

**Alma Mater Studiorum - Università di Bologna**

**SCUOLA DI SCIENZE**

**Dipartimento di Chimica Industriale "Toso Montanari"**

Corso di Laurea Magistrale in

## **Chimica Industriale**

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

# Sintesi di biomateriali con design molecolare "ad hoc" per applicazioni biomedicali: dal rilascio controllato di farmaci all'ingegneria tissutale

Tesi di laurea sperimentale

### **CANDIDATO**

Nicola Arlandini

### **RELATORE**

**Prof.ssa** Elisabetta Salatelli

### **CORRELATORI**

**Prof.ssa** Nadia Lotti

**Dott.ssa** Michelina Soccio

**Dott.ssa** Giulia Guidotti

---

**Anno Accademico 2015-2016**

---

# Indice

<b>1. CAPITOLO 1: Introduzione.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Biomateriali .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.1 Classificazione dei biomateriali .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.2 Applicazioni .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Materiali polimerici .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.1 Struttura .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.2 Cristallinità .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2.3 Proprietà termomeccaniche .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2.4 Peso Molecolare .....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.5 Sintesi .....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.6 Processi tecnologici .....</b>	<b>26</b>
<b>1.2.7 Degradazione .....</b>	<b>27</b>
<b>1.2.8 Polimeri in ambito biomedicale .....</b>	<b>30</b>
1.2.8.1 Poliesteri .....	30
1.2.8.2 Poliolfine.....	32
1.2.8.3 Polistirene .....	34
1.2.8.4 Politetrafluoroetilene .....	34
1.2.8.5 Polisilossani .....	35
1.2.8.6 Poliuretani.....	35
1.2.8.7 Polimetilmetacrilato.....	36
1.2.8.8 Polipropilene fumarato .....	36
1.2.8.9 Acido polilattico-co-glicolico.....	37
1.2.8.10 Poli- $\epsilon$ -caprolattone.....	38
1.2.8.11 Poliidrossialcanoati.....	38
1.2.8.12 Collagene .....	39
1.2.8.13 Polisaccaridi.....	40
1.2.8.14 Chitina .....	41
1.2.8.15 Polianidridi .....	41
1.2.8.16 Poliammidi .....	42
1.2.8.17 Poliortoesteri.....	42
1.2.8.18 Policarbonati.....	43
<b>1.3 Copolimeri .....</b>	<b>43</b>

1.3.1	Copolimeri a blocchi.....	45
1.3.2	Copolimeri statistici.....	47
1.4	Controlled drug delivery.....	48
1.4.1	Meccanismo di rilascio controllato.....	50
1.4.2	Sistemi di trasporto.....	51
1.4.3	Interfacce di rilascio.....	53
1.4.3.1	Stent.....	53
1.4.3.2	Microparticelle.....	54
1.4.3.3	Nanovettori.....	58
1.4.3.3.1	Contributo dei polimeri ai nanovettori.....	59
1.4.4	Polimeri nel drug delivery.....	61
1.5	Tissue engineering.....	62
1.5.1	Cellule.....	64
1.5.2	Scaffold.....	65
1.5.3	Distribuzione dei segnali in ingegneria tissutale.....	67
1.6	Stato dell'arte del poli(butilene succinato), del poli(trietilene succinato) e dell'acido polilattico.....	69
1.6.1	PBS: struttura e proprietà dell'omopolimero.....	69
1.6.2	PTES: aggiunta in copolimeri e modulazione di proprietà.....	71
1.6.3	Acido polilattico (PLA).....	73
2.	<b>CAPITOLO 2: Scopo.....</b>	<b>78</b>
3.	<b>CAPITOLO 3: Materiali e metodi.....</b>	<b>82</b>
3.1	Sintesi.....	82
3.1.1	Reagenti.....	82
3.1.2	Descrizione della sintesi dei polimeri.....	84
3.1.2.1	Sintesi del PBS-OH.....	84
3.1.2.2	Sintesi del PTES-OH.....	86
3.1.2.3	Sintesi del PLLA.....	86
3.1.2.4	Sintesi del copolimero P(BS <sub>13</sub> TES <sub>12</sub> )-OH.....	87
3.1.2.5	Sintesi del copolimero P(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> )-OH.....	87
3.1.2.6	Sintesi del copolimero PLLAP(BS <sub>13</sub> TES <sub>12</sub> ).....	87
3.1.2.7	Sintesi del copolimero PLLAP(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> ).....	88
3.1.2.8	Sintesi del PLLA-CE.....	88
3.1.2.9	Sintesi del copolimero PLLAP(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> )-CE.....	89
3.1.3	Purificazione dei polimeri ottenuti.....	90
3.1.4	Preparazione delle microparticelle.....	91

3.1.5	Preparazione delle nanoparticelle .....	91
3.1.6	Preparazione di film polimerici .....	92
3.2	Caratterizzazione .....	93
3.2.1	Caratterizzazione molecolare .....	93
3.2.1.1	Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) .....	93
3.2.1.2	Cromatografia a permeazione su gel (GPC) .....	95
3.2.2	Caratterizzazione termica .....	97
3.2.2.1	Calorimetria differenziale a scansione .....	97
3.2.2.2	Analisi termogravimetrica (TGA).....	99
3.2.3	Analisi diffrattometrica a raggi X (WAXS).....	100
3.2.4	Caratterizzazione delle particelle .....	102
3.2.4.1	Microscopia ottica (caratterizzazione microparticelle).....	102
3.2.4.2	Light scattering dinamico (caratterizzazione nanoparticelle).....	102
3.2.4.3	Cinetica di rilascio del farmaco (caratterizzazione micro- e nanoparticelle) 105	
3.2.4.3.1	Spettrofotometro a doppio raggio.....	106
3.2.5	Caratterizzazione meccanica .....	107
3.2.6	Studi di degradazione idrolitica.....	110
3.2.7	Determinazione dell'angolo di contatto .....	111
4.	<b>CAPITOLO 4: Risultati e discussioni.....</b>	<b>113</b>
4.1	Sintesi e caratterizzazione molecolare.....	113
4.2	Caratterizzazione termica e diffrattometrica.....	124
4.3	Realizzazione di particelle vuote e contenenti desametasone.....	134
4.3.1	Studi di cinetica di rilascio del farmaco .....	137
4.4	Caratterizzazione meccanica .....	140
4.5	Studi di degradazione idrolitica.....	143
5.	<b>CAPITOLO 5: Conclusioni.....</b>	<b>147</b>
6.	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>150</b>





# CAPITOLO 1: Introduzione

Il campo interdisciplinare della scienza dei materiali, anche comunemente chiamata scienza e ingegneria dei materiali, coinvolge la scoperta e la progettazione di nuovi prodotti, tra cui metalli, ceramiche, polimeri e biomateriali. Le origini intellettuali della scienza dei materiali derivano dall'Illuminismo, quando i ricercatori iniziarono ad utilizzare il pensiero analitico proveniente dalla chimica, fisica e ingegneria per comprendere antiche osservazioni fenomenologiche in metallurgia e mineralogia. Come tale, il settore è stato a lungo considerato dalle istituzioni accademiche come un sub-campo di numerosi campi correlati (chimica, fisica ed ingegneria). A partire dal 1940 tuttavia, la scienza dei materiali ha cominciato ad essere più ampiamente riconosciuta come un campo specifico e distinto della scienza e dell'ingegneria, e le principali università tecniche di tutto il mondo hanno creato scuole dedicate allo studio.

La scienza dei materiali ha come oggetto di studio la struttura microscopica dei materiali e le relazioni esistenti tra sintesi, lavorazione e proprietà finali dei prodotti. Queste ultime sono migliorabili significativamente intervenendo sulla composizione chimica, disposizione atomica o molecolare mediante l'uso di nanotecnologie, oppure sulle dimensioni, forma, orientazione di un materiale cristallino.

Per comprendere quali proprietà di un materiale sono migliorabili è necessario dapprima conoscere la relazione esistente tra struttura e caratteristiche chimico-fisiche dello stesso, valutando come è possibile controllare la struttura attraverso trattamenti chimici, termici, meccanici o altre operazioni.

## 1.1 Biomateriali

Una prima definizione venne redatta nel 1976, ad opera dell'*European Society for Biomaterials* (ESB), all'interno della *Consensus Conference on Definitions in Biomaterials Science*. In quell'occasione fu identificato come biomateriale un “materiale non vivente utilizzato in un dispositivo medico e finalizzato all'interazione con sistemi biologici” <sup>(1)</sup>. Attualmente si indica invece come biomateriale quel “materiale finalizzato all'interazione con un sistema biologico allo scopo di valutare, trattare, aumentare o sostituire qualsiasi tessuto, organo o funzione corporea” <sup>(2)</sup>.

Le due definizioni presentano una forte discrepanza: in origine il biomateriale non doveva necessariamente interagire in modo significativo con il corpo umano, oggi, invece, è

richiesto ai biomateriali di influenzare i processi biologici finalizzati alla ricostruzione tissutale.

Le principali questioni legate al significato di biomateriale riguardano da una parte il concetto del prefisso “bio”, dall'altra il concetto di “materiale”, che, secondo la scienza dei materiali, rappresenta la sostanza di cui è composto un oggetto, per cui, secondo questa definizione, vi sono tre classi principali di materiali:

- metallici (ferro, cromo, cobalto, titanio, nichel), caratterizzati dalla presenza di legami metallici;
- ceramici (allumina, idrossiapatite, grafite, carbonio pirolitico), in cui compaiono legami ionici;
- polimeri, contenenti nelle loro catene legami covalenti.

Mediante gli imponenti sviluppi nel campo dei biomateriali, oggi sono disponibili sistemi caratterizzati da una certa complessità strutturale, ottenibili mediante le nanotecnologie e i processi di auto-assemblaggio. Occorre dunque superare il concetto tradizionale del termine “materiale” affinché esso possa comprendere non solo oggetti solidi, tangibili, realizzati con approccio top-down, ma anche nanoparticelle attive, idrogel, agenti solubili, sistemi biologici auto-assemblati, cellule e virus.

Al termine biomateriale sarebbe dunque possibile associare una definizione più completa, ovvero quella di “sostanza ingegnerizzata in modo tale da assumere una forma che, da sola o come parte di un sistema più complesso, viene utilizzata per dirigere, tramite il controllo delle interazioni con i componenti di un sistema vivente, il corso di qualsiasi procedura diagnostica o terapeutica, sia in ambito di medicina umana sia di quella veterinaria”.

### **1.1.1 Classificazione dei biomateriali**

I biomateriali, a seconda delle caratteristiche che ne rendono possibile l'uso in applicazioni mediche specifiche, sono suddivisibili in cinque categorie:

- Materiali metallici: trovano largo impiego nella realizzazione di dispositivi impiantabili, protesi ortopediche (Figura 1.1) e dentali, strumenti chirurgici e mezzi di osteosintesi. Le loro caratteristiche più importanti sono:
  - elevato modulo elastico ( $100 \div 200$  GPa) ed elevata resistenza di snervamento ( $300 \div 1000$  MPa), che rendono così possibile la realizzazione di strutture in grado di supportare carichi elevati senza incorrere in importanti deformazioni elastiche, né deformazioni plastiche permanenti;

- buona duttilità e malleabilità: quando la sollecitazione applicata supera la resistenza di snervamento, la struttura si deforma plasticamente, invece di rompersi in maniera fragile. Questo permette di intervenire sostituendo il componente deformato prima che si rompa;
- elevata resistenza alla fatica meccanica, necessaria in tutte le applicazioni per le quali sono previsti cicli di carico.

Tali proprietà meccaniche li rendono ideali per la sostituzione di tessuti duri, quali ossa e denti. Al contrario, il fatto che siano soggetti a corrosione in ambienti fisiologici, potrebbe dare origine a fenomeni di tossicità. Ulteriori problematiche sono legate alle elevate densità e rigidità, fronteggiabili utilizzando leghe di metalli diversi o interfacce con materiali maggiormente bioinerti, quali le ceramiche.



Figura 1.1. Protesi di ginocchio realizzata in materiale metallico.

- Materiali ceramici: la loro struttura atomica (natura del legame ionico e microstruttura) conferisce elevatissima resistenza al calore e all'attacco degli agenti chimici (refrattarietà), un ottimo isolamento termico ed elettrico, nonché buona resistenza ai carichi di compressione, indice di elevato modulo elastico. Purtroppo tale struttura, che non consente il movimento relativo degli atomi, è anche causa di un comportamento meccanico tipicamente fragile. Nonostante a causa delle spiccate durezza e fragilità e bassa tenacità risultino difficilmente lavorabili e inadeguati per la realizzazione di interi componenti, possono essere

convenientemente impiegati come rivestimento di manufatti realizzati con altri materiali, allo scopo di conferirne particolari proprietà superficiali. In base alla potenziale compatibilità biologica, si individuano due categorie principali di biomateriali ceramici: ceramici bioinerti (non subiscono, né inducono alterazioni chimiche o biologiche a contatto con l'ambiente corporeo) e ceramici bioattivi (inducono una risposta nei tessuti attivando processi chimici e biologici all'interfaccia). I principali impieghi si trovano in ambito ortopedico, nella realizzazione di dispositivi per la sostituzione funzionale di tessuti duri, come protesi articolari e mezzi di osteosintesi, nel settore odontoiatrico, per l'implantologia e la realizzazione di denti artificiali (Figura 1.2), oppure in chirurgia cardiovascolare come protesi valvolari cardiache.



Figura 1.2. Corone dentali in materiale ceramico.

- Materiali biologici: materiali di origine umana o animale, impiegati previa devitalizzazione cellulare per impedire risposte immunitarie nell'organismo ospite. I tessuti connettivi risultano i più interessanti, alla cui categoria appartengono, tra gli altri, tessuti ossei, cartilagini, sangue ed endoteli. I materiali provenienti da tessuti molli trovano generalmente impiego come protesi vascolari e valvolari (Figura 1.3), mentre i tessuti duri vengono utilizzati come riempitivi in ambito ortopedico, a supporto di tessuti ossei contenenti cavità provocate da patologie, malformazioni o asportazioni.

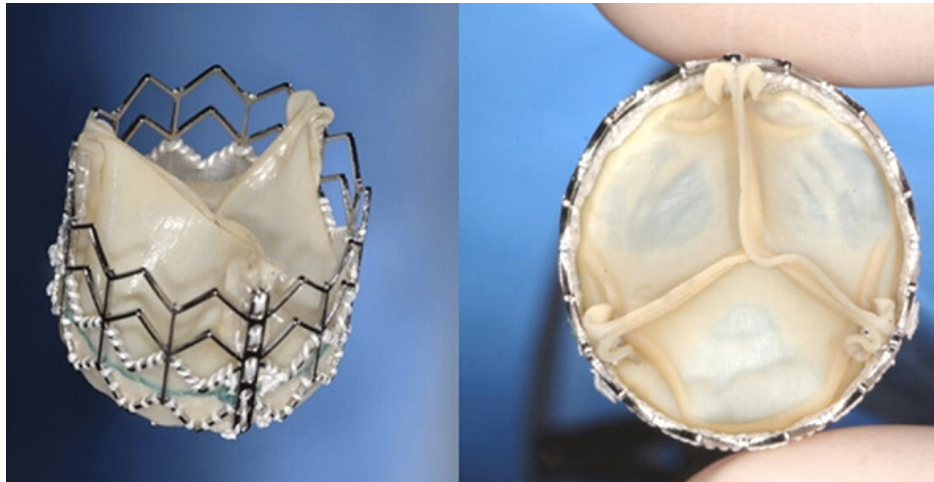


Figura 1.3. Valvola cardiaca biologica su stent.

