite cromatografia su permeazione di gel (GPC) (si veda **Tabella 4.1**).

Il PPCE a basso peso molecolare, dopo purificazione, si presenta a temperatura ambiente sotto forma di fiocchi di colore bianco opaco. Entrambi i copolimeri purificati risultano invece cerosi e di colore giallo chiaro.

La Tabella 4.1 mostra come i tre polimeri di partenza siano caratterizzati, come atteso, da un peso molecolare non elevato, a garanzia della presenza della necessaria quantità di gruppi -OH terminali per il successivo processo di estensione di catena.

Tabella 4.1. Dati di caratterizzazione molecolare e termica di PPCE e dei copolimeri P(PAz m NAz n).

Polimeri	PAz** (mol%)	M $_n$ * (g/mol)	I scan		II 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)
PPCE-OH	--	3500	154	46	9	0.339	--	--	154	40
P(PAz70NAz30)-OH	72	7350	32	35	-52	0.560	-40	35	35	36
P(PAz85NAz15)-OH	86	6900	36	45	-54	0.520	-43	37	38	45

La struttura chimica e la composizione effettiva di tutti i polimeri idrossil terminati sintetizzati sono state determinate tramite analisi $^1\text{H-NMR}$. Gli spettri ottenuti sono risultati coerenti con la struttura prevista, permettendo di escludere la presenza di reazioni secondarie durante la polimerizzazione.

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ evidenziano inoltre come la composizione dei copolimeri si sia discostata pochissimo da quella di alimentazione (Tabella 4.1).

Lo spettro in **Figura 4.1** mostra i segnali caratteristici del PPCE. A δ 1.97 ppm e a δ 4.14 ppm sono registrati i segnali dei protoni metilenici della subunità propandiolica, (b) e (a) rispettivamente. Gli stessi protoni relativi però al propandiolo terminale (b', a' e a'') si trovano invece a δ 1.88 ppm, δ 3.69 ppm e δ 4.24 ppm, rispettivamente. Inoltre, a δ 2.06 ppm è presente il segnale del doppietto dei protoni metilenici dell'anello alifatico (d). Infine, si possono notare i segnali ascrivibili ai protoni dell'anello posizionati in α al carbossile (c): a δ 2.98 ppm i protoni *c trans* e a δ 2.48 ppm i protoni *c cis*.

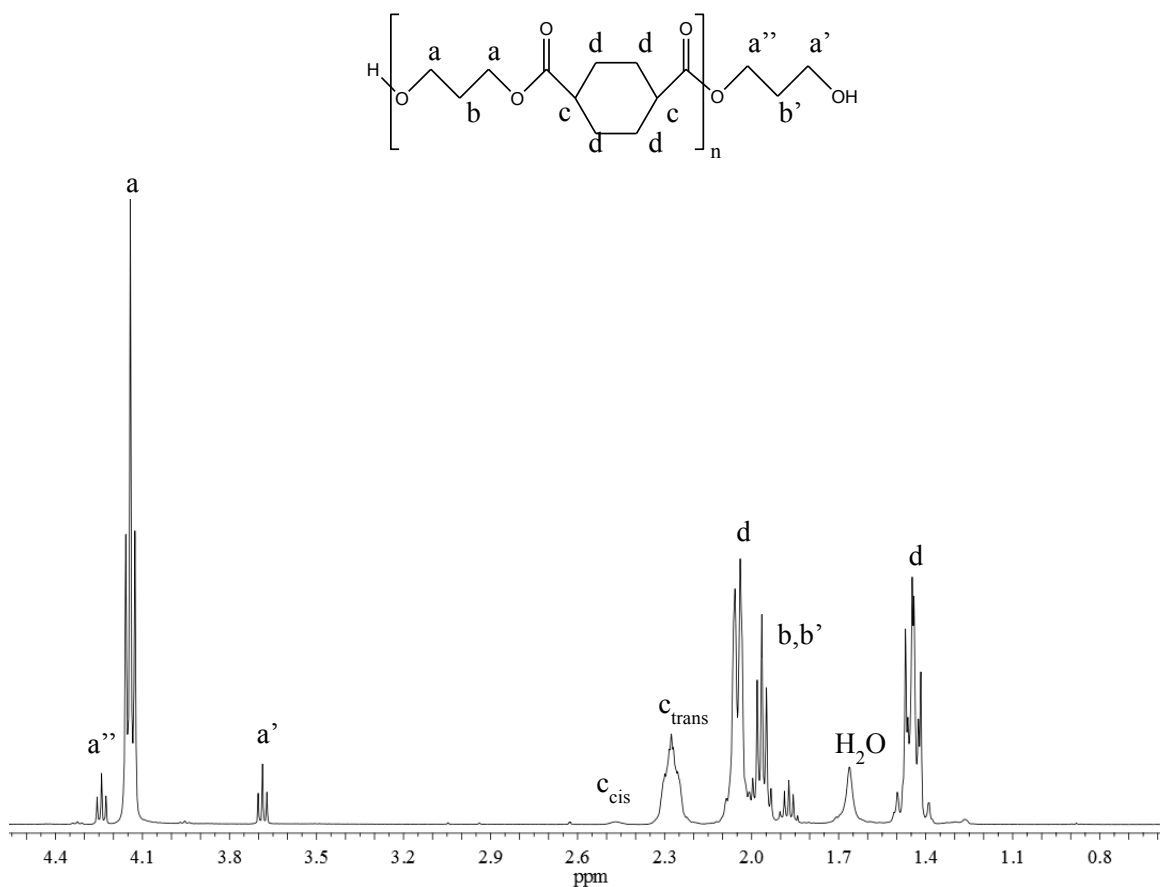


Figura 4.1. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del PPCE-OH con attribuzione dei picchi.

