

ALMA MATER STUDIORUM-UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**SVILUPPO E CARATTERIZZAZIONE DI SCAFFOLDS
POLIMERICI A BASE DI GELATINA E NANOCCELLULOSA
PER LA RIGENERAZIONE DEI TESSUTI**

Elaborato in Biomateriali

Relatore

Prof. Giovanni Valdrè

Presentata da

Chiara Faccini

Correlatori

Dott.ssa Monica Sandri

Dott.ssa Campodoni Elisabetta

Sessione II

Anno Accademico 2015-2016

INDICE

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	1
1.1 Ingegneria tissutale	1
1.2 Lo <i>scaffold</i> nell'ingegneria tissutale	2
1.2.1 Scaffold per la rigenerazione della cartilagine articolare	4
1.2.2 Scaffold per la rigenerazione di tessuti connettivi fibrosi	6
1.2.3 Scaffold per la rigenerazione del tessuto osseo	8
1.3 Cellule coinvolte nella rigenerazione dei tessuti	10
1.4 Materiali utilizzati per lo sviluppo degli scaffold	11
1.4.1 Generalità	11
1.4.2 Biomateriali polimerici	12
1.4.2.1 Gelatina	14
1.4.2.2 Nanocellulosa	15
1.5 Processi di reticolazione	17
1.5.1 Trattamento termico di disidratazione (DHT)	18
1.5.2 Esametilendiammina (HMDA)	18
1.5.3 Genipina	19
1.6 Risposta dei tessuti all'impianto	20
CAPITOLO 2: OBIETTIVO DELLA TESI	22
CAPITOLO 3: REALIZZAZIONE DEGLI SCAFFOLD	23
3.1 Sintesi di blend a base di gelatina e nanocellulosa	23
3.2 Processo di reticolazione	24
3.3 Liofilizzazione	26

CAPITOLO 4: TECNICHE ANALITICHE	29
4.1 Analisi della porosità dei campioni	29
4.1.1 Metodo della densità	29
4.1.2 Metodo del water squeezing	29
4.2 Analisi della stabilità dei campioni	30
4.2.1 Test di swelling	30
4.2.2 Test di degradazione	31
4.3 Spettroscopia UV-visibile	31
4.3.1 Grado di cross-linking	35
4.4 Microscopio elettronico a scansione	36
4.5 Analisi all'infrarosso (FT-IR)	39
4.6 Angolo di contatto	42
CAPITOLO 5: PROVE MECCANICHE	44
5.1 Generalità	44
5.2 DMA (Analisi Meccanica Dinamica)	44
5.2.1 Principi teorici della DMA	47
5.3 Prove di stress-strain	49
5.4 Prove di creep	50
5.5 Prove multi-frequency strain	51
CAPITOLO 6: RISULTATI E DISCUSSIONE	52
6.1 Analisi morfologica	52
6.1.1 Misure di Bagnabilità	52
6.1.2 Osservazioni al SEM	54

6.1.3 Porosità	58
6.2 Caratterizzazione chimico-fisica	59
6.2.1 Analisi FT-IR	59
6.2.2 Valutazione della stabilità: Test di Swelling e Degradazione	61
6.2.3 Grado di cross-linking	64
6.3 Proprietà meccaniche	65
6.3.1 Prove di stress-strain	67
6.3.2 Prove di creep	69
6.3.3 Prove multi-frequency strain	70
CONCLUSIONI	73
BIBLIOGRAFIA	75

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 Ingegneria tissutale

L'ingegneria dei tessuti è un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita allo sviluppo di sostituti che riparano, mantengono o migliorano la funzionalità dei tessuti.

Essa prevede due tipologie di approcci: quello sostitutivo, il cui scopo è quello di costruire *ex vivo* tessuti o organi del tutto simili a quelli impiegati nei trapianti, e quello conduttivo o induttivo, che ha lo scopo di ottimizzare la struttura e la composizione di materiali di origine naturale o sintetica e di indurre la proliferazione di cellule *in vivo*. In ogni caso, l'approccio dell'ingegneria tissutale è sostanzialmente diverso da quello delle più tradizionali terapie che prevedono, ad esempio, la sostituzione del tessuto o organo compromesso mediante trapianto eterologo: i tessuti ingegnerizzati sono infatti progettati non solo per integrarsi con quelli del paziente ma anche per favorire la rigenerazione di tessuto sano.

La strategia classica dell'ingegneria tissutale prevede la semina di cellule su supporti, detti scaffolds, realizzati in opportuni materiali, eventualmente destinati alla coltura in bioreattori nei quali vengono fornite stimolazioni di carattere chimico e fisico. La completa colonizzazione dello scaffold darà origine ad un costrutto pseudotissutale *in vitro*, che potrà essere impiantato *in vivo* nell'uomo.

Il processo standard per l'ingegnerizzazione di un tessuto per l'impianto su esseri umani prevede l'isolamento di una linea cellulare specifica tramite una biopsia, effettuata o direttamente sul paziente o su donatore compatibile, e una successiva semina di tali cellule su scaffold al fine di coltivare il costrutto in condizioni specifiche per generare un tessuto il più possibile omogeneo. Infine, lo scaffold contenente le cellule, viene impiantato nel paziente, dove garantirà la sopravvivenza e la proliferazione cellulare e nel tempo subirà un progressivo processo di degradazione. Il supporto viene quindi progressivamente riassorbito dall'organismo e sostituito dal tessuto rigenerato dalle cellule sane impiantate.

La premessa di base dell'ingegneria tissutale consiste, dunque, nel combinare la giusta tipologia cellulare con il giusto materiale per garantirne la proliferazione e quindi la

generazione di nuovo tessuto. La natura del biomateriale e le sue proprietà chimico-fisiche sono fondamentali per creare le condizioni favorevoli alla formazione del tessuto¹.

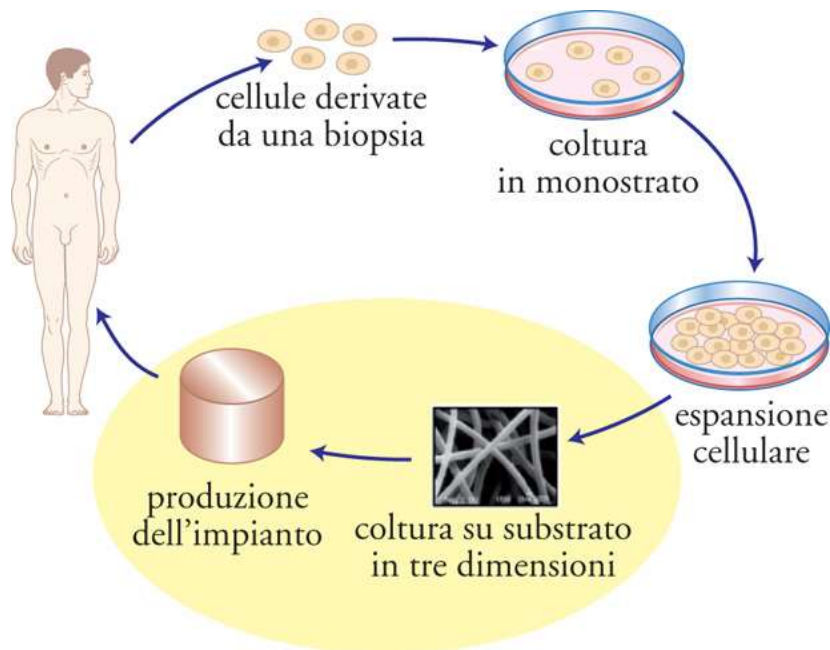


Figura 1 - Iter operativo dell'ingegneria tissutale

1.2 Lo *scaffold* nell'ingegneria tissutale

Si definisce *scaffold* una struttura tridimensionale, di origine naturale o sintetica, sulla quale vengono seminate e coltivate cellule, al fine di generare un costrutto biologico funzionale. Lo *scaffold* guida lo sviluppo del tessuto e fornisce alla componente cellulare una struttura di supporto temporanea, che può andare incontro a fenomeni di degradazione. La produzione di matrice extracellulare da parte delle cellule in maturazione contribuisce allo sviluppo del nuovo tessuto. Occorre sottolineare come non esista uno *scaffold* "universale" per il trattamento dei difetti a carico dei diversi tessuti; ciò significa, ad esempio, che per la rigenerazione del tessuto osseo, il quale richiede in aggiunta la presenza di una componente inorganica, sono necessari supporti con caratteristiche differenti, in termini di composizione chimica, struttura e proprietà

meccaniche, rispetto a quelli impiegati per la terapia di lesioni ai tessuti molli, come i vasi ematici o il tessuto muscolare.

Le caratteristiche ottimali che un biomateriale deve possedere affinché possa essere processato come scaffold si possono riassumere in:

- biocompatibilità, in particolare, il materiale deve essere caratterizzato da una bassa trombogenicità e immunogenicità, nonché risultare angiogenico e suturabile; deve essere riconoscibile e rimodellabile dalle cellule tissutali del sito d'impianto e dagli enzimi della matrice extracellulare;
- bioriassorbibilità, con velocità di degradazione modulabile e compatibile con i tempi di rigenerazione del tessuto vivente e produzione di cataboliti atossici;
- elevata porosità interconnessa (di diametro tipicamente compreso tra i 200 e i 500 μm) che permettano la diffusione e la crescita cellulare, il trasporto di sostanze nutritive, la penetrazione dei vasi sanguigni e la rimozione dei cataboliti;
- opportune proprietà superficiali che favoriscano l'adesione, la proliferazione e/o il corretto differenziamento cellulare;
- proprietà meccaniche comparabili a quelle del tessuto da sostituire;
- riproducibilità in geometrie e dimensioni variabili.

La quasi totalità dei tessuti biologici possiede un'architettura e un'organizzazione spaziale ben definita e strettamente correlata alle funzioni dei tessuti stessi. Per questa ragione, la realizzazione di costrutti per l'ingegneria tissutale richiede l'utilizzo di tecniche con un elevato controllo sui parametri strutturali dello *scaffold*, come la distribuzione e la geometria dei pori e la rugosità delle superfici. La struttura gerarchica dei tessuti biologici, finemente organizzata a partire dalla scala nanometrica fino a quella millimetrica, ha portato al recente sviluppo di tecniche di produzione e di lavorazione dette *nano* e *micro* fabbricazione. A livello nanometrico è necessario controllare la distribuzione di ligandi e siti di adesione, al fine di garantire la corretta organizzazione del citoscheletro e lo sviluppo di processi biochimici in grado di condurre la cellula verso il fenotipo desiderato. Considerando invece il livello micrometrico, occorre fornire ai costrutti una struttura porosa che permetta un'adeguata perfusione di nutrienti, la rimozione dei prodotti di scarto del metabolismo cellulare e la possibilità di sviluppare

una rete capillare, attraverso l'innescò di processi angiogenici. Per raggiungere questi obiettivi sono state sviluppate tecniche in grado di realizzare *scaffold* tridimensionali con pori interconnessi e dalle dimensioni controllate, che agevolino i processi di migrazione, proliferazione e differenziamento cellulare così come raffigurato in Figura 2. Spostandosi verso un ordine superiore di osservazione, infine, occorre realizzare un costrutto con morfologia compatibile con quella del tessuto trattato e con dimensioni adeguate per la corretta collocazione nel sito d'impianto².

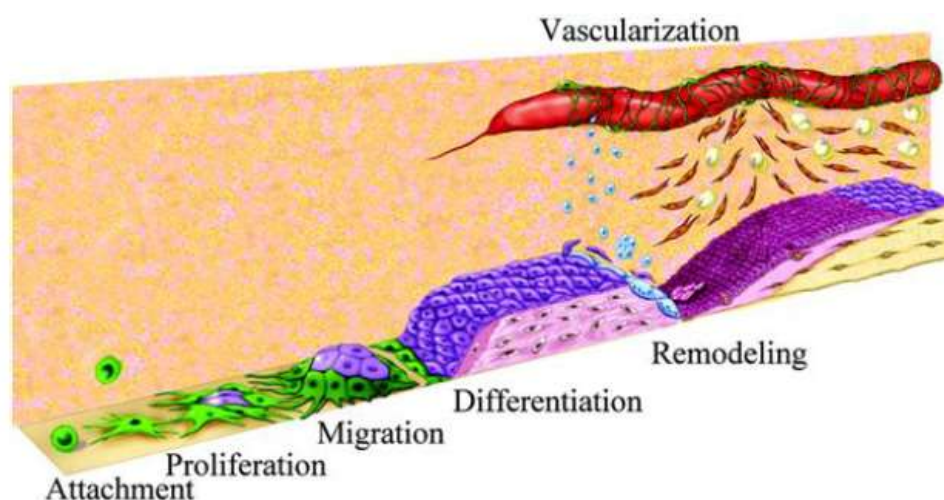


Figura 2 - Fasi della rigenerazione tissutale mediante scaffold

1.2.1 Scaffold per la rigenerazione della cartilagine articolare

Il tessuto cartilagineo è una forma specializzata di tessuto connettivo la cui funzione principale è quella di sostegno. Tale tessuto è costituito da cellule (condrociti) circondate da una sostanza intercellulare, nella quale sono presenti fibre, immerse in una matrice amorfa in fase gel. La cartilagine è quindi composta da una parte fluida, che le dona la capacità di assorbire traumi, e da una parte solida che ne aumenta la resistenza meccanica. Tali fasi interagiscono tra loro per garantire il movimento e proteggere le superfici articolari dall'usura.

Considerando la quantità e la costituzione della sostanza amorfa e in base alle fibre in essa presenti, la cartilagine viene classificata in: ialina, fibrosa ed elastica (Figura 3).

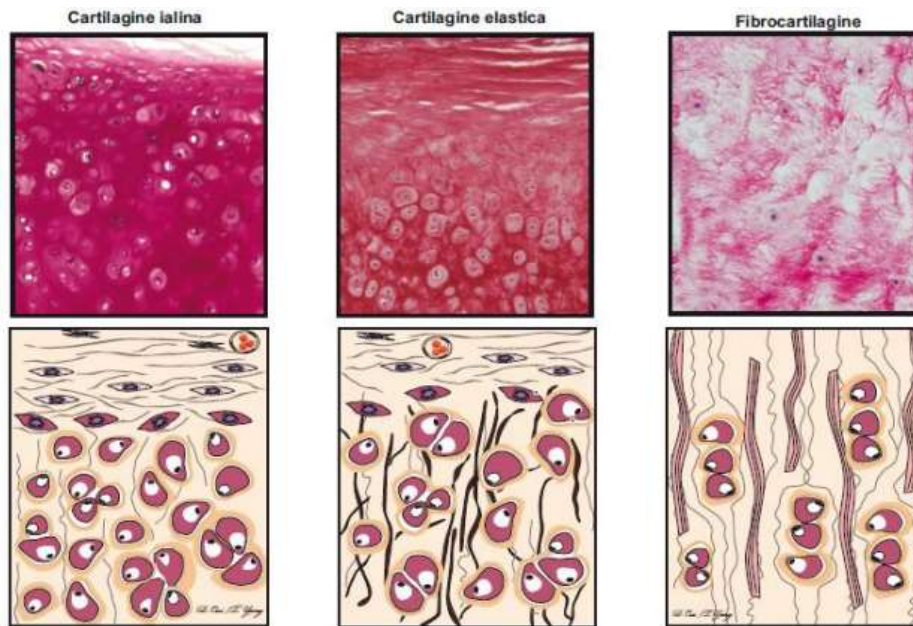


Figura 3 - Rappresentazione delle diverse tipologie di cartilagine

La funzione di tali cartilagini è molto importante soprattutto dal punto di vista della biomeccanica in quanto esse sono in grado di assorbire gli shock e i colpi nonostante abbiano uno spessore di pochi millimetri, e sono in grado anche di ripartire al meglio i carichi senza sforzare eccessivamente l'osso sub-condrale.

Il tessuto cartilagineo non essendo vascolarizzato presenta una limitatissima capacità di autorigenerazione, al contrario degli altri tessuti connettivi.

Per questo una lesione cartilaginea dovuta a difetti congeniti, traumi o conseguenze patologiche comporta una notevole limitazione sulle potenzialità del tessuto. Infatti l'assenza di vasi sanguigni e quindi di una risposta al danneggiamento, comporta un limite nella rigenerazione dei condrociti. L'unica opzione per prevenire la completa degenerazione dell'articolazione è l'intervento chirurgico mediante trapianto, ma in genere esso non risulta molto soddisfacente e non ristabilisce totalmente le funzionalità dell'articolazione ed è soggetto a revisioni nel tempo³.

Per tali ragioni l'ingegneria dei tessuti sta guidando la propria ricerca verso la rigenerazione del tessuto cartilagineo per ristabilire le normali funzioni articolari mediante lo sviluppo di scaffold tridimensionali bifasici che siano in grado di riprodurre

i differenti requisiti biologici e funzionali. L'integrazione tra tessuto e scaffold infatti dovrebbe avvenire su tre livelli: cartilagine rigenerata con la cartilagine originaria, l'osso rigenerato con l'osso originario e la cartilagine rigenerata con l'osso rigenerato. Per questo motivo sono stati realizzati compositi con due o tre strati.

In particolare la rigenerazione della cartilagine articolare dovrebbe essere accompagnata da un adeguato ripristino della struttura ossea subcondrale, in modo che la nuova cartilagine si integri con l'osso. Siccome però l'interfaccia tra l'osso originario e quello rigenerato si integra più velocemente di quella tra le due cartilagini, è necessario un costrutto osteocondrale a tre strati (osso - cartilagine calcificata - cartilagine) capace di integrare in maniera adeguata il nuovo tessuto con il tessuto originario.

Per ottenere un costrutto di questo tipo sono quindi necessari requisiti non ottenibili con un solo materiale.

Sebbene diversi studi si siano concentrati su scaffold biopolimerici a base di acido ialuronico e collagene, l'insorgere di incongruenze in combinazione a problemi immunogenici hanno suggerito ai ricercatori di focalizzarsi su scaffold polimerici a base di acido poliglicolico (PGA). Freed et al. hanno dimostrato che il grado di proliferazione e di deposito dei condrociti su scaffold a base di PGA è significativamente maggiore se paragonato a scaffold a base di acido polilattico (PLA). Entrambi i polimeri hanno però evidenziato maggiori capacità di promuovere la sintesi di proteoglicani rispetto a scaffold costituiti da collagene⁴. L'abilità di promuovere la proliferazione, la maturazione e la differenziazione di condrociti e le migliori proprietà meccaniche di polimeri biodegradabili a base di poliesteri ne ha incrementato l'impiego per la riparazione della cartilagine. Inoltre studi recenti relativi al copolimero acido D, L-lattico-co-glicolico (PLGA) ne hanno evidenziato una forte tendenza nel favorire l'adesione cellulare da osteoblasti³.

1.2.2 Scaffold per la rigenerazione di tessuti connettivi fibrosi

Per tessuti connettivi fibrosi si intendono tendini e legamenti, che risultano avere un ruolo fondamentale nel movimento delle articolazioni. Nel caso di rottura totale di un tendine o di un legamento la soluzione primaria rimane la ricostruzione chirurgica tramite

autograft⁵; si preleva una porzione di tessuto da un altro legamento e lo si utilizza per riparare il legamento rotto. Questa operazione previene l'instabilità o il malfunzionamento dell'articolazione.

Il trattamento chirurgico può però determinare l'insorgenza di alcune complicazioni, come difetti che permangono sul legamento da cui è stato fatto l'autograft, oppure dolore residuo sull'articolazione, problemi nell'estensione totale dell'articolazione e problematiche nell'adesione dell'autograft ai tessuti adiacenti. Per questi motivi la medicina rigenerativa applicata a tendini e legamenti è da considerarsi una valida alternativa alla ricostruzione chirurgica. Infatti oltre che ristabilire la morfologia, le proprietà meccaniche e l'integrità del legamento, si cerca di ripristinare la funzionalità dell'intera articolazione.

Per questo tipo di applicazioni sono state sviluppate una serie di terapie geniche e cellulari per indurre la rigenerazione tissutale oltre alla realizzazione di opportuni scaffold. Infatti a differenza dei normali tessuti connettivi molli, tendini e legamenti presentano elevate proprietà meccaniche da attribuirsi alla loro capacità di trasmettere forze e mantenere la stabilità articolare. Per questo il materiale adottato per la realizzazione dello scaffold deve saper mimare tali caratteristiche ed essere in grado di fornire un ambiente biologico ideale per la migrazione e la colonizzazione di nuove cellule (fibroblasti).

Una serie di scaffold sintetici sono stati prodotti utilizzando diverse tipologie di polimeri e metodi di fabbricazione sia per la riparazione sia per il rinforzo di tendini e legamenti. Alcuni impianti per la sostituzione del legamento crociato anteriore hanno visto l'impiego di fibre di carbonio, Gore-Tex e Dacron ma senza ottenere risultati soddisfacenti in termini di stabilità a lungo termine. I materiali sintetici non sembrano particolarmente adatti per fornire il supporto necessario per la crescita di nuovo tessuto nonostante garantiscano un'estrema stabilità, elevata biocompatibilità e un range di degradazione controllato⁶.

Sicuramente lo sviluppo di scaffold bio-ibridi ha permesso di ottenere risultati migliori in relazione a stabilità e proprietà meccaniche. Uno scaffold a base di chitosano e acido ialuronico, seminato da fibroblasti per riparare i tendini su coniglio, ha provocato un incremento nella produzione di collagene di tipo I e un miglioramento significativo della resistenza a trazione. Altre ricerche sono state condotte su hydrogel di PEG-DA

incorporati con idrossiapatite (HA); l'introduzione di quest'ultima seppure riducendo la percentuale di swelling ha aumentato la resistenza e la rigidità dell'hydrogel⁷.

1.2.3 Scaffold per la rigenerazione del tessuto osseo

Il tessuto osseo è un particolare tipo di tessuto connettivo, la cui funzione è quella di sostenere il corpo, proteggere organi vitali e permettere, insieme ai muscoli, il movimento. Si tratta di un materiale composito caratterizzato da notevole durezza e resistenza meccanica unite a elasticità e leggerezza. Strutturalmente esso è costituito principalmente da collagene di tipo I, soffice ma resistente, mineralizzato da nano-cristalli di fosfato di calcio, l'idrossiapatite. L'osso deve le sue proprietà meccaniche alla particolare disposizione e organizzazione delle fibre di collagene e alla distribuzione dell'idrossiapatite su di esse che gli conferiscono una buona rigidità accoppiata a un'elevata tenacità. Contrariamente a quello che si può pensare, la struttura ossea non è mai statica: le cellule contenute al suo interno (osteoclasti, osteoblasti e osteociti) lavorano continuamente per mantenerne e adattarne la struttura micro, macro-strutturale, attraverso il processo di rimodellamento osseo.