- Materiali polimerici: i polimeri (dal greco "che hanno molte parti") sono macromolecole, ovvero molecole dall'elevato peso molecolare, costituite da un gran numero di gruppi molecolari (detti monomeri) uguali o diversi, uniti "a catena" mediante la ripetizione dello stesso tipo di legame, generalmente covalente (più raramente ionico). La loro struttura può variare significativamente (esistono polimeri a catena lineare, ramificata ecc.) e sono caratterizzati da bassa densità, cattiva conducibilità elettrica e basse temperature di rammollimento. Le proprietà meccaniche sono estremamente variabili in funzione della natura dei costituenti e del tipo di struttura del polimero. L'affinità chimica esistente tra molti polimeri e i tessuti dell'organismo conferisce a questi materiali caratteristiche eccellenti di biocompatibilità, intesa come interazione che promuove l'accettazione del materiale da parte dell'organismo ospite. In alcuni casi tale interazione può condurre a una forma di metabolizzazione del polimero che nel tempo risulta degradato, quindi eliminato. Questi polimeri vengono utilizzati nella realizzazione di dispositivi per applicazioni temporanee (es. sistemi di osteosintesi e fili di sutura), che si degradano in tempi compatibili con quelli necessari al dispositivo per esplicare la sua azione. Alcuni polimeri sintetici presentano una struttura chimica molto simile a quella dei polimeri naturali contenuti nei tessuti biologici, tanto che talvolta è possibile ottenere dei legami chimici tra le catene dei polimeri naturali e quelle dei polimeri sintetici al fine, per esempio, di fissare protesi artificiali al tessuto osseo. Sussistono diverse metodologie di classificazione dei polimeri:

- secondo la natura dei costituenti, i polimeri sono suddivisi in omopolimeri, costituiti da una sola tipologia monomerica, e copolimeri, caratterizzati dalla presenza di due o più tipi di monomeri;
- in base al peso molecolare la distinzione è in oligomeri, se la catena polimerica conta meno di 1500 unità, polimeri a basso peso molecolare, se contenenti dalle 1500 alle 5000 unità, e polimeri ad elevato peso molecolare, quando costituiti da più di 10000 unità.

I materiali polimerici trovano numerose applicazioni grazie alla semplice realizzazione di manufatti di differenti forme, quali fibre, tessuti, pellicole, barre, forme geometricamente complesse e liquidi viscosi, oltre alla possibilità di fabbricare gran parte dei materiali compositi, dove i polimeri possono assumere sia funzione di matrice, sia di carica. Il 45% dei biomateriali sono costituiti dai polimeri <sup>(3)</sup>, in particolare con applicazioni in biomedicina, dall'ortopedia, alle protesi cardiovascolari, fino alla realizzazione di interi organi artificiali; polimeri liquidi o in forma di gel sono ampiamente utilizzati nel settore oftalmico per la produzione di lenti a contatto e come riempitivi nelle protesi di tipo cosmetico. Occorre sottolineare che i materiali polimerici ad uso biomedicale differiscono dagli stessi materiali impiegati per altre applicazioni visto che i primi devono contenere quantità estremamente limitate di additivi e residui monomerici, che potrebbero dare luogo a rilascio indesiderato nei tessuti.

Tabella 1.1. Principali polimeri impiegati nel settore biomedicale.

<b>Polimero</b>	<b>Sigla</b>	<b>Principali applicazioni</b>
Polietilene	PE; LDPE	Film, imballaggi, cateteri, tubi connettori, somministrazione controllata di farmaci
Polietilene (PM > 2000000)	UHMWPE	Superfici articolari, fibre per compositi, placche ortopediche, rivestimenti steli femorali
Polipropilene	PP	Imballaggi sterili, siringhe, connettori, membrane per ossigenatori, fili di sutura, anse di supporto lenti intraoculari

Polivinilcloruro	PVC	Sacche per sangue, tubi indotracheali, guanti monouso, cateteri, accessori monouso
Policarbonato	PC	Membrane per ossigenatori ed emodialisi, linee ematiche
Politetrafluoroetilene	PTFE	Protesi vascolari, componenti di protesi valvolari, legamenti artificiali, rivestimenti
Polietilentereftalato	PET	Protesi vascolari, anelli di sutura, suture, passaggi transcutanei, componenti di protesi valvolari, componenti di assistenza cardiaca
Polimetilmetacrilato	PMMA	Cemento osseo, lenti a contatto, lenti intraoculari, membrane per emodialisi, materiali dentari
Siliconi		Cateteri, drenaggi, membrane, pelle artificiale, impianti per chirurgia plastica, protesi vascolari, protesi tracheali, rivestimenti, infusori, componenti di protesi valvolari
Poliuretani	PURs	Cateteri, cannule, tubi endotracheali, protesi valvolari, membrane per emodialisi, sacche ventricolari, rivestimenti emocompatibili, dispositivi di assistenza cardiaca, somministrazione controllata di farmaci, protesi vascolari
Polisolfone		Membrane per ossigenatori ed emodialisi
Acido poliglicolico	PGA	Suture biodegradabili, placche e chiodi intramidollari, placche di frattura degradabili



Acido polilattico	PLA	Placche e chiodi intramidollari, legamenti artificiali, placche di frattura degradabili, somministrazione controllata di farmaci
Copolimeri Butadiene-Stirene	BS	Articoli monouso, imballaggi
Copolimeri Stirene-Acrilnitrile	SAN	Aspiratori per sangue, componenti di emodializzatori
Poliacrilnitrile	PAN	Membrane per emodialisi
Poliammidi		Suture
Polidrossietilmetacrilato	PHEMA	Lenti a contatto, legamenti artificiali

- Materiali compositi: materiali le cui proprietà sono modulate in funzione della destinazione d'uso. La distinzione tra le diverse fasi dei materiali costituenti, che a seconda della funzione prendono il nome di matrice (componente più abbondante) e carica (rinforzo o riempitivo), è visibile soltanto a livello microscopico. La carica incrementa (rinforzo) o decrementa (riempitivo) le proprietà meccaniche del materiale e può essere costituita da piccole particelle puntiformi (composti particellari), piccole fibre allungate (composti rinforzati con fibre) o lunghe fibre disposte ordinatamente (composti strutturati). Nonostante siano caratterizzati da difficile lavorabilità e scarsa coesione tra i diversi componenti, i compositi, come la vetroresina e le plastiche rinforzate, possono fornire prestazioni migliori rispetto a quelle dei materiali omogenei. Numerose sono le applicazioni in ambito biomedico: riempitivi per protesi odontoiatriche, protesi porose, cementi ossei rinforzati e impianti ortopedici personalizzati.

Tabella 1.2. Classi di materiali impiegati in ambito biomedicale.

<b>Materiali</b>	<b>Vantaggi</b>	<b>Svantaggi</b>	<b>Campi d'applicazione</b>
<u>Metalli</u> (acciai, Titanio e leghe, leghe di Cobalto)	Buone proprietà meccaniche e resistenza alla corrosione	Scarsa biocompatibilità, rigidità, alta densità e corrosione in ambiente biologico	Mezzi di osteosintesi, protesi per ortopedia ed odontoiatria

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

### 1.1.2 Applicazioni

Il campo di applicabilità dei biomateriali è estremamente ampio e in forte espansione. Ingenti risorse umane e finanziarie sono impiegate costantemente per il loro sviluppo e miglioramento prestazionale.

Tra i principali utilizzi ricordiamo l'assistenza alla guarigione, l'ausilio per la diagnosi e per la terapia clinica, la correzione di anomalie estetiche e funzionali, il ripristino di capacità funzionali e la sostituzione di parti malate o mancanti.

Esempi esplicativi riguardanti l'assistenza alla guarigione sono le suture (tecnologie biorisorbibili), le viti e le placche ossee.

In merito all'ausilio per la diagnosi, si segnalano cateteri e sensori, sia miniaturizzati in punta di catetere che trasduttori esterni al corpo.

Relativamente alla terapia clinica, compaiono cateteri vescicali, drenaggi, dializzatori, ossigenatori primari, e sistemi per il rilascio controllato di farmaci.

Le protesi mammarie, quelle dentarie e le protesi cosmetiche dell'orecchio esterno rientrano invece nelle correzioni di anomalie estetiche, ovvero interventi sul corpo finalizzati a migliorarne l'estetica stessa.

Tipica correzione di anomalie funzionali è rappresentata dai distrattori per la spina dorsale, che sono strumenti mediante i quali è possibile raddrizzare e mantenere in asse la colonna vertebrale.

Sempre nell'ambito del ripristino funzionale sono da segnalare le lenti a contatto e i pacemaker cardiaci.

Raggruppati nella sostituzione di parti malate o mancanti, compaiono la pelle artificiale, le protesi ossee e articolari, il cuore artificiale e le protesi valvolari cardiache.

## **1.2 Materiali polimerici**

Per la trattazione generale si rimanda al paragrafo 1.1.1.

### **1.2.1 Struttura**

Le caratteristiche di un polimero risultano fortemente influenzate dalla conformazione spaziale e dall'organizzazione delle catene. Sono distinguibili quattro tipi di struttura:

- Struttura lineare, in cui le molecole di monomero si susseguono l'una all'altra, formando lunghe catene che si aggrovigliano tra loro, dando origine a gomitoli (tra le catene macromolecolari si instaurano interazioni deboli, tra cui interazioni dipolo-dipolo, legami a idrogeno, forze di Van der Waals) (Figura 1.4 a);
- Struttura ramificata, simile a quella lineare, ad eccezione di alcune unità monomeriche, che invece di susseguirsi linearmente, si diramano anche in catene laterali, riducendo la capacità di impacchettamento del polimero, quindi la densità. Le singole catene laterali interagiscono tramite legami deboli (Figura 1.4 b);
- Struttura a legami trasversali o intermolecolari, caratterizzata dalla presenza di catene laterali che legano tra loro varie molecole polimeriche, creando una struttura tridimensionale. Il polimero risulta perciò formato da un'unica grande macromolecola derivata dall'unione, attraverso tali catene, delle sue macromolecole di partenza (Figura 1.4 c);
- Struttura reticolata, in cui il polimero è un'unica macromolecola caratterizzata da unità monomeriche trifunzionali che possiedono tre legami covalenti attivi, i quali danno origine alla rete tridimensionale (Figura 1.4 d).

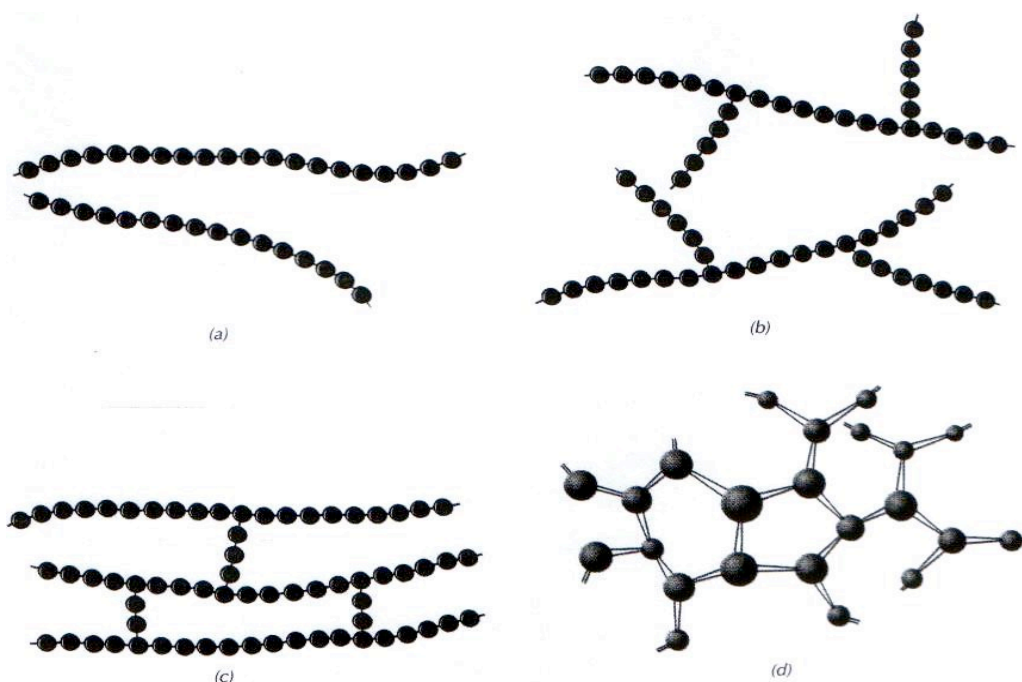


Figura 1.4. Strutture macromolecolari dei polimeri: a) lineare, b) ramificata, c) struttura a legami trasversali o intermolecolari, d) reticolata.

I polimeri a catena lineare o ramificata risultano meno rigidi, e in generale possiedono proprietà meccaniche peggiori rispetto a quelle dei polimeri reticolati. Infatti, i legami deboli attraverso cui le catene lineari e ramificate sono legate fra loro, consentono, quando il polimero è sottoposto a sollecitazione, lo scorrimento viscoso delle catene l'una rispetto all'altra, responsabile del comportamento viscoelastico dei polimeri a catena lineare o ramificata. Ciò non risulta possibile per i polimeri a struttura reticolata, a causa della natura stessa dei legami covalenti presenti tra le catene.

### 1.2.2 Cristallinità

Un materiale si trova allo stato solido in fase cristallina quando le sue unità costituenti risultano disposte ordinatamente nello spazio secondo un motivo ripetitivo. La porzione più piccola di tale struttura che contiene tutte le operazioni di simmetria del cristallo e che, traslata nelle tre direzioni spaziali, riproduce il medesimo reticolo cristallino, è denominata cella elementare.

Definito il grado di cristallinità come la percentuale in peso di sostanza in forma cristallina in funzione del peso totale, i materiali polimerici sono considerabili come sistemi bifasici,

costituiti ovvero da una fase cristallina ed una amorfa (Figura 1.5). Lo stato amorfo è presente in tutti i polimeri, in percentuali maggiori nel caso di strutture reticolate, ed è indicativo della capacità del polimero di mantenere, allo stato solido, una struttura disordinata tipica dello stato fuso. La componente cristallina, invece, risulta in genere superiore nel caso di polimeri a catena lineare, le cui macromolecole possono allinearsi più facilmente nello spazio. Anche la presenza di gruppi funzionali può incidere positivamente sulla cristallinità: essi, infatti, possono favorire la formazione di legami deboli tra le catene. Dal punto di vista delle proprietà, una maggiore cristallinità risulta vantaggiosa, in quanto rende i polimeri più densi, rigidi e duri grazie al maggior impacchettamento, più resistenti all'usura e agli agenti ambientali, e meno soggetti a fenomeni viscoelastici quali rilassamento e *creep* (deformazione viscosa).