Per quanto riguarda i copolimeri a basso peso molecolare, i picchi caratteristici del P(PAz70NAz30) e del P(PAz85Naz15) (di cui è riportato l'esempio di P(PAz70NAz30) in **Figura 4.2**) sono un singoletto a δ 0.97 ppm e uno a δ 3.89 ppm dovuto ai protoni metilici (d) e ai protoni metilenici (c) del neopentil glicole, un quintupletto in posizione δ 1.96 ppm e un tripletto a δ 4.14 ppm dovuti ai protoni metilenici della subunità propandiolica (b, a). I segnali dovuti alle unità terminali del neopentil glicole cadono rispettivamente: d' a δ 0.92 ppm, c' a δ 3.30 ppm, c'' a δ 3.94 ppm. Per quanto riguarda invece il propandiolo terminale, i suoi segnali sono localizzati nella zona: b' a δ 1.86 ppm, a' a δ 3.70 ppm e a'' a δ 4.24 ppm. Per quanto riguarda invece la sub-unità acida, i segnali relativi ai metileni g a h cadono nella stessa zona (δ 1.31 ppm), i protoni f sono rappresentati da un multipletto a δ 1.61 ppm, mentre quelli e cadono a δ 2.29 ppm. La composizione dei copolimeri è stata calcolata considerando l'area del picco di risonanza dei protoni dei gruppi metilenici della subunità propandiolica (a, a' e a'') rapportata all'area totale dei segnali dei protoni metilenici delle subunità glicoliche (a, a', a'' e c, c', c'').

I copolimeri sono caratterizzati da una distribuzione statistica delle unità comonomeriche: infatti, l'elevata temperatura del processo di policondensazione e il catalizzatore impiegato [Ti(OBu)₄] favoriscono le reazioni di transesterificazione con conseguente distribuzione statistiche delle sequenze.

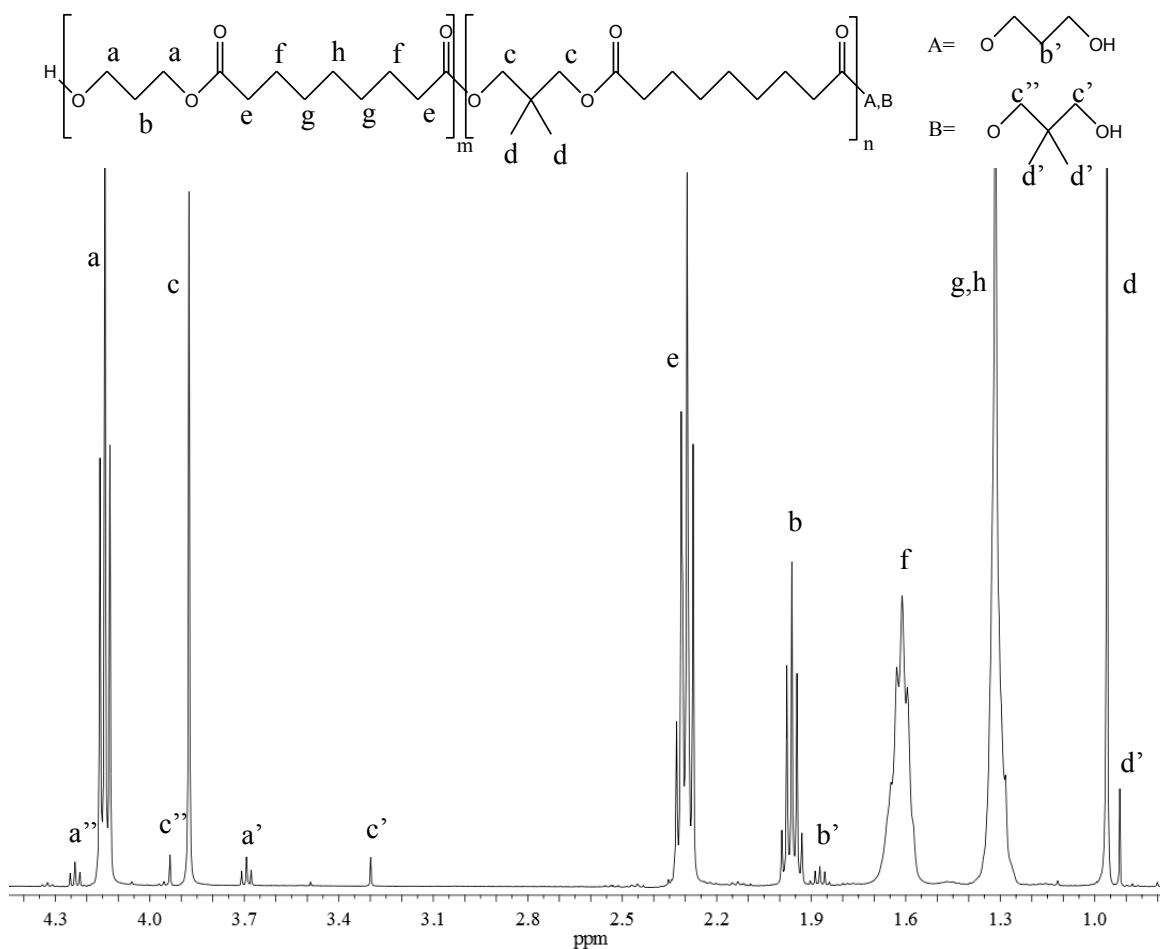


Figura 4.2. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del P(PAz70NAz30)-OH con attribuzione dei picchi.

4.1.2 Caratterizzazione termica

Poiché il processo di fusione di un polimero è influenzato dalla storia termica del materiale, prima dell'analisi i campioni sono stati mantenuti per due settimane a temperatura ambiente, per consentirne la completa cristallizzazione e uniformarne la storia termica.

Mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC) sono state determinate la temperatura di transizione vetrosa (T_g), la temperatura di fusione (T_m) e i calori in gioco in entrambe le transizioni termiche (**Tabella 4.1**). Le curve calorimetriche di scansione sono tipiche di polimeri semicristallini ad alto grado di cristallinità: i calori di fusione sono elevati e la transizione vetrosa, caratteristica della porzione amorfa di materiale, non è visibile. Dopo rapido raffreddamento dal fuso, si osserva un diverso comportamento di fase per i tre polimeri a basso peso: PPCE-OH e

P(PAz85NAz15)-OH risultano semicristallini, mentre P(PAz70Naz30)-OH è amorfo. I due copolimeri P(PAz m NAz n)-OH, una volta superata T_g sono entrambi in grado di cristallizzare in scansione. Nel caso del copolimero P(PAz85NAz15)-OH $\Delta H_m > \Delta H_c$, ad indicare che il materiale non può essere congelato in uno stato completamente amorfo per rapido raffreddamento dal fuso. Per il copolimero P(PAz70Naz30)-OH invece $\Delta H_m = \Delta H_c$ a riprova della natura completamente amorfa di questo materiale. Da ultimo, la curva calorimetrica di seconda scansione del PPCE-OH è tipica di un polimero semicristallino, essendo caratterizzata da una variazione endoterma della linea di base associata alla transizione vetrosa e da una endoterma di fusione a più alta temperatura. In tutti i polimeri si registra in seconda scansione la transizione vetrosa: per il PPCE-OH è pari a 9°C, mentre la T_g dei due copolimeri è notevolmente più bassa (data la presenza della subunità azelaico) e risulta pari a -52°C per il P(PAz85NAz15)-OH e -54°C per il P(PAz70Naz30)-OH. Il picco di fusione si manifesta a 154°C per il PPCE-OH, mentre risulta essere nettamente inferiore (38 e 35°C rispettivamente per il P(PAz85NAz15)-OH e P(PAz70Naz30)-OH). I dati ottenuti sono riportati in Tabella 4.1.

4.2 CARATTERIZZAZIONE DEI POLIMERI OTTENUTI PER ESTENSIONE DI CATENA

I polimeri a basso peso molecolare sono stati successivamente sottoposti a reazione di estensione di catena: sono stati preparati cinque polimeri con percentuali diverse di segmenti *soft* ed *hard*. La subunità *hard* del PPCE è presente in tutti i polimeri sintetizzati.

4.2.1 Caratterizzazione molecolare

Dopo la reazione di estensione di catena, il PPCE ottenuto si presenta ancora come solido cristallino, di colore bianco. I quattro copolimeri sono anch'essi tutti semicristallini e di colore giallognolo.

L'analisi $^1\text{H-MNR}$ ha permesso di verificarne la struttura chimica; uno spettro è riportato in **Figura 4.3** a titolo di esempio.

Tabella 4.3. Dati di caratterizzazione molecolare dei polimeri ad alto peso molecolare

Polimeri	M_n[*] (g/mol)	D[*]	PCE^{**} (mol%)	PAzNAz^{**} (mol%)	%HDI^{**} (mol%)
PPCE	60500	3.5	100	-	7
PPCE₅₀P(PAz70NAz30)₅₀	67600	3.1	47	53	6
PPCE₇₀P(PAz70NAz30)₃₀	86800	2.3	71	29	4
PPCE₅₀P(PAz85NAz15)₅₀	78200	2.7	47	53	4
PPCE₇₀P(PAz85NAz15)₃₀	70800	2.9	70	30	7

Lo spettro evidenzia la presenza dei picchi caratteristici di entrambi i polimeri a basso peso molecolare di partenza; in aggiunta sono presenti tre picchi relativi all'estensore di catena (esametilene diisocianato) introdotto in catena: a δ 3.18 ppm il segnale dei protoni metilenici in α all'azoto (m); a δ 1.34 ppm e δ 1.25 ppm il segnale dei protoni metilenici interni alla catena carbonilica (n, o). Il calcolo della composizione reale è stato effettuato in base al rapporto tra le aree dei picchi di risonanza dei protoni alifatici a delle subunità propandiolo (δ 4.17 ppm) ed i protoni i del nepentil glicole (δ 3.88 ppm), dopo aver sottratto dall'integrale dei protoni alifatici a, la percentuale dovuta alla componente PPAz (determinata dalla composizione del blocchetto iniziale). I dati riportati in **Tabella 4.3** dimostrano come la composizione effettiva sia risultata, in tutti i casi, molto vicina a quella di alimentazione.

Il peso molecolare dei copolimeri ottenuti tramite estensione di catena è stato determinato attraverso cromatografia a permeazione su gel, che ha permesso di verificare un aumento dell'M_n di circa 10 volte rispetto a quello iniziale nel caso dei copolimeri e di circa 17 volte nel caso del PPCE (Tabella 4.3).