La presenza di traumi, degenerazioni patologiche, osteoporosi, perdita di potenzialità rigenerativa e deformazioni congenite richiedono applicazioni cliniche per il riparo o la sostituzione del tessuto osseo. Attualmente, le terapie cliniche si basano sull'impiego di sostituti artificiali come le ceramiche, oppure innesti di tessuto osseo provenienti dallo stesso paziente (*autograft*), da tessuti prelevati da cadavere (*allograft*) o da una specie animale diversa da quella umana (*xenograft*)⁸. Nonostante il trapianto autologo sia la soluzione più impiegata grazie all'elevato potenziale osteoinduttivo, spesso esso non è realizzabile a causa della presenza di una patologia estesa ai potenziali siti donatori o per la scarsità di tessuto osseo disponibile per il prelievo. Per quanto riguarda gli *allograft* e gli *xenograft*, queste strategie sono spesso veicolo di patologie e possono causare reazioni immunogeniche.

Per affrontare e migliorare tali problematiche l'ingegneria tissutale ha iniziato a sviluppare scaffold bioattivi, con una superficie ingegnerizzata per stimolare la funzione cellulare e interagire con le cellule stesse. In tale ambito inizialmente sono stati progettati e realizzati sostituenti ossei con adeguate proprietà meccaniche e con una porosità

controllata che permettesse l'infiltrazione cellulare, la vascolarizzazione e la ristrutturazione del tessuto. Tuttavia, sebbene molti di questi prodotti assomigliassero microscopicamente al tessuto da sostituire, molteplici fattori intervenivano compromettendo la guarigione dell'area impiantata.

Si è passati quindi ad un secondo approccio basato su una migliore definizione della reale composizione del tessuto osseo naturale, inteso come un sistema dinamico di più componenti interagenti in un ambiente complesso, che ha portato ai materiali di ultima generazione detti bioibridi, denominati così proprio perché ottenuti attraverso una sintesi che cerca di imitare il naturale processo di mineralizzazione dell'osso mimandone le caratteristiche chimico-fisiche e meccaniche dalla nano alla macro-scala. A tale scopo sono stati fabbricati diversi tipi di compositi a base di idrossiapatite e materiali polimerici quali acido polilattico (PLA), PLGA, chitosano e collagene (Figura 4), dimostrando un incremento nella generazione di tessuto osseo sia in vitro che in vivo. Questi materiali, considerati biomimetici, stimolano la formazione, la precipitazione e il deposito di calcio fosfato da fluido biologico simulato (SBF), determinando così un aumento della resistenza all'interfaccia matrice-osso⁹.

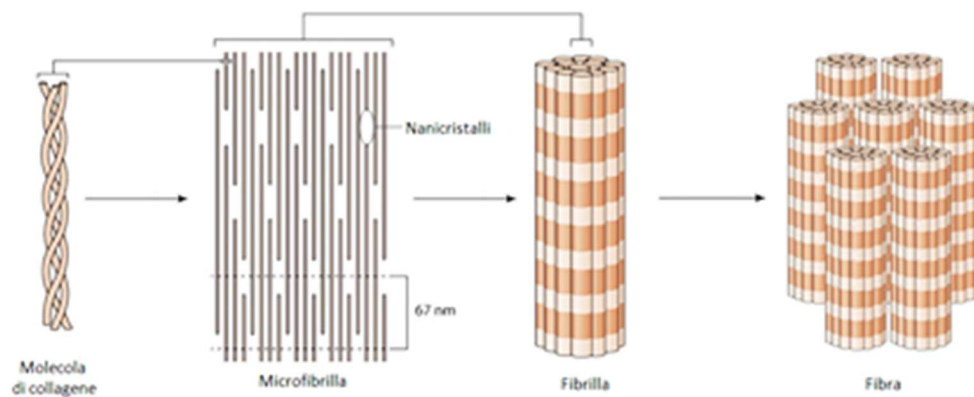


Figura 4 – Struttura tridimensionale gerarchicamente organizzata delle molecole di collagene formata da una matrice organica e da una fase inorganica nanostrutturata

1.3 Cellule coinvolte nella rigenerazione dei tessuti

Il processo di sintesi di un costrutto ingegnerizzato ha inizio con la selezione del tipo cellulare necessario alla generazione del tessuto di interesse. Tra le differenti tipologie cellulari di possibile utilizzo si considerano:

- cellule autologhe: isolate da tessuti naturali dell'individuo in cui saranno reimpiantate;
- cellule allogene: isolate da un organismo della stessa specie di quello in cui saranno reimpiantate;
- cellule xenogene: isolate da individui di altra specie;
- cellule isogene: estratte da tessuti nativi di individui identici, quali gemelli o cloni.

Tecnologie innovative nel campo della biologia molecolare hanno recentemente consentito l'impiego di cellule staminali per la rigenerazione di tessuti e organi. Una cellula staminale è per definizione una cellula in grado di autorinnovarsi generando una progenie con le stesse caratteristiche della cellula madre, differenziare in più linee cellulari e rigenerare in vivo il tessuto di origine.

Durante lo sviluppo e la vita, molti tessuti sono in grado di autoripararsi in seguito ad un danno: questo processo che conduce alla rigenerazione e alla riparazione dipende da una popolazione di cellule di riserva che si dividono lentamente per automantenersi ma che, quando necessario, possono proliferare per fornire i precursori commissionati per uno specifico tipo di cellula differenziata. In base alla potenza, ovvero la capacità di dare origine a una o più specie cellulari, esse si dividono in:

- totipotenti: cellule in grado di svilupparsi in un intero organismo e persino in tessuti extra-embryonali;
- pluripotenti: cellule in grado di specializzarsi in tutti i fenotipi cellulari individuabili in un organismo adulto;
- multipotenti, in grado di specializzarsi unicamente in alcuni tipi di cellule;
- unipotenti, capaci di generare solamente un tipo di cellula specializzata;

Le cellule staminali vengono, inoltre, suddivise in due classi: cellule staminali embrionali, ricavate dalle cellule interne di una blastocisti (pluripotenti), e adulte, ovvero cellule non

specializzate reperibili tra cellule specializzate di un tessuto specifico adulto (multipotenti, unipotenti).

La possibilità di utilizzare cellule staminali embrionali umane per lo sviluppo di trapianti a carattere terapeutico ha però generato una serie di dibattiti riguardanti gli aspetti etici dell'impiego di embrioni umani come materiale di partenza da cui ottenere cellule staminali. Questa controversia ha orientato gran parte della ricerca sullo studio di cellule staminali adulte come alternativa all'impiego di cellule di origine embrionale. Le cellule staminali adulte o somatiche sono presenti in diversi tessuti e, benché in numero minore rispetto alle embrionali, anch'esse rispondono ai criteri caratteristici delle cellule staminali.

Dati sperimentali in conflitto e questioni irrisolte inerenti al differenziamento, transdifferenziamento e dedifferenziamento, di cellule staminali adulte, garantiscono il proseguimento degli studi di ricerca in tale settore.

1.4 Materiali utilizzati per lo sviluppo degli scaffold

1.4.1 Generalità

Con il termine biomateriali si indicano quei materiali che rispondono al bisogno dell'uomo di sostituire o integrare tessuti e organi, non più attivi dal punto di vista funzionale o metabolico, danneggiati da eventi traumatici o patologici. Il numero delle loro applicazioni è cresciuto notevolmente in questi anni e spaziano dagli organi artificiali, alle protesi, ai dispositivi medici più usuali.

Le modalità di utilizzo determinano quindi la scelta di un materiale rispetto a un altro; inoltre, la comprensione della relazione esistente tra struttura-proprietà-funzione dei biomateriali costituisce una sfida per la moderna scienza dei materiali in quanto è fondamentale per la progettazione e realizzazione di costrutti, in grado di sostituire o riparare tessuti danneggiati, finalizzati ad ottimizzare trattamenti terapeutici per la cura di patologie.

Uno degli aspetti fondamentali che riguarda l'applicazione di un biomateriale è la compatibilità¹⁰. Per compatibilità non si intende solo quella biologica, ma una caratteristica più articolata che può essere suddivisa in tre aspetti principali:

- **Compatibilità morfologica:** aspetto che riguarda le interfacce dimensionali, quelle di forma e quelle relative alla massa. Ad esempio, un dispositivo impiantabile deve avere forma e dimensione tali da essere inseribile al posto del tessuto naturale e deve essere interfacciabile geometricamente.
- **Compatibilità funzionale:** aspetto che riguarda il ruolo svolto dal dispositivo rispetto al ruolo atteso. Infatti, non sempre un dispositivo si comporta rispetto al ruolo atteso. A volte può avere caratteristiche funzionali in più a volte in meno.
- **Compatibilità biologica o biocompatibilità:** aspetto che riguarda la capacità di un materiale di determinare, da parte di un sistema vivente, una reazione favorevole alla sua presenza in una specifica applicazione. Specifichiamo che la biocompatibilità riguarda tutti gli aspetti di natura chimica e biologica che possono indurre alterazioni dannose sia per i tessuti, sia per i materiali utilizzati, che vengono a contatto con questi tessuti.

1.4.2 Biomateriali polimerici

Per polimero si intende un composto naturale o sintetico caratterizzato da un elevato peso molecolare (o massa molecolare) e costituito da molecole di grandi dimensioni (macromolecole). Queste macromolecole formano generalmente catene organizzate in lunghi filamenti aggrovigliati fra di loro. I polimeri derivano dalla combinazione di molecole a basso peso molecolare, dette monomeri, che si legano tra di loro a formare le lunghe catene sopraccitate. La sequenza con cui si concatenano è variabile da polimero a polimero ed i monomeri che le formano rappresentano le unità strutturali del polimero stesso. Se il polimero è formato da una ripetizione dello stesso monomero è detto omopolimero. Un polimero, invece, formato da due o più tipi di monomeri è denominato copolimero.

All'interno di un omopolimero i legami tra i vari monomeri sono per lo più covalenti e possono essere semplici o doppi. Nel secondo caso, siccome la forza di legame è maggiore, essi irrobustiscono la struttura rendendola meno flessibile, ma più resistente alla degradazione. Stessa cosa causano gruppi laterali caratterizzati da elevato ingombro sterico.

Circa il 45% dei biomateriali attualmente in uso appartiene alla famiglia dei polimeri, che sono quindi i materiali più impiegati nella realizzazione di dispositivi medici (Figura 5). Vengono scelti sia polimeri naturali (ad esempio collagene, gelatina, alginato, chitosano, cellulosa, acido ialuronico), sia polimeri sintetici (ad esempio acido polilattico, acido poliglicolico, policaprolattone). Da notare che la struttura chimica dei polimeri sintetici è molto simile a quella dei polimeri naturali, di conseguenza è possibile ottenere la formazione di legami chimici tra polimeri naturali e sintetici.

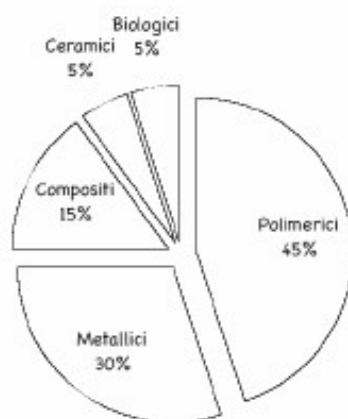


Figura 5 – Utilizzo, in percentuale, delle diverse classi di biomateriali

I principali vantaggi dei materiali polimerici rispetto alle altre classi di materiali, quali ceramici o metalli, sono: maggiore biocompatibilità, possibilità di modificarne la composizione e le proprietà meccaniche-fisiche, bassi coefficienti di attrito, facile lavorabilità, possibilità di modificarne chimicamente e/o fisicamente la superficie, possibilità di immobilizzare cellule o biomolecole al loro interno o sulla superficie. Tuttavia, i materiali polimerici possiedono anche diversi svantaggi, quali le povere proprietà meccaniche, la presenza di sostanze che possono essere rilasciate nell'organismo (monomeri, catalizzatori, additivi, ecc.), la facilità di assorbimento di acqua e biomolecole dall'ambiente circostante e, in certi casi, difficoltà di sterilizzazione. La buona biocompatibilità dei materiali polimerici viene intesa come interazione che promuove l'accettazione del materiale da parte dell'organismo. Talvolta, questa interazione può condurre ad una sorta di metabolizzazione del polimero, che nel tempo

viene degradato ed eliminato. Questa tipologia di polimeri è detta bioassorbibili e vengono utilizzati nelle applicazioni temporanee.

Come precedentemente accennato, nel campo dell'ingegneria tissutale sono due le classi dei polimeri utilizzati: sintetici e naturali. Per i campi di applicazione visti sopra, vengono scelti principalmente polimeri naturali. Per polimeri naturali si intende una vasta famiglia di polimeri presenti in natura e non sintetizzati direttamente dall'uomo. Sono polimeri naturali le proteine, le catene di carboidrati, gli acidi nucleici, etc. In ambito tissutale però risultano avere particolare interesse quei polimeri che possiedono tutte le caratteristiche necessarie all'interazione cellulare ed alla rigenerazione dei tessuti. I polimeri di origine naturale, benché fortemente biocompatibili e biologicamente attivi, presentano scarse proprietà meccaniche, che ne restringono il campo di applicabilità; inoltre, molto spesso, l'utilizzo di polimeri naturali non garantisce l'uniformità e la riproducibilità del prodotto. Una via per poter ottimizzare le proprietà dei singoli materiali è la sintesi di miscele polimeriche. Per miscela polimerica si intende una miscelazione fisica di due o più polimeri, omo e/o copolimeri, che possono essere tra loro completamente miscibili, parzialmente miscibili o immiscibili. Polimeri immiscibili formano miscele eterogenee bifasiche (blend), che consistono nella interdizione di un polimero nell'altro. Attraverso una miscela è possibile variare e soprattutto migliorare le proprietà dei polimeri di partenza. Questo sistema viene perciò adottato perché permette di ottenere un buon rapporto costo/prestazioni nelle applicazioni, piuttosto che ricorrere alla preparazione di nuovi polimeri.

1.4.2.1 Gelatina

La gelatina è un biopolimero naturale derivante dalla reazione di idrolisi parzialmente acida o alcalina del collagene presente nella pelle, nelle ossa e nei tendini animali. Le diverse fonti di gelatina e le varie tecniche di produzione ne determinano una forte variabilità in termini di struttura, proprietà fisiche ed omogeneità chimica¹¹. Nonostante le differenze presenti nei metodi di produzione, la gelatina è ampiamente utilizzata in campo alimentare, cosmetico, farmaceutico e medico per le sue eccellenti proprietà, quali biocompatibilità, biodegradabilità, eccellente bioadesione e bassi costi di produzione.

La struttura della gelatina è caratterizzata da un numero elevato di gruppi funzionali liberi (Figura 6) che possono legarsi tra di loro o con altri ligandi per formare uno scaffold stabile o opportunamente funzionalizzato per applicazioni specifiche.

Infatti, il principale svantaggio della gelatina è la rapida degradazione che ne dissolve la struttura prima della rigenerazione dei tessuti operata dalle cellule perdendo così la funzione di supporto tridimensionale tipica e fondamentale per uno scaffold. Questo problema può essere superato tramite l'utilizzo di opportuni agenti reticolanti che determinano un incremento nella stabilità chimica e strutturale dello scaffold attraverso la formazione di legami covalenti tra le catene polimeriche.

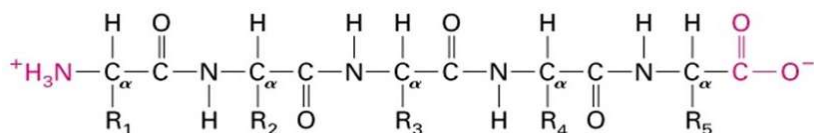


Figura 6 - Formula chimica della gelatina

1.4.2.2 Nanocellulosa

La nanocellulosa (CNF) è costituita da nanofibre o nanofibrille di cellulosa normalmente estratta dalle piante. L'elevata presenza di gruppi OH sulla superficie della cellulosa (Figura 7) favorisce la formazione di legami a idrogeno che determinano la creazione di catene di cellulosa assemblate in strutture ordinate. Inoltre i legami a idrogeno giocano un ruolo critico nell'adesione della nanocellulosa ad altri materiali polimerici¹².

La presenza di gruppi funzionali sulle catene polimeriche permette, attraverso reazioni opportune, di funzionalizzare il polimero modulando le sue proprietà chimiche, un esempio è l'ossidazione dei gruppi alcolici della cellulosa per aumentarne la sua reattività. L'ossidazione mediata da TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-ossido radicale), un composto chimico eterociclico, rappresentata in Figura 8, permette di introdurre gruppi aldeidici e carbossilici sulla superficie delle fibrille di cellulosa, sfruttando l'ipoclorito di sodio come ossidante. La nanocellulosa così ottenuta è costituita da singole nanofibrille

di 3,5-20 nm di larghezza e lunghezze dell'ordine dei μm . A basse concentrazioni di solido (approssimativamente 0,5%) la dispersione delle fibrille si presenta sotto forma di gel fisici o reversibili, costituiti da legami a idrogeno, interazioni ioniche e interconnessione tra le fibrille. I gel reversibili sono poco resistenti e si disgregano facilmente al variare delle condizioni chimiche o se sottoposti a forze meccaniche. Per ottenere gel chimici o irreversibili si procede attraverso la reticolazione covalente delle fibrille. Studi precedenti hanno infatti dimostrato che i gruppi aldeidici presenti sulla nanocellulosa ossidata possono essere sfruttati per reticolare le fibrille così da ottenere gel dalla struttura stabile¹³.

Le proprietà della nanocellulosa come l'ampia superficie specifica, l'elevata cristallinità, l'idrofilicità e le eccezionali proprietà meccaniche, la rendono particolarmente adatta per essere impiegata in combinazione con polimeri per la sintesi di biocompositi; proprio per questo viene sfruttata come rinforzo per la gelatina.

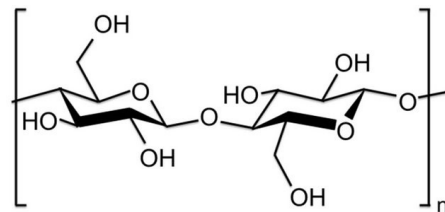


Figura 7 - Formula chimica della nanocellulosa

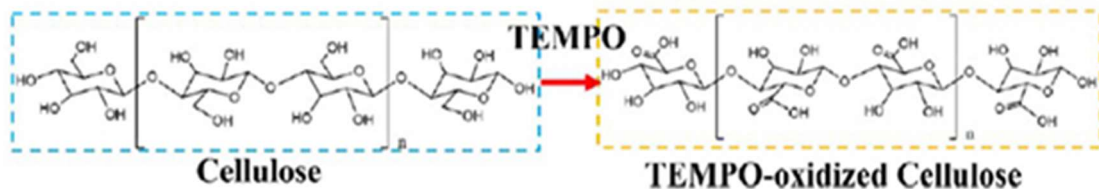


Figura 8 - Reazione di ossidazione della cellulosa mediata da TEMPO

1.5 Processi di reticolazione

La reticolazione è un processo di stabilizzazione nella chimica dei polimeri che determina un'estensione multidimensionale delle catene polimeriche all'interno della struttura attraverso la formazione di nuovi legami tra le catene, ionici o covalenti (Figura 9). Quando le catene polimeriche si legano tra loro perdono in parte la loro capacità di muoversi determinando, inoltre, un aumento della massa molecolare del polimero. I polimeri reticolati hanno migliori proprietà meccaniche, presentano una minore solubilità e sono in grado di resistere al calore, all'usura e all'attacco da solventi ed enzimi. Tuttavia, lo svantaggio principale associato ai polimeri post reticolazione è la perdita di viscosità ed elasticità.

La reazione di reticolazione può avvenire tramite due principali metodi: cross-linking fisico e cross-linking chimico. Il cross-linking fisico prevede la regolazione di parametri quali la pressione, la temperatura, il volume, al fine di innescare particolari processi grazie a cui viene a formarsi una reticolazione senza aggiunta di agenti chimici (crosslinkers), ad esempio il trattamento termico di disidratazione in vuoto (DHT). Il cross-linking chimico invece prevede l'utilizzo di agenti chimici di sintesi (e.g. esametildiammina – HMDA, 1,4-butanediol diglycidyl ether – BDDGE, glutaraldeide - GTA) o naturali (e.g. genipina, acido tannico) con conseguente formazione di legami covalenti fra le catene del polimero¹⁴.

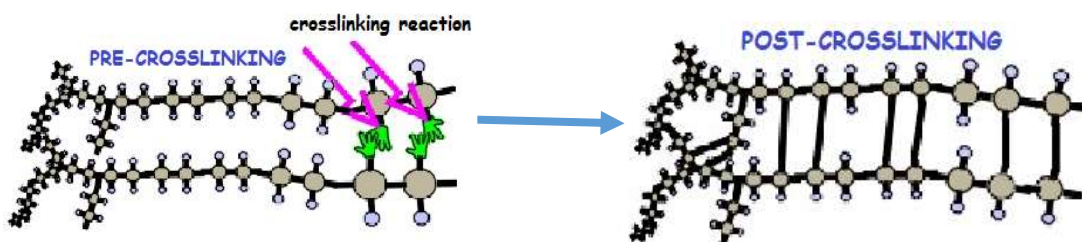


Figura 9 - Processo di reticolazione con conseguente formazione di legami tra le catene polimeriche

1.5.1 Trattamento termico di disidratazione (DHT)

Il trattamento termico di disidratazione (DHT) è una tecnica impiegata comunemente per stabilizzare il collagene e i materiali che ne derivano come la gelatina. È un trattamento fisico che sottopone il campione a un aumento di temperatura ($>90^{\circ}\text{C}$) in condizioni di vuoto. Tale processo determina una rimozione dell'acqua dalle molecole di gelatina in seguito alla formazione di reticolazioni intermolecolari derivanti da reazioni di condensazione, esterificazione o formazione di ammidi.

Il trattamento termico di disidratazione è da preferirsi rispetto ad altre tecniche di cross-linking perché non comporta l'utilizzo di reagenti chimici che potrebbero risultare citotossici e favorisce la sterilizzazione del campione attraverso le alte temperature. Inoltre studi passati hanno evidenziato come l'aumento della temperatura del DHT e la durata dell'esposizione migliorino le proprietà meccaniche delle fibre di gelatina¹⁵.