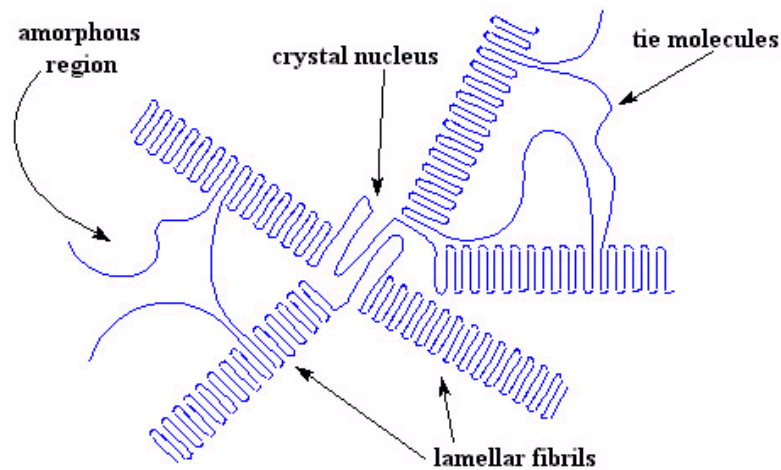


Figura 1.5. Struttura di un polimero semicristallino.

### 1.2.3 Proprietà termomeccaniche

I materiali polimerici sono classificabili, in base alle loro proprietà termomeccaniche, in:

- Termoplastici: a catena lineare o ramificata, presentano progressivo rammollimento sotto l'azione del calore, considerata la presenza, tra le catene polimeriche, di legami secondari a bassa resistenza termica. Questo li rende modellabili e riutilizzabili un numero illimitato di volte, purché ciò avvenga in un preciso intervallo di temperature.
- Termoindurenti: a catena reticolata, sono caratterizzati da una fase iniziale di rammollimento per riscaldamento, seguita da un processo di indurimento

provocato da reticolazioni. Per effetto combinato di calore e pressione risultano formabili nella prima fase di rammollimento, tuttavia se riscaldati in seguito ad indurimento, si decompongono carbonizzandosi.

I materiali termoplastici, preferiti nella realizzazione di dispositivi medici impiantabili, possiedono diagrammi sforzo-deformazione differenti in funzione della velocità di deformazione e della temperatura, come conseguenza delle proprietà termomeccaniche e viscoelastiche delle molecole costituenti. L'analisi di tali diagrammi, in differenti condizioni termiche o di deformazione, evidenzia un incremento della fragilità con la velocità di deformazione, in opposizione ad un decremento con la temperatura.

Per un materiale polimerico è possibile definire alcune temperature caratteristiche, in funzione delle quali egli assume comportamenti differenti, analizzando l'andamento del modulo elastico in funzione della temperatura:

- Temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ): tipica per ogni polimero, decreta il passaggio del materiale da uno stato vetroso ad uno gommoso. Materiali in quest'ultimo stato presentano bassa rigidità, ma alta tenacità e deformabilità. Al di sotto della  $T_g$ , inferiore per le materie termoplastiche rispetto a quelle termoindurenti, si registreranno invece caratteristiche vetrose, ossia fragilità e scarsa deformabilità.
- Temperatura di rammollimento ( $T_r$ ): segna il confine, per i polimeri amorfi privi di struttura cristallina, tra lo stato solido gommoso e lo stato fuso liquido.
- Temperatura di fusione ( $T_m$ ): punto di fusione della fase cristallina, corrispondente al cedimento del reticolo, con conseguente variazione significativa delle proprietà meccaniche.
- Temperatura limite di stabilità chimica ( $T_l$ ): temperatura oltre la quale il materiale polimerico si degrada irreversibilmente in seguito alla rottura dei legami chimici. Tale valore rappresenta perciò il limite del campo d'analisi del comportamento dei materiali polimerici in funzione della temperatura.

Nella Figura 1.6 è riportato l'andamento del modulo elastico  $E$ , in scala logaritmica, in funzione della temperatura, per tre classi di polimeri: reticolati, semicristallini, amorfi. Per i polimeri a struttura reticolata risulta impossibile stabilire i valori esatti di  $T_g$  e  $T_m$ , vista la continuità delle proprietà meccaniche nell'intervallo di stabilità. Il modulo elastico di un polimero semicristallino, invece, rimane costante fino alla  $T_g$ , per poi calare leggermente in seguito alla rottura dei legami della fase amorfa; oltre la  $T_m$  si nota una

brusca caduta di  $E$ , causata questa volta dalla rottura dei legami della fase cristallina. Un polimero amorfo, infine, presenta modulo  $E$  costante fino a  $T_g$ , che cala bruscamente non appena si raggiunge lo stato gommoso, e nuovamente in seguito alla temperatura di rammollimento.

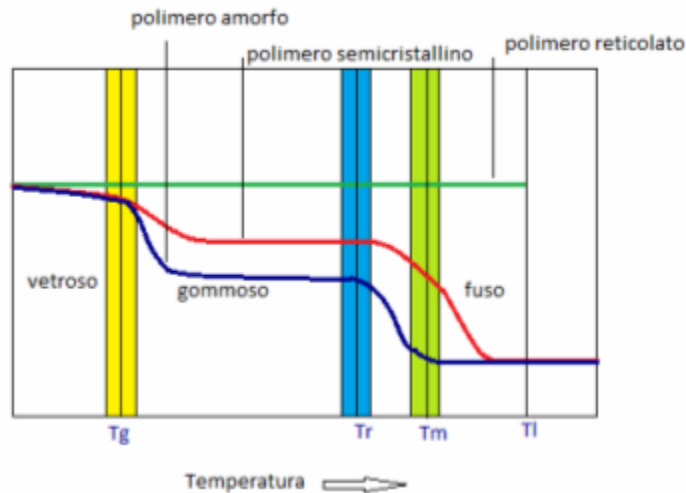


Figura 1.6. Variazione logaritmica del modulo elastico, in funzione della temperatura, per strutture polimeriche differenti.

#### 1.2.4 Peso Molecolare

Il peso molecolare rappresenta un parametro estremamente importante nella caratterizzazione di un polimero, in grado di influire sulle proprietà fisiche e meccaniche del materiale stesso, tra cui viscosità, resistenza a rottura e temperatura di transizione vetrosa.

Le sostanze a basso peso molecolare presentano una massa specifica ed unica per il composto, contrariamente a quanto avviene per le macromolecole. Durante il processo di polimerizzazione infatti, risulta inevitabile la formazione di molecole di diversa lunghezza, come conseguenza degli eventi che sussistono nel corso della reazione. Il prodotto finale risulta pertanto costituito da macromolecole contenenti un differente numero di unità strutturali (grado di polimerizzazione), aventi quindi diverse dimensioni e pesi molecolari. Per stimare il peso molecolare complessivo di un polimero si stabilisce un grado medio di polimerizzazione, dato dal rapporto tra il numero totale di molecole monomeriche ed il numero complessivo di macromolecole. Il peso molecolare di una singola macromolecola è ottenuto dalla massa dell'unità ripetitiva moltiplicata per il grado di polimerizzazione.

Il peso molecolare medio delle macromolecole è calcolabile facendo riferimento a due differenti valori:

- Peso molecolare medio numerale ( $M_n$ ): esprime la media numerica dei pesi molecolari, perciò è definito come il rapporto tra una determinata quantità di materiale ed il numero di macromolecole presenti in esso.

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

$N_i$  rappresenta il numero di molecole di peso molecolare  $M_i$ .

- Peso molecolare medio ponderale ( $M_w$ ): indica la media pesata sulla massa delle macromolecole presenti.

$$M_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}$$

$M_w$  risulta sempre maggiore di  $M_n$ , visto che il primo è influenzato principalmente dalle molecole di grandi dimensioni, mentre il secondo da quelle più piccole.

Il parametro rappresentativo dell'ampiezza della distribuzione dei pesi molecolari è l'indice di polidispersità  $D$ :

$$D = \frac{M_w}{M_n}$$

Si identifica come monodisperso ( $D = 1$ ) un polimero costituito globalmente da molecole con medesimo peso molecolare. Difficilmente il limite inferiore teorico della polidispersità arriva ad 1, solitamente è infatti compreso tra 1.5 e 2.5.

Indici  $D$  relativamente bassi sono preferibili per applicazioni biomedicali, essi infatti garantiscono ridotta distribuzione dei pesi molecolari, quindi buone proprietà meccaniche.

### 1.2.5 Sintesi

Con il termine polimerizzazione si intende il processo di formazione dei materiali polimerici a partire dalle molecole monomeriche. Queste ultime sono ottenute generalmente da petrolio, carbone e gas naturale. Nel corso degli ultimi anni, tuttavia, è cresciuto l'interesse per la valorizzazione della biomassa non alimentare e degli scarti industriali, finalizzata alla preparazione di polimeri *bio-based*, in sostituzione ai tradizionali polimeri sintetici derivati da fonti non rinnovabili.

Tra i principali processi di polimerizzazione figurano:



- Policondensazione: prevede l'unione delle molecole di monomero a formare la catena polimerica, con successiva eliminazione di molecole più piccole come acqua, cloruro di sodio, metanolo ed acido cloridrico. Tale processo, attraverso cui vengono generalmente prodotti poliesteri, poliammidi, poliuretani e polisilossani, porterà all'ottenimento di polimeri caratterizzati da una formula chimica differente rispetto a quella dei monomeri di partenza. Si distinguono due tipologie di policondensazione:
  - bifunzionale, quando le molecole di monomero reagenti presentano due gruppi funzionali, quindi le macromolecole accrescono sviluppandosi linearmente;
  - polifunzionale, attraverso la quale si ottengono polimeri reticolati in quanto i monomeri reagenti presentano più di due gruppi funzionali.

Gli aspetti negativi principali sono legati alle tempistiche estremamente lunghe ed al basso grado di polimerizzazione raggiunto, che porta all'ottenimento di polimeri a basso peso, con catene piuttosto corte.

- Poliaddizione: reazione a catena (Figura 1.7) in cui l'unione tra monomeri avviene direttamente senza liberazione di molecole secondarie. Al termine del processo i pesi molecolari medi raggiungono valori anche molto elevati, inoltre la formula chimica del monomero e quella delle unità strutturali del polimero ottenuto risultano uguali. I monomeri impiegati sono dotati di una bifunzionalità interdependente, tipica dei composti insaturi, contenenti uno o più legami C=C. Affinchè la polimerizzazione avvenga è necessario che il monomero risulti attivato, ovvero uno dei due legami che uniscono gli atomi di carbonio si apra in modo tale che ciascuno di questi atomi presenti un elettrone libero. Tale attivazione è ottenibile mediante ausilio di calore, raggi ultravioletti o più frequentemente attraverso un composto attivo. La molecola attivata entra in contatto con un'altra molecola e vi si lega, grazie all'apertura di uno dei due legami, portando alla formazione di un dimero. Il processo si ripete determinando la formazione di macromolecole. I processi di poliaddizione sono suddivisibili in:
  - radicalici, dove l'attivazione delle molecole monomeriche avviene attraverso un altro composto (iniziatore I) che ad una certa temperatura decompone dando luogo alla formazione di radicali liberi. La

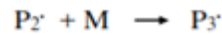
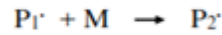
polimerizzazione prosegue in seguito al contatto di tale composto attivo con un'altra molecola di monomero;

- ionici, in cui la polimerizzazione si verifica tra sostanze in grado di dar luogo, reagendo con il monomero, a composti di carattere ionico.

Il processo di poliaddizione, attraverso cui sono ottenuti materiali quali polietilene, polimetilmetacrilato e polivinilcloruro, può essere quindi suddiviso in quattro fasi:

- 1 fase iniziale o induzione: le molecole di iniziatore diventano attive ed iniziano a loro volta ad attivare le molecole di monomero.
- 2 fase di propagazione: prevede la crescita delle molecole di polimero.
- 3 fase di chiusura: conclusione della crescita macromolecolare in differenti modi possibili: per diretto accoppiamento tra le molecole in crescita, per mezzo di un radicale, oppure per scambio di un atomo di idrogeno tra due molecole in crescita.
- 4 trasferimento di catena: disattivazione o arresto dell'accrescimento per attivazione di una molecola di monomero o di una catena chiusasi precedentemente.

La rapidità e l'alta esotermicità rappresentano aspetti della reazione di poliaddizione problematici per quanto riguarda la polimerizzazione diretta *in situ* biologico: eccessivi aumenti di temperatura locale risultano infatti in effetti deleteri per l'organismo.

**Inizio:****Propagazione:**

.....

.....

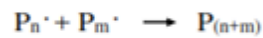
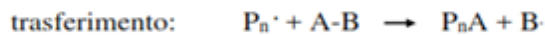
**Terminazione:****Trasferimento:**

Figura 1.7. Meccanismo di poliaddizione. I: iniziatore organico; R: radicale primario; M: unità monomerica; P<sub>i</sub>: catena polimerica; A-B: trasferitore di catena.

- Polimerizzazione per apertura d'anello (Ring opening polymerization ROP): metodo molto promettente di sintesi polimerica a partire dai eteri ciclici, lattami (ammidi cicliche), lattoni (esteri ciclici) e lattidi, ovvero esteri intermolecolari formati per reazione tra due molecole di un acido  $\alpha$ -idrossicarbossilico (Figura 1.8). Consiste in una poliaddizione che, essendo caratterizzata da limitate reazioni secondarie, agevola il controllo di proprietà quali il peso molecolare <sup>(4)</sup> e la sua distribuzione, o la presenza di opportuni gruppi funzionali terminali. La ROP di molecole di lattide fu realizzata per la prima volta da Carothers nel 1932, tuttavia non furono ottenuti polimeri ad alto peso molecolare, finchè nel 1954 DuPont non migliorò le tecniche di purificazione del lattide (Garlotta, 2002), processo poi perfezionato e brevettato dalla Cargill Dow. Nella polimerizzazione ad apertura di anello, attraverso una propagazione ionica, il gruppo terminale di una catena polimerica funge da centro attivo su altri monomeri ciclici che si congiungono formando catene polimeriche lineari di maggiore lunghezza contenenti gruppi esterei. A seconda della natura del centro reattivo della catena di propagazione si distinguono due differenti tipologie di ROP:

- cationica, applicata alla maggior parte dei monomeri eterociclici per ottenere poliacetali, poliammidi, polieteri e poliesteri, consiste nella protonazione o nell'alchilazione dell'ossigeno carbossilico ottenendo pertanto un'attivazione elettrofilica del legame. Quest'ultimo va incontro a rottura in seguito all'attacco nucleofilo di un altro monomero, processo che si ripete fino a terminazione tramite un nucleofilo, come l'acqua <sup>(5)</sup>;
- anionica, applicata al propilene solfuro, l'ossido di etilene e l' $\epsilon$ -caprolattame, prevede sia lo stato d'attivazione, sia quello di propagazione, basato su un attacco nucleofilo di un anione sul gruppo CO del lattide, seguito dalla rottura del legame CO-O. L'attacco può anche deprotonare il carbonio in posizione iniziale, causando delle reazioni di deprotonazione/riprotonazione che portano a racemizzazione (reazione secondaria impossibile da evitare, che limita l'impiego di tale tecnica su scala industriale <sup>(6)</sup>).