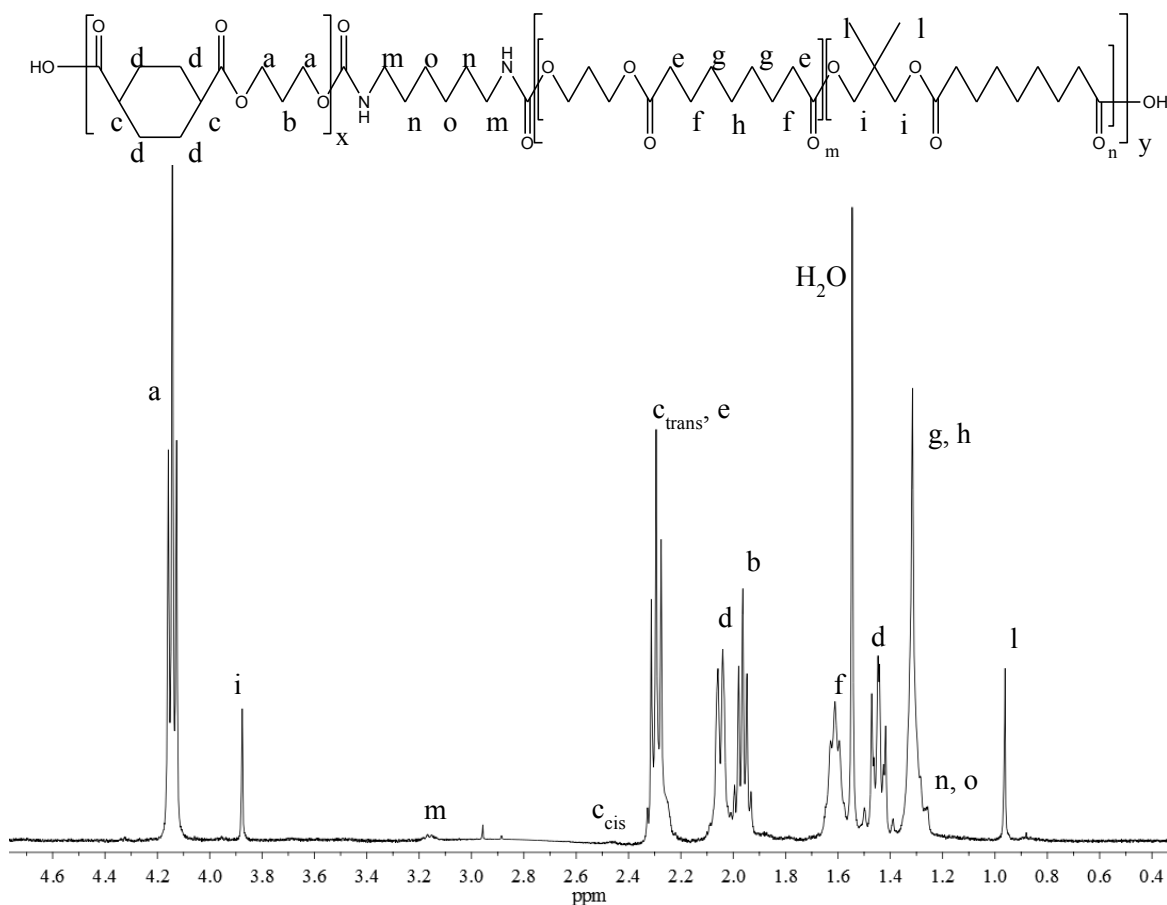


Figura 4.3. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del $\text{PPCE}_{50}\text{P}(\text{PAz}85\text{NAz}15)_{50}$ con attribuzione dei picchi.

Prima della caratterizzazione, i campioni ottenuti per estensione di catena sono stati sottoposti a pressofusione per ottenere film sottili di spessore uniforme, secondo la procedura indicata nel capitolo 3. Per gli studi di caratterizzazione sono stati utilizzati i campioni privi di difetti e con spessore circa costante tra 0,20 e 0,30 mm, i quali sono stati mantenuti a temperatura ambiente sotto vuoto in essiccatore per 15 giorni, per consentire il pieno sviluppo della fase cristallina e permettere di uniformare la storia termica dei vari campioni.

4.2.2 Caratterizzazione termica

Tramite analisi termogravimetrica (TGA), condotta in atmosfera inerte di azoto, è stata determinata la temperatura di inizio decomposizione (T_{id}) e la temperatura corrispondente alla massima velocità di perdita di peso (T_{max}). La perdita di peso è in tutti i casi pari al 100% ed avviene praticamente in un unico stadio. Inoltre, tutti i polimeri analizzati hanno mostrato simile e buona stabilità termica (**Tabella 4.4**).

Tabella 4.4. Dati di caratterizzazione termica ottenuti tramite TGA e DSC dei polimeri PPCE e $PPCE_xP(PAz_mNAz_n)_y$.

Polimero	I scan						II scan						
	T_{id} (°C)	T_{max} (°C)	T_g (°C)	ΔC_p (J/°C·g)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_g (°C)	ΔC_p (J/°C·g)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_{cc} (°C)
PPCE	391	416	17	0.022	144	25	9	0.196	145	25	73	20	105
$PPCE_{70}P(Paz_{70}Naz_{30})_{30}$	394	415	-31	0.225	120	14	-27	0.31	122	16	34	13	51
$PPCE_{70}P(Paz_{85}Naz_{15})_{30}$	398	419	-37	0.239	128	14	-27	0.374	130	16	35	13	57
$PPCE_{50}P(Paz_{70}Naz_{30})_{50}$	389	418	-46	0.334	96	9	-41	0.385	97	11	44	10	--
$PPCE_{50}P(Paz_{85}Naz_{15})_{50}$	397	422	-47	0.289	106	10	-40	0.410	106	12	43	12	--

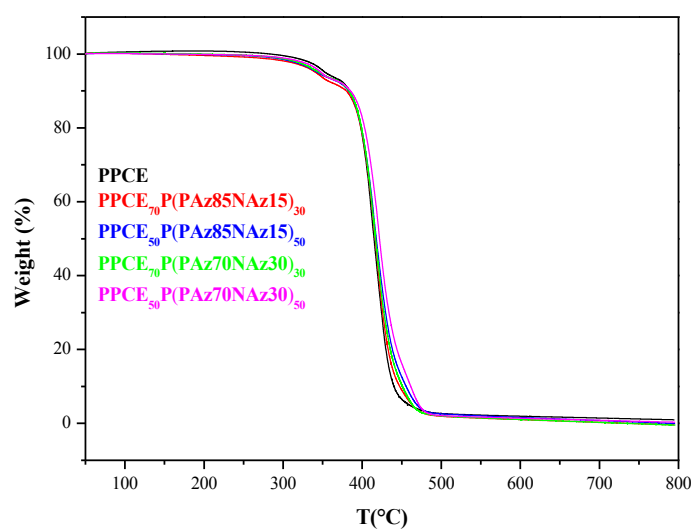


Figura 4.4. Curve termogravimetriche di PPCE e dei polimeri $PPCE_xP(PAz_mNAz_n)_y$.

Successivamente, il PPCE e i copolimeri sono stati sottoposti a misure calorimetriche: il peso molecolare, elevato e comparabile, dei campioni in esame permette di escludere una sua influenza sulle proprietà termiche.

Dalle curve calorimetriche, riportate in **Figura 4.5a**, è possibile notare come tutti i campioni presentino una variazione endotermica della linea di base, associata alla

transizione vetrosa. Inoltre, tutti i poliesteri risultano semicristallini, mostrando un'endoterma di fusione.