1.5.2 Esametildiammina (HMDA)

Le diammine, quali l'esametildiammina (HMDA) (Figura 10), sono agenti reticolanti chimici largamente impiegate in campo biomedico. I gruppi funzionali amminici sono in grado di reagire velocemente con aldeidi, così le diammine formano legami covalenti con le aldeidi presenti sulla superficie della nanocellulosa risultanti dalla reazione di ossidazione mediata da TEMPO¹³.

Lo svantaggio principale associato all'impiego di agenti reticolanti chimici è dato dalla possibilità che non tutto il crosslinker reagisca all'interno dello scaffold e che interagisca con il substrato durante la degradazione in vivo rischiando la formazione di prodotti tossici. Per questo motivo sono stati condotti diversi studi per trovare agenti reticolanti alternativi, potenzialmente meno tossici. I trattamenti chimici trovano comunque un largo impiego poiché permettono di ottenere un grado di cross-linking elevato.

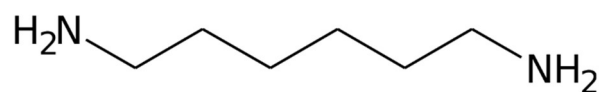


Figura 10 - Struttura chimica dell'esametildiammina

1.5.3 Genipina

La genipina (Figura 11) è un agente reticolante derivante dall'iridoide glicoside geniposide presente nel frutto della gardenia. La genipina è ampiamente utilizzata nell'erboristeria mentre i pigmenti blu scuri ottenuti dalla reazione della genipina con ammine primarie sono stati sfruttati per la produzione di pH e coloranti alimentari. Questo crosslinker naturale è uno tra i reticolanti impiegati negli scaffolds a base di peptidi per la sua scarsa citotossicità ed elevata biocompatibilità, proprietà che lo contraddistingue dalla glutaraldeide, un crosslinker chimico comunemente utilizzato¹¹. Inoltre i tessuti fissati con genipina mostrano una resistenza meccanica e alla degradazione pari a quelli trattati con glutaraldeide¹⁶.

Il meccanismo di reticolazione è composto da due reazioni che coinvolgono siti differenti della molecola di genipina. Il primo passo consiste nell'attacco nucleofilo all'atomo di carbonio C3 della genipina da un gruppo di ammine primarie così da formare un gruppo aldeidico intermedio. Non appena formatasi l'ammina secondaria, essa reagisce con il gruppo aldeidico costituendo così un composto eterociclico. Lo step successivo è caratterizzato dalla reazione di sostituzione nucleofila che comporta la sostituzione del gruppo estereo sulla molecola di gelatina attraverso un legame ammidico secondario. La reazione è complicata dalla polimerizzazione radicalica dell'ossigeno della genipina che si manifesta una volta formatosi il composto eterociclico e che conferisce al gel un colore blu¹⁶.

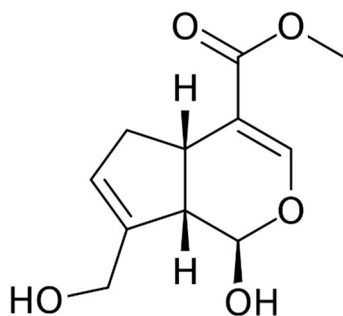


Figura 11 - Struttura chimica della genipina

1.6 Risposta dei tessuti all'impianto

La reazione che si origina dall'interazione di un materiale con i tessuti vivi del corpo umano è molto complessa.

In generale, la reazione di un organismo alla presenza di un corpo estraneo è quella di espellere quest'ultimo, o comunque di eliminarlo tramite aggressione o metabolizzazione. È da tener presente che inizialmente i tessuti lesi sono comunque sede di un processo infiammatorio che tenta di ripararli. La reazione tipica in questo caso è la comparsa di macrofagi che tendono a fagocitare, se possibile, il corpo estraneo. Nel caso in cui quest'ultimo sia chimicamente inerte, i macrofagi possono non essere presenti e il corpo viene incapsulato in un sottile strato di collagene; se invece non è inerte si instaura un complesso processo infiammatorio con ritardo della cicatrizzazione e possibilità di necrosi dei tessuti.

Per esempio nel caso in cui un impianto ortopedico metallico sia soggetto a corrosione, può verificarsi il rilascio nei tessuti di ioni metallici anche tossici e difficilmente eliminabili. Ciò conduce inevitabilmente anche alla riduzione delle caratteristiche meccaniche del dispositivo impiantato.

Il diffondersi degli ioni metallici nell'organismo può determinare pericolosi effetti sistemici, quindi non strettamente localizzati nella sede di rilascio, in quanto gli ioni sono trasportati dalla corrente ematica.

I materiali ceramici (e.g. allumina, zirconia) sono generalmente inerti dal punto di vista chimico e quindi sono sostanzialmente incapsulati da tessuto connettivo.

Nel caso di superficie porosa è possibile una parziale penetrazione dei tessuti all'interno dei pori (per migrazione); in questo modo aumenta l'aderenza dei tessuti al manufatto.

Anche i materiali bioibridi sono normalmente bioinerti e hanno la capacità di formare un legame con il tessuto circostante senza interposizione di tessuto fibroso; il tempo di formazione, la forza del legame generato, il meccanismo di formazione del legame e lo spessore della zona di legame differiscono a seconda dei materiali impiegati.

I materiali polimerici infine, solitamente impiegati negli impianti, hanno un elevato peso molecolare e sono quindi potenzialmente inerti dal punto di vista chimico, ma altre sostanze, quali residui di monomeri nella massa polimerica, spesso usate nelle fasi di

sintesi e lavorazione dei polimeri possono essere rilasciate ed essendo solitamente tossiche possono determinare effetti negativi sia localmente, sia a livello sistemico.

In alcune situazioni i polimeri sono resi chimicamente attivi e così come nel caso dei polimeri biodegradabili l'attività è una proprietà indotta per fini specifici di interazione positiva con i tessuti¹⁰.

CAPITOLO 2: OBIETTIVO DELLA TESI

L'ingegneria tissutale rappresenta oggi una delle tematiche più importanti di ricerca in ambito medico-ingegneristico. Questa disciplina si pone come obiettivo di far fronte alla mancanza, sostituzione o riparazione di tessuto attraverso lo sviluppo di scaffolds opportunamente ottimizzati. Infatti queste strutture tridimensionali di supporto devono poter essere realizzate, in termini di composizione e processo produttivo, in maniera differente a seconda dell'applicazione richiesta. Come trattato nel capitolo introduttivo, i polimeri naturali rappresentano una classe di materiali particolarmente indicata per soddisfare i requisiti richiesti soprattutto per la biocompatibilità che spesso li caratterizza. La gelatina è uno dei materiali che si presta alla realizzazione di scaffolds innovativi ad altissima biocompatibilità nonostante le scarse proprietà meccaniche e la facilità di degradazione. Proprio per questo è possibile migliorarne le prestazioni attraverso l'ottimizzazione di processi di blending con altri polimeri, in questo caso le nanofibre di cellulosa e l'impiego di agenti reticolanti.

Lo scopo di questo lavoro di tesi, svolto presso l'Istituto di Scienza e Tecnologia dei Materiali Ceramici (ISTEC-CNR) di Faenza, è la progettazione, lo sviluppo e la caratterizzazione di scaffolds polimerici porosi a base di gelatina e nanocellulosa opportunamente reticolati per un ampio range di applicazioni nell'ambito dell'ingegneria tissutale. A questo scopo, sono stati sviluppati cinque dispositivi 3D porosi, ottenuti tramite liofilizzazione, che differiscono per il tipo di processo reticolante applicato. Ogni campione, in relazione alla propria struttura e resistenza meccanica, può risultare adatto per un particolare ambito di applicazione, tra cui la rigenerazione dei tessuti cartilaginei, dei tessuti connettivi fibrosi o del tessuto osseo.

Il progetto ha previsto una prima fase di ricerca bibliografica che ha permesso di conoscere lo stato dell'arte sull'argomento trattato. Si è potuto così procedere alla realizzazione degli scaffolds e a una prima caratterizzazione di carattere chimico-fisico e morfologico. A questo punto, sulla base dei dati ottenuti, sono stati scelti i campioni su cui effettuare ulteriori caratterizzazioni meccaniche. In ultimo, sono stati analizzati e rielaborati tutti i risultati.

CAPITOLO 3: REALIZZAZIONE DEGLI SCAFFOLD

3.1 Sintesi di blend a base di gelatina e nanocellulosa

Per lo sviluppo degli scaffold 3D porosi è stato applicato un processo di blending scegliendo come biopolimeri la gelatina (gel) come componente principale e le nanofibrille di cellulosa (CNF) come elemento rinforzante. Per la sintesi è stata utilizzata gelatina in polvere di tipo A estratta da pelle suina tramite un trattamento acido (Italgelatine, Italia) impiegata per preparare una soluzione acquosa all'8.55 wt%. La sospensione di nanofibrille di cellulosa da fonte vegetale (CNF 1.1 wt%) è stata fornita da PFI (Norvegia) ed è stata prodotta tramite reazione di ossidazione mediata da TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-ossido radicale).

Gli agenti reticolanti chimici che si è scelto di impiegare nel processo sono la genipina che è stata acquistata dalla Wako Pure Chemical USA (purezza 98% HPLC) e l'esametildiammina (HMDA, purezza 98%). Per settare specifici valori di pH è stato utilizzato idrossido di sodio (NaOH, purezza 97%) dalla Sigma Aldrich (Saint Louis, Missouri). Tutte le soluzioni sono state preparate con acqua milli-Q (TOC 3 ppb, resistività 18.2 MΩ/cm a 25 °C).

Inizialmente vengono preparate due soluzioni acquose di CNF (1.1 wt%) e gelatina (8.55 wt%) sotto agitazione meccanica a 40-50 °C fino a completa omogeneità nelle sospensioni. Successivamente la soluzione di gelatina viene aggiunta alla sospensione di CNF e il blend viene mantenuto 40 °C per un'ora sotto agitazione meccanica (Figura 12). La concentrazione finale del blend è 5 wt% circa, con un rapporto CNF/gel in peso pari a 1/10. Le reazioni di reticolazione vengono condotte a pH 7 per questo motivo, al termine della miscelazione delle due soluzioni polimeriche il pH viene stabilizzato a 7 aggiungendo la soluzione acquosa di NaOH 0.1 M. Solo in seguito, vengono aggiunte le soluzioni contenenti gli agenti reticolanti (soluzione di genipina 1wt% e soluzione HMDA 1wt%). La sospensione così ottenuta è stata mantenuta in agitazione per garantirne l'omogeneità ed è stata poi versata negli appositi stampi in Teflon. Il processo di sintesi è schematizzato in Figura 13.



Figura 12 - Blend di gelatina e nanocellulosa sotto agitazione meccanica

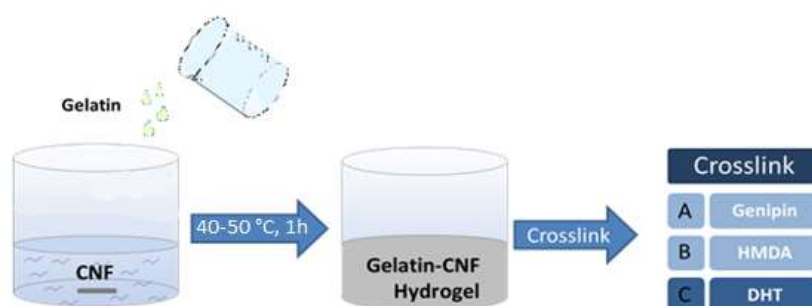


Figura 13 – Rappresentazione schematica del processo di Sintesi

3.2 Processo di reticolazione

In questo studio sono stati valutati diversi metodi di reticolazione al fine di individuare quale fosse quello più efficace per aumentare la stabilità chimica e meccanica degli scaffolds a base di CNF-gel.

Per la nanocellulosa (CNF) è stato scelto come agente reticolante l'esametildiammina (HMDA) e studi recenti hanno dimostrato come la concentrazione più adatta in relazione alla nanocellulosa sia pari al 6 wt%. Per la gelatina sono stati impiegati due diversi approcci di reticolazione: cross-linking chimico con genipina, utilizzando una

concentrazione del 1 wt% e cross-linking fisico attraverso un trattamento termico di disidratazione (DHT) che prevede un periodo di permanenza del campione post liofilizzazione in stufa a 160 °C per due giorni in condizioni di vuoto ($P = 0.001$ mbar). Quattro diversi campioni sono stati realizzati applicando diverse combinazioni dei processi di reticolazione selezionati. La Tabella 1 riporta in dettaglio le specifiche dei singoli campioni mostrati nella figura sottostante (Figura 14).

Campione	CNF-gel	CNF-gel+DHT	CNF-gel+HMDA	CNF-gel+gen	CNF-gel+HMDA+gen+DHT
Reticolazione con HMDA (g HMDA/g di CNF * 100)	-	-	6 wt%	-	6 wt%
Reticolazione con Genipina (g gen/g di gel * 100)	-	-	-	1 wt%	1 wt%
Condizioni di reticolazione (pre-liofilizzazione)	-	-	80 °C 20 h	20 °C 2 giorni	80 °C 20 h
Condizioni di reticolazione (post-liofilizzazione)	-	160 °C 2 giorni condizioni di vuoto ($P=0.001$ mbar)	-	-	160 °C 2 giorni condizioni di vuoto ($P=0.001$ mbar)

Tabella 1 – Campioni realizzati e relative condizioni di reticolazione



Figura 14 - Aspetto macroscopico post-liofilizzazione dei campioni ottenuti applicando le diverse strategie di reticolazione

3.3 Liofilizzazione

La liofilizzazione è un processo tecnologico che permette l'eliminazione dell'acqua da una matrice organica con il minimo deterioramento possibile della struttura e dei componenti della matrice stessa. Il metodo consiste nel congelamento della fase acquosa contenuta in una sospensione e la sua successiva sublimazione, ovvero la transizione di fase dell'acqua dallo stato solido a quello gassoso senza passare dallo stato liquido.

Il processo viene condotto in condizioni di temperatura e pressione accuratamente controllate per evitare danni alla struttura del prodotto, cosicché la matrice originale sia quasi perfettamente ripristinabile quando, al momento dell'utilizzo, si voglia procedere alla reidratazione qualora venisse messa nuovamente a contatto con l'acqua.

Il materiale liofilizzato mantiene quasi completamente il volume della soluzione iniziale, solo in alcuni casi si verifica una lieve diminuzione, e si ottiene una struttura porosa e spugnosa, che tende a riprodurre le geometrie dei cristalli congelati del solvente (Figura 15). Un controllo delle rampe di congelamento ed essicamento consentono, nel caso di sospensioni polimeriche come quella CNF-gel, di ottenere specifiche strutture porose aventi geometrie, dimensioni ed organizzazione nello spazio predefinite ed idonee alla colonizzazione e crescita cellulare.



Figura 15 - Aspetti macroscopici degli scaffold pre- e post-liofilizzazione

I parametri principali che influenzano il processo e l'architettura del materiale poroso sono i seguenti:

1. Stabilità della sospensione: occorre evitare fenomeni di aggregazione durante lo stadio del congelamento.
2. Concentrazione della sospensione: determina, in modo inversamente proporzionale, la quantità totale di porosità.
3. Condizioni di congelamento: sia la cinetica che la direzionalità delle condizioni di congelamento determinano la morfologia globulare/lamellare e distribuzione dei pori.
4. Dimensione delle particelle di solido in sospensione: si ha una perdita nell'omogeneità della struttura porosa quando le dimensioni delle particelle di solido si avvicinano alle dimensioni dei cristalli del solvente.

Lo strumento (Figura 16) è costituito da una camera contenente una piastra che può essere riscaldata o raffreddata in funzione del risultato finale che si vuole ottenere.

La dimensione dei pori è direttamente correlata alla velocità di raffreddamento. Un congelamento veloce determina la formazione di pori più piccoli dovuti ai numerosi cristalli di ghiaccio la cui successiva sublimazione risulterà più lenta. Al contrario una velocità di raffreddamento più lenta consente l'accrescimento dei cristalli di ghiaccio e di conseguenza lo sviluppo di una struttura con pori più grandi.

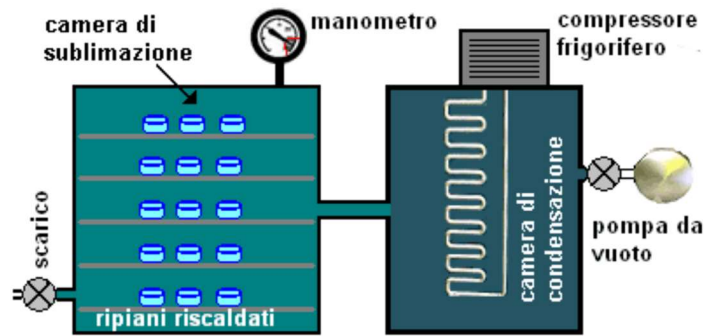


Figura 16 - Rappresentazione schematica di un'apparecchiatura per liofilizzazione

Modello di liofilizzatore utilizzato: serie LIO-1000P/2000P (Figura 17).

Nel caso in esame il ciclo di liofilizzazione procede ad una velocità controllata di congelamento a 50 °C/h fino a -40 °C. Quando il congelamento è avvenuto si crea il vuoto ($P=0.086$ mbar) e si procede con una velocità di riscaldamento di 5 °C/h da -40 °C a -5 °C e di 3 °C/h fino a 20 °C.

In base alla natura e alla geometria del substrato l'intero processo può durare alcune ore o alcuni giorni. In questo caso si preferisce un processo lento e si lascia perciò il campione all'interno della macchina per tre giorni.



Figura 17 - Liofilizzatore serie LIO-1000P/2000P

CAPITOLO 4: TECNICHE ANALITICHE

4.1 Analisi della porosità dei campioni

4.1.1 Metodo della densità

Il metodo della densità permette di misurare la densità dello scaffold e successivamente valutarne la porosità in questo modo: i campioni liofilizzati sono stati prima pesati e poi misurati per ricavarne il volume. La densità assoluta degli scaffolds è stata stimata attraverso la seguente equazione:

$$\rho = \frac{W}{\pi \times \left(\frac{D}{2}\right)^2 \times H}$$

Dove W rappresenta il peso dello scaffold, D è il diametro e H è l'altezza dello scaffold. La densità assoluta è divisa per la densità teorica assoluta del materiale valutata a partire dalla diversa composizione e la differente densità teorica assoluta dei reagenti. Tramite la densità relativa è quindi possibile ricavare la porosità dello scaffold.

4.1.2 Metodo del water squeezing

Il metodo del water squeezing permette di valutare la macroporosità dello scaffold, parametro importante per poterne prevedere una possibile colonizzazione ad opera delle cellule. Questo metodo si basa sulla stima della quantità di acqua all'interno dello scaffold prima e dopo la sua sollecitazione meccanica. Infatti l'acqua all'interno degli scaffolds è presente sia all'interno dei pori che nelle microporosità della struttura stessa; grazie alla sollecitazione meccanica che sfrutta questo metodo si riesce ad eliminare e, successivamente, valutare la porosità dovuta ai macropori. Il seguente metodo si propone di misurare la percentuale in volume dei macropori in questo modo: gli scaffolds sono stati immersi in un tampone fosfato salino (PBS) (pH 7.2) per 2-3 ore (tempo necessario affinché si bagnino completamente) per poi essere pesati. Successivamente è stata estratta

la soluzione dal campione spremendo lo scaffold e aiutandosi con della carta da filtro e ne è stato misurato nuovamente il peso. Il volume dei macropori è stato calcolato utilizzando la seguente equazione:

$$\text{Percentuale in volume dei macropori} = \frac{(M_{\text{swollen}} - M_{\text{squeezed}})}{M_{\text{swollen}}} \times 100$$

4.2 Analisi della stabilità dei campioni

4.2.1 Test di swelling

Questi test vengono implementati per conoscere la capacità di un materiale di assorbire liquidi.

Per swelling si intende l'aumento del volume di un solido causata dall'assorbimento di liquidi o vapori nell'ambiente in cui si trova. Questo fenomeno è causato da un processo di diffusione che a volte può essere accompagnato da un processo di solvatazione. Esistono due tipi di swelling, quello limitato e quello illimitato. Nel primo caso le macromolecole sono legate in maniera forte e lo swelling termina quando il materiale ha raggiunto un certo limite di assorbimento. In questo caso l'interfaccia solido-liquido rimane costante. Il secondo avviene per quei materiali caratterizzati da legami deboli, in cui l'assorbimento è continuo in quanto l'interfaccia tra solido e liquido si modifica continuamente. Ciò è causato dalla solvatazione del solido e solitamente in questi casi il solido tende a degradarsi completamente nella fase liquida.

Il grado di swelling permette anche di avere una misura qualitativa del grado di idrofilicità del materiale: più è alto lo swelling, più il materiale sarà idrofilico e viceversa.

Gli scaffolds a base di gelatina e CNF sono stati immersi in un tampone fosfato salino (PBS) (pH 7.2) in presenza di 0.1% (w/v) NaN_3 a 37 °C. A specifici intervalli di tempo (subito dopo l'immersione, 30 minuti, 1 ora, 2 ore, 6 ore, 24 ore e 48 ore) i campioni sono stati estratti dalla soluzione tampone e tamponati lievemente con carta per rimuovere le gocce in superficie.

Il rapporto di swelling (Q_s) è stato valutato attraverso la seguente equazione:

$$Q_s = \frac{W_s - W_d}{W_d}$$

Dove W_s rappresenta il peso del campione tamponato in un preciso istante di tempo e W_d è il peso iniziale del campione da secco.

4.2.2 Test di degradazione

Gli scaffolds a base di gelatina e CNF sono stati immersi in un tampone fosfato salino (PBS) (pH 7.2) in presenza di 0.1% (w/v) NaN_3 a 37 °C. A specifici intervalli di tempo (7 gg, 14 gg, 21 gg, 28 gg) i campioni sono stati estratti dalla soluzione tampone e lavati due volte con acqua Milli-Q. I campioni sono stati poi liofilizzati per due giorni e successivamente pesati. La degradazione (D) è stata valutata attraverso la seguente equazione:

$$D = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100\%$$

Dove W_i rappresenta il peso iniziale dei campioni a secco e W_f è il peso dei campioni liofilizzati in un preciso istante di tempo.

4.3 Spettroscopia UV-visibile

Modello utilizzato: Perkin-Elmer Lambda 35 Spettrofotometro UV/VIS.

Le tecniche spettroscopiche sono basate sullo scambio di energia che si verifica fra l'energia radiante e la materia.