Altro possibile meccanismo di polimerizzazione coinvolto nella ROP è quello di coordinazione-inserzione, che si basa su alcossidi metallici che hanno un legame covalente tra ossigeno e metallo, con un comportamento da acido debole di Lewis. Il lattide si comporta come un ligando che coordina l'atomo metallico con l'ossigeno legato al carbonile <sup>(34)</sup>. Questa coordinazione migliora l'elettrofilicità del gruppo CO e la nucleofilità del gruppo O-R, cosicché può avvenire l'inserzione del lattone nel legame ossigeno-metallo. Tipici iniziatori di questo meccanismo sono gli alcossidi di magnesio, alluminio, stagno, zirconio e zinco. In particolare lo zinco e lo stagno (II) portano i polimeri ad un più elevato livello di purezza. Attualmente il composto più utilizzato è lo stagno (II) ottanoato ( $\text{SnOct}_2$ ) grazie alle sue proprietà di solubilità, elevata attività catalitica e capacità di favorire la formazione di polimeri ad elevato peso molecolare con basso livello di racemizzazione (< 1%). Inoltre, questo catalizzatore presenta bassi livelli di tossicità ed è stato riconosciuto dalla FDA come adatto per gli utilizzi in campo biomedico ed alimentare <sup>(35)</sup>.

Polimerizzazione per apertura di anello  
(ring opening polymerisation ROP)

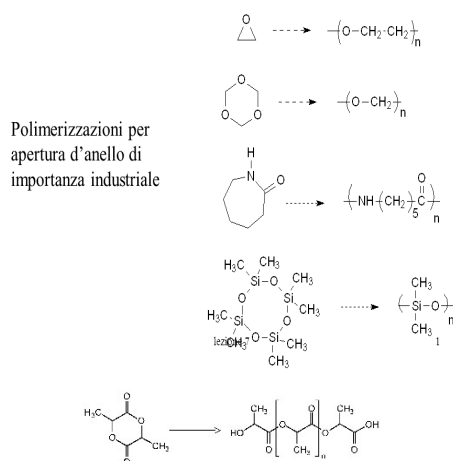


Figura 1.8. Esempi di ROP.

- Miscelazione reattiva (Reactive blending): miscelazione tra polimeri o tra un polimero ed un composto a basso peso molecolare che porta alla formazione di un nuovo materiale polimerico. Attraverso le elevate temperature raggiunte, durante tale processo si verificano numerose reazioni di scambio tra i gruppi funzionali (sia terminali che interni alle catene) dei polimeri coinvolti. All'aumentare dei tempi di reazione, inoltre, si riscontra un progressivo cambiamento nella struttura macromolecolare, da blocchi a random <sup>(7)</sup>. La miscelazione reattiva è effettuabile in soluzione, allo stato solido e in fase fusa, quest'ultima indubbiamente la più vantaggiosa: operare in assenza di solventi consente di ridurre i costi associati alla rimozione, al recupero, ed alle perdite dello stesso solvente, ma anche di attenersi alle normative ambientali vigenti. In secondo luogo, si ha la possibilità di ottenere un buon controllo della temperatura, una buona efficienza di pompaggio, ed un risparmio economico derivante dall'integrazione di più operazioni in un'unica apparecchiatura. Occorre infine evidenziare che la lavorazione da fuso permette di ridurre la probabilità di contaminazione per i prodotti finali. D'altra parte, tale metodica richiede reazioni rapide (affinché sia garantita l'economicità del processo), in grado di avvenire ad alte temperature, in cui i reagenti coinvolti ed i legami chimici ottenuti siano termicamente stabili.

### 1.2.6 Processi tecnologici

I materiali polimerici sono forniti generalmente in soluzione o sotto forma di polveri o grani. Tra i più importanti processi di produzione di manufatti polimerici figurano:

- Stampaggio: processo garante di buona tolleranza e finitura superficiale adeguata. Ne esistono tre varianti:
  - *Stampaggio ad iniezione*: granuli di materiale termoplastico sono caricati sulla superficie di una vite rotante che li spinge in direzione di uno stampo; i grani, forzati dalla vite contro le pareti dello stampo, fondono a causa del calore di compressione e di attrito. Si giunge a terminazione del processo quando una quantità sufficiente di materiale raggiunge lo stampo, in seguito sottoposto a raffreddamento ad acqua.
  - *Stampaggio a compressione*: contro una lastra preformata viene spinta una quantità esatta di resina preriscaldata che fluisce in tal modo all'interno di uno stampo. Attraverso la giusta combinazione di pressione e temperatura è possibile ottenere pezzi con un buon grado di finitura superficiale.
  - *Stampaggio per soffiatura*: consente di ottenere una forma complessa a partire da una preforma più semplice. Il materiale termoplastico viene infatti preriscaldato all'interno di uno stampo caldo, facendolo quindi aderire contro le pareti insufflando aria compressa.
- Estrusione: metodo solitamente impiegato per materiali termoplastici, prevede l'utilizzo di una vite senza fine caricata con il polimero in polvere. Quest'ultima, scaldata, è forzata contro una matrice che rappresenta il negativo del prodotto finale desiderato; nel passaggio attraverso la matrice il polimero ne assume la forma. L'estrusione è impiegata anche per mescolare eventuali additivi alla massa polimerica o un secondo componente di un *blend*, ed eventualmente per far avvenire reazioni chimiche (estrusione reattiva).

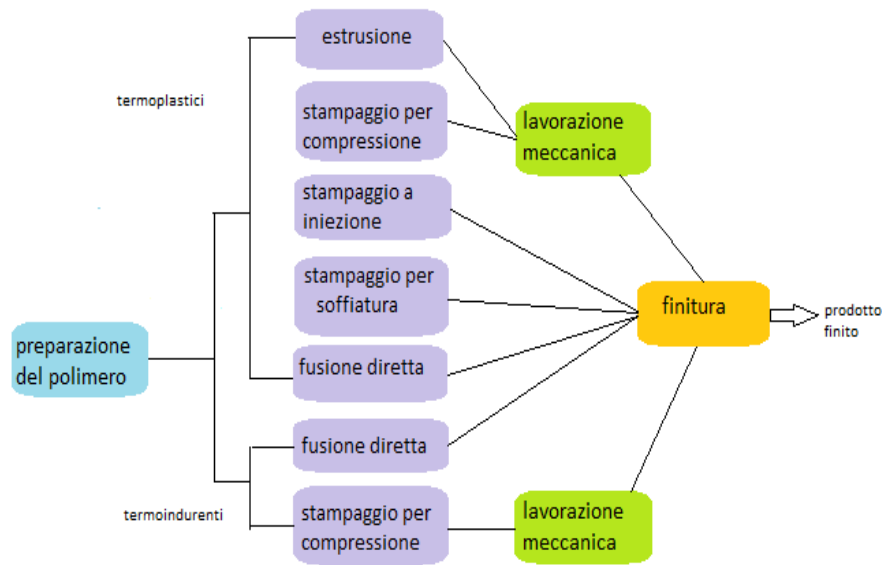


Figura 1.9. Fasi lavorative dei materiali polimerici.

### 1.2.7 Degradazione

Una delle caratteristiche più interessanti di alcuni materiali polimerici, come per esempio i poliesteri alifatici, è sicuramente la capacità di degradarsi, anche totalmente, in ambienti biologici, senza rilasciare sostanze nocive per l'organismo ospite.

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

Gli effetti responsabili della degradazione polimerica sono distinguibili in:

- Effetti chimici: rotture casuali dei legami chimici e delle catene (con eventuali formazioni di prodotti secondari), le quali causano la depolimerizzazione tramite un processo inverso rispetto a quanto si verifica nella fase di accrescimento della polimerizzazione.
- Effetti della sterilizzazione: al fine di evitare infezioni in seguito ad un impianto, si rende necessario un processo di sterilizzazione del materiale, finalizzato all'inattivazione dei microorganismi potenzialmente patogeni presenti sulla superficie ed attuato con diverse modalità in funzione del polimero in analisi. Il

metodo di sterilizzazione più dispendioso in termini economici, ma con minori rischi di degradazione, prevede l'uso di agenti chimici quali gas o soluzioni a basse temperature.

- Effetti meccanici: sollecitazioni statiche o cicliche possono indurre la frammentazione del polimero ed il conseguente rilascio di residui e particelle con elevato rapporto superficie-volume, entrambi fattori che contribuiscono alla degradazione.
- Effetti dell'ambiente biologico: la più probabile causa di deterioramento dei polimeri impiantati in ambiente biologico, altamente aggressivo, è imputabile all'attacco ionico (in particolare dello ione OH<sup>-</sup>) e all'ossigeno disciolto. Alla biodegradazione ossidativa se ne affiancano altre due:
  - Idrolitica: affinché possa essere degradato dall'acqua, il materiale polimerico deve contenere legami idrolizzabili, quali ad esempio esteri, ortoesteri, eteri, anidridi, ammidi, uree e uretani. Esistono due modalità di scissione dei legami polimerici: l'erosione in *bulk*, se la diffusione dell'acqua all'interno del materiale risulta più veloce della degradazione dei legami del materiale stesso, e la degradazione superficiale, se la cinetica di degradazione dei legami presenta maggiore rilevanza rispetto alla diffusione acquosa (Figura 1.10) <sup>(8)</sup>. Per i poliesteri alifatici, in molti casi biocompatibili e biorisorbibili, la degradazione idrolitica avviene per erosione in *bulk*: l'ingresso di acqua innesca la degradazione chimica del polimero, portando alla formazione di oligomeri e monomeri <sup>(9)</sup>. Da un punto di vista macroscopico, tale processo idrolitico avviene in due fasi: in primo luogo, si verifica una rottura casuale dei legami della catena polimerica con una sostanziale diminuzione di peso molecolare, portando ad una riduzione delle proprietà meccaniche, quali resistenza a trazione, allungamento a rottura e resistenza all'urto, mentre le perdite di peso sono trascurabili <sup>(10)</sup>; nella seconda fase, i frammenti di catena passano in soluzione con conseguente perdita di peso gravimetrico <sup>(11)</sup>.



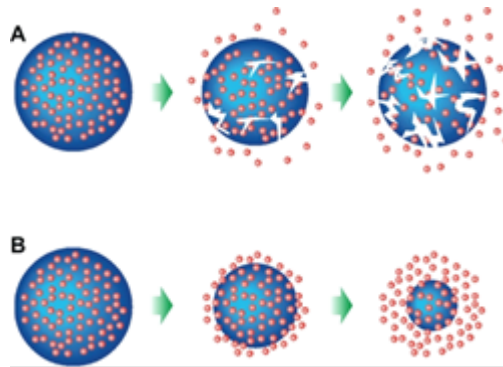


Figura 1.10. Erosione in *bulk* (A), degradazione superficiale (B).

- Enzimatica: reazioni di idrolisi nei sistemi biologici risultano catalizzate da numerosi enzimi, differenti a seconda della tipologia del legame idrolizzato; legami glicosidici, peptidici ed esterei sono interessati da tale processo. La biodegradazione è efficace quando l'enzima entra nella conformazione stereochemica del substrato della molecola, tale azione è assimilabile ad un meccanismo chiave-serratura, in cui ciascun enzima esegue una funzione chimica specifica. La degradazione enzimatica procede unicamente sulla superficie del substrato, poiché l'enzima non può penetrare nella matrice polimerica; essa dunque comporta una perdita di peso gravimetrico, mentre la massa molecolare e la sua distribuzione non variano significativamente, a differenza di quanto avviene in caso di idrolisi chimica <sup>(11)</sup>. I prodotti di degradazione a basso peso molecolare vengono rimossi dal substrato mediante solubilizzazione nel mezzo acquoso circostante.

Il biorisorbimento si differenzia dalla biodegradazione in quanto è un processo metabolicamente passivo, che non richiede energia, ma dipende unicamente dall'equilibrio cinetico e dalla composizione superficiale delle cellule con cui il materiale entra in contatto <sup>(12)</sup>. Esso infatti è definibile come il processo di dissoluzione o di rimozione, dovuto ad attività cellulare, di un materiale inserito in un ambiente biologico <sup>(13)</sup>.

Tra i fattori più importanti che influenzano la biodegradazione di un materiale polimerico vi è la cristallinità; infatti, sia la biodegradazione idrolitica, sia quella enzimatica, ha luogo preferenzialmente nelle regioni amorfe, caratterizzate da mobilità superiore. Occorre sottolineare inoltre come la presenza di imperfezioni nelle regioni cristalline influenzi

positivamente la degradazione; lo stesso dicasi per la porosità, ovvero se una superficie porosa è esposta agli enzimi, la velocità di degradazione aumenta a causa dell'elevato rapporto superficie/volume, che si traduce in una maggiore disponibilità per l'attacco enzimatico. Anche l'orientamento della catena è importante: ad esempio, nel caso di fibre, l'orientamento delle catene lungo l'asse del filamento impedisce la penetrazione dell'acqua e migliora la resistenza all'attacco idrolitico. Fra i polimeri biodegradabili, poi, quelli aventi un punto di fusione inferiore sono generalmente più sensibili alla biodegradazione rispetto a quelli aventi un punto di fusione più elevato. Questo spiega perché i poliesteri alifatici, più flessibili rispetto a quelli aromatici e con una  $T_m$  generalmente inferiore, risultino più facilmente degradabili <sup>(10)</sup>. Occorre ricordare che anche la composizione chimica del materiale influenza notevolmente la velocità di degradazione: per esempio, introducendo una seconda unità ripetitiva in catena si modificano alcune proprietà, come il grado di cristallinità, il punto di fusione e la temperatura di transizione vetrosa, tutti fattori che, come detto precedentemente, hanno un effetto indiretto sui processi degradativi <sup>(9)</sup>.

## **1.2.8 Polimeri in ambito biomedicale**

### *1.2.8.1 Poliesteri*

I poliesteri sono una classe di polimeri identificati dal ricorrere dell'unità funzionale esterea nella catena carboniosa, si differenziano in aromatici e alifatici in relazione alla presenza o meno di anelli aromatici all'interno della struttura. Essi vengono sintetizzati principalmente attraverso due modalità: policondensazione di dioli, diacidi e idracidi, oppure ROP di diesteri ciclici, lattoni e acetali chetonici ciclici. La prima tecnica, a fronte di un'elevata semplicità, risulta piuttosto lenta e permette di realizzare, mediante l'eliminazione di molecole più semplici come acqua, alcoli e acidi inorganici, polimeri con un limitato grado di polimerizzazione (problemi che possono essere eliminati agendo sulla temperatura e sui tempi di reazione); la seconda modalità di sintesi, invece, permette di incrementare la velocità di reazione, di limitare le reazioni secondarie e di realizzare polimeri con un peso molecolare maggiore.