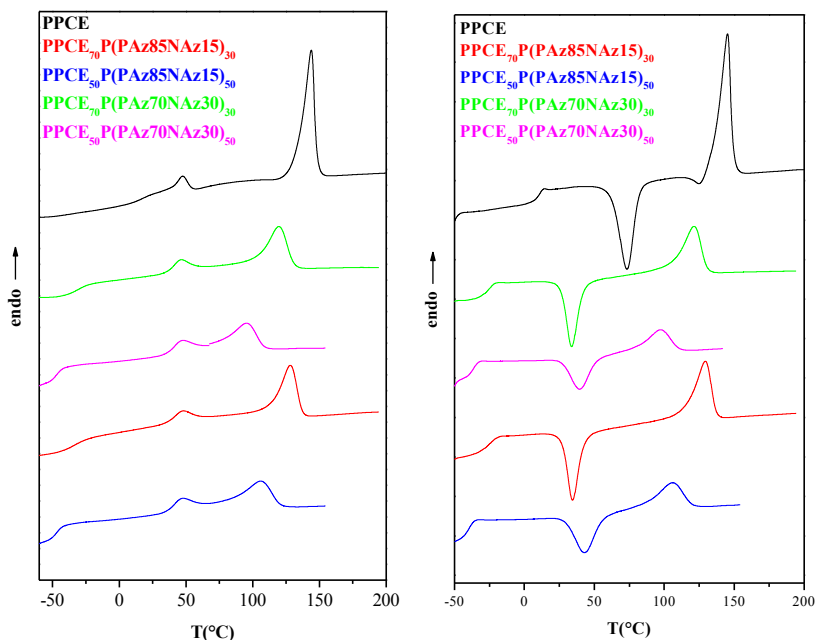


Figura 4.5. Curve calorimetriche di PPCE e dei polimeri $PPCE_xP(PAz_mNAz_n)_y$: a) I scan; b) II scan dopo rapido raffreddamento dallo stato fuso.

Nel caso del PPCE, il picco di fusione si manifesta ad alta temperatura (144 °C); il calore di fusione associato è abbastanza consistente. Tutti i copolimeri in oggetto presentano invece una temperatura di fusione più bassa e un calore di fusione inferiore rispetto al PPCE.

Tra i diversi copolimeri è possibile notare un leggero spostamento del picco di fusione principale, al variare del quantitativo di segmenti *soft* e alla natura dello stesso. In particolare, la temperatura di fusione diminuisce all'aumentare del quantitativo di sequenze NAz, a causa della formazione di una fase cristallina caratterizzata da un minor grado di perfezione. Allo stesso tempo, la diminuzione del quantitativo di fase *hard* (PPCE) comporta anche una riduzione del calore di fusione, indice, come atteso, di un abbassamento del valore di cristallinità.

In tutti i casi, omopolimero incluso, è presente un'endoterma di piccola entità intorno ai 50°C, imputabile alla fusione di cristalli piccoli e molto imperfetti di PPCE (si vedano risultati WAXS riportati di seguito).

Al fine di verificare la natura della fase cristallina nei copolimeri $PPCE_xP(PAz_mNAz_n)_y$ è stata eseguita l'analisi a raggi X. I diagrammi di diffrazione dei copolimeri sono riportati in **Figura 4.6**, insieme ai quello del PPCE per necessità di confronto.

I profili sono tipici dei materiali semicristallini avendo alcuni riflessi ben evidenti, caratteristici della porzione ordinata del materiale, sovrapposti ad una linea di base a campana, dovuta alla presenza di materiale amorfo.

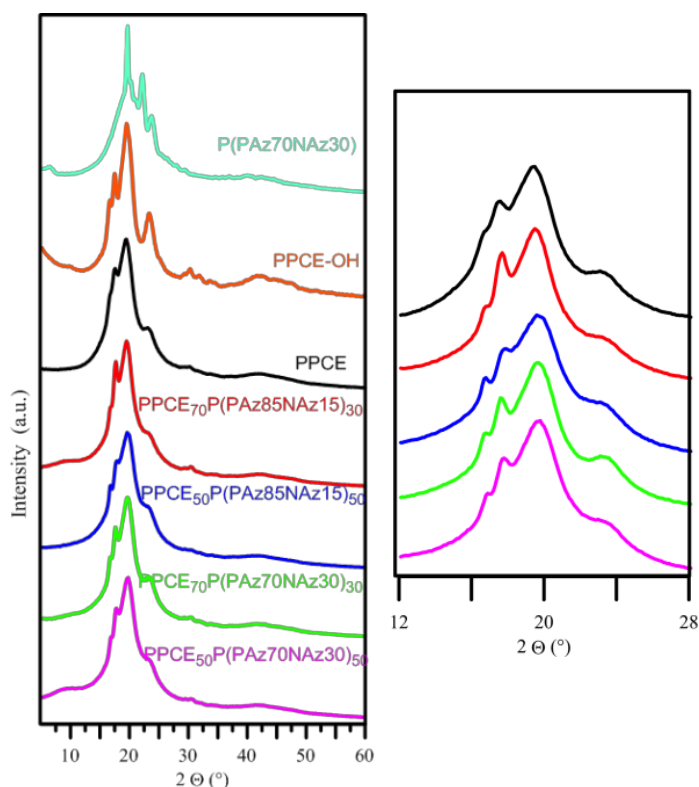


Figura 4.6. Spettri di diffrazione RX di PPCE e $PPCE_xP(PAz_mNAz_n)_y$ ed ingrandimento della regione dello spettro compresa tra 12 e 28°.

Si può osservare come tutti i campioni presentino uno spettro simile a quello del PPCE. Ciò consente di affermare che in ogni polimero è presente la fase cristallina tipica del PPCE.

L'omopolimero PPCE presenta una fase cristallina con domini piccoli (il corrispondente profilo di diffrazione è infatti caratterizzato da riflessi più allargati e meno definiti).

Peculiarmente, i copolimeri risultano caratterizzati da una fase cristallina caratterizzata da un maggior grado di perfezione, con domini cristallini di maggiori dimensioni ad indicare che le co-unità non alterano significativamente la qualità della fase cristallina del PPCE. Non si apprezzano significative variazioni nelle posizioni dei riflessi a riprova della formazione di una fase cristallina pura di PPCE con totale rigetto delle co-unità nella fase amorfa (si veda ingrandimento della Figura 4.6).