In particolare, la spettrofotometria di assorbimento è interessata ai fenomeni di assorbimento delle radiazioni luminose della regione dello spettro elettromagnetico appartenenti al campo del visibile (350 – 700 nm) e del vicino ultravioletto (180 – 350

nm). Viene interessato anche l'UV lontano (10 – 180 nm), anche se in questo caso si opera sotto vuoto o in atmosfera di gas inerte, perché l'ossigeno atmosferico copre i segnali delle altre sostanze.

L'assorbimento di questi tipi di radiazioni da parte delle molecole è in grado di produrre delle transizioni energetiche degli elettroni esterni delle molecole, sia impegnati che non impegnati in un legame (Figura 18).

Questi elettroni possono essere:

- di tipo sigma (σ), costituiti da una nube elettronica addensata lungo l'asse di unione dei nuclei degli atomi interessati al legame (i legami semplici sono di tipo σ);
- di tipo pi-greco (π), costituiti da coppie di elettroni la cui maggior densità elettronica è situata al di fuori dell'asse di unione dei nuclei (come accade nei legami doppi o tripli).

Gli elettroni π sono 'meno legati' e risultano perciò più facilmente eccitabili rispetto ai σ ; per esempio per eccitare gli elettroni π dell'etilene occorre una quantità di energia corrispondente ad una radiazione di 180nm (vicino U.V.) contro i 120nm (lontano U.V.) della radiazione necessaria per eccitare gli elettroni σ .

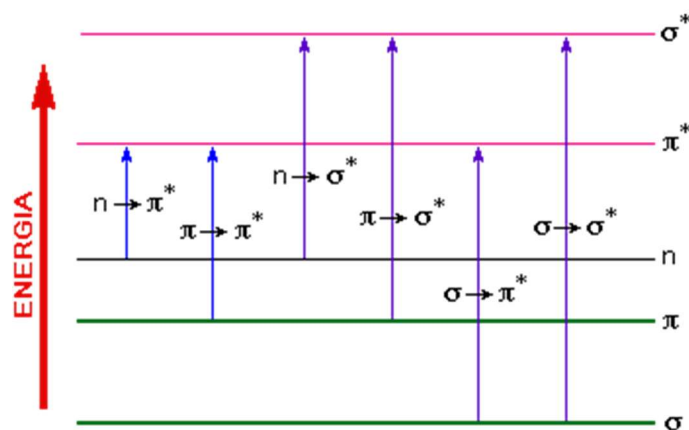


Figura 18 - Transizioni elettroniche

Se poi in una molecola sono presenti doppi legami coniugati, si verifica una delocalizzazione elettronica con conseguente diminuzione energetica tra un livello e

l'altro: per effettuare transizioni occorreranno quindi radiazioni di minor energia, quali ad esempio quelle nel campo visibile. Di solito, perciò, sono gli elettroni delocalizzati ad entrare in gioco, ad esempio quelli che partecipano al legame π nel doppio legame carbonio – carbonio, e quelli del doppietto libero dell'azoto e dell'ossigeno.

Gli spettri nel visibile (che sono spettri a banda, giacché queste transizioni sono generalmente accompagnate a transizioni sia vibrazionali che rotazionali, per cui gli assorbimenti sono costituiti da moltissime righe molto vicine tra loro, tanto da apparire un continuo, cioè una banda) sono quindi dovuti agli elettroni di legame π più o meno ampiamente delocalizzati.

Tale delocalizzazione può essere estesa a tutta la molecola oppure può risultare limitata a raggruppamenti particolari, separati fra di loro nella molecola da un insieme di legami completamente saturi che fungono da isolante e che quindi impediscono la delocalizzazione

Nel primo caso lo spettro di assorbimento è unico e difficilmente interpretabile secondo regole semplici; nel secondo caso, invece, può essere considerato come la somma di assorbimenti dovuti ai vari gruppi insaturi che vengono chiamati “cromofori”.

Si intende quindi per 'cromoforo' un raggruppamento chimico insaturo responsabile di un assorbimento situato nella regione delle lunghezze d'onda comprese tra 180 e 1000 nm.

Per eseguire analisi quantitative si fa uso di raggi monocromatici, cioè costituiti da radiazioni di una sola frequenza. In pratica, date le difficoltà di avere raggi dotati di questa proprietà, si impiegano fasci di radiazioni comprendenti una banda molto ristretta dello spettro, ossia fasci quasi monocromatici.

Le determinazioni quantitative sono basate sul fatto che, quando una radiazione attraversa una soluzione, viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione; in altre parole l'assorbimento dipende dalla concentrazione.

Disponendo quindi di strumenti in grado di misurare l'assorbimento si risale facilmente alla concentrazione della soluzione.

Infatti, se si fa passare attraverso una soluzione a concentrazione incognita una radiazione monocromatica (cioè di una determinata λ) e di intensità I_0 , al di là della soluzione si troverà una radiazione di intensità I , che sarà minore di I_0 se una parte della radiazione è stata assorbita dalla soluzione stessa, o uguale ad I_0 se non si è verificato alcun assorbimento.

Appositi dispositivi (i rivelatori) sono in grado di misurare l'intensità del flusso luminoso; in particolare vengono misurate:

- I_0 : intensità del flusso luminoso all'ingresso della cella con il campione;
- I : intensità del flusso luminoso all'uscita della cella con il campione.

La frazione di luce trasmessa, rispetto a quella incidente, si definisce trasmittanza T , data da:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Questa grandezza esprime quale frazione della luce incidente ha attraversato il campione senza essere assorbita, e può assumere valori compresi tra 0 e 1, e tale rapporto è tanto più piccolo quanto maggiore è stato l'assorbimento.

L'entità della radiazione assorbita è detta più comunemente assorbanza (A), ed è pari al logaritmo del reciproco della trasmittanza:

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I}$$

Esiste una legge che ci permette di calcolare la concentrazione di campione dal suo assorbimento; questa è la legge di Lambert – Beer, che assume la forma:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

dove:

A = assorbanza del campione

ε = coefficiente di estinzione molare, specifico per ogni sostanza

d = cammino ottico (cm)

c = concentrazioni (mol/l)

Secondo la legge di Lambert – Beer, dunque, l'assorbanza A è proporzionale sia alla concentrazione della sostanza assorbente, sia allo spessore dello strato attraversato, per cui più elevata è la concentrazione delle molecole che passano dallo stato fondamentale

a quello eccitato, maggiore sarà l'assorbanza (maggiore sarà la diminuzione dell'intensità del raggio incidente).

4.3.1 Grado di cross-linking

Per valutare il grado effettivo di cross-linking degli scaffolds è stata sfruttata un'analisi chimica che si basa sulla riduzione delle ammine libere primarie (-NH₂) o i gruppi carbossilici liberi (-COOH), risultanti dalla reazione di reticolazione. In questo studio, la concentrazione delle ammine libere negli scaffolds reticolati e non reticolati è stata valutata attraverso l'impiego dell'acido 2, 4, 6 – Trinitrobenzenesulfonico (TNBS), in accordo con un protocollo riportato in letteratura.

Per prima cosa sono stati pesati 5 mg per ogni tipo di campione. Sono stati aggiunti ad ogni campione 1 mL di idrogenocarbonato di sodio (bicarbonato di sodio) al 4% (w/v) e 1 mL di TNBS al 0.5% (w/v) appena preparato. I campioni sono stati lasciati in incubazione per due ore in un bagno ad acqua a 40 °C e poi sono stati aggiunti per ogni falcon 3 mL di acido cloridrico (HCl) 6 M. Prima di procedere alla misura mediante spettrofotometro i campioni sono stati nuovamente riposti per un'ora e mezza in un bagno ad acqua a 60 °C e opportunamente diluiti con acqua distillata. I campioni bianchi di controllo sono stati preparati con la stessa procedura ma senza scaffolds.

Le misurazioni sono state svolte inserendo, una alla volta, le cuvette contenenti il campione dentro lo spettrofotometro e rilevando ogni volta lo spettro di assorbimento da 600 nm a 240 nm. A questo punto è stato possibile valutare l'ammontare dei gruppi amminici liberi a una lunghezza d'onda pari a 415 nm sottraendo l'assorbanza dei campioni bianchi all'assorbanza di ogni campione. Le misure per ogni campione sono state condotte in triplicato.

Per calcolare la percentuale di cross-linking (CD) si procede come segue:

$$CD(\%) = \left(1 - \frac{\text{Assorbanza campioni reticolati}}{\text{Assorbanza campioni non reticolati}}\right) \times 100$$

4.4 Microscopio elettronico a scansione (SEM)

Modello utilizzato: Quanta 200 FEG, FEI Company, Hillsbrono, OR.

La caratteristica essenziale del microscopio elettronico a scansione è la sua capacità di fornire un'immagine notevolmente ingrandita della superficie del campione con una risoluzione ed una profondità di campo molto alta, superiori a quelle che è possibile ottenere da microscopi ottici.

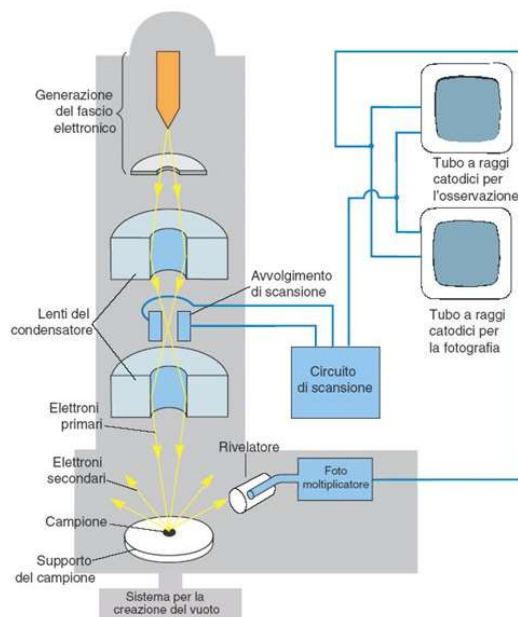


Figura 19 - Sezione di un microscopio a scansione elettronico

L'immagine viene generata attraverso una scansione della superficie del campione, compiuta da parte di un sottile pennello elettronico, ottenuto per mezzo di un emettitore di elettroni (un catodo a tungsteno) e a piastre collimatrici polarizzate. Un rivelatore, registra l'intensità di emissione del campione in funzione della posizione, permettendo di osservare un'immagine della sua superficie (Figura 19).

Le qualità peculiari di questo strumento sono:

- la facilità di preparazione dei provini
- la semplicità di osservazione di superfici massive irregolari
- la profondità elevata di campo (ingrandimenti anche oltre 100.000 X)

- la capacità di scegliere il meccanismo di formazione dell'immagine
- la possibilità di determinare, tramite, ad esempio microsonde elettroniche, la composizione chimica della zona esplorata

Una schematica descrizione di quanto avviene quando un fascio elettronico, con energia di qualche decina di KeV, colpisce la superficie di un materiale, è riportata in Figura 20.

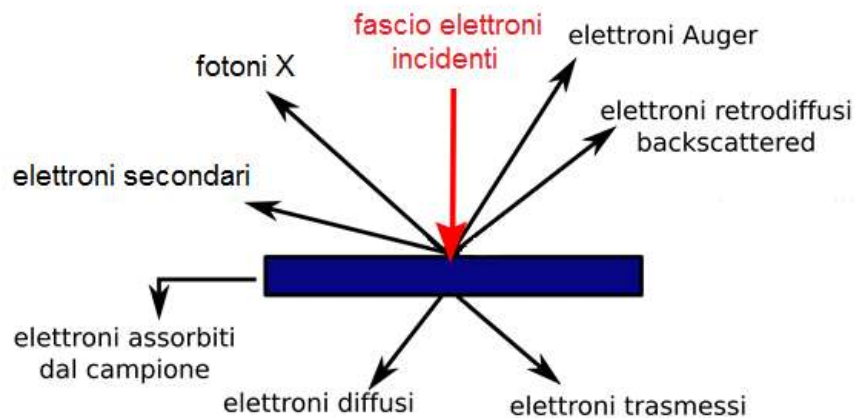


Figura 20 - Schematizzazione dei fenomeni che si verificano alla superficie del campione sottoposto all'azione di un fascio elettronico incidente

Una parte degli elettroni incidenti, detti anche elettroni primari, sono riflessi mantenendo l'energia iniziale: essi prendono il nome di elettroni retrodiffusi. Gli elettroni primari non riflessi perdono la loro energia trasferendola agli elettroni del solido; questi ultimi possono ora diffondere verso la superficie ed una frazione di essi sfuggirà all'esterno; questi elettroni, di energia molto bassa (qualche decina di eV), sono detti elettroni secondari. Convenzionalmente sono indicati come elettroni secondari quelli con energia minore di 50eV che costituiscono quasi la totalità degli elettroni di bassa energia. Inoltre, gli elettroni incidenti, quando possiedono energia sufficientemente elevata, sono in grado di ionizzare i livelli energetici più interni degli atomi del materiale; questi atomi tornano allo stato fondamentale mediante l'emissione di un fotone X o di un elettrone. Il primo processo è detto fluorescenza RX, mentre il secondo è noto come emissione di elettroni Auger. Entrambi possiedono energie caratteristiche degli atomi da cui provengono,

possono quindi essere utilizzati per ottenere informazioni sulla composizione chimica del campione. Infine, se il campione è sufficientemente sottile, gli elettroni sono in grado di attraversarlo potendo quindi avere anche degli elettroni trasmessi. Ognuna di queste radiazioni emesse può essere captata da opportuni rivelatori, ed utilizzata per ricavare informazioni su alcune qualità specifiche del campione.

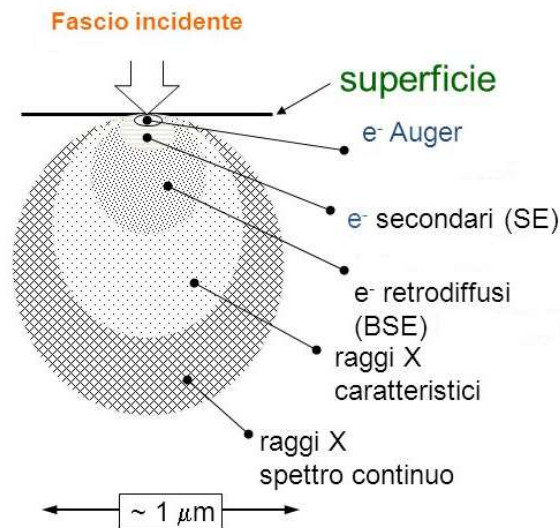


Figura 21 - Radiazioni emesse

Nel SEM, i diversi punti del campione, sono esplorati in successione mediante un sottile fascio elettronico primario: l'interazione degli elettroni con il campione genera elettroni secondari e retrodiffusi. Gli elettroni secondari (SE) sono quelli di norma rilevati ed elaborati per ottenere un'immagine del campione sulla base di variazioni dell'intensità di emissione, legate alla morfologia superficiale ed al particolare angolo d'incidenza formato con il fascio. Il contrasto dell'immagine, dipende dall'efficienza di raccolta, in quanto questi seguono traiettorie rettilinee e sono rivelati solo se il punto di produzione è in linea di collegamento ottico con il rivelatore. L'immagine ottenuta è formata da ombre molto nette e si presta ad evidenziare piccole rugosità della superficie.

Il rendimento di produzione degli elettroni retrodiffusi (BSE), è invece notevolmente condizionato dal numero atomico dell'elemento interessato: al contrasto, contribuisce così non solo la morfologia, ma principalmente la composizione del campione.

Utilizzando questa analisi su campioni policristallini, è possibile distinguere le varie fasi, che mostreranno una diversa gradazione di chiaro scuro, in funzione della loro densità elettronica.

Affinché l'analisi risulti efficace è necessario che il campione sia conduttivo, poiché così risulta più facile da studiare in quanto il flusso degli elettroni a massa non è ostacolato, venendo ridotti al minimo gli inconvenienti derivanti dall'accumulo di cariche. I materiali conduttori di elettricità sono anche buoni conduttori di calore, questo minimizza la probabilità di degradazione termica.

La tecnica utilizzata è quella dello sputtering, una tecnica che consente di rivestire la superficie del campione con un sottile film metallico. È importante realizzare un delicato equilibrio tra il rivestimento più sottile ed uniforme possibile ed un rivestimento eccessivamente spesso che mascheri i dettagli della superficie. Normalmente, sulla superficie del campione, precedentemente bloccato su un portacampione di Al con pasta o adesivi a base di grafite, si deposita tramite una camera al plasma di Ar uno strato di oro (Au). Grafite, alluminio e oro, sono buoni conduttori, così che la conduttività elettronica risulta garantita anche all'interno del campione. I campioni così preparati vengono disposti sul portacampioni all'interno della camera del SEM (max 8 campioni). Qui viene creato il vuoto e si procede alla scansione.

4.5 Analisi all'infrarosso (FT-IR)

Modello utilizzato: Thermo Nicolet-Avatar 320 FT-IR.

Attraverso l'analisi spettroscopica FT-IR è possibile identificare i legami molecolari presenti in una matrice organica. IR si riferisce all'impiego della radiazione infrarossa mentre FT all'operatore matematico trasformata di Fourier che trasforma l'interferogramma (trasmissione del campione in funzione del tempo) in spettro ricavando la trasmissione in funzione del numero d'onda. Tale analisi si basa sull'interazione tra una radiazione elettromagnetica e la materia. In particolare quando una molecola è investita da una radiazione infrarossa l'energia ceduta viene convertita in energia vibrazionale. Si possono verificare vibrazioni di:

- Stretching simmetrico, per un allungamento o un accorciamento degli atomi;

- Stretching asimmetrico, dove si hanno due stiramenti fuori fase: uno si stira, l'altro si contrae;
- Bending, dove i legami modificano il loro assetto lineare in modo che vari l'angolo formato tra tre atomi successivi.

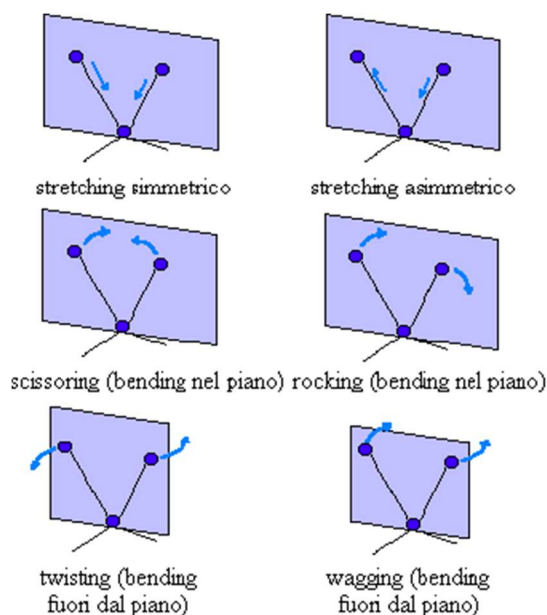


Figura 22 - Possibili vibrazioni molecolari

Lo spettrometro (Figura 23) è costituito da una sorgente luminosa a incandescenza in grado di emettere un raggio luminoso che giunge a uno specchio semiriflettente in grado di dividerlo in due fasci: uno diretto verso uno specchio fisso e l'altro verso uno specchio mobile che si muove avanti e indietro con velocità costante. I raggi riflessi da questi specchi sono inviati nuovamente allo specchio semiriflettente. In base alla differenza del cammino dei due raggi si creano delle interferenze costruttive o distruttive che creano un segnale proporzionale alla differenza di cammino ottico dei due raggi. Al variare della posizione dello specchio mobile nel tempo si avrà una modifica dell'interferenza fra le radiazioni e della trasmittanza. Quest'ultima rappresenta la frazione di luce incidente che a una data lunghezza d'onda attraversa il campione. Una volta che il raggio sia giunto al detector, il segnale di intensità luminosa in funzione del tempo viene trasformato, tramite la trasformata di Fourier, in trasmittanza in funzione del numero d'onda. Si ottiene così

uno spettro dove in ascissa si ha la lunghezza d'onda mentre in ordinata la trasmittanza %.

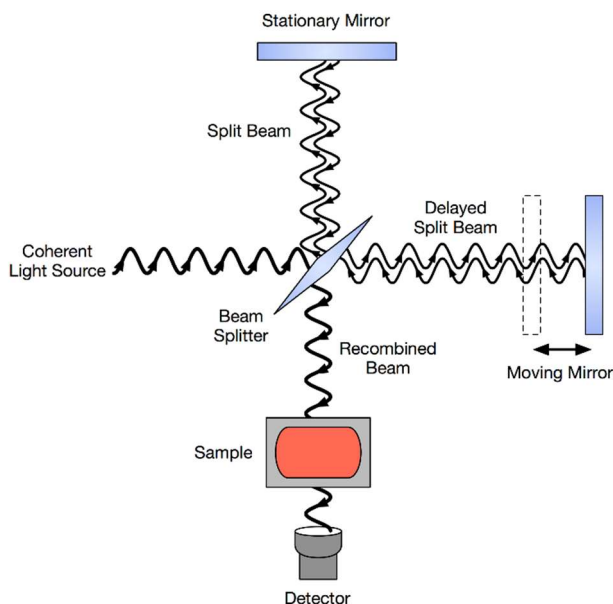


Figura 23 – Schema di funzionamento di uno spettrometro FT-IR

Per poter essere analizzati agli infrarossi, i campioni devono essere inseriti all'interno di una pasticca di Bromuro di potassio (KBr). Questa sostanza, infatti, risulta trasparente alle lunghezze d'onda nel range infrarosso, che la attraversano senza nessuna variazione nello spettro in uscita.

La pasticca viene prodotta utilizzando del KBr in polvere, il quale viene inserito all'interno di un apposito stampo. Il campione (2% rispetto al KBr) viene ridotto in polvere con un mortaio da laboratorio e opportunamente miscelato con il KBr. Successivamente lo stampo viene chiuso e viene pressato, utilizzando una pressa ad olio, con una forza pari a 10^5 Newton.

La pressione permette la compattazione della pasticca che raggiunge uno spessore di circa 1 mm.

Normalmente viene preparata una pasticca di solo KBr che viene utilizzata come bianco.

4.6 Angolo di contatto

Le misure dell'angolo di contatto vengono generalmente effettuate per determinare la bagnabilità di una superficie. L'angolo di contatto è una grandezza termodinamica definita come l'angolo formato dall'incontro di un solido con la tangente al profilo della goccia del liquido nel punto di contatto tra il profilo della goccia e la superficie del solido su cui questa poggia (Figura 24).