Alcuni poliesteri sono, inoltre, biodegradabili, caratteristica che li rende molto interessanti per applicazioni biomedicali; essi, infatti, possono essere gradualmente degradati ed eliminati dall'organismo, senza richiedere interventi chirurgici, fornendo prestazioni

ottimali per periodi di tempo programmabili *ad hoc* per le specifiche destinazioni d'uso, quali ad esempio impianti ortopedici, *stent* intravascolari, dispositivi dentali, sistemi per il rilascio controllato di farmaci e supporti temporanei per la crescita tissutale.

Tra i poliesteri maggiormente impiegati per applicazioni biomediche figurano:

- Polietilentereftalato (PET): polimero resistente e deformabile, prodotto tramite policondensazione di dimetil-tereftalato e glicole etilenico. Può essere facilmente trasformato non solo in fibre, commercializzate con il nome di Dacron® o Terylene®, ma anche in film molto resistenti alla lacerazione, noti come Mylar®. Nelle sue diverse forme, il PET (Figura 1.11) è spesso utilizzato in chirurgia cardiovascolare per protesi di largo diametro, suture, e per la fabbricazione di anelli valvolari. I tessuti di Dacron trovano anche interessanti applicazioni in ingegneria tissutale, come rinforzo per tessuti danneggiati, ad esempio nel caso delle ernie addominali o inguinali; altra importante applicazione è la sostituzione di tendini e legamenti (legamento Stryker-Dracon).

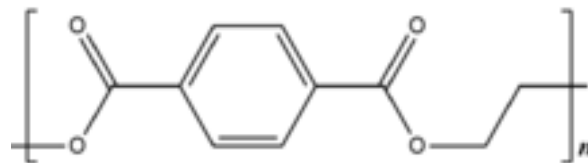


Figura 1.11. Formula di struttura del PET.

- Acido poliglicolico (PGA): poliestere alifatico dato dalla ripetizione dell'unità [-O-CH<sub>2</sub>-CO-] (Figura 1.12). Tale polimero semicristallino presenta temperatura di fusione piuttosto alta (220-226 °C) e temperatura di transizione vetrosa superiore a quella ambiente, intorno ai 35-40 °C. La lavorazione e fabbricazione avviene in svariate forme, attraverso tecniche come lo stampaggio a iniezione, l'estrusione e lo stampaggio a compressione. Questo promettente materiale presenta, però, alcuni svantaggi, quali la scarsa solubilità in solventi comuni, l'elevata sensibilità all'umidità ed il rilascio in dosi massicce di acido glicolico durante la biodegradazione (che, pur essendo assorbibile dalle cellule ed eliminabile mediante il ciclo dell'acido citrico, in alte concentrazioni causa una forte risposta infiammatoria nei tessuti limitrofi). I principali campi di applicazione del materiale sono tre: l'ingegneria tissutale grazie alla sua lavorabilità, alle buone proprietà meccaniche e alla prevedibilità di degradazione, il *controlled drug release* (grazie

alla possibilità di controllare ed ingegnerizzare il rateo di biodegradazione), e la realizzazione di suture chirurgiche in funzione delle sue ottime prestazioni biodegradative e della resistenza chimico-fisica.

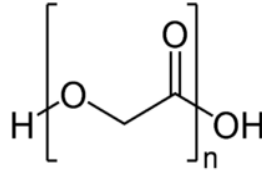


Figura 1.12. Formula di struttura del PGA.

- Acido polilattico (PLA): si rimanda al paragrafo 1.6.3.

Il PGA e il PLA, insieme ai loro copolimeri (ad esempio il PLGA) rappresentano i materiali biorassorbibili più utilizzati dal punto di vista applicativo e commerciale. PGA e PLA sono stati impiegati, oltre che come materiale di sutura, anche per fabbricare chiodi, viti e placche e per impianti ortopedici e dentali, come mezzi per il rilascio controllato di farmaci e come supporti artificiali temporanei per la crescita di tessuti. Il PLA, il PGA ed il PLGA sono  $\alpha$ -idrossiesteri, ossia poliesteri ottenuti dalla polimerizzazione di  $\alpha$ -idrossiacidi. Sono composti biocompatibili e biodegradabili i cui prodotti di degradazione, dovuti ad idrolisi non enzimatica dei legami esteri in ambiente fisiologico, sono composti a basso peso molecolare, quali acido lattico e acido glicolico, che rientrano nei normali percorsi metabolici (vengono infatti espulsi dall'organismo sotto forma di biossido di carbonio e acqua). Inoltre, il PLGA presenta un ampio range di velocità di degradazione, da giorni ad anni, a seconda del rapporto dei due monomeri e/o del peso molecolare. Quest'ultimo aspetto si rivela molto importante in ambito di *drug delivery*, in cui l'erosione può avvenire in superficie oppure in *bulk*.

#### 1.2.8.2 Poliolefine

Le poliolefine sono impiegate in modo estensivo per la fabbricazione di componenti di impianti ortopedici, specialmente per le superfici sottoposte a forti carichi, come le protesi dell'anca e del ginocchio. Possiedono buona biocompatibilità e vengono usate o in forma compatta o, quando sia richiesto un certo grado di permeabilità ai gas, porosa.

Tra le poliolefine figurano:

- Polipropilene (PP): esiste in tre differenti forme, ovvero atattico, sindiotattico e isotattico. L'atattico è amorfo a causa della distribuzione casuale dei gruppi metilici, mentre il sindiotattico (distribuzione alternata) e l'isotattico risultano generalmente cristallini; in particolare, un più elevato contenuto di molecole isotattiche, dotate di centri stereogeni con medesima configurazione (disposizione del gruppo metilico nello spazio), aumenta il grado di cristallinità, la densità, la temperatura di rammollimento e la resistenza chimica. Tuttavia, la presenza di gruppi metilici limita il movimento delle catene, di conseguenza l'indice di cristallinità raramente supera il 50-70% anche per un polimero quasi totalmente isotattico. Il polipropilene (Figura 1.13) presenta una straordinaria resistenza alle flessioni ripetute, pertanto risulta impiegato nella costruzione di giunture per protesi delle dita. Altra caratteristica fondamentale è la resistenza agli agenti ambientali, grazie alle ottime proprietà barriera.

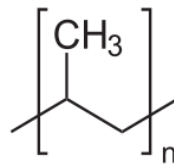


Figura 1.13. Unità ripetitiva del PP.

- Polietilene (PE): polimero costituito dalla ripetizione dell'unità  $[-\text{CH}_2-\text{CH}_2-]$  (Figura 1.14), classificabile in base al peso molecolare in *low density polyethylene* (LDPE), *linear low density polyethylene* (LLDPE), *high density polyethylene* (HDPE) e *ultra high molecular weight polyethylene* (UHMWPE). Tipiche applicazioni biomediche di LDPE (ramificato) e LLDPE sono la fabbricazione di pellicole, contenitori e tubi. HDPE e UHMWPE, più cristallini considerata la semplicità di impaccamento delle catene polimeriche dotate di minori difetti (ramificazioni), le proprietà antiattrito, di biocompatibilità e resistenza meccanica a carichi impulsivi e a fatica, sono per lo più utilizzati in ortopedia (cotile d'anca, piatto tibiale del ginocchio). Tuttavia, essendo esposti a elevate deformazioni da *creep*, sono soggetti ad usura e ossidazione.

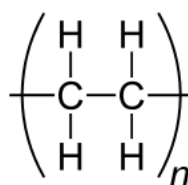


Figura 1.14. Unità ripetitiva del PE.

### 1.2.8.3 Polistirene

Materiale polimerico caratterizzato dalla ripetizione dell'unità  $[-\text{CH}_2-\text{CHS}^* -]$  dove  $\text{S}^*$  rappresenta l'anello benzenico (Figura 1.15).

Conosciuto nella forma espansa negli imballaggi, il polistirene (PS) viene impiegato nel settore biomedicale per la realizzazione di dispositivi extracorporei, grazie alla sua eccezionale inerzia chimica e alla sua completa insolubilità in solventi organici clorurati. Viene inoltre utilizzato come comonomero nella preparazione di *scaffold* per l'ingegneria tissutale grazie alla sua lenta degradazione e all'inerzia chimica.

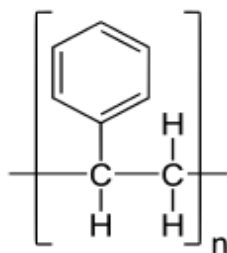


Figura 1.15. Formula di struttura del PS.

### 1.2.8.4 Politetrafluoroetilene

Noto con il nome commerciale di Teflon, il politetrafluoroetilene (PTFE) (Figura 1.16) è un polimero costituito dalla ripetizione dell'unità  $[-\text{CF}_2-\text{CF}_2-]$ , caratterizzato da elevati pesi molecolari (nell'ordine di  $10^6$  u.m.a.) e cristallinità, e da una buona biocompatibilità, dovuta in gran parte alla sua elevata inerzia chimica, che lo rende stabile nel tempo. Esso presenta inoltre eccellenti proprietà antiattrito, ma modeste proprietà meccaniche, fra cui un basso modulo elastico. Per aumentare le proprietà meccaniche si possono utilizzare dei rinforzi, ottenendo così compositi a matrice di PTFE.

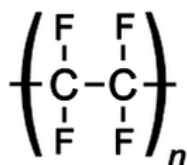


Figura 1.16. Formula strutturale del PTFE.

#### 1.2.8.5 Polisilossani

I polisilossani (o siliconi) (Figura 1.17) sono polimeri caratterizzati dalla ripetizione dell'unità [-R<sub>1</sub>SiR<sub>2</sub>-O-] (dove R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> sono gruppi funzionali organici), dalle eccellenti proprietà chimico-fisiche, di biocompatibilità e di stabilità nel tempo in ambiente biologico. Comprendono lubrificanti, materiali quali elastomeri, gel, fluidi, antischiumanti e adesivi. Fra i maggiori impieghi dei polisilossani (il più comune dei quali è il SILASTIC, un elastomero impiegato in biomedicina) vi è la fabbricazione di cateteri e di tubatismi, sia per condurre fluidi biologici (incluso il sangue), sia per veicolare altre sostanze fluide all'interno dell'organismo. Gli elastomeri ed i gel in polisilossano vengono entrambi utilizzati in chirurgia plastica come riempitivi per ricostruire tessuti mancanti o asportati (come quello mammario).

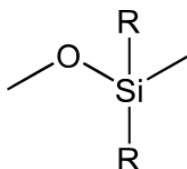


Figura 1.17. Formula strutturale dei polisilossani.

#### 1.2.8.6 Poliuretani

I poliuretani sono polimeri costituiti dalla ripetizione dell'unità [-O-CO-NH-R<sub>1</sub>-NH-CO-O-R<sub>2</sub>-], dove R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> rappresentano due gruppi funzionali che, se scelti opportunamente, possono contribuire a far sì che i materiali ottenuti presentino proprietà anche molto diverse tra loro. Mediante macroglicoli, si possono inoltre realizzare copolimeri a segmenti o a blocchi, composti da due fasi, una più morbida, detta *soft segment*, costituita dal macrodiolo, ed una più rigida, denominata *hard segment*, formata dalle unità uretaniche debitamente unite fra loro. Le caratteristiche meccaniche di tali copolimeri saranno pertanto modulabili in funzione del rapporto in peso tra le due fasi.

Per quanto riguarda le applicazioni, i poliuretani (Figura 1.18) vengono applicati come elastomeri per protesi vascolari e per le superfici interne di cuori artificiali, poiché emocompatibili e dotati di un'elasticità simile a quella delle arterie.

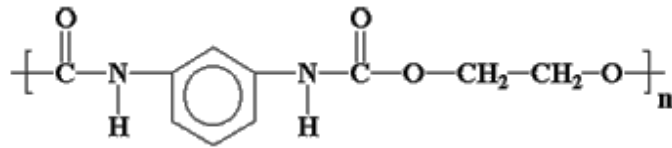


Figura 1.18. Esempio di un poliuretano.

#### 1.2.8.7 Polimetilmetacrilato

Il PMMA, o polimetilmetacrilato (Figura 1.19), è un polimero ottenuto dalla ripetizione dell'unità strutturale  $[-CH_2-COOCH_3 \cdot C \cdot CH_3-]$ , commercialmente noto con il nome di Plexiglas o Perspex.

Esso possiede eccellenti proprietà di resistenza chimica alle condizioni ambientali. Risulta piuttosto rigido, ma con buone proprietà meccaniche, e dal punto di vista della lavorazione può essere stampato, fuso o lavorato con le macchine tradizionali. Viene largamente utilizzato per la fabbricazione di filtri, pompe, ossigenatori, contenitori, lenti a contatto, lenti impiantabili, cementi ossei per la fissazione di protesi delle giunture, protesi dentali e maxillo-facciali.

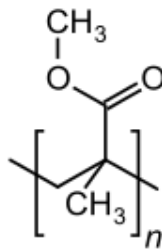


Figura 1.19. Unità strutturale del PMMA.

#### 1.2.8.8 Polipropilene fumarato

Il PPF (Figura 1.20), grazie alla sua rigidità e alla capacità di trasmettere carichi, trova impiego nella rigenerazione ossea, poiché particolarmente adatta come cemento ortopedico.



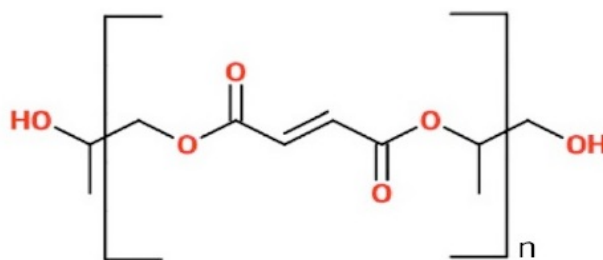


Figura 1.20. Formula del polipropilene fumarato.

#### 1.2.8.9 *Acido polilattico-co-glicolico*

L'acido polilattico-co-glicolico (PLGA) è un copolimero random, con unità derivanti sia dall'acido lattico che da quello glicolico, la cui struttura è riportata in Figura 1.21. Nelle sue diverse forme, tende ad essere amorfo più che cristallino, ed è solubile in molti solventi comuni, differentemente dagli omopolimeri costituenti. È un biomateriale ampiamente studiato, il cui utilizzo presenta diversi vantaggi, grazie alla sua biodegradabilità e alle proprietà di durata nel tempo e flessibilità. Una caratteristica molto interessante di questo polimero è la modulabilità delle sue proprietà attraverso la variazione delle percentuali relative di PLA e PGA (ad esempio, il PLGA degrada a una velocità direttamente proporzionale al contenuto di acido glicolico). Questo biomateriale viene utilizzato con successo per la realizzazione di suture chirurgiche, di dispositivi per il rilascio controllato (in forma di nanofibre, nanosfere, microsfele e microcapsule per trattamenti chemioterapici, antibiotici, antinfiammatori, analgesici e compensatori), e nell'ingegneria tissutale (sia da solo che incorporato a polimeri naturali come il collagene), a causa della sua buona adesione, proliferazione e vitalità cellulare. Il principale svantaggio rappresentato da questo copolimero è la difficoltà nella modulazione della velocità di degradazione, e l'elevata acidità e nocività dei prodotti primari di degradazione.