I copolimeri risultano comunque meno cristallini dell'omopolimero di riferimento e caratterizzati da un grado di cristallinità che dipende esclusivamente dal rapporto molare tra segmento *soft* e segmento *hard*. Il grado di cristallinità calcolato tramite analisi XRD per i polimeri in oggetto è riportato in **Tabella 4.5**; i dati risultano in accordo con quelli ottenuti tramite calorimetria.

Tabella 4.5. Indice di cristallinità X_c (%) dei campioni in esame determinate tramite analisi XRD

Polimeri	X_c (%)
PPCE	26 (3)
PPCE ₇₀ P(PAz85NAz15) ₃₀	22 (3)
PPCE ₅₀ P(PAz85NAz15) ₅₀	18 (3)
PPCE ₇₀ P(PAz70NAz30) ₃₀	22 (3)
PPCE ₅₀ P(PAz70NAz30) ₅₀	18 (3)

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 amorfiche e quindi alzando il valore di T_g . Pertanto, il fenomeno deve essere studiato 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 sottoposti a tale trattamento sono riportate in **Figura 4.5b**: sia il PPCE che i copolimeri PPCE_xP(PAz m NAz n)_y mostrano una transizione vetrosa seguita da un picco esotermico e, a temperature più alte, da un picco endotermico. Nel caso del PPCE e dei due copolimeri caratterizzati dal

maggior contenuto di segmento *hard* (PPCE₇₀P(PAz85NAz15)₃₀ e PPCE₇₀P(PAz70NAz30)₃₀), il ΔH_m risulta maggiore del ΔH_c , ad indicare la natura semicristallina di questi campioni. Per i restanti due copolimeri, PPCE₅₀P(PAz85NAz15)₅₀ e PPCE₅₀P(PAz70NAz30)₅₀, l'entalpia di cristallizzazione è pari a quella del picco di fusione, indicando che questi copolimeri possono essere ottenuti, attraverso raffreddamento veloce, in uno stato completamente amorfo.

Come si può vedere dalla Figura 4.5b e dai dati raccolti nella Tabella 4.4, anche la temperatura di transizione vetrosa è influenzata dalla quantità del segmento *soft* presente in catena. Il PPCE omopolimero presenta una T_g pari a circa 9 °C. Nei copolimeri a parità di composizione del segmento *soft*, i campioni costituiti da una percentuale di blocco *soft* più alta presentano una T_g leggermente inferiore; se invece manteniamo fissa la quantità di blocchi *soft*, la T_g invece non cambia, evidenziando che non c'è alcun effetto della natura del segmento *soft*.

Per valutare l'influenza delle co-unità sulla cinetica di cristallizzazione del PPCE, sono stati condotti esperimenti di cristallizzazione in condizioni non isoterme, sottoponendo i campioni a un raffreddamento del fuso a velocità controllata (Tabella 4.5). Tali analisi hanno permesso la determinazione della temperatura corrispondente al massimo del picco di cristallizzazione (T_{cc}), che risulta correlabile alla velocità di cristallizzazione del materiale in condizioni isoterme (Tabella 4.4). Il valore di questa temperatura varia al variare del quantitativo e della natura del segmento *soft*; nello specifico, all'aumentare della percentuale molare di co-unità NAz, si può osservare un abbassamento della velocità di cristallizzazione del PPCE. Ciò indica una maggiore difficoltà a cristallizzare, data la presenza di queste co-unità che ostacolano il regolare processo di impaccamento delle catene polimeriche del PPCE.

Da ultimo, è interessante notare che nei copolimeri caratterizzati da uguale contenuto di blocchi *soft* e *hard*, il processo di cristallizzazione è completamente inibito, nelle condizioni sperimentali adottate.

4.2.3 Caratterizzazione meccanica

Le proprietà meccaniche sono state studiate su film di forma 40 x 5 x 0.3 mm, mediante misure di trazione, allungando un provino di forma rettangolare a velocità costante, e misurando la variazione dello sforzo in funzione della deformazione. Sono stati sottoposti a trazione solo i polimeri ottenuti dopo reazione di estensione

di catena, e per ogni campione le misure sono state effettuate su cinque provini diversi, riportando il risultato come valore medio delle 5 prove \pm deviazione standard. In **Tabella 4.6** sono raccolti i valori del modulo elastico (E), dello sforzo a rottura (σ_b), e della deformazione a rottura (ϵ_b).

Tabella 4.6. Dati di caratterizzazione meccanica dei polimeri PPCE e PPCE_xP(PAz m NAz n)_y.

Polimeri	E (MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)
PPCE	222 \pm 4	17 \pm 6	303 \pm 13
PPCE ₅₀ PPAz70NAz30 ₅₀	53 \pm 3	6 \pm 2	652 \pm 53
PPCE ₇₀ PPAz70NAz30 ₃₀	108 \pm 2	12 \pm 1	450 \pm 51
PPCE ₅₀ PPAz85NAz15 ₅₀	49 \pm 2	7 \pm 1	605 \pm 58
PPCE ₇₀ PPAz85NAz15 ₃₀	112 \pm 5	14 \pm 2	443 \pm 52

Le prove di trazione hanno evidenziato chiaramente come l'introduzione della frazione *soft* P(PAz m NAz n) all'interno della catena polimerica del PPCE comporti una consistente variazione delle proprietà meccaniche del materiale.

Come atteso, il PPCE possiede il maggiore modulo elastico e il minore allungamento a rottura tra i polimeri studiati (Tabella 4.6), a causa della più elevata rigidità della catena macromolecolare del polimero conferita dall'anello cicloalifatico.