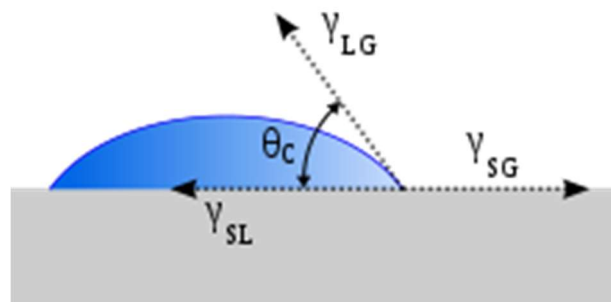


Figura 24 - Definizione dell'angolo di contatto, θ_c

Tenendo conto di questa definizione, l'angolo di contatto che si determina tra una certa superficie solida e il profilo della goccia di liquido corrisponde alla configurazione che minimizza l'energia libera superficiale del sistema, ed è, infatti, fisicamente descritto dalla legge di Young, la quale corrisponde al bilancio delle forze orizzontali agenti su una goccia di volume trascurabile deposta su una superficie ideale:

$$\gamma_{SG} - \gamma_{SL} - \gamma_{LG} \cos \theta = 0$$

Per convenzione si definiscono idrofobiche le superfici aventi un angolo di contatto con il liquido maggiore di 90° , idrofiliche quelle caratterizzate da angoli di contatto minori di 90° (Figura 25).



Figura 25 - Correlazione bagnabilità superficiale-angolo di contatto: elevata bagnabilità per $\theta < 90^\circ$, ridotta bagnabilità per $\theta > 90^\circ$

Le misure dell'angolo di contatto sono state effettuate mediante un tensiometro ottico OCA 15 Plus (DataPhysics Instruments, Filderstadt, Germany) formato da una videocamera ad alta risoluzione (752x582 pixels e velocità di acquisizione immagine pari a 25 fotogrammi al secondo), un sistema automatico di dispensazione di liquidi e un piatto portacampione.

La telecamera è interfacciata con un software in grado di acquisire ed analizzare l'immagine.

Il software gestisce algoritmi con cui, tramite un calcolo ad approssimazioni successive, è possibile ottenere il profilo della goccia che meglio si adatta al contorno reale ottenuto dall'immagine. In base a tale profilo, sfruttando gli strumenti forniti dal software, si procede alla stima dell'angolo di contatto tracciando la retta tangente al profilo della goccia nel suo punto di contatto con il solido.

Per procedere all'analisi è stato sufficiente stendere un sottile film di campione su un vetrino da microscopio.

Le prove sono state condotte a temperatura ambiente. I dati di angolo di contatto per ogni provino sono espressi come valori medi ricavati dalle 4 misure \pm deviazione standard.

CAPITOLO 5: PROVE MECCANICHE

5.1 Generalità

Quando un oggetto è sottoposto ad una forza esterna F , esso si deforma. Il tipo e l'intensità della deformazione dipendono dalla forza applicata, dalle caratteristiche del materiale e dalla forma dell'oggetto¹⁰.

Per caratterizzare meccanicamente un materiale occorre sottoporre un provino, la cui forma è preventivamente definita, a forze o a momenti; di solito tali provini sono cilindrici o a forma di strisce sottili.

Esistono due tipologie di sollecitazioni meccaniche semplici.

Il primo tipo è prodotto dall'applicazione di una forza F che produce una modifica dimensionale ΔL del provino senza modificare essenzialmente la forma. La forza utilizzata può essere di due tipi: di trazione e di compressione.

Il secondo tipo è prodotto dall'applicazione di un momento M che produce modifiche nella forma del provino; tali modifiche sono determinate dalla misura dell'angolo ν compreso tra l'orientamento iniziale e quello finale di un bordo del provino.

5.2 DMA (Analisi Meccanica Dinamica)

L'analisi meccanica dinamica (*Dynamic Mechanical Analysis*) è una tecnica di analisi termica utilizzata per misurare le proprietà dei materiali, ed in particolare per la valutazione del comportamento viscoelastico dei polimeri. In particolare, nel corso di una DMA, una tensione variabile con andamento sinusoidale è applicata ad un provino e la deformazione risultante (sinusoidale) viene misurata e registrata. Se il materiale in oggetto è puramente elastico, la differenza di fase δ tra lo sforzo e la deformazione è nulla (cioè sono in fase), mentre se esso è puramente viscoso la differenza risulterà di $\pi/2$. Nella maggior parte dei materiali reali, compresi i polimeri, si avrà $0 < \delta < \pi/2$ (Figura 26). Tale differenza di fase, insieme all'ampiezza della tensione e della deformazione, è utilizzata per stimare il creep, l'assorbimento del suono e la resistenza all'impatto e per determinare una grande varietà di parametri caratteristici (tra i quali ricordiamo il *loss modulus*, lo *storage modulus*, $\tan\delta$) che definiremo in seguito.

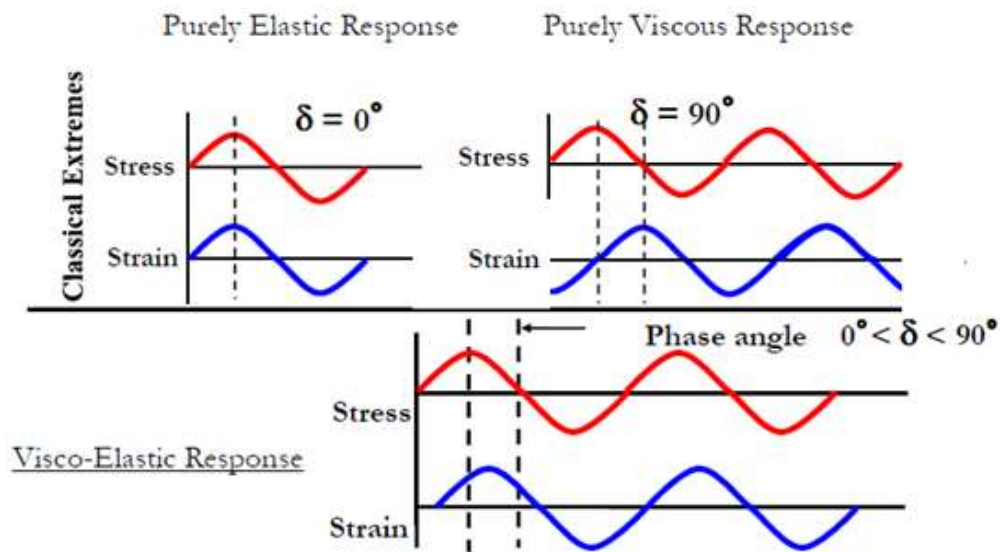


Figura 26 - Rappresentazione dei possibili andamenti sforzo-deformazione in relazione alle caratteristiche visco-elastiche del materiale

Il DMA Q800 (Figura 27), terza generazione dei Dynamic Mechanical Analyzers prodotti dalla TA Instruments, è uno strumento costituito da un codificatore ottico lineare ad alta risoluzione, che si basa su modelli di diffrazione della luce attraverso reticoli (uno mobile e uno fisso), capace di misurare spostamenti di frazioni di micron. Lo strumento è caratterizzato da un motore ad azionamento diretto e termostato con componenti ad alte prestazioni che assicurano bassa cedevolezza. Quest'ultimo trasmette la forza a dei cuscinetti ad aria rettangolari che hanno un'apertura massima di 25 mm e sono collegati all'albero motore e ai morsetti portacampione. Lo strumento è inoltre dotato di una fornace automatica che provvede in maniera efficiente al controllo della temperatura (Figura 28a)

Prima di procedere a qualsiasi tipo di analisi la macchina deve essere opportunamente calibrata. La DMA modello Q800 prevede due "livelli" di calibrazione, entrambe da eseguirsi a fornace chiusa:

- Calibrazione dello strumento: viene eseguita in fase di installazione e va ripetuta se lo strumento viene spostato ed eventualmente una volta ogni sei mesi
- Calibrazione della clamp: deve essere eseguita ogni volta che l'afferraggio viene sostituito

Per poter caratterizzare adeguatamente gli scaffolds è stata scelta la modalità di compressione. In questa modalità il campione è riposto su una superficie piana fissa mentre una piastra oscillante applica il carico. Per assicurare un contatto ottimale tra il morsetto mobile e il campione è necessario impostare una forza minima di precarico necessaria per ottenere il contatto massimo tra la superficie dello scaffold e quella della parte mobile. La clamp di compressione (Figura 28b) misura attivamente l'altezza del campione mentre il diametro deve essere inserito manualmente. I campioni testati presentano un diametro di 7-8 mm e un'altezza di 4-6 mm. Tutte le prove sono state condotte a 37 °C dopo aver immerso i campioni una notte in PBS a 37 °C, per replicare il più possibile le condizioni fisiologiche.

Di seguito sono riportate alcune specifiche tecniche (Tabella 2).

Dimensioni	Profondità: 56 cm Larghezza: 46 cm Altezza: - fornace aperta: 71 cm - fornace chiusa: 56 cm
Peso	39,5 kg
Condizioni ambientali di operatività	Temperatura: 15 °C Umidità relativa: 5-80% Categoria d'installazione II <i>Pollution Degree 2</i> Altitudine massima: 2000 m
Lunghezza campione	max 50 mm
Larghezza campione	max 15 mm
Spessore campione	da 5 a 10 mm (a seconda del clamp)
Intervallo di displacement	25 mm
Carico	da 0,001 N a 18 N

Tabella 2 – Alcune specifiche tecniche della DMA Q800



Figura 27 - (Modello Q800, TA Instruments)

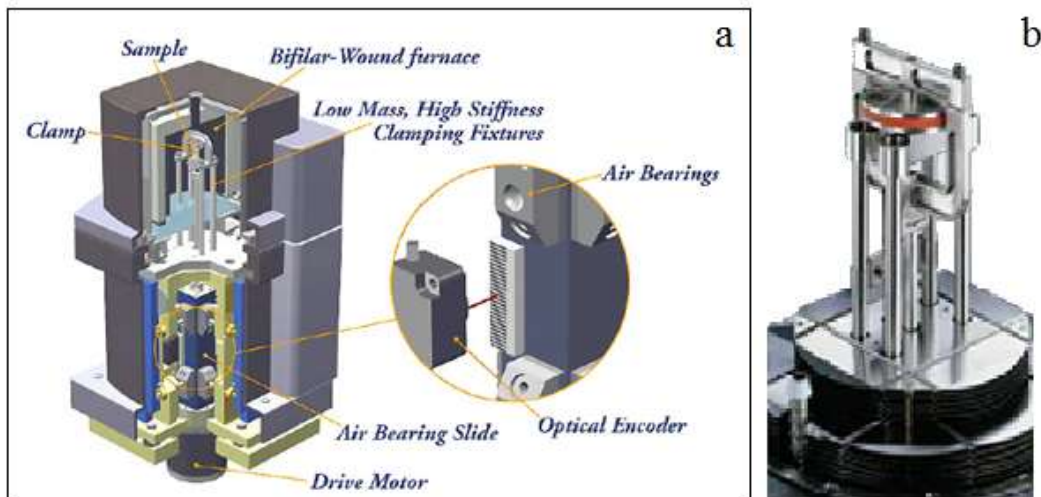


Figura 28 – a) Rappresentazione schematica di un'apparecchiatura per DMA

b) Dettaglio del fissaggio di un provino per una prova dinamica a compressione

5.2.1 Principi teorici della DMA

È già stato anticipato come la non perfetta elasticità dei mezzi materiali determina in ogni caso reale degli sfasamenti sforzo-deformazione; in particolare lo sforzo sinusoidale è fuori fase rispetto alla tensione applicata di un angolo δ (Figura 29) a causa dei tempi necessari affinché si verifichino moti e rilassamenti molecolari.

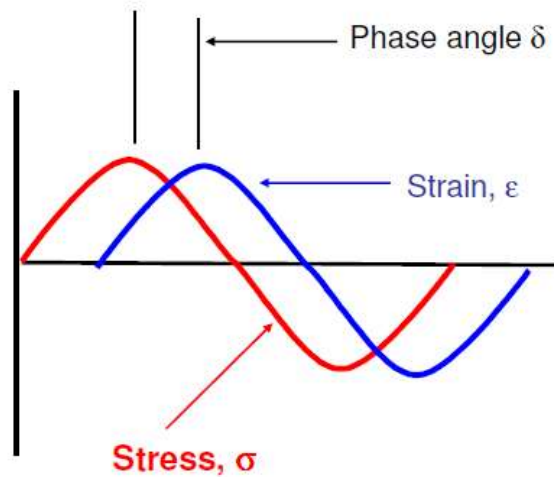


Figura 29 - Rappresentazione dello sfasamento δ tra la funzione sforzo e la funzione deformazione

La tensione dinamica σ e la deformazione conseguente ε sono date da:

$$\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta) \qquad \varepsilon = \varepsilon_0 \sin(\omega t)$$

dove ω è la velocità angolare. Espandendo otteniamo:

$$\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t) \cos \delta + \sigma_0 \cos(\omega t) \sin \delta$$

ovvero la tensione può essere divisa in una parte in fase con la deformazione ($\sigma_0 \cos \delta$) e una parte sfasata rispetto a questa di $\pi/2$ ($\sigma_0 \sin \delta$).

Dividendo lo sforzo per la deformazione otteniamo:

$$\sigma = \varepsilon_0 E' \sin(\omega t) + \varepsilon_0 E'' \cos(\omega t)$$

avendo posto:

$$E' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cos \delta \qquad E'' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \sin \delta$$

con E' il modulo in fase (reale) e E'' il modulo fuori fase (immaginario).

Il modulo complesso ottenuto dal test dinamico meccanico è quindi dato da:

$$E^* = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} (\cos\delta + i\sin\delta) = E' + iE''$$

La parte reale (*storage*) descrive l'abilità del materiale nell'immagazzinare energia potenziale e di rilasciarla al momento della deformazione, mentre la parte immaginaria (*loss*) è associata all'energia dissipata sotto forma di calore. Dall'equazione precedente è possibile ricavare la tangente all'angolo di sfasamento $\tan\delta$ che, secondo la definizione di E' e E'' , è uguale a:

$$\tan\delta = \frac{E''}{E'}$$

5.3 Prove di stress-strain

In generale un materiale sottoposto ad una modesta sollecitazione si deforma in modo reversibile, e quindi se la sollecitazione è eliminata, il materiale recupera la sua forma iniziale; questo comportamento è definito comportamento elastico a cui è associata una deformazione detta elastica.

Solitamente esiste per ogni materiale un valore della sollecitazione, detto limite elastico, oltre il quale la deformazione diventa irreversibile; questo comportamento è definito plastico e la deformazione residua è detta deformazione plastica.

Al fine di valutare le proprietà intrinseche di un materiale, è opportuno convertire la relazione tra la forza applicata e la deformazione in una relazione che non dipenda dalle dimensioni del provino su cui vengono effettuate le misure.

Si introducono due nuove grandezze: lo stress, o sforzo unitario, e lo strain, o deformazione unitaria. Con riferimento alla prova di compressione (che è quella utilizzata in questo lavoro), si definisce:

- stress: $\sigma = F / A_0$

dove con F si indica la forza applicata e con A_0 si indica l'area della sezione resistente del provino non deformato;

- strain: $\varepsilon = (l - l_0) / l_0$

dove con l si indica la lunghezza del provino dopo la deformazione e con l_0 si indica la lunghezza iniziale del medesimo provino.

Le prove di stress-strain permettono di tracciare l'andamento dello sforzo in funzione della deformazione e da questi grafici permettono di ricavare un parametro molto importante, il modulo di Young, quindi la transizione del comportamento del materiale da elastico a plastico.

Le prove di stress-strain sono state effettuate con una rampa di forza di 0.5 N/min fino a 8 N e sono precedute da una fase isoterma a 37 °C per 5 minuti. La pendenza della linea di regressione lineare per il calcolo del modulo di Young è stata calcolata in un intervallo di deformazione da 1 a 10%.

5.4 Prove di creep

Un materiale ha un comportamento viscoelastico quando la relazione che lega lo sforzo e la deformazione è dipendente dal tempo. Generalmente un materiale viscoelastico ha un modulo di Young che cresce con la velocità di deformazione.

I materiali polimerici e quelli biologici sono soliti presentare un comportamento viscoelastico.

Per ottenere la caratterizzazione di un materiale viscoelastico si effettua la prova di creep che consiste nella applicazione istantanea di un carico al provino, al mantenimento di tale carico e nella misura della deformazione nel tempo (Figura 30).

In questo lavoro si è scelto di effettuare le prove di creep a carico costante pari a 0.1 MPa per ciascun campione; il carico da applicare è stato calcolato attraverso uno studio di linearità dopo aver eseguito diverse prove di creep applicando carichi da 0.001 a 0.1 MPa. Dopo una fase isoterma a 37 °C per 5 minuti, il carico viene applicato al provino e mantenuto per un tempo pari a 15 minuti, poi viene rimosso per altri 15 minuti per studiare il recupero (Recovery) e il rilassamento del materiale.

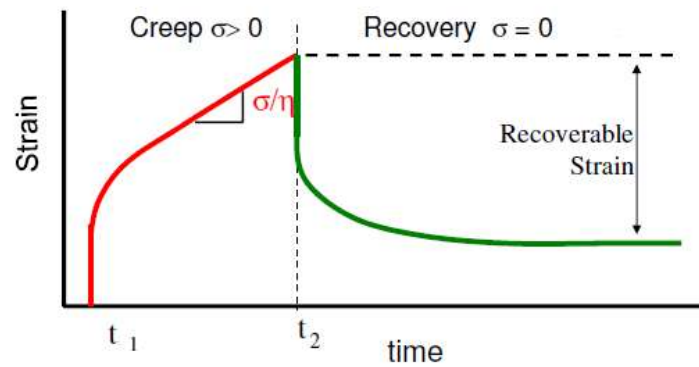


Figura 30 – Tipica risposta di un materiale viscoelastico sottoposto a una prova di creep

5.5 Prove multi-frequency strain

Come detto in precedenza, per poter caratterizzare il materiale vengono definiti alcuni parametri visco-elastici quali *loss modulus*, *storage modulus* e $\tan\delta$. La modalità Multi-Frequency Strain fissa l'ampiezza della deformazione e applica diverse frequenze per poter valutare di conseguenza la risposta del campione attraverso l'analisi di tali parametri.

Le modalità di svolgimento della prova prevedono l'applicazione di un valore di deformazione costante pari a $75 \mu\text{m}$ e una frequenza di acquisizione che varia da 0.1 a 10 Hz.

CAPITOLO 6: RISULTATI E DISCUSSIONE

6.1 Analisi morfologica

La superficie di un biomateriale è il primo componente di un impianto ad entrare in contatto con le cellule e i fluidi biologici. Per questo motivo una buona adesione cellulare sarà primariamente influenzata dalle proprietà della superficie del biomateriale, in particolare dalla bagnabilità, dalla natura chimica degli atomi in superficie, dall'energia e dalla morfologia della superficie¹⁷.

Tanto maggiore è la bagnabilità di un biomateriale tanto più elevata risulterà l'interazione cellula-scaffold e quindi la colonizzazione dello scaffold.

Per favorire questi processi è necessario che lo scaffold soddisfi alcuni importanti parametri tra cui la dimensione media dei pori, la loro distribuzione, il loro volume, l'interconnessione, la forma e la rugosità della parete dei pori. Il controllo e la modulazione di queste proprietà fornisce un sistema poroso biocompatibile all'interno del quale può svilupparsi il tessuto circostante e agire come un sostegno temporaneo per la crescita e la riorganizzazione di nuovo tessuto¹⁸.

La dimensione dei pori è inoltre rilevante perché se i pori sono troppo piccoli rischiano di ostacolare la penetrazione cellulare, la produzione di matrice extracellulare e la vascolarizzazione delle regioni interne dello scaffold.

6.1.1 Misure di Bagnabilità

Per indagare l'idrofilicità dei materiali sintetizzati sono stati effettuati test per valutare l'angolo di contatto utilizzando come solvente acqua.

I valori ottenuti, riportati in Tabella 3, sottolineano un comportamento intermedio dei campioni in termini di bagnabilità e se confrontati con il campione non reticolato è possibile osservare come i trattamenti di reticolazione impiegati non abbiano modificato sostanzialmente le proprietà superficiali anzi, tutti i campioni reticolati risultano lievemente più idrofilici rispetto al film di CNF-gel.

Tra i materiali analizzati, i campioni CNF-gel+DHT e CNF-gel+HMDA+gen+DHT, presentano un valore dell'angolo di contatto in linea con quello degli altri campioni nonostante abbiano un grado di cross-linking superiore, così come vedremo in seguito. Infatti, dopo aver sottoposto i campioni al processo di reticolazione, ci si aspetterebbe un numero minore di gruppi funzionali liberi in grado di reagire con le molecole di acqua; in realtà la presenza di gruppi funzionali liberi sulle catene di entrambi i biopolimeri è molto elevata nonostante quelli impegnati nel cross-linking.

Il valore relativamente elevato delle deviazioni standard è da attribuire alla difficoltà della misura per la rugosità superficiale dei campioni.

Questo test permette non solo di caratterizzare le proprietà superficiali dei nostri materiali, ma bensì di prevederne il comportamento in termini di biocompatibilità in presenza di una linea cellulare. Infatti, così come dimostrato in letteratura¹⁷, un biomateriale con elevate bagnabilità risulterà probabilmente più biocompatibile di un biomateriale poco bagnabile.

Campione	Angolo di contatto (°)
CNF-gel	114 ± 10
CNF-gel+DHT	96 ± 8
CNF-gel+HMDA	105 ± 5
CNF-gel+gen	104 ± 10
CNF-gel+HMDA+gen+ DHT	102 ± 1

Tabella 3 - Valori dell'angolo di contatto relativi a ciascun campione

6.1.2 Osservazioni al SEM

Sono state condotte delle analisi al microscopio a scansione elettronica (SEM) a diversi ingrandimenti per indagare più da vicino la reale struttura degli scaffolds. Questa tecnica ci ha consentito di riscontrare la presenza di morfologie tipiche dei polimeri nei blends ottenuti e soprattutto di verificare come queste abbiano reagito ai trattamenti di reticolazione. Inoltre ci ha permesso di valutare il grado di porosità e omogeneità dei vari campioni e l'avvenuta interazione tra i polimeri di partenza.

Per verificare ciò, abbiamo analizzato anche la morfologia dei singoli polimeri, ovvero della sola gelatina (gel) e della sola nanocellulosa (CNF), entrambe liofilizzate.

Di seguito si riportano le immagini al SEM delle strutture tipiche di Gelatina (Figura 31) e Nanocellulosa (Figura 32).