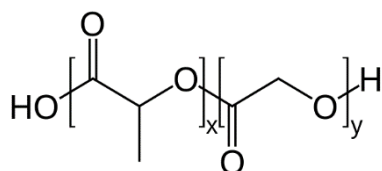


Figura 1.21. Unità strutturale del PLGA.

#### 1.2.8.10 Poli- $\epsilon$ -caprolattone

Poliestere alifatico semicristallino utilizzato in particolar modo nel *drug delivery* (Figura 1.22), e caratterizzato da elevata biocompatibilità, permeabilità, buone proprietà meccaniche e limitato rilascio di prodotti dannosi per l'organismo. Presenta una velocità di biodegradazione piuttosto lenta (si decompone in ambiente corporeo in circa 2 anni) e per questo motivo viene utilizzato per dispositivi a rilascio continuo di farmaco anche per lunghi periodi di tempo, oppure nella terapia orale, dove l'eliminazione della matrice polimerica è più veloce ed immediata. Altre possibili applicazioni del PCL sono nell'ambito dell'ingegneria tissutale, per la realizzazione di *scaffold* per la rigenerazione di ossa, legamenti, cartilagini, pelle, tessuto vascolare e nervoso.

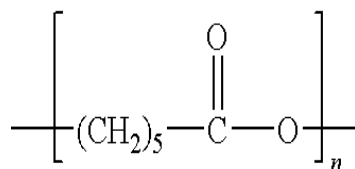


Figura 1.22. Unità strutturale del PCL.

#### 1.2.8.11 Poli-idrossialcanoati

Poliesteri caratterizzati dalla ripetizione del monomero  $[-\text{O}-\text{CH}-\text{R}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-]$  dove  $n$  è il numero dei gruppi  $-\text{CH}_2$  ed  $\text{R}$  è solitamente un gruppo alchilico lineare o ramificato. Sono polimeri termoplastici sintetizzati da diversi batteri attraverso la fermentazione di zuccheri o lipidi. La composizione dei poli-idrossialcanoati o PHA (Figura 1.23) è molto variabile, e funzione del tipo di batteri da cui sono ottenuti, nonché della matrice di coltura. Sono impiegati, inoltre, nella *tissue engineering* dell'osso grazie alle loro buone proprietà in termini di biodegradabilità, ottima trasmissibilità dei carichi e rigidità compatibile con quella del tessuto osseo.

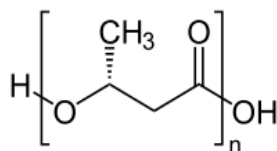


Figura 1.23. Struttura chimica del PHB, un esempio di PHA.

### 1.2.8.12 Collagene

Il collagene (Figura 1.24) è una proteina strutturale, naturalmente sintetizzata dall'organismo umano, caratterizzata dall'alternanza dei seguenti amminoacidi: -X-GLY-PRO-HYP-GLY-Y, dove GLY rappresenta la glicina (Figura 1.25 a), PRO la prolina (Figura 1.25 b), HYP l'idrossiprolina (Figura 1.25 c), e X e Y due altri generici amminoacidi. Il collagene si trova all'interno dell'organismo nella pelle, nei tendini, nelle ossa, nelle cartilagini e nei tessuti cardiovascolari, con la funzione di limitare la deformazione dei tessuti, rendendoli più rigidi e resistenti ed impedendone brusche rotture. A partire dai singoli amminoacidi salendo fino alla fibra di collagene si incontrano diverse strutture: gli amminoacidi (GLY, PRO e HYP), le sequenze primarie di amminoacidi (-X-GLY-PRO-HYP-GLY-Y-), le singole eliche (disposizione primaria), le singole eliche avvolte in un superavvolgimento, triple eliche in cui si legano tre singole eliche avvolte l'una sull'altra e unite attraverso legami ad idrogeno e cross-link, minifibrille costituite dall'impacchettamento delle triple eliche, fibrille di collagene ottenute dall'unione di più minifibrille, ed infine le macrofibre di collagene. Le principali caratteristiche del collagene sono l'ottima resistenza a trazione (indispensabile per l'espletamento, da parte dei tessuti, delle varie funzionalità richieste), l'elevato modulo di Young (dell'ordine dei GPa) e l'alto sforzo a rottura (nel range dei 50-100MPa). Grazie alla sua elevata biocompatibilità, esso trova applicazione nel campo dell'ingegneria tissutale, dove i tessuti ricchi di collagene espianati possono essere utilizzati, dopo opportuni trattamenti, per la realizzazione di protesi impiantabili, quali protesi valvolari, vasi sanguigni, pericardio, tendini e legamenti.

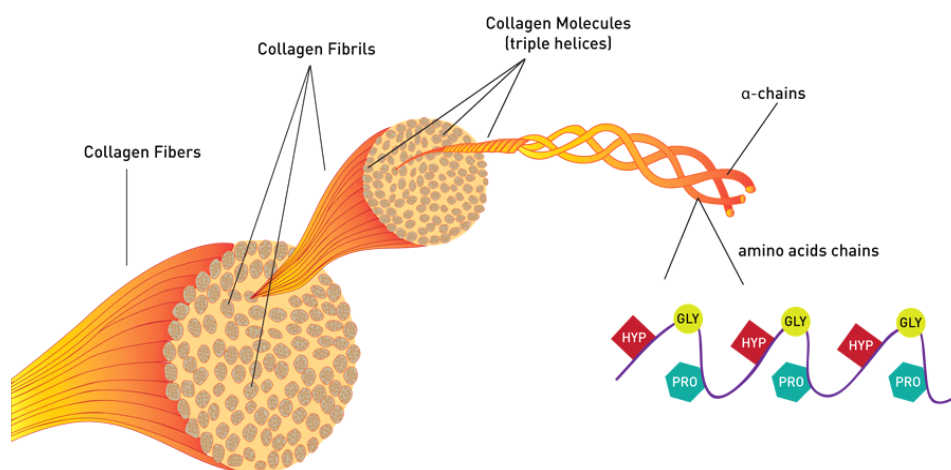


Figura 1.24. Struttura del collagene.

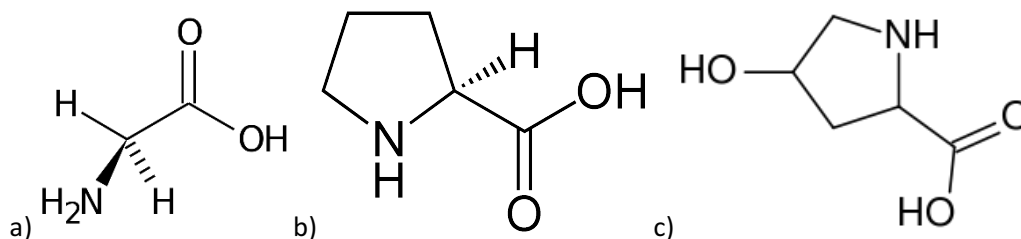


Figura 1.25. Formule di struttura di: a) glicina, b) prolina, c) idrossiprolina.

### 1.2.8.13 Polisaccaridi

Sono polimeri composti da subunità di monosaccaridi unite da legami glicosidici (Figura 1.26) e caratterizzati da buona biodegradabilità, processabilità e bioattività, fattori che li rendono materiali naturali molto promettenti in ambito biomedicale. Per quanto riguarda i polisaccaridi di origine umana, tra i più importanti figura l'acido ialuronico (HA), un polisaccaride lineare della famiglia dei glicosamminoglicani che si trova nel fluido sinoviale, nell'umor vitreo, nella pelle e nelle cartilagini articolari, alle quali conferisce viscoelasticità. Esso è idrosolubile, formando in acqua soluzioni molto viscose, ed è stato dimostrato come giochi un ruolo fondamentale nella riparazione dei tessuti. Tuttavia, l'omopolimero che si trova allo stato fluido è troppo debole per essere efficace come supporto. Per superare questo limite, l'HA viene complessato con esteri per formare idrogel, versatili e facilmente lavorabili, con cui vengono fabbricati *scaffold* per la ricostruzione di cartilagini articolari, di tessuto tracheale, vascolare e nervoso. In forma liquida inoltre l'HA può essere iniettato nell'articolazione del ginocchio al fine di alleviare il dolore dovuto alle artriti e migliorare la mobilità dell'articolazione stessa. Infine, in forma di nanoparticelle, l'acido ialuronico viene impiegato come veicolo per il rilascio controllato di farmaci chemioterapici, antibiotici, analgesici, *small interfering RNA* (siRNA) (classe di molecole di RNA a doppio filamento, lunghe pochi nucleotidi in grado di svolgere numerosi ruoli biologici) e proteine.

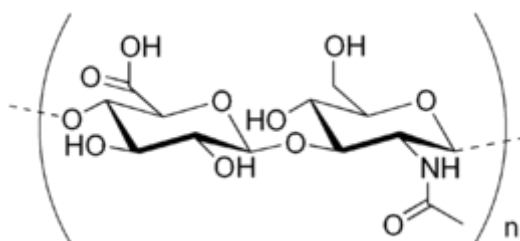


Figura 1.26. Struttura dell'unità disaccaridica dell'acido ialuronico.

#### 1.2.8.14 Chitina

La chitina (Figura 1.27) costituisce uno dei principali componenti dell'esoscheletro degli insetti, della parete cellulare dei funghi, ed è presente anche nell'epidermide o in altre strutture superficiali di molti invertebrati. Dopo la cellulosa, la chitina è il più abbondante biopolimero presente in natura. Un suo derivato, il chitosano, presenta un'elevata biocompatibilità in vivo, ed è considerato un potenziale materiale per la realizzazione di *scaffold* per la ricostruzione di ossa, cartilagini e pelle.

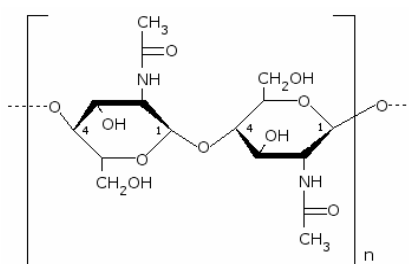


Figura 1.27. Unità strutturale della chitina.

#### 1.2.8.15 Polianidridi

A questa classe appartengono polimeri caratterizzati da due gruppi carbonilici legati attraverso un legame etereo (Figura 1.27). Essi sono stati impiegati in ambito biomedicale a partire dagli anni '80, fino a ricevere l'approvazione dell'FDA nel 1996. Una loro proprietà peculiare consiste nella velocità di degradazione superficiale, variabile fino a sei ordini di grandezza attraverso l'azione sulla chimica dei monomeri costituenti. Il controllo della velocità di degradazione ha permesso un loro ampio utilizzo nell'ambito del rilascio controllato di antibiotici, farmaci chemioterapici, vaccini e proteine. Il loro basso peso molecolare però influenza negativamente le proprietà meccaniche, le quali risultano insufficienti per impieghi in ingegneria tissutale. Per limitare questo problema e aumentare la loro resistenza sono state studiate polianidridi metacrilate per potenziali applicazioni nella rigenerazione del tessuto osseo.

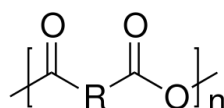


Figura 1.27. Struttura delle polianidridi.

### 1.2.8.16 Poliammidi

Le poliammidi sono polimeri da policondensazione ottenuti dall'unione di un diacido e una diammina; fra queste si ricordano il Nylon (Figura 1.28) e le ammidi aromatiche (o poliaramidi). Sono caratterizzate da legami estremamente stabili idroliticamente, erodibili solo da enzimi specifici, e presentano la tendenza a formare fibre, grazie ai legami ad idrogeno intercatena; sono inoltre caratterizzate da elevata cristallinità, che ne accresce la resistenza in direzione della fibra. Inoltre, il numero e la distribuzione dei gruppi ammidici (-CONH-) influenzano proprietà come il carico di rottura, l'allungamento a rottura, il modulo elastico e la temperatura di rammollimento (Tr).

Tra le ammidi aromatiche, il poli-(p-fenilene tereftalamide), noto come Kevlar (Figura 1.29), risulta essere una delle più importanti. Questo materiale, ampiamente usato per la realizzazione di compositi, viene facilmente trasformato in fibre che hanno resistenza cinque volte maggiore rispetto a quella dell'acciaio.

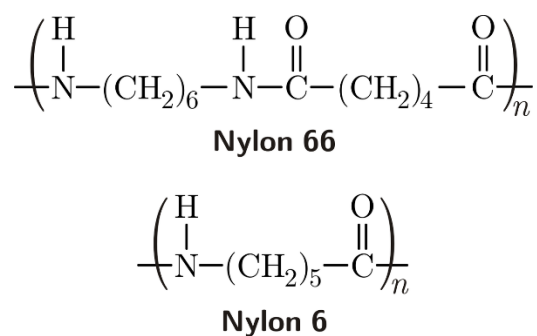


Figura 1.28. Formula di struttura del nylon 6,6 (in alto) e del nylon 6 (in basso).

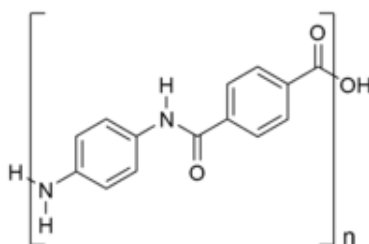


Figura 1.29. Formula di struttura del kevlar.

### 1.2.8.17 Poliortoesteri

Polimeri idrofobici caratterizzati da tre legami etere (Figura 1.30); lavorando sulla chimica di questi materiali si possono ottenere polimeri con proprietà, tra cui la velocità di degradazione, variabili. Già dai primi anni '70 sono stati impiegati nel trasporto controllato

di farmaci e ad oggi ne sono state sviluppate quattro classi. L'ultima, quella dei poli(ortoesteri) di quarta generazione (POE IV), contiene all'interno della sua catena brevi segmenti di acido lattico o glicolico, al fine di aumentarne la velocità di degradazione rispetto alle classi precedenti, le quali si sono rivelate inadatte per l'applicazione. Polimeri a base di POE IV sono stati utilizzati per il rilascio di analgesici e molecole di DNA. La possibilità di impiegarli in ingegneria tissutale risulta limitata a causa delle scarse proprietà meccaniche e della moderata risposta infiammatoria indotta nei tessuti a contatto con questo materiale.