I copolimeri, invece, dimostrano il comportamento tipico degli elastomeri. Infatti tutti presentano un modulo elastico piuttosto basso, e decisamente inferiore a quello del PPCE (per alcuni copolimeri la riduzione è di circa il 25%) e un notevole allungamento a rottura. L'andamento osservato del modulo elastico e dello sforzo a rottura si può spiegare sulla base del grado di cristallinità e quindi della quantità di porzione *hard*: al diminuire di χ_c si assiste ad una progressiva diminuzione di E e di σ_b ed a un aumento di ϵ_b . A riprova di ciò, basta osservare che i copolimeri caratterizzati dallo stesso grado di cristallinità presentano un analogo comportamento meccanico.

Da ultimo, vale la pena osservare che la copolimerizzazione porta ad un significativo aumento degli allungamenti percentuale: infatti, i campioni caratterizzati da rapporto *hard/soft* =1 presentano un ϵ_b superiore di circa il 50% rispetto all'omopolimero di riferimento.

4.3 DEGRADAZIONE IDROLITICA

Tutti i polimeri oggetto della presente Tesi sono stati sottoposti a esperimenti di degradazione idrolitica *in vitro* in condizioni fisiologiche di temperatura (37°C) e di pH (7.4) in presenza di tampone fosfato, per poterne valutare la tempistica di degradazione. I test sono stati condotti in duplicato su film polimerici di dimensioni pari a 40 x 5 x 0.3 mm. Sono stati eseguiti prelievi a tempi di incubazione successivi.

I risultati ottenuti hanno fornito informazioni relative al decorso del processo di degradazione, attraverso la caratterizzazione di ciascun campione parzialmente degradato mediante misure di perdita di peso. E' stato calcolato il peso residuo percentuale (Peso residuo %) attraverso la seguente equazione:

$$\text{Peso residuo \%} = \left(1 - \frac{m_{in} - m_{fin}}{m_{in}}\right) \cdot 100$$

dove m_{in} è la massa iniziale del film polimerico e m_{fin} è la massa del campione misurata dopo il processo degradativo.

Nessuno dei campioni oggetto della presente Tesi mostra tuttavia alcuna significativa perdita di peso nei tempi di incubazione studiati.

I risultati ottenuti non sono sorprendenti se si tiene conto che il processo di degradazione idrolitica avviene in bulk: tale processo prevede la scissione statistica da parte dell'acqua dei legami esterei delle macromolecole, con formazione di spezzoni di catena via via più corti. Perciò, nelle prime fasi del processo, le perdite di peso non sono apprezzabili in quanto le sequenze formatesi non sono sufficientemente corte da diffondere attraverso la matrice polimerica e passare in soluzione; il processo può essere dunque osservato solo attraverso misure di peso molecolare. Con l'avanzare del processo di idrolisi, si generano sequenze solubili in acqua e anche le variazioni di peso diventano significative.

Per confermare dunque che il processo di degradazione idrolitica è presente nei campioni in esame, i film prelevati dalla soluzione tampone sono stati sottoposti ad analisi GPC. I rispettivi valori di peso molecolare medio numerico residuo percentuale ($M_{(n-R)}\%$), riportati in **Figura 4.7**, sono stati calcolati con la seguente equazione:

$$M_{n-R} \% = \left(1 - \frac{M_{n-in} - M_{n-fin}}{M_{n-in}}\right) * 100$$

dove $M_{(n-fin)}$ è il peso molecolare medio numerico del campione dopo il processo di degradazione e $M_{(n-in)}$ è il peso molecolare medio numerico iniziale del campione.

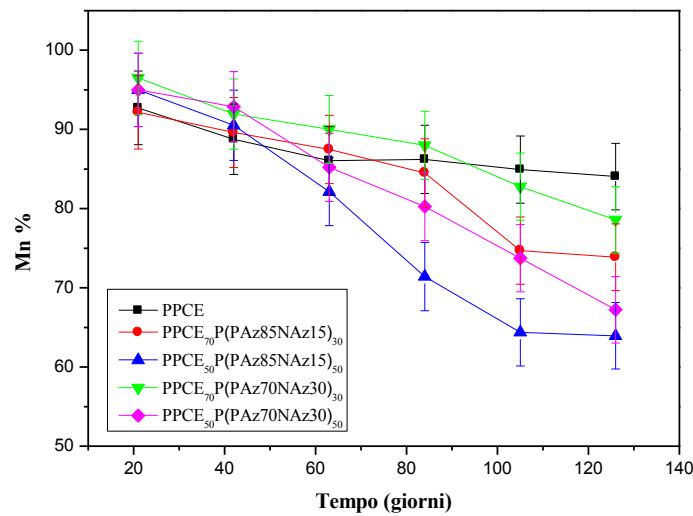


Figura 4.7. Perdite di peso molecolare nel tempo dei polimeri sintetizzati.

Come atteso, si è osservato un decremento del peso molecolare del campione, indice dell'inizio del processo degradativo. L'andamento osservato può essere spiegato sulla base del grado di cristallinità, determinato dal rapporto molare tra segmento *soft* e segmento *hard*. Dai dati riportati in Figura 4.7, si evince che non c'è alcuna influenza della natura del blocco *soft*.

Sui campioni parzialmente degradati sono previste ulteriori analisi che consentano di comprendere più in dettaglio la cinetica ed il meccanismo del processo.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

I biomateriali rivestono un ruolo di grande importanza nel settore biomedicale, in particolare in campi emergenti quali l'ingegneria tissutale ed il rilascio controllato di farmaci. I polimeri, ed in particolare i poliesteri alifatici, sono la classe di materiali che si è rivelata più interessante per le applicazioni sopracitate. Ad oggi però, solo pochi poliesteri sono stati approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per la realizzazione di dispositivi medici impiantabili nel corpo umano; tra questi si possono ricordare l'acido polilattico, l'acido poliglicolico ed il policaprolattone. Purtroppo, tali polimeri non riescono a soddisfare gli stringenti requisiti fisico/meccanici per ogni diversa applicazione, per cui la sintesi di nuovi polimeri, che offrano garanzie di biocompatibilità e biodegradabilità, può aprire nuove prospettive in tali ambiti.