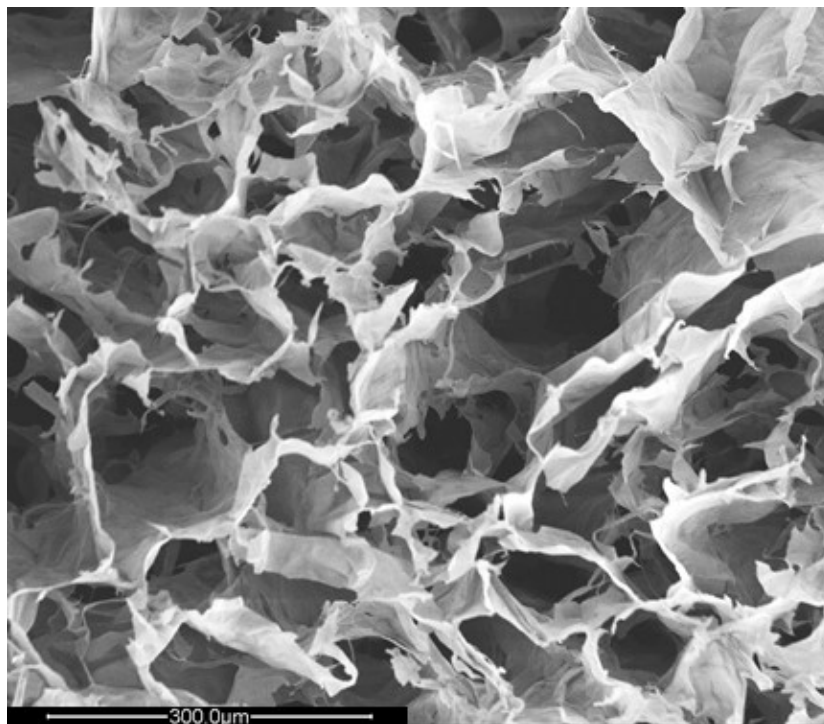


Figura 31 - Immagine SEM di Gelatina liofilizzata

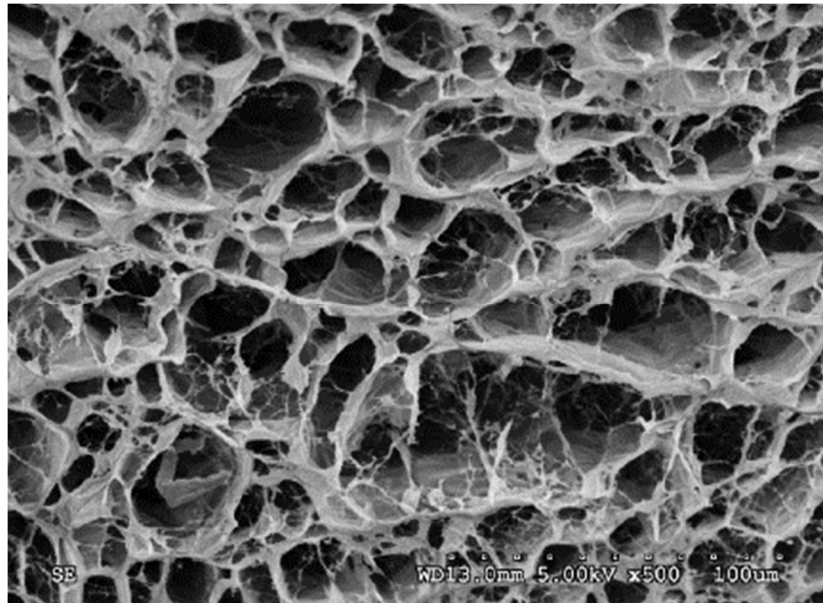
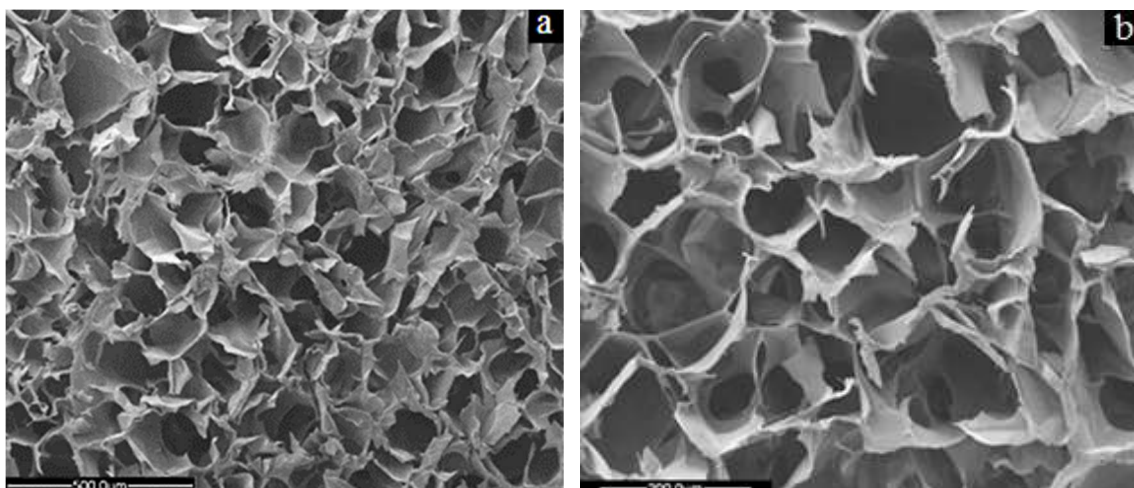
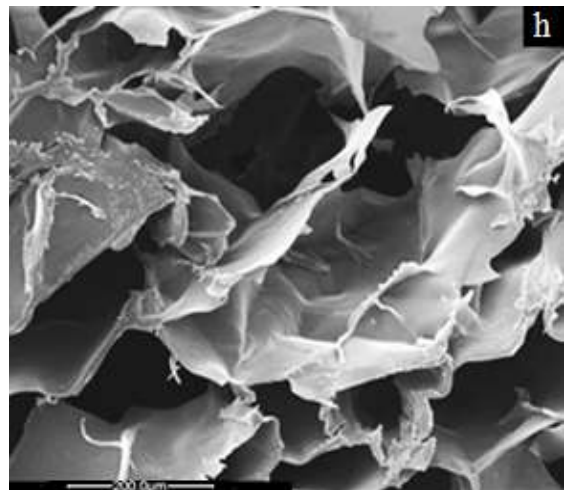
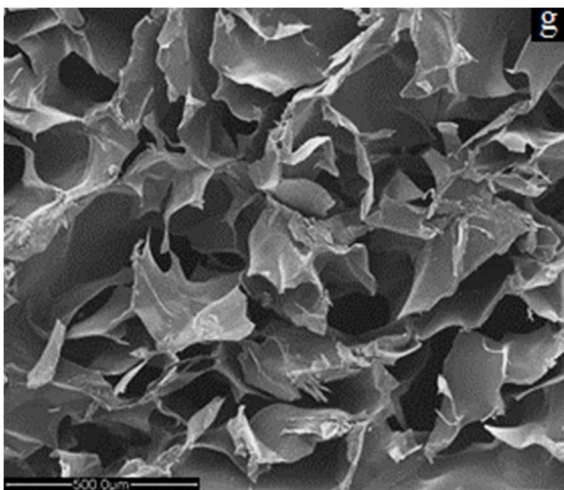
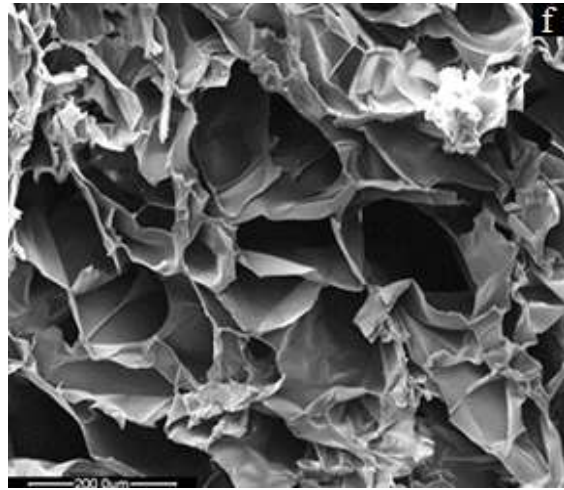
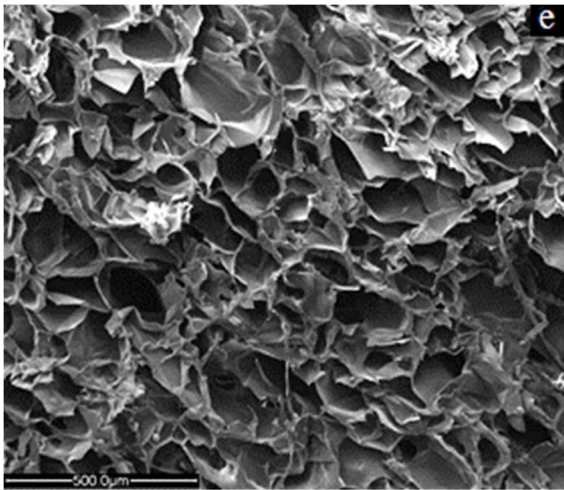
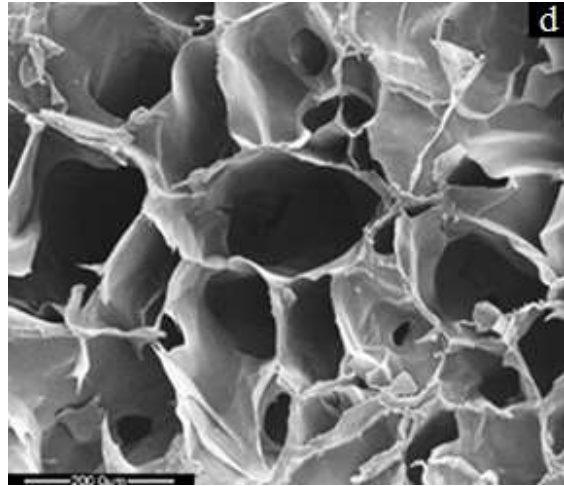
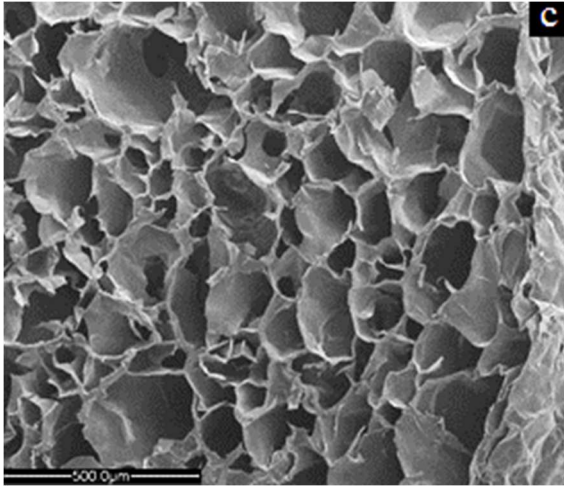


Figura 32 - Immagine SEM di Nanocellulosa liofilizzata¹²

Dalle immagini SEM vediamo che l'impiego della gelatina permette, attraverso il processo di liofilizzazione, di ottenere strutture porose interconnesse ed omogenee con le superfici dei pori piuttosto lisce ed uniformi. La nanocellulosa, altamente fibrosa, presenta delle fibrille compatte e interconnesse tra loro che conferiscono maggior rugosità e stabilità alle pareti dei pori. Gli scaffolds liofilizzati dei campioni di CNF-gel presentano anch'essi una struttura altamente porosa e omogenea come si può osservare in Figura 33(a-l). Analizzando tali immagini è facile individuare la tipica struttura porosa della gelatina liofilizzata.





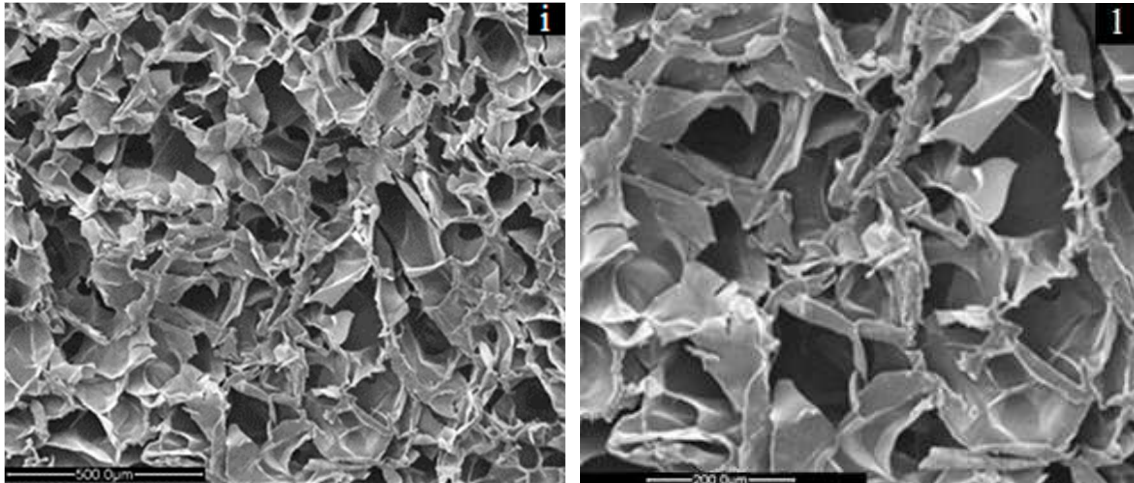


Figura 33 - Immagine SEM dei campioni: (a-b) CNF-gel (c-d) CNF-gel+DHT (e-f) CNF-gel+HMDA (g-h) CNF-gel+gen (i-l) CNF-gel+HMDA+gen+DHT (scala 500 μm (a,c,e,g,i) e 200 μm (b,d,f,h,l)).

Le immagini SEM dei vari campioni mostrano una struttura e una dimensione dei pori simili tra loro, questi dati confermano che gli agenti reticolanti non ne influenzano significativamente la morfologia.

Così come mostrano le immagini, tutti gli scaffolds presentano una struttura rugosa e porosa con pori interconnessi distribuiti omogeneamente per tutta la sezione trasversale. È inoltre possibile osservare che il trattamento termico effettuato su alcuni campioni per fare avvenire la reazione di reticolazione ha determinato una leggera riduzione della dimensione dei pori. L'HMDA, per esempio, richiede un tempo di permanenza di 20 ore in stufa a 80 °C in condizione di vuoto e questo può comportare una diminuzione della dimensione dei pori così come mostrano le Figura 33(e-f). Anche nelle Figura 33(i-l) è possibile riscontrare lo stesso effetto, qui ulteriormente accentuato dall'impiego di tutti e tre gli agenti reticolanti.

6.1.3 Porosità

La densità e la porosità degli scaffolds sono state valutate attraverso il metodo della densità e il metodo del water squeezing. I dati ottenuti sono riportati in Tabella 4. Il test di porosità in accordo con le immagini SEM rileva un'elevata porosità che raggiunge valori del 95% a dimostrazione del fatto che i processi di reticolazione non interferiscono con tale parametro. Infatti la porosità degli scaffolds è direttamente determinata dal processo di liofilizzazione che rimane invariato per tutti i campioni.

Il metodo del water squeezing rivela una porosità inferiore rispetto al metodo della densità perché prende in considerazione solo la percentuale di volume dei macropori e non la porosità totale del campione. Considerando tale aspetto, i valori ottenuti confermano, anche in questo caso, l'elevata porosità dei campioni.

La dimensione media dei pori compresa tra i 90 μm e i 150 μm , valutata attraverso ImageJ con $n=30$, insieme ai parametri precedentemente analizzati e riassunti di seguito mostrano come gli scaffolds ottenuti, grazie alla loro struttura e morfologia, siano idonei per la colonizzazione e la proliferazione cellulare.

Campione	Densità (g/cm^3)	Porosità (%)		Dimensione dei pori (μm)
		Metodo della densità	Metodo del water squeezing	
CNF-gel	0.054	95%	Instabile	116 ± 23
CNF-gel+DHT	0.056	94%	74%	149 ± 33
CNF-gel+HMDA	0.060	94%	Instabile	125 ± 27
CNF-gel+gen	0.056	94%	47%	142 ± 29
CNF-gel+HMDA+gen+ DHT	0.049	95%	76%	92 ± 22

Tabella 4 - Densità, porosità e dimensione dei pori di ciascun campione

6.2 Caratterizzazione chimico-fisica

6.2.1 Analisi FT-IR

La spettroscopia infrarossa ci fornisce un'informazione qualitativa relativa ai legami chimici presenti all'interno dei materiali in esame. Infatti tale analisi è stata effettuata per avere informazioni comparative sui campioni e verificare se gli spettri ottenuti presentano picchi simili eventualmente shiftati per effetto dell'interazione tra i polimeri e l'impiego di agenti reticolanti.

In Figura 34 è mostrato lo spettro FT-IR del campione CNF-gel ed è stato messo a confronto con gli spettri di sola gelatina e nanocellulosa per sottolineare come il composito non sia dato dalla semplice somma dei due polimeri ma dalla loro interazione. Le reazioni di reticolazione hanno luogo tra i gruppi aldeidici e carbossilici della nanocellulosa e i gruppi amminici liberi residui della gelatina. Un chiaro esempio è rappresentato dal picco caratteristico sia di gelatina che nanocellulosa che compare a 2900 cm^{-1} e che risulta solo lievemente accennato nel composito ad indicare il verificarsi dell'interazione chimica tra la nanocellulosa e la gelatina.

Come mostrato in Figura 35 l'aggiunta di agenti reticolanti al composito non elimina le bande caratteristiche dei polimeri di partenza quindi non ne altera la natura chimica. Infatti la presenza di nanofibrille di cellulosa nei compositi reticolati è evidenziata dalla presenza di bande nell'intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 3300 cm^{-1} a 3500 cm^{-1} e tra 1000 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} .

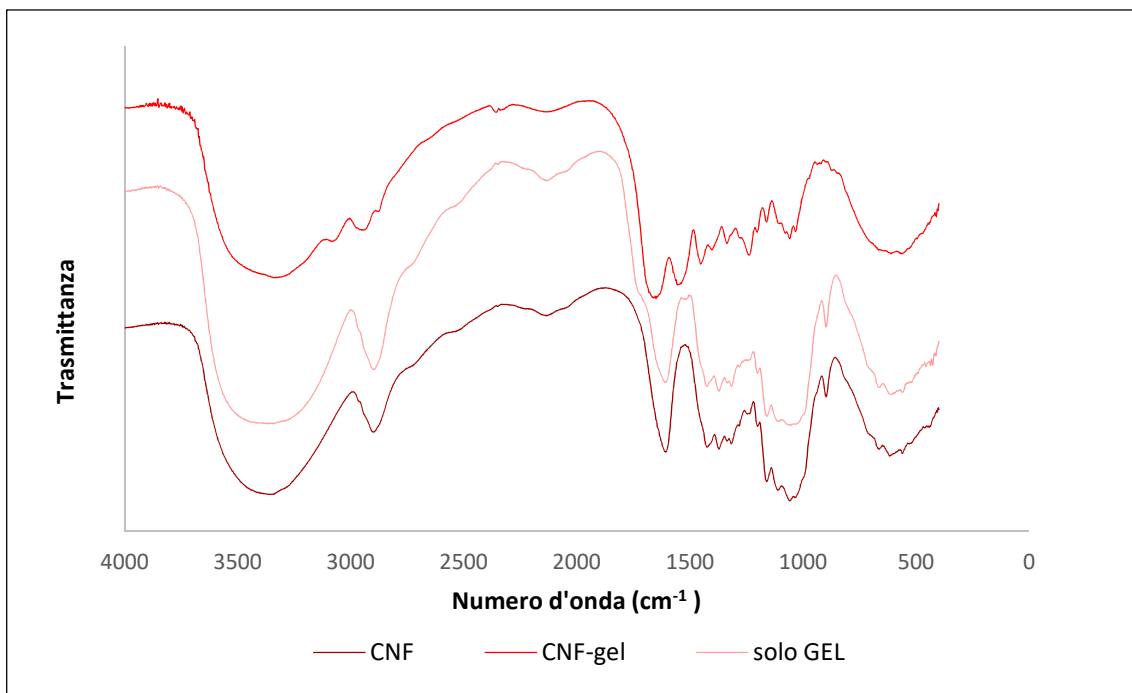


Figura 34 - Spettri FT-IR del campione CNF-gel, della sola CNF e della sola gel

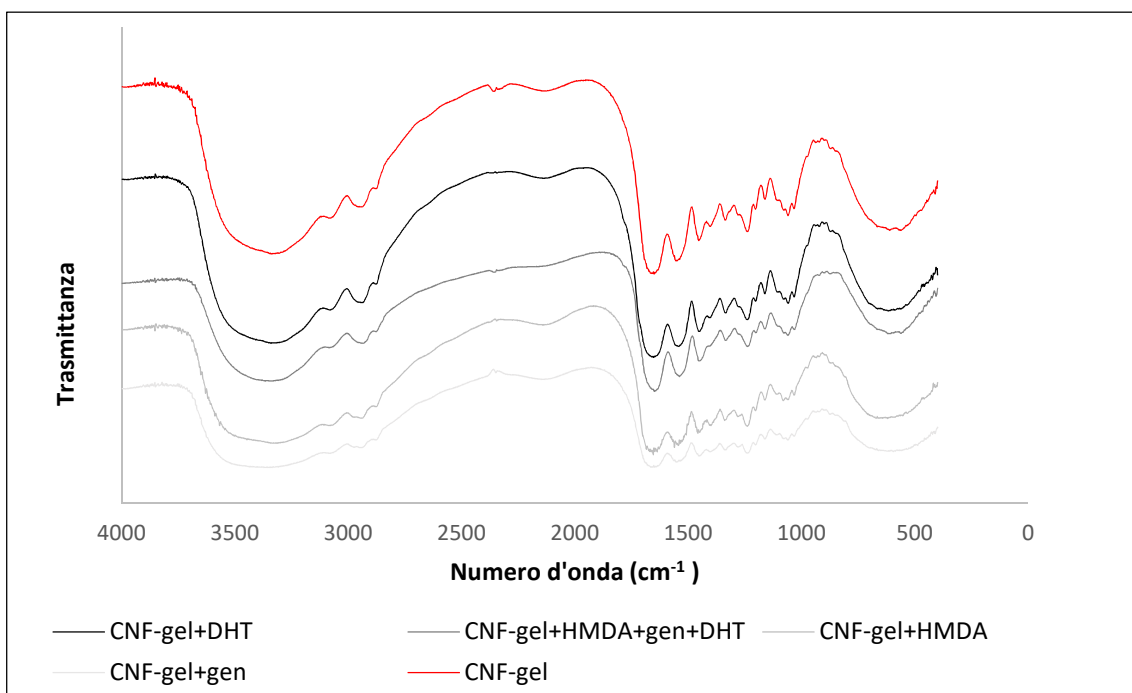


Figura 35 - Spettri FT-IR dei campioni CNF-gel, CNF-gel+DHT, CNF-gel+HMDA, CNF-gel+gen e CNF-gel+HMDA+gen+DHT

6.2.2 Valutazione della stabilità: Test di Swelling e Degradazione

Prima di procedere con le analisi è stato condotto uno studio preliminare per valutare l'influenza degli agenti reticolanti sulla stabilità dei campioni immersi in soluzione. I risultati del test hanno evidenziato come alcuni campioni, immersi in PBS a 37 °C, risultino essere instabili già dopo poche ore dall'immersione. In particolare, già dopo le prime 6 ore, i campioni non reticolati e quelli reticolati con HMDA sono risultati difficili da maneggiare. Per questo motivo le caratterizzazioni che seguono sono state condotte solo sui tre campioni che hanno superato il test di stabilità preliminare (CNF-gel+DHT, CNF-gel+gen, CNF-gel+HMDA+gen+ DHT).