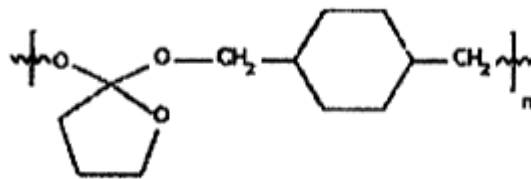


Figura 1.30 Struttura di un poliortoestere.

#### 1.2.8.18 Policarbonati

I policarbonati sono polimeri termoplastici ottenuti dall'acido carbonico (Figura 1.31). Hanno una struttura molecolare estremamente ordinata e cristallina, caratteristica che li rende estremamente tenaci e resistenti ad azioni meccaniche come il graffio, la perforazione e l'abrasione; inoltre la possibilità di sterilizzarli in autoclave ne ha permesso l'impiego per la fabbricazione di strumenti cardiocirurgici e per dialisi.

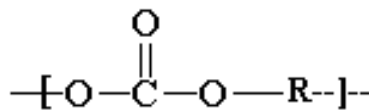


Figura 1.31. Unità strutturale dei policarbonati.

### 1.3 Copolimeri

A differenza dei polimeri, le cui macromolecole sono costituite da catene dello stesso monomero, i copolimeri risultano dall'unione di due o più monomeri di diverso tipo. L'introduzione di una seconda unità monomerica all'interno della struttura, e di conseguenza la sua disposizione rispetto al primo monomero, la concentrazione relativa, l'influenza sul processo di sintesi e sull'assetto finale della macromolecola, sono variabili

che permettono di modificare e modulare notevolmente le proprietà e le caratteristiche del materiale finale. Un ruolo decisivo in questo processo viene ricoperto dal centro attivo di polimerizzazione e dalle condizioni operative, prima fra tutte la temperatura.

Al fine di determinare la struttura di un copolimero è necessario identificare e stimare alcuni parametri, con riferimento a modelli cinetici o statistici che consentano di descrivere le unità monomeriche e la loro distribuzione nelle catene.

Risulta quindi indispensabile conoscere:

1. La composizione, vale a dire la quantità relativa dei monomeri A e B, e la loro distribuzione.
2. La tipologia delle unità ripetitive derivanti da A e da B nella catena, valutate rispetto alle caratteristiche intrinseche del monomero.
3. L'ordine di inserimento del monomero A rispetto a B; tale organizzazione comporta la formazione di sequenze monomeriche di diversa lunghezza, di cui è necessario conoscere la disposizione.
4. La dimensione delle catene, in termini di peso molecolare, e la loro distribuzione.
5. La misura diretta delle costanti di velocità di accrescimento, propagazione e di terminazione, da cui sono derivabili le grandezze citate nel punto precedente.
6. La presenza di ramificazioni, ciclizzazioni o reticolazioni indesiderate, come risultato di processi non controllati.

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

- **Copolimeri statistici (o random)**, in cui le unità monomeriche sono disposte in maniera casuale all'interno della catena principale.

...AAABBABBBAABAABBBAAAABAABBBAAA...

- **Copolimeri alternati**, in cui le unità monomeriche sono alternate con regolarità lungo la catena.

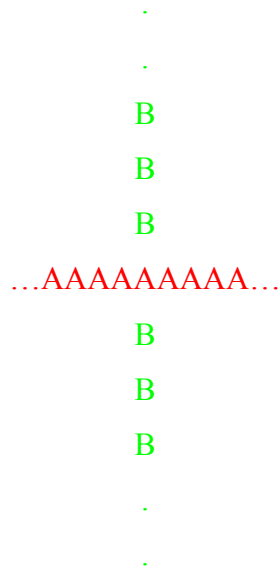
...ABABABABABABABABABABABABABABABABAB...



- **Copolimeri a segmenti (o a blocchi)**, in cui i comonomeri assumono una disposizione regolarmente alternata.

...AAAAABBBBAAAAAABBBBBBAAABBBBB...

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



### 1.3.1 Copolimeri a blocchi

Nell'ambito della chimica macromolecolare, negli ultimi decenni sono state ottenute numerose strutture copolimeriche a blocchi. Tra queste, le più importanti risultano:

- **Di-blocchi:**  $A_m-B_n$ . I blocchi possono contenere gruppi terminali (-OH), gruppi di giunzione (-CO-), oppure, in alternativa, il secondo blocco può includere un terzo monomero C ( $A_m-B-C$ ), distribuito in maniera casuale, alternato, o in sequenze decrescenti, ecc.
- **Tri-blocchi:**  $A_m-B_n-A_m$ ,  $A_m-B_n-A_q$ ,  $A_m-B_n-C_q$ , sequenze che rappresentano, in maniera semplificata, copolimeri contenenti tre blocchi così distribuiti.
- **Multi-blocchi:** copolimeri segmentati del tipo  $A_m-B_n-A_m-B_q-A_m-B_q$ .
- **Copolimeri a di-blocchi ripetuti:**  $(A_m-B_n)_x$ .
- **Copolimeri a stella**, che presentano multi-braccia collegate da un'unità di giunzione. Tali polimeri rappresentano un caso particolare di copolimeri ad innesto.

Le vie di sintesi dei copolimeri a blocchi sono due:

- creazione di centri o siti attivi (radicalici, anionici, cationici) su una catena polimerica che può in seguito innescare la polimerizzazione di un secondo monomero. Se non è precisata l'ubicazione terminale del centro attivo, in questa definizione rientrano anche i copolimeri ad innesto;
- condensazione tra gruppi funzionali situati al termine del polimero o pre-polimero:  
$$A_m-X + Y-B_n \rightarrow A_m-B_n + XY.$$

I copolimeri costituiti da blocchi cristallizzabili e non cristallizzabili di sequenze A e B incompatibili formano, come conseguenza di una separazione di fase, domini cristallini e microdomini amorfi.

Le transizioni termiche in tali sistemi multifasici microsegregati sono fortemente influenzate dalla morfologia, che a sua volta dipende, oltre che dalle caratteristiche molecolari del copolimero a blocchi, dal metodo di preparazione del campione (effetto della storia termica, meccanica, del solvente, ecc.).

Si distinguono quindi due tipologie di copolimeri a blocchi:

- *Blocchi non cristallizzabili*: ad ogni fase amorfa presente corrisponde una transizione vetrosa che, in linea di principio e nell'ipotesi di una separazione di fase che porti a microdomini nettamente distinti, è facilmente correlabile alla  $T_g$  dell'omopolimero corrispondente. La situazione reale si avvicina a quella descritta solo quando il peso molecolare dei blocchi è elevato e la loro incompatibilità è molto marcata. Nei copolimeri a blocchi che formano domini separati, la piccola dimensione dei domini porta ad un elevato rapporto superficie/volume con conseguente aumento delle interazioni tra fasi diverse. Inoltre, la continuità della catena attraverso l'interfaccia tra i domini promuove la trasmissione cooperativa dei moti molecolari da una microfase all'altra; come conseguenza di tali interazioni, le transizioni termiche caratteristiche subiscono spostamenti e variazioni d'intensità e ampiezza. Nei casi in cui il volume interfacciale sia cospicuo e si formi una vera e propria interfase, oltre alle  $T_g$  delle due microfasi si può osservare un'altra transizione vetrosa a temperatura intermedia, relativa all'interfase (in alcuni casi essa diventa la transizione termica principale).
- *Blocchi cristallizzabili*: se nel copolimero uno o entrambi i blocchi sono cristallizzabili, la segregazione di fase comporta la formazione di domini cristallini, che possono dare luogo a strutture organizzate con un arrangiamento periodico,

oppure a strutture prive di organizzazione. Quando entrambi i blocchi sono cristallizzabili, la morfologia è dettata dal blocco che cristallizza per primo; il secondo componente deve adattarsi a cristallizzare in presenza delle restrizioni steriche imposte dai domini cristallini già formati. Nel caso di un solo blocco cristallizzabile (A), il componente amorfo (B) può inibire la cristallizzazione se vetrifica prima che A abbia potuto cristallizzare. In caso contrario A cristallizza formando strutture regolari alternate di strati amorfi e cristallini. La morfologia dei copolimeri con blocchi cristallizzabili risulta inoltre molto influenzata dall'uso di solventi che solvatano selettivamente uno dei blocchi.

### 1.3.2 Copolimeri statistici

La maggior parte dei copolimeri statistici (*random*) è ottenuta mediante processi di poliaddizione in cui la reattività dei due monomeri è generalmente diversa. La composizione di un copolimero, che può essere definita in corrispondenza a una certa miscela di alimentazione, è una composizione istantanea, risultante dopo una conversione infinitesima di monomeri. La fusione della componente cristallina e la transizione vetrosa della fase amorfa, che si manifestano rispettivamente alle temperature  $T_m$  e  $T_g$ , sono transizioni termiche fondamentali anche nei copolimeri. Questi ultimi possono, inoltre, mostrare più di una singola fase amorfa e cristallina, e di conseguenza è possibile individuare più processi di fusione o di transizione vetrosa.

La transizione vetrosa dei copolimeri statistici nella maggioranza dei casi varia in maniera monotona con la composizione. Inoltre, quando una o entrambe le unità monomeriche possono cristallizzare, tali copolimeri esibiscono un comportamento di cristallizzazione molto complesso. La transizione vetrosa che caratterizza la fase amorfa si manifesta ad una temperatura  $T_g$  intermedia rispetto a quelle caratteristiche dei due omopolimeri,  $T_{gA}$  e  $T_{gB}$ . L'andamento della  $T_g$  nel copolimero può essere descritto dalle equazioni di Fox o Couchman (che legano con una curva monotona crescente la  $T_g$  e la composizione copolimerica). In riguardo alla  $T_m$  si può far riferimento all'equazione di Flory, che assume che la temperatura di fusione sia indipendente dalla natura del comonomero B, a patto che esso risulti escluso dal reticolo.

Per ciò che concerne la fase cristallina dei copolimeri, occorre precisare che, se nella catena di un omopolimero (A) cristallizzabile, vengono introdotte unità chimicamente o

strutturalmente diverse (B) è prevedibile che la capacità di cristallizzazione del polimero A venga modificata.

In generale, le unità B possono:

- venire totalmente escluse dal reticolo cristallino;
- entrare nel reticolo cristallino in condizioni di equilibrio;
- entrare nel reticolo cristallino sotto forma di difetto, ossia in condizioni di non-equilibrio.

Nel caso di comonomeri esclusi dal reticolo cristallino, entrambe le fasi cristalline risultano pure.

I copolimeri a distribuzione statistica possono, inoltre, mostrare co-cristallizzazione, cioè sostituzione isomorfa delle unità comonomeriche, analogamente a quanto avviene nelle sostanze a basso peso molecolare. Se ciò avviene, i copolimeri assumono un elevato grado di cristallinità in tutto il campo di composizione.

Si possono distinguere due tipi di sostituzione isomorfa:

1. quando gli omopolimeri dei due comonomeri hanno struttura cristallina molto simile, il copolimero mostra una fase cristallina i cui parametri cambiano gradualmente al variare della composizione, da quelli caratteristici di un omopolimero a quelli dell'altro;
2. se i due omopolimeri hanno struttura cristallina differente, una delle unità monomeriche risulta inclusa in una struttura cristallina diversa da quella del proprio omopolimero: si parla allora di "isodimorfismo". Esiste una composizione precisa alla quale il copolimero passa da una struttura cristallina all'altra e, a causa delle unità estranee ospitate, i parametri del reticolo cristallino variano rispetto a quelli dell'omopolimero corrispondente.

#### **1.4 Controlled drug delivery**

Una delle principali linee di ricerca nel settore tecnologico farmaceutico punta l'attenzione sullo sviluppo di formulazioni in grado di liberare farmaci nell'organismo in quantità e velocità controllate, sensibili e capaci di rispondere direttamente agli stimoli patologici. Esistono già numerose forme farmaceutiche dalle quali il rilascio può essere ritardato, o mediante le quali la velocità e la durata della liberazione del principio attivo possono essere programmate: tali formulazioni sono definite appunto sistemi a rilascio controllato e consentono la regolazione del livello ematico del farmaco, in modo da evitare fenomeni di

sotto- o sovradosaggio e di minimizzare gli effetti collaterali indesiderati. Dispositivi dalle dimensioni nano-micrometriche possono massimizzare l'efficienza dei trattamenti terapeutici, in quanto in grado di individuare ed isolare rapidamente, all'interno dell'organismo, la patologia, e di agire senza intervenire sulle cellule ed i tessuti sani (come accade ad esempio durante la chemioterapia), a totale vantaggio del paziente.

I metodi convenzionali di somministrazione dei farmaci, normalmente, non permettono di ottenere un rilascio controllato nel tempo del principio attivo: in molti casi, si ha un repentino rilascio senza il raggiungimento dei siti recettoriali specifici localizzati sulle cellule bersaglio. Di conseguenza può essere necessario l'impiego di dosi maggiori, con il rischio di raggiungere in breve tempo il limite di tossicità, ossia la concentrazione a cui il principio attivo comporta effetti collaterali o tossici indesiderati. Una volta somministrato il farmaco, esso mantiene per un periodo relativamente breve il limite terapeutico (che equivale alla concentrazione minima al di sotto della quale non si produce l'effetto desiderato) e successivamente i suoi livelli ematici diminuiscono lentamente fino alla successiva somministrazione. Gli effetti terapeutici desiderati si potranno ottenere, dunque, solo mediante somministrazioni ripetute del farmaco, che risultano molto onerose per il paziente e decisamente costose (Figura 1.32).

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

- mantenere costante l'azione del farmaco conservando, per l'intera durata di un intervallo di tempo predeterminato, la concentrazione desiderata nell'organismo, riducendo nel contempo gli effetti collaterali associati ad un modello cinetico del tipo "dente di sega", caratteristico di iniezioni successive;
- localizzare spazialmente l'azione del farmaco, limitandola alla zona (tessuto o organo) che necessita del trattamento;
- specificare ulteriormente il target d'azione (a livello della tipologia di cellula) del farmaco, per mezzo di vettori o derivatizzazioni chimiche;
- somministrare farmaci con particolari proprietà in termini di instabilità fisica e chimica, suscettibilità alla degradazione enzimatica, caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche non favorevoli;
- ridurre il costo della terapia.

Risulta, così, evidente come, agendo sulla distribuzione spaziale e temporale del farmaco, si possano risolvere problemi legati alle tradizionali forme di dosaggio. Il risultato delle

ricerche svolte in questo ambito è rappresentato anche dall'uso di particolari polimeri innovativi come mezzo di rilascio e direzionamento di molecole biologicamente attive; tali polimeri sono in grado di consentire un aumento del tempo di permanenza del farmaco nel circolo sanguigno o nella sede di applicazione, una riduzione dell'antigenicità, un'augmentata stabilità nei confronti di enzimi e, quindi, una maggiore biodisponibilità. Una vasta classe di farmaci può, inoltre, usufruire dei benefici dei sistemi a rilascio controllato, tra cui chemioterapici, immunosoppressori, agenti antiinfiammatori, antibiotici, oppiacei, steroidi, ormoni, anestetici, vaccini.