In questo contesto si inserisce il presente lavoro di Tesi finalizzato alla sintesi e caratterizzazione di una nuova classe di copoliesteri alifatici "green" a base di poli(propilene 1,4-cicloesandicarbossilato) con promettenti proprietà meccaniche.

Grazie al lavoro di ricerca qui descritto è stato infatti possibile realizzare dei materiali con spiccate caratteristiche elastomeriche (basso modulo elastico ed elevato allungamento a rottura), con elevata temperatura di fusione e buona stabilità termica.

Tali nuovi materiali si sono rivelati biodegradabili, in condizioni fisiologiche, con una cinetica del processo funzione del rapporto molare tra segmento *hard* e *soft*.

Gli obiettivi della ricerca sono stati dunque raggiunti: sia le proprietà meccaniche che la velocità di biodegradazione sono state significativamente migliorate rispetto a quelle dell'omopolimero di riferimento (PPCE); inoltre tali proprietà sono risultate modulabili, agendo semplicemente sul rapporto mutuo tra segmento *hard* e *soft*.

La strategia di sintesi impiegata ha permesso di superare alcune delle limitazioni imposte da una normale copolimerizzazione. Infatti, tramite tale approccio si riescono generalmente a migliorare alcune caratteristiche a scapito però di altre: ad esempio, l'inserimento di una o più unità comonomeriche lungo la catena macromolecolare di un polimero comporta un consistente abbassamento del punto di

fusione. Nel caso in esame, invece, sono state migliorate le proprietà non soddisfacenti dell'omopolimero di riferimento, il PPCE, senza andare a detrimento di quelle già buone.

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

In conclusione, le proprietà dei copoliesteri in oggetto risultano estremamente interessanti in vista di possibili applicazioni nel campo dell'ingegneria biomedicale. Ciononostante, tali risultati rappresentano solo un punto di partenza verso una loro reale applicazione; rimane ancora da testarne la biocompatibilità dapprima *in vitro*, attraverso studi di citotossicità diretta ed indiretta, e successivamente attraverso test più approfonditi *in vivo* fino a giungere a veri e propri trials clinici.

Bibliografia

- [1]. S. Richard Turner. Development of Amorphous Copolyesters Based on 1,4-Cyclohexanedimethanol, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 2004, 42, 5847–5852.

- [2]. Yanchun Liu, S. Richard Turner. Synthesis and Properties of Cyclic Diester Based Aliphatic Copolyesters, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 2010, 48, 2162–2169.

- [3]. U.Edlund, A.-C.Albertsson. Polyesters based on diacid monomers, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003, 55, 585–609.

- [4]. Pathiraja A.Gunatillake and Raju Adhikari. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *European Cells and Materials* 2003, 5, 1-16.

- [5]. Federico Biordi, *Sintesi e caratterizzazione di nuovi copoliesteri alifatici multiblocco per applicazioni biomedicali*. Tesi di Laurea in Ingegneria biomedica, 2013.

- [6]. <http://www.degrapol.com/content/ingegneria%20tissutale.pdf>

- [7]. Pietrabissa R., *Biomateriali per protesi e organi artificiali*, 1996, Pàtron Editore.

- [8]. Agnese Magnani, *Biomateriali e Ingegneria Tissutale: dalla sostituzione alla rigenerazione di tessuti ed organi*, Università degli Studi di Siena, Dip. Farmaco Chimico Tecnologico, 2010.

- [9]. <https://semplicementescienza.wordpress.com/2013/04/15/smpbio/>

- [10]. Jianwen Xu, Fioleda Prifti, and Jie Song. A Versatile Monomer for Preparing Well-Defined Functional Polycarbonates and Poly(ester-carbonates), *Macromolecules* 2005, 538-546.
- [11]. <http://www.nanoxm.it/i-servizi/i-laboratori/studio-e-preparazione-di-materiali-per-applicazioni-biomediche-e-ambientali/>
- [12]. http://www.scienzattiva.eu/wp-content/uploads/2014/06/C_Drug_delivery.pdf
- [13]. http://www.ordinefarmacistimantova.it/f_rilascio.htm

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti coloro che hanno dato il loro contributo alla stesura della tesi con suggerimenti, critiche ed osservazioni.

Ringrazio anzitutto la Prof.ssa Nadia Lotti per i preziosi insegnamenti e le numerose ore dedicate alla mia tesi. Inoltre, ringrazio la Dott.ssa Martina Fabbri che, nonostante la distanza, è riuscita a seguirmi durante questi mesi, la Dott.ssa Michela Costa che con la sua pazienza e professionalità mi ha affiancata in tutto il percorso nei laboratori DICAM, e infine vorrei ringraziare l'Ing. Matteo Gigli e la Dott.ssa Michelina Soccio per i consigli e il tempo dedicatomi.

Un grazie speciale va a Elisa e “le Francy”, compagne di studio e di vita che in questi anni hanno condiviso con me tutte le gioie e difficoltà di questo percorso. Siete state le migliori persone che potessi incontrare nel mio cammino universitario, una spalla, una garanzia, una certezza. Sicuramente senza di voi la strada sarebbe stata più lunga e tortuosa.

Non ha mai capito di cosa trattasse questa tesi, ma in prima persona, quotidianamente, nonostante le difficoltà di quest'ultimo periodo, ne ha respirato tutte le emozioni: un Grazie particolare va a mia madre che in tutti questi anni non mi ha fatto mancare mai nulla. Grazie Mamma.

Un'altra persona importantissima nella mia vita che desidero ringraziare è Andrea che in ogni situazione è stato al mio fianco, sopportandomi, incoraggiandomi e sostenendomi nei periodi difficili di questo percorso. Ha sempre creduto in me trasmettendomi serenità e gioia in ogni momento.

Ringrazio inoltre, Federica, Ilaria e Carolina per tutti i momenti di svago e festa che ho condiviso con loro, è grazie a quei momenti che sono riuscita a ricaricarmi dopo i periodi pesanti di esami e studio.

E infine ringrazio tutti i miei compagni di studio in particolare Alessia, Stefano e Serena, gli amici dell'unità cinofila e tutti i parenti.

Grazie a tutti!!!