I test di swelling e degradazione sono stati scelti per valutare la capacità degli scaffolds di assorbire acqua e, di conseguenza, il terreno cellulare, e la capacità di conservare la loro stabilità nel lungo termine, oltre i 90 giorni.

Nell'ingegneria tissutale, lo swelling è un importante fattore che influenza le proprietà chimiche e fisiche degli scaffolds prima e dopo il loro impianto.

Tale fenomeno determina infatti un aumento nella dimensione dei pori dello scaffold favorendo l'apporto di nutrienti e di ossigeno alle regioni interne¹⁸.

Questo parametro è inoltre direttamente influenzato dall'idrofilicità del materiale e quindi risulta una misura indiretta di quest'ultima.

Attraverso prove di assorbimento e rilascio di soluzione acquosa è stata valutata, sui dispositivi porosi, la loro abilità nell'assorbire rapidamente il fluido e rilasciarlo solo sotto l'effetto di una debole pressione applicata. Eliminando la pressione i dispositivi sono in grado di riassorbire quasi completamente il fluido rilasciato recuperando la loro geometria iniziale, come si può osservare in Figura 36.

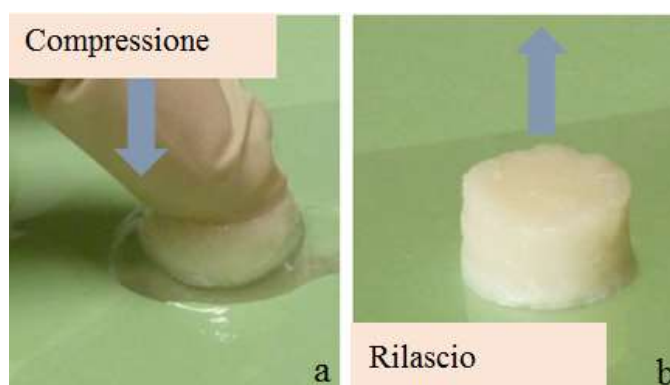


Figura 36 - Swelling immediato dei campioni liofilizzati: a) esercitando la pressione il liquido fuoriesce, b) immediato riassorbimento

Il peso iniziale di ogni campione è riportato in Tabella 5.

Campione	Peso (mg)
CNF-gel	Instabile
CNF-gel+DHT	24.3
CNF-gel+HMDA	Instabile
CNF-gel+gen	21.3
CNF-gel+HMDA+gen+ DHT	21.6

Tabella 5 - Peso a secco dei campioni testati

I risultati del test di swelling Figura 37 dimostrano che la porosità interconnessa dei campioni, e la loro natura chimica permette l'assorbimento di una quantità di acqua pari a circa 8-11 volte il peso del campione stesso. I valori ottenuti si mantengono mediamente costanti durante l'intero test; questo è molto importante perché variazioni nel tempo potrebbero significare la graduale degradazione e il danneggiamento della struttura.

Il campione che presenta un rapporto di swelling inferiore è quello reticolato solo con DHT poiché questo trattamento si basa sulla formazione di legami ammidici mediante

residui carbossilici e amminici. Questa reazione riduce l'idrofilicità strutturale dello scaffold e di conseguenza il rapporto di swelling, anche se in maniera lieve in accordo con la precedente analisi dell'angolo di contatto.

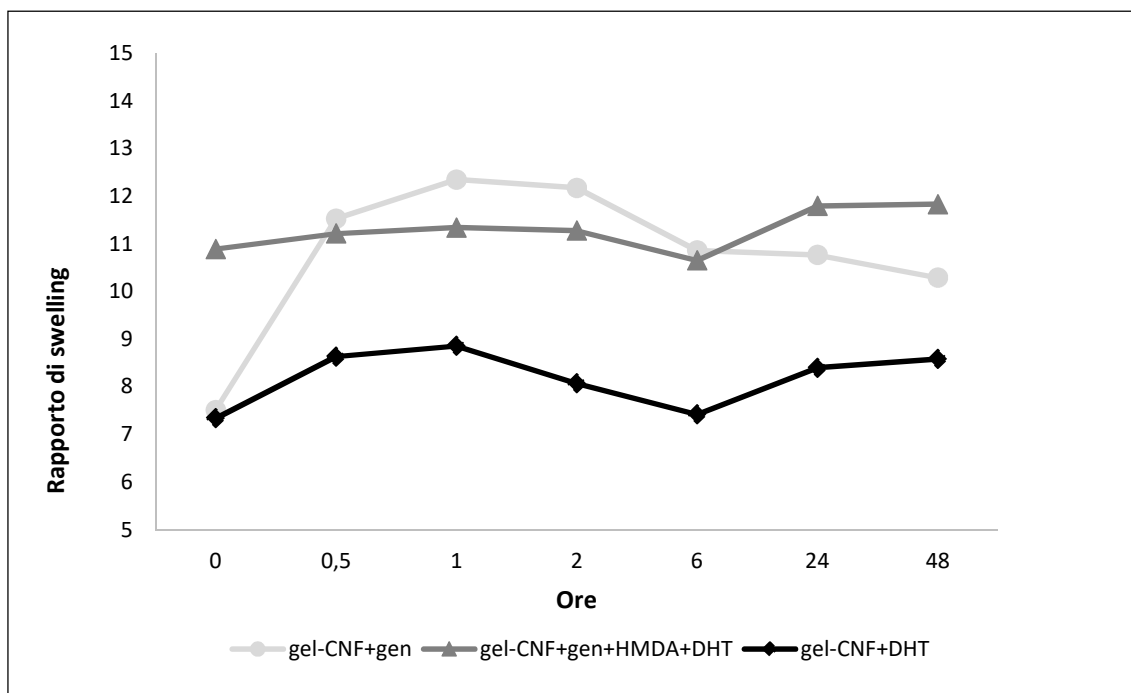


Figura 37 - Grafico del rapporto di swelling rispetto al tempo di immersione. Il tempo 0 corrisponde all'istante immediatamente successivo all'immersione.

Il test di degradazione permette di valutare la stabilità degli scaffold in condizioni molto simili a quelle fisiologiche e per un arco di tempo pari a 28 giorni, periodo scelto sulla base della necessità dei successivi test biologici. All'interno di questo periodo, uno scaffold stabile per passare ai successivi test *in vitro* deve avere una degradazione inferiore al 20% (p/p). È necessario che per tutta la durata del test gli scaffolds siano stabili e quindi mantengano la loro funzione di struttura portante per permettere alle cellule di entrare in contatto con essi, aderire e successivamente colonizzare lo scaffold e, solo in un secondo momento, iniziare la degradazione per favorire la generazione di nuovi tessuti.

In Figura 38 si osserva che dopo 28 giorni a 37 °C in PBS i campioni conservano la loro struttura macroscopica e la propria microstruttura perdendo circa dal 10% al 20% del loro peso iniziale. Il campione reticolato con genipina si dimostra, tra quelli analizzati, il meno

stabile raggiungendo valori di degradazione superiori al 26%. Questo comportamento è in linea con quanto emerge dal grado di cross-linking, inferiore rispetto agli altri due campioni così come vedremo in seguito.

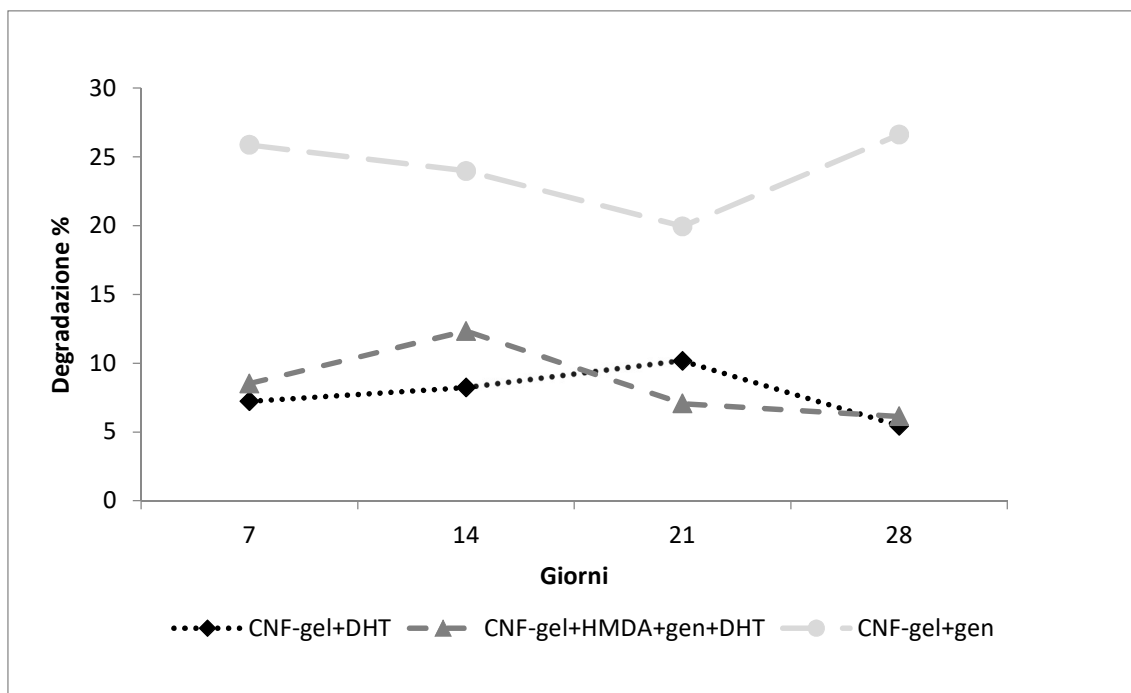


Figura 38 - Degradazione % rispetto al tempo di immersione

6.2.3 Grado di cross-linking

Per determinare la resa dei processi di reticolazione è stato quantificato il numero di ammine libere che quindi non hanno reagito durante il trattamento di reticolazione.

Il grado di reticolazione è stato calcolato mettendo a confronto l'assorbanza dei campioni reticolati (CNF-gel+DHT, CNF-gel+HMDA, CNF-gel+gen e CNF-gel+HMDA+gen+DHT) con il campione di controllo (CNF-gel).

Come mostra la Tabella 6, i campioni che presentano un grado di reticolazione maggiore sono quelli reticolati solo con DHT (13%) e quelli reticolati con tutti e tre gli agenti contemporaneamente (15%). Questo risultato conferma a pieno le aspettative in accordo con l'esito dello studio preliminare relativo alla stabilità dei campioni. La resistenza alla degradazione in soluzione infatti è una delle conseguenze principali che deriva

dall'utilizzo di agenti reticolanti. Si ricordi il comportamento instabile già dopo poche ore dello scaffold reticolato solo con HMDA che in questo test presenta un grado di cross-linking pressoché comparabile con il campione di controllo (non reticolato). Un altro fattore rilevante riguarda i campioni di CNF-gel+DHT e CNF-gel+HMDA+gen+ DHT che, come già sottolineato, hanno il grado di reticolazione più elevato e con valori ravvicinati. Questa evidenza ci suggerisce che il trattamento di disidratazione di per sé può essere considerato un metodo di cross-linking efficiente che ci permette di risparmiare non solo in termini di tempistiche (l'HMDA infatti richiede un tempo di permanenza in stufa a 80 °C per 20 ore) ma soprattutto in termini di costi (la genipina infatti è molto costosa) e di praticità (il DHT è l'unico trattamento che si effettua dopo la liofilizzazione, quindi su un campione secco e non umido evitando di compromettere la stabilità del polimero).

Campione	Grado di cross-linking (%)
CNF-gel	0 %
CNF-gel+DHT	13 %
CNF-gel+HMDA	1.5 %
CNF-gel+gen	8.7 %
CNF-gel+HMDA+gen+ DHT	15 %

Tabella 6 - Grado di cross-linking (%) dei campioni analizzati

6.3 Proprietà meccaniche

Un biomateriale per applicazioni di ingegneria tissutale deve avere le giuste proprietà meccaniche per garantire il successo dell'impianto.

La bio-stabilità degli scaffolds è direttamente determinata da alcuni fattori quali resistenza, elasticità, assorbimento all'interfaccia del materiale e degradazione chimica.

Lo scaffold infatti deve avere proprietà meccaniche e valori di degradazione adeguati così da favorire la rapida generazione di tessuto. È essenziale mantenere la resistenza meccanica della struttura dello scaffold dopo l'impianto per la ricostruzione di tessuti duri e portanti quali ossa e cartilagine. Infatti, per poter essere impiegato con successo nell'ingegneria dei tessuti, è fondamentale che un biomateriale sia in grado di resistere e trasmettere i carichi e le tensioni che il nuovo tessuto dovrebbe essere in grado di sostenere.

Le proprietà meccaniche dei biomateriali sono influenzate dai trattamenti a cui vengono sottoposti gli scaffolds e inoltre tendono a diminuire rapidamente in funzione del tempo di impianto. La rigidità meccanica della matrice, così come la rugosità del materiale e il confinamento fisico, determinate dalla microstruttura tridimensionale su scala subcellulare e supercellulare rispettivamente, possono modulare significativamente il risultato dell'equilibrio tra forze e matrice cellulare, conducendo al rimodellamento della citoarchitettura e alla polarizzazione cellulare.

Tuttavia il fattore principale che influenza le proprietà meccaniche e l'integrità strutturale degli scaffolds oltre alla natura chimica è la loro porosità, quindi il volume dei pori, la forma, la grandezza, l'orientazione e l'interconnessione¹⁹.

Per valutare il comportamento meccanico degli scaffolds rispetto al sito di applicazione è importante testarne le proprietà meccaniche in condizioni realistiche, in termini di temperatura e umidità; questo è possibile attraverso la DMA.

In seguito alle caratterizzazioni chimico-fisiche condotte e in particolar modo in relazione alla stabilità dei campioni analizzati è stato deciso di caratterizzare meccanicamente solo i provini reticolati con DHT (CNF-gel+DHT) e quelli reticolati con tutti gli agenti reticolanti (CNF-gel+HMDA+gen+DHT). Come campione di controllo è stato testato uno scaffold contenente solo gelatina e genipina (gel-gen) così da poter verificare il sostegno meccanico alla struttura introdotto dalla nanocellulosa. Attraverso le prove meccaniche si vuole indagare però, non solo l'importanza della nanocellulosa come nano-rinforzo, ma anche la relazione che intercorre tra grado di reticolazione e proprietà meccaniche. Diversi studi presenti in letteratura infatti riportano che all'aumentare del grado di reticolazione si ottiene un miglioramento delle proprietà meccaniche degli scaffolds.

Ogni test è stato condotto su 5 provini per ogni tipo di campione.

6.3.1 Prove di stress-strain

Le Figure 39-40 mostrano le proprietà meccaniche dei blend polimerici diversamente reticolati a confronto con lo scaffold di gelatina reticolato con genipina, valutate tramite test a compressione. Il modulo di Young, riportato in Figura 40, è stato calcolato misurando la pendenza della curva di stress-strain nel suo tratto lineare, in particolar modo nel range di strain da 0.01 a 0.1. Il modulo di Young cresce drasticamente da 0.018 MPa a 0.035 fino a 0.055 MPa negli scaffolds in cui la CNF è introdotta come nano-rinforzo. Anche il grafico di stress-strain rivela che la resistenza a compressione degli scaffolds aumenta significativamente da 0.021 MPa a 0.028 MPa nel campione reticolato con DHT grazie all'impiego della nanocellulosa.

Inoltre, confrontando i diversi campioni è possibile osservare che lo scaffold reticolato con DHT ha un modulo di Young superiore rispetto a quello reticolato con genipina, HMDA e DHT. Questa caratteristica ci suggerisce di impiegare gli scaffolds per diverse applicazioni sulla base delle proprietà meccaniche richieste. È noto infatti che, se i moduli di Young dei tessuti da rigenerare si discostano molto da quelli del substrato polimerico, può verificarsi una concentrazione degli sforzi all'interfaccia tessuto/polimero, tale da generare una risposta infiammatoria dell'organismo, con formazione di una capsula fibrotica.

In riferimento ai valori del modulo di Young ottenuto e ai dati presenti in letteratura, lo scaffold trattato con tutti e tre gli agenti di reticolazione potrebbe essere applicato a livello del menisco mentre lo scaffold trattato con DHT, che presenta un modulo di Young superiore, potrebbe risultare più adatto per la rigenerazione della cartilagine articolare²⁰.

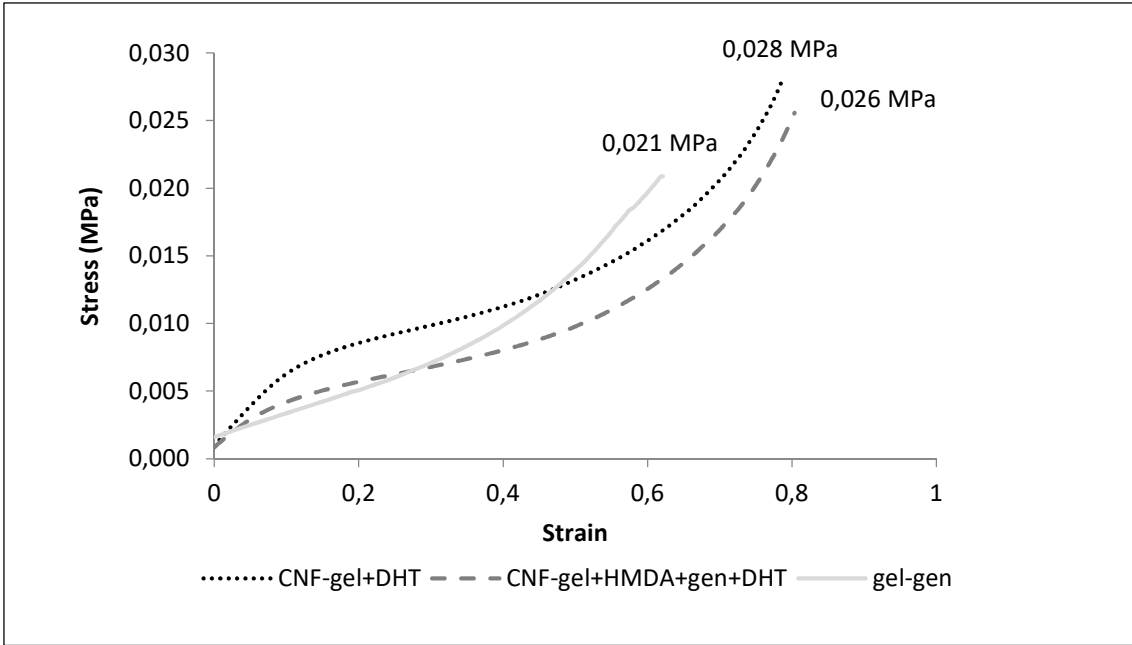


Figura 39 - Curve di stress-strain dei campioni CNF-gel+DHT, CNF-gel+HMDA+gen+DHT e gel+gen

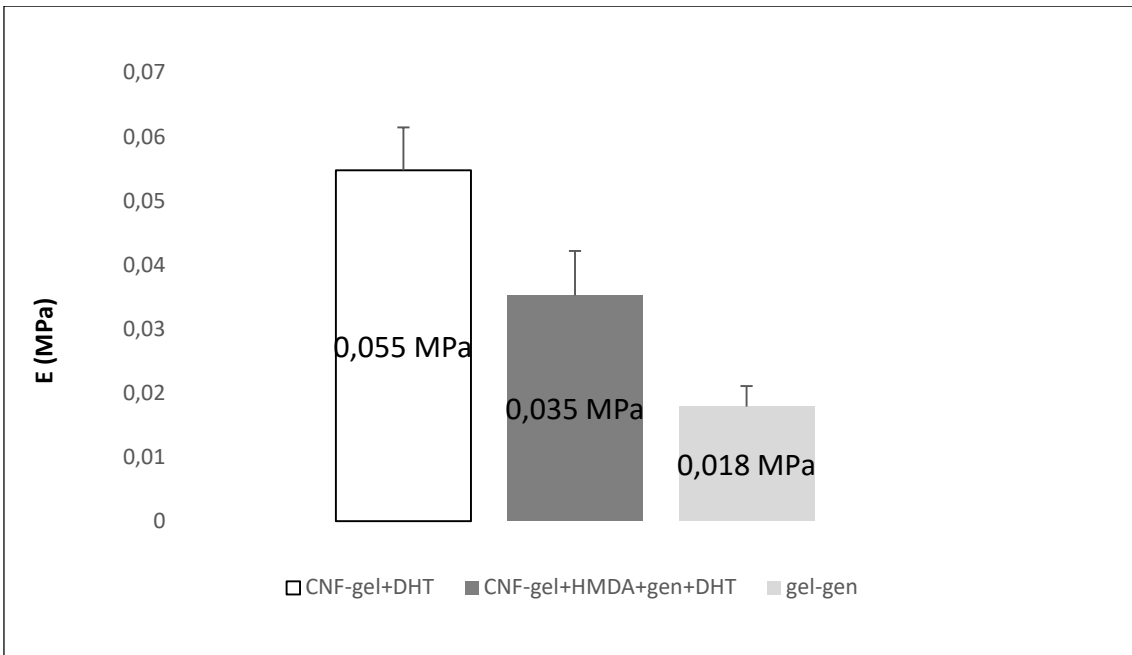


Figura 40 - Valori medi dei Moduli di Young con relativa deviazione standard

6.3.2 Prove di creep

Insieme al modulo di Young, valutato tramite curve di stress-strain, le prove di creep permettono di effettuare uno studio approfondito sul materiale per valutarne il comportamento dopo essere stato sottoposto a tensioni elevate per un tempo specifico. Come discusso in precedenza, i test preliminari di linearità ci hanno permesso di identificare la deformazione adeguata da applicare ai campioni. Le curve di creep in funzione del tempo sono rappresentate in Figura 41 e presentano un andamento qualitativamente simile tra loro. Inoltre mostrano come gli scaffolds, dopo essere stati sottoposti a un carico statico per 15 minuti, riescano a recuperare quasi totalmente la loro forma iniziale. La deformazione finale dei provini risulta infatti inferiore al 10% a partire da una deformazione sotto stress del 40% circa nel caso del controllo e del campione con tutti gli agenti reticolati e del 70% nel caso del campione CNF-gel+DHT, quest'ultimo dato è sintomo di una maggior elasticità rispetto agli altri campioni.

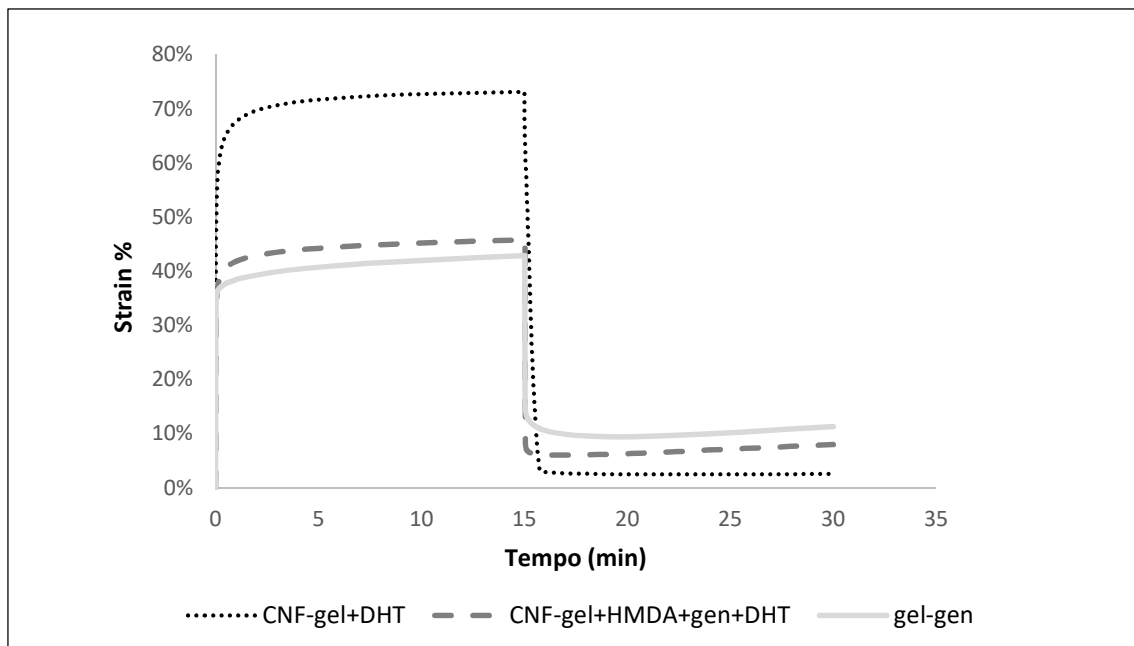


Figura 41 - Curve di creep dei campioni CNF-gel+DHT, CNF-gel+HMDA+gen+DHT e gel+gen

6.3.3 Prove multi-frequency strain

Le proprietà viscoelastiche dei materiali sono state valutate anche attraverso l'analisi della risposta meccanica del campione sottoposto a deformazioni periodiche. Lo *storage modulus* E' è riportato in Figura 42 e presenta un andamento simile per tutti i campioni. All'aumentare della frequenza da 0.1 a 10 Hz si ha un aumento dello *storage modulus*, più evidente per i campioni reticolati rispetto al campione di controllo gel-gen. Infatti nell'intervallo di frequenze analizzato i moduli aumentano da 0.016 a 0.023 MPa, da 0.035 a 0.064 MPa e da 0.061 a 0.11Mpa rispettivamente per i campioni gel-gen, CNF-gel+HMDA+gen+DHT e CNF-gel+DHT. Inoltre risulta evidente non solo un valore di *storage modulus* maggiore, ma anche un suo aumento più accentuato nei campioni reticolati rispetto al campione di controllo; aspetto riscontrabile anche nei grafici del *loss modulus* E'' in Figura 43 e di conseguenza della $\tan\delta$ in Figura 44. I valori negativi dello *storage modulus* e della $\tan\delta$ per il provino di gelatina e genipina sono legati ad un errore di misura dello strumento in relazione alla scarsa resistenza del materiale ad alte frequenze. I campioni di CNF-gel+HMDA+gen+DHT e CNF-gel+DHT recuperano a pieno lo strain iniziale tra una compressione e l'altra a differenza del campione di controllo.

I risultati ottenuti possono essere attribuiti all'influenza esercitata dagli agenti reticolanti sull'interazione tra la gelatina e le nanofibrille di cellulosa. Il valore di E'' risulta considerabilmente inferiore rispetto a E' tanto da suggerirci l'impiego degli scaffolds nell'ingegneria dei tessuti elastici. Questo dato è confermato dall'andamento della $\tan\delta$ che decresce lievemente all'aumentare della frequenza. La $\tan\delta$ infatti non è altro che il rapporto tra la quantità di energia dissipata da meccanismi viscosi rispetto all'energia immagazzinata dalla componente elastica.

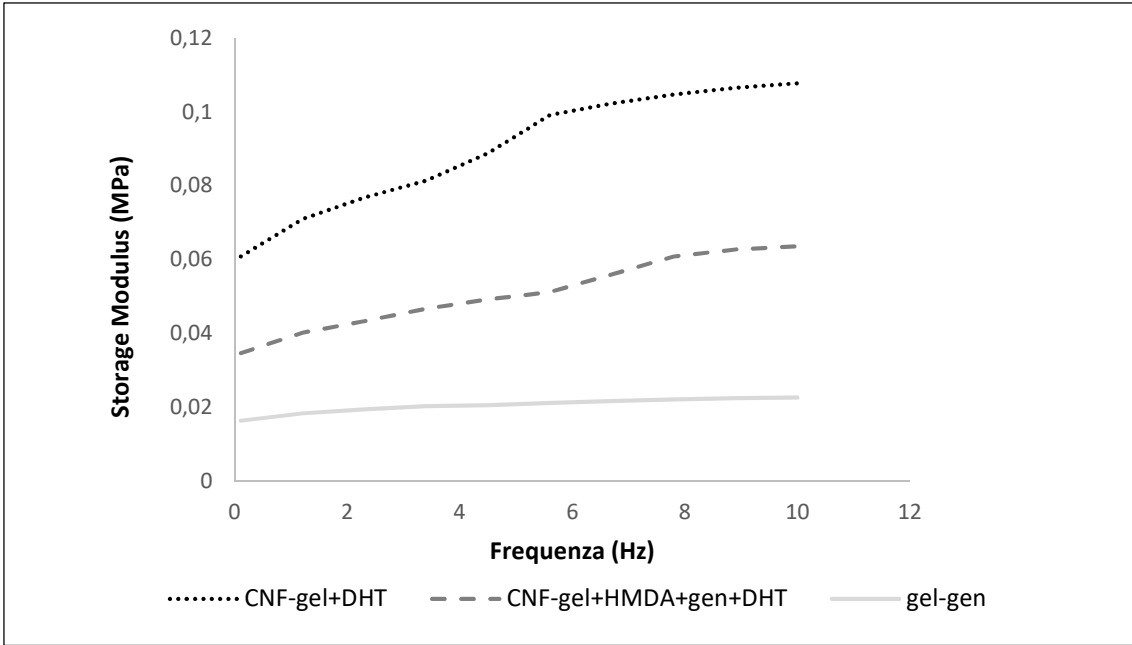


Figura 42 - Storage modulus dei campioni CNF-gel+DHT, CNF-gel+HMDA+gen+DHT e gel+gen

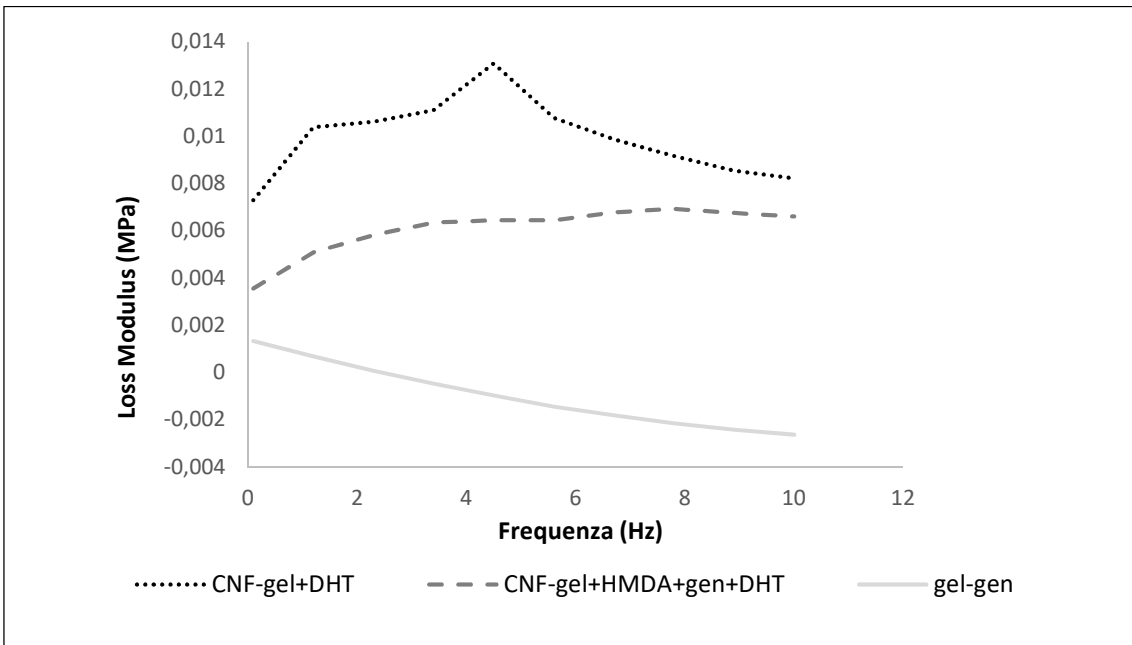


Figura 43 - Loss modulus dei campioni CNF-gel+DHT, CNF-gel+HMDA+gen+DHT e gel+gen

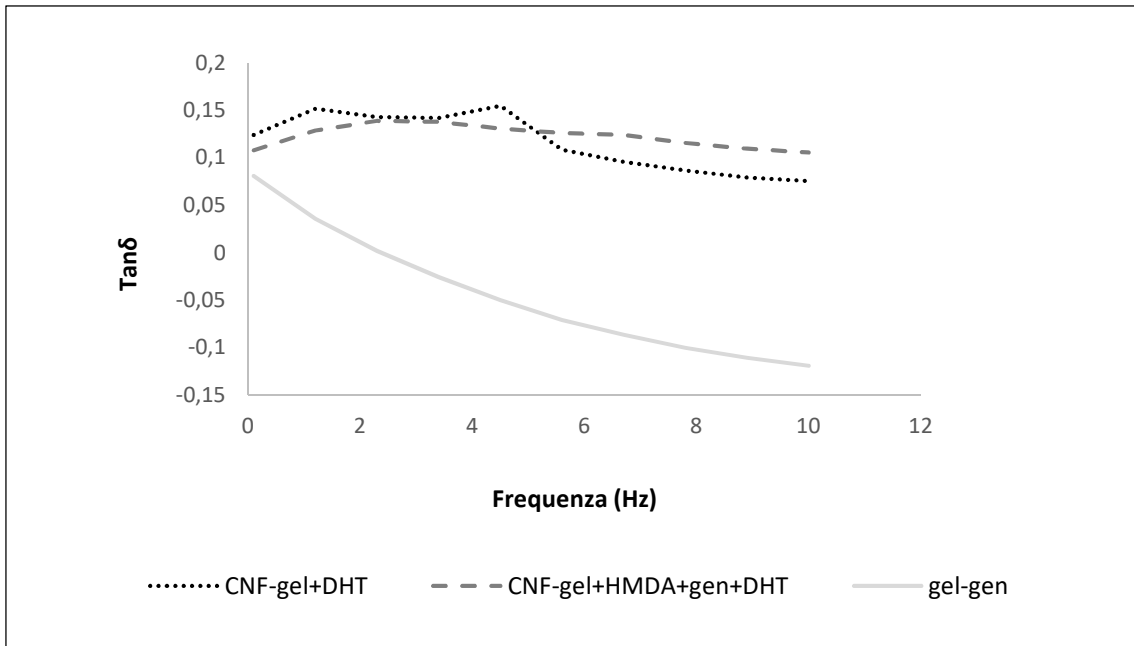


Figura 44 - $Tan\delta$ dei campioni CNF-gel+DHT, CNF-gel+HMDA+gen+DHT e gel+gen

CONCLUSIONI

Questo progetto di tesi si è focalizzato sulla progettazione, sviluppo e caratterizzazione di materiali polimerici naturali per la realizzazione di costrutti 3D potenzialmente sfruttabili in un ampio range di applicazioni nel campo dell'ingegneria tissutale.

L'esperienza di ISTECCNR, la conoscenza approfondita nell'ambito dei polimeri naturali e un'attenta ricerca bibliografica hanno reso possibile la progettazione di miscele polimeriche (blends) a base di gelatina e nanocellulosa. Attraverso la combinazione di due o più materiali si vuole ottenere un dispositivo dalle proprietà innovative, come risultato delle performance chimico-fisiche e meccaniche dei singoli materiali di partenza. È stata scelta la gelatina per le sue eccellenti proprietà, quali biocompatibilità, biodegradabilità, bioadesività e bassi costi di produzione. Poiché risulta meccanicamente instabile e facilmente degradabile si è scelto di rinforzarla con la nanocellulosa in combinazione con diversi trattamenti reticolanti (HMDA, genipina e DHT), in grado di fornirle stabilità chimica ed un adeguato sostegno strutturale e meccanico. Questo è reso possibile attraverso la formazione di legami chimici tra le catene polimeriche, grazie al processo di reticolazione che prevede, per ogni agente di cross-linking, particolari condizioni di sintesi in termini di concentrazione, temperatura, pressione e pH. Ai composti ottenuti è stata conferita una struttura 3D porosa attraverso un processo di liofilizzazione, sono quindi stati caratterizzati mediante l'utilizzo di diverse tecniche analitiche.

In particolare attraverso la misura dell'angolo di contatto è stato possibile indagare le proprietà superficiali degli scaffolds. I valori ottenuti, hanno rivelato un comportamento intermedio di tutti i campioni in termini di bagnabilità ma hanno altresì evidenziato che gli agenti reticolanti non influenzano sostanzialmente tale parametro.

Mediante la microscopia a scansione elettronica (SEM) e i test di porosità è stato possibile verificare la morfologia dei materiali realizzati. Tutti gli scaffolds presentano una struttura altamente porosa ed omogeneamente distribuita, con pori interconnessi e sufficientemente ampi da garantire la colonizzazione cellulare.

L'analisi morfologica ha attestato una certa validità di tutti i campioni presto smentita attraverso uno studio preliminare di stabilità. Il campione non reticolato così come quello trattato con HMDA sono risultati instabili poche ore dopo la loro immersione in PBS.

Questo comportamento è facilmente spiegabile analizzando i risultati del grado di cross-linking che rivelano un grado di reticolazione relativamente basso per tutti i campioni ma pressoché comparabile con quello del campione di controllo, non reticolato, per il campione trattato con HMDA.

Dalle prove relative allo swelling e alla degradazione emerge la capacità dei campioni di assorbire una notevole quantità di liquido e di conseguenza terreno di cultura cellulare e di conservare la loro stabilità nel lungo termine, così da svolgere il ruolo di struttura portante per l'adesione e la proliferazione cellulare.

L'analisi chimico-fisica è stata particolarmente utile per individuare quali tra i campioni testati fosse più stabile e potesse quindi essere sottoposto ai test meccanici. Per quanto riguarda i moduli di Young e la resistenza a compressione, valori maggiori sono stati rilevati nei campioni in cui è presente la nanocellulosa che ne conferma la reale funzione di rinforzo. Attraverso le prove di creep e multi-frequency strain è emerso il comportamento viscoelastico degli scaffold, sicuramente più evidente nei campioni in cui la gelatina è stata combinata con la nanocellulosa e gli agenti reticolanti. Da un'attenta analisi dei risultati ottenuti e da un loro confronto con le caratteristiche meccaniche dei tessuti biologici emerge la possibilità di impiegare tali materiali per la rigenerazione di diversi tessuti, quali il tessuto cartilagineo, il tessuto connettivo fibroso e il tessuto osseo; quest'ultimo solo in seguito a una fase di biomineralizzazione.

Gli steps successivi ai quali tali materiali dovranno esser sottoposti, prima di poter essere eventualmente utilizzati sull'uomo, saranno i test di biocompatibilità *in vitro* ai quali, se superati con successo, seguiranno i test *in vivo* su adeguati modelli animali.

BIBLIOGRAFIA

1. E. Lavik, R. Langer, "Tissue engineering: current state and perspectives", *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 65, no. 1, 2004.
2. S. Mantero, M. Raimondi, A. Remuzzi, A. Ahluwalia, *Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa*. Bologna: Pàtron, 2009, pp. 67-110.
3. R. Tuli, W. Li, R. Tuan, "Current state of cartilage tissue engineering", *Arthritis Research & Therapy*, vol. 5, no. 5, pp. 235-238, 2003.
4. L. Freed, J. Marquis, A. Nohria, J. Emmanuel, A. Mikos, R. Langer, "Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers", *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 27, no. 1, pp. 11-23, 1993.
5. S. Woo, A. Almaraz, R. Liang, M. Fisher, "Functional Tissue Engineering of Ligament and Tendon Injuries", *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 367, pp. 163-179, 1999.
6. A. Ratcliffe, D. Butler, N. Dymant, P. Cagle, C. Proctor, S. Ratcliffe, E. Flatow, "Scaffolds for Tendon and Ligament Repair and Regeneration", *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 43, no. 3, pp. 819-831, 2015.
7. U. Longo, A. Lamberti, S. Petrillo, N. Maffulli, V. Denaro, "Scaffolds in Tendon Tissue Engineering", *Stem Cells International*, vol. 2012, pp. 1-8, 2012.
8. F. Boschetti, A. Tomei, S. Turri, M. Levi, M. Swartz, "Design, fabrication, and characterization of a composite scaffold for bone tissue engineering", *The International Journal of Artificial Organs*, vol. 31, no. 8, pp. 697-707, 2008.
9. A. Amini, C. Laurencin, S. Nukavarapu, "Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges", *Crit Rev Biomed Eng*, vol. 40, no. 5, pp. 363-408, 2012.
10. R. Pietrabissa, *Biomateriali per protesi e organi artificiali*. Bologna: Patron, 1996.
11. M. Hoque, T. Nuge, T. Yeow, N. Nordin, R. Prasad, "Gelatin Based Scaffolds For Tissue Engineering – A review", *Polymers Research Journal*, vol. 9, no. 1, pp. 15-32, 2015.
12. C. Salas, T. Nypelö, C. Rodriguez-Abreu, C. Carrillo, O. Rojas, "Nanocellulose properties and applications in colloids and interfaces", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 19, no. 5, pp. 383-396, 2014.
13. K. Syverud, S. Pettersen, K. Draget, G. Chinga-Carrasco, "Controlling the elastic modulus of cellulose nanofibril hydrogels—scaffolds with potential in tissue engineering", *Cellulose*, vol. 22, no. 1, pp. 473-481, 2014.
14. J. Maitra, V. Shukla, "Cross-linking in Hydrogels - A Review", *American Journal of Polymer Science*, vol. 4, no. 2, pp. 25-31, 2014.

15. M. Haugh, M. Jaasma, F. O'Brien, "The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen-GAG scaffolds", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 89, no. 2, pp. 363-369, 2009.
16. R. Muzzarelli, "Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids", *Carbohydrate Polymers*, vol. 77, no. 1, pp. 1-9, 2009.
17. K. Menzies, L. Jones, "The Impact of Contact Angle on the Biocompatibility of Biomaterials", *Optometry and Vision Science*, p. 1, 2010.
18. K. Nazemi, F. Moztafzadeh, N. Jalali, S. Asgari, M. Mozafari, "Synthesis and Characterization of Poly(lactic-co-glycolic) Acid Nanoparticles-Loaded Chitosan/Bioactive Glass Scaffolds as a Localized Delivery System in the Bone Defects", *BioMed Research International*, vol. 2014, pp. 1-9, 2014.
19. B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, D. Kumar, "Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review", *International Journal of Polymer Science*, vol. 2011, pp. 1-19, 2011.
20. L. Yan, J. Oliveira, A. Oliveira, S. Caridade, J. Mano, R. Reis, "Macro/microporous silk fibroin scaffolds with potential for articular cartilage and meniscus tissue engineering applications", *Acta Biomaterialia*, vol. 8, no. 1, pp. 289-301, 2012.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Giovanni Valdrè per la disponibilità dimostratami.

Ringrazio la Dott.ssa Monica Sandri e il gruppo di Biomateriali per avermi dato l'opportunità di svolgere questa esperienza presso l'ISTEC-CNR.

Un ringraziamento speciale alla Dott.ssa Elisabetta Campodoni che mi ha seguita e supportata durante tutto il percorso, consigliandomi e guidandomi nel lavoro svolto e dandomi preziosi consigli sulla stesura dell'elaborato finale.

Grazie ai miei genitori e a mio fratello per avermi sostenuta e incoraggiata durante tutti questi anni di studi, siete la mia forza.

Grazie ad Alberto per esserci sempre stato, per aver compreso e condiviso con me ogni sforzo e momento di difficoltà.

Ringrazio i miei amici, quelli storici che nonostante i numerosi impegni sono sempre stati al mio fianco e tutti i nuovi compagni dell'università, senza di voi questo percorso sarebbe stato sicuramente meno divertente.

Grazie infine a tutti coloro che mi hanno sostenuta in questi anni e hanno creduto in me.