Queste innovazioni hanno riscosso notevole interesse non soltanto nella somministrazione per via sistemica, ma anche per le applicazioni legate al trattamento di ferite, alla medicazione dell'epidermide e delle mucose: anche in questo caso risulta possibile controllare il rilascio nel sito d'interesse utilizzando micro o nanoparticelle di natura polimerica come serbatoio del farmaco.

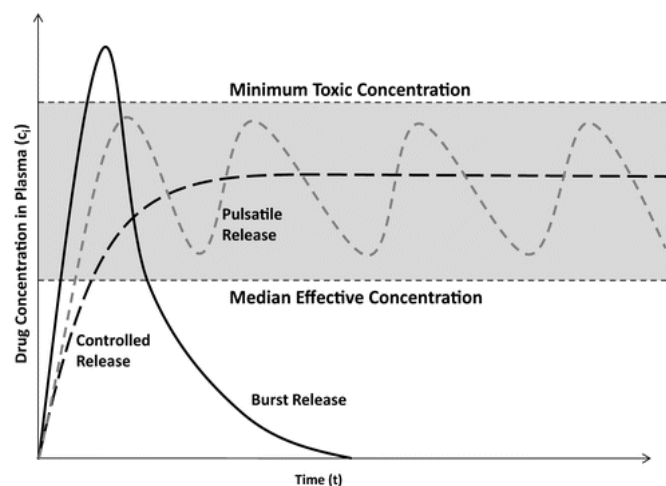


Figura 1.32. Andamento della concentrazione del farmaco nei tessuti dopo l'assunzione secondo la tecnica tradizionale e mediante rilascio controllato.

#### 1.4.1 Meccanismo di rilascio controllato

A causa della presenza di numerose variabili in gioco, tra cui la tipologia del farmaco, la dose da somministrare, il sito d'azione, la durata della terapia e la stabilità delle molecole attive, è necessario che i sistemi a rilascio controllato presentino diverse cinetiche e meccaniche di rilascio, che rispettino le diverse necessità di somministrazione e permettano la distribuzione del farmaco nei tessuti che necessitano del trattamento. È

possibile individuare cinque diversi profili di rilascio del farmaco (Figura 1.33), di cui i primi due sono quelli più largamente utilizzati <sup>(14)</sup>:

- profilo I: curva a decadimento esponenziale con ritardo iniziale e rilascio non costante di farmaco (rilascio convenzionale);
- profilo II: rilascio di ordine zero, caratterizzato da un gradino con salita ripida e mantenimento del rilasciato nel tempo;
- profilo III: rilascio costante preceduto da un delay programmato (utile per i farmaci che svolgono la loro funzione durante la notte);
- profilo IV: picco di bassa intensità e di breve durata (profilo rettangolare) assimilabile a una somministrazione impulsiva ritardata (anche questo utile per i farmaci ad effetto notturno);
- profilo V: somministrazioni impulsive periodiche ritardate, con distanziamenti temporali modulabili.

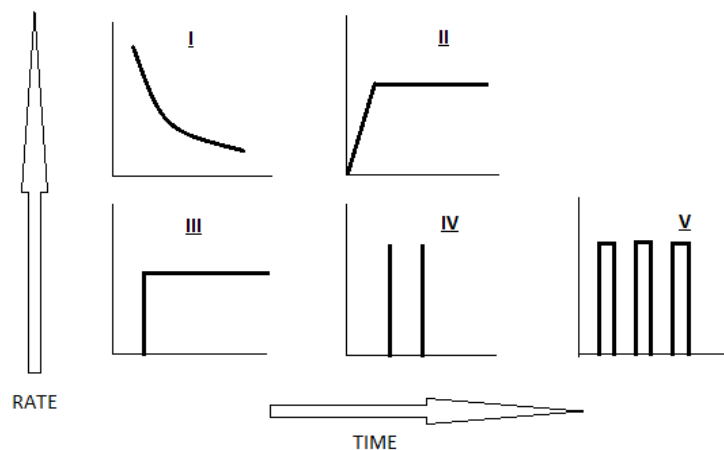


Figura 1.33. Profili di rilascio del farmaco.

### 1.4.2 Sistemi di trasporto

I sistemi di trasporto (Figura 1.34) si classificano, in base alla tipologia di meccanismo di rilascio, in:

- Sistemi a diffusione controllata: sfruttano il meccanismo di diffusione del farmaco attraverso il polimero, e si suddividono in sistemi a serbatoio (sistemi a membrana) e a matrice (sistemi monolitici). I primi sono caratterizzati da cinetica di ordine zero, poiché basati sulla diffusione semplice, dal cuore della capsula, contenente un'elevata concentrazione di principio attivo, verso l'esterno, in cui questo non è

presente. Tali dispositivi sono generalmente costituiti da un nucleo centrale circondato da una membrana polimerica cava, e differiscono dai sistemi monolitici proprio per la loro struttura bifasica. Nel secondo gruppo invece si ritrovano strutture matriciali polimeriche omogenee in cui è uniformemente disciolto il farmaco. In questo caso la cinetica di rilascio è del primo ordine, caratterizzata da una velocità di diffusione elevata all'inizio e successivamente decrescente, dovuta all'aumentato percorso di diffusione e alla diminuzione dell'area della matrice.

- Sistemi controllati chimicamente: si dividono in bioerodibili (biodegradabili) e a catena pendente. Il rilascio ha luogo in ambiente acquoso, dove il polimero si degrada a causa della presenza di legami labili idroliticamente o enzimaticamente, che coinvolgono soltanto la superficie oppure anche la parte centrale del dispositivo, detta *bulk*. Ciò da una parte evita la necessità di una rimozione chirurgica, ma dall'altra richiede che i prodotti della degradazione non provochino reazioni tossiche o cancerogene, effetto non sempre facile da ottenere. Nei sistemi bioerodibili il principio attivo è dissolto all'interno del dispositivo e solo l'azione di erosione da parte dell'acqua permette la fuoriuscita di farmaco, mentre nei sistemi a catena pendente la molecola del farmaco è legata chimicamente al polimero, e viene rilasciata mediante una scissione idrolitica o enzimatica, con velocità proporzionale a quella con cui i legami vengono rotti dall'azione dell'acqua o delle proteine.
- Sistemi attivati dal solvente: particolari idrogeli costituiti da macromolecole a struttura reticolata create in modo da formare una maglia aggrovigliata che funge da matrice per l'intrappolamento di farmaci. Quando queste grosse macromolecole entrano in contatto con un solvente compatibile, le loro strutture si modificano e si rilassano, permettendo all'acqua di penetrare all'interno e al farmaco incapsulato di fuoriuscire dalla matrice. Si distinguono due tipologie di controllo in questi sistemi:
  - osmotico, dove è il rapporto tra le osmosi di farmaco e quelle di solvente a determinare la cinetica del processo;
  - mediante rigonfiamento, in cui l'entrata di importanti quantità di acqua causa un aumento del volume della struttura, con il conseguente allargamento dei pori e la fuoriuscita del principio attivo.



- Sistemi a rilascio modulato: controllati da stimoli esterni quali la temperatura, il pH, campi elettrici e magnetici, radiazioni elettromagnetiche, oppure raggi UV.

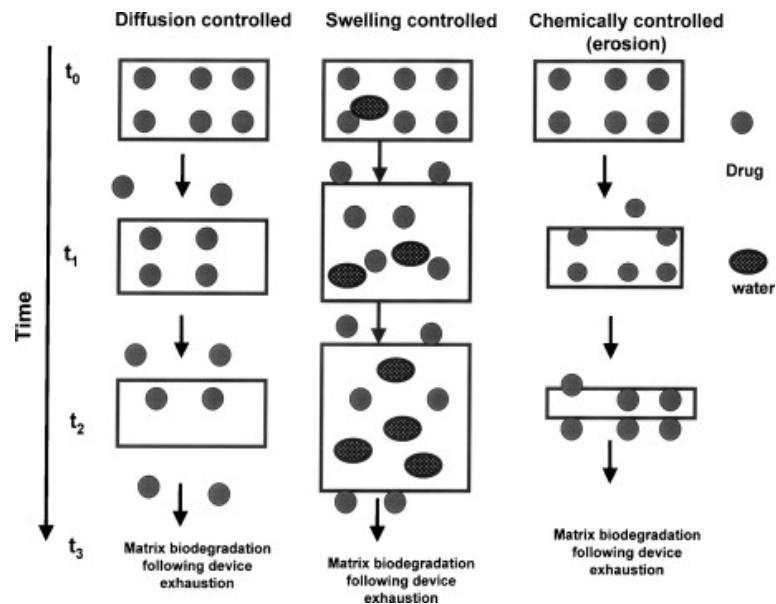


Figura 1.34. Schema di alcuni meccanismi diffusionali.

### 1.4.3 Interfacce di rilascio

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

#### 1.4.3.1 Stent

Lo *stent* (Figura 1.35) è una struttura metallica a maglie, cava e cilindrica, impiegata per il trattamento di stenosi, sia in fase acuta che a lungo termine. Esso viene introdotto nel lume dell'arteria ostruita e fatto espandere a livello dell'ostruzione, fino al raggiungimento di un diametro pari a quello originario del vaso. Poiché gli *stent* si trovano in contatto con l'apparato vascolare, la biocompatibilità, ed in particolare l'emocompatibilità, risultano essenziali: per questo motivo spesso tali dispositivi vengono ricoperti con polimeri carichi con agenti antitrombotici (per esempio eparina), oppure con polimeri inerti, i quali limitano l'adesione piastrinica.

Oltre a svolgere una funzione meccanica, gli *stent* possono contenere al loro interno anche farmaci o agenti antinfiammatori da rilasciare una volta a contatto con l'organismo, in modo da indirizzare la cura, localizzandola nel solo tessuto interessato. Le più comuni tecniche di realizzazione di questi dispositivi consistono nello scioglimento di polimero e

farmaco nello stesso solvente in modo da ottenere una soluzione omogenea; in seguito all'evaporazione del solvente si ottiene un polimero, contenente al suo interno molecole di farmaco, il quale può essere lavorato mediante stampaggio a compressione per ottenere la forma desiderata. Nei casi in cui il solvente rischia di alterare le proprietà del farmaco si ricorre direttamente all'estrusione. Un'innovazione nell'ambito dei dispositivi impiantabili è stata la creazione di *stent* riassorbibili di materiale polimerico i quali, dopo un periodo di tempo di qualche mese, vengono completamente degradati dall'organismo ospite, prevenendo così l'esigenza di un ulteriore intervento chirurgico di asportazione. Impianti di questo tipo si sono rivelati efficaci nella cura di malattie della retina e nel trattamento di stenosi tracheali refrattarie ai trattamenti tradizionali.

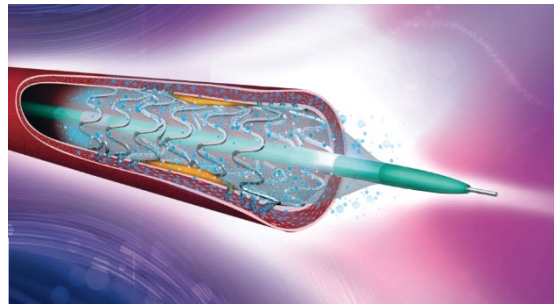


Figura 1.35. Stent coronarico a rilascio di farmaci.

#### 1.4.3.2 Microparticelle

Le microparticelle sono piccole gabbie polimeriche (dell'ordine dei  $\mu\text{m}$ ) che inglobano, trasportano e rilasciano un determinato principio attivo. Le diverse tecniche di microincapsulamento esistenti variano in base alla natura e al peso molecolare della matrice polimerica, alla natura, alla grandezza e alla solubilità del farmaco da intrappolare, alla durata della terapia, e all'organo/tessuto bersaglio. Le microparticelle sono utilizzate per somministrare in maniera efficace piccole dosi di farmaco (anche insolubile o nocivo) a bassa frequenza e, data la capacità delle microsfele di aderire ai tessuti bersaglio, per somministrazioni continue e regolari nel tempo di dosi moderate <sup>(15)</sup>. La taglia delle microcapsule dipende da quella del materiale che andrà a formare il *core*. Per *core* solidi, se le dimensioni del materiale di partenza non risultano idonee, è necessario provvedere a riduzione della taglia tramite processi di micronizzazione. Anche gli stessi materiali solidi da incapsulare devono essere finemente suddivisi. Nel caso di agglomerazione, invece, si

dovrà intervenire tramite setacciatura o selezione delle migliori condizioni di conservazione (umidità, temperatura).

Le microparticelle si dividono, a seconda delle modalità di rilascio della sostanza incapsulata, in:

- Sistemi bioerodibili: in sistemi di questo tipo il principio attivo viene confinato all'interno di una struttura polimerica; il farmaco può veicolare attraverso la microparticella per raggiungere i siti di destinazione come conseguenza di un processo di diffusione verso l'esterno, oppure a causa dell'erosione della particella stessa. Infatti, a seguito della penetrazione dell'acqua nel rivestimento o nella matrice polimerica, si ha la scissione di vari legami nelle catene, con conseguente abbassamento del peso molecolare. Il principio attivo fuoriesce dal dispositivo bioerodibile attraverso i fenomeni dell'erosione e della diffusione semplice, se il farmaco è semplicemente disperso nel polimero, o attraverso la sola diffusione se l'agente attivo forma un *core* interno ben distinto dalla matrice polimerica confinante. La predominanza di un meccanismo sull'altro deriva dalle proprietà del polimero, quali l'idrofilicità, la flessibilità, la velocità di degradazione, il peso molecolare, la cristallinità, la geometria della particella e la porosità della matrice/rivestimento; la cinetica del rilascio risulta influenzata anche dalle caratteristiche del farmaco stesso, e principalmente dal suo peso molecolare, dalla sua solubilità in acqua e dalla sua distribuzione all'interno della matrice. Devono, poi, anche essere prese in considerazione le caratteristiche del mezzo esterno, quali la temperatura ed il pH.
- Idrogeli: strutture tridimensionali polimeriche reticolate che possono intrappolare il farmaco al loro interno, e che rigonfiano in presenza di acqua grazie alla loro elevata idrofilicità. Essi, infatti, possono assorbire dall'atmosfera dal 10-20% fino a migliaia di volte il loro peso secco <sup>(16)</sup>. Quando gli idrogeli asciutti vengono a contatto con l'acqua, le catene di polimero si distendono permettendo un flusso di acqua verso il *core* interno e la fuoriuscita della molecola attiva all'esterno. Dal momento in cui il solvente comincia a interagire con l'idrogel si osservano diverse fasi:
  - un primo ingresso di acqua con conseguente idratazione dei gruppi più idrofilici e rigonfiamento della struttura che espone al solvente i gruppi più idrofobici;

- una seconda entrata di acqua causata dalla pressione osmotica e limitata dai forti legami covalenti costituenti l'idrogel;
- il raggiungimento di un equilibrio tra l'acqua uscente e quella entrante con sistemazione delle molecole di H<sub>2</sub>O negli spazi intercatena e nei larghi pori della struttura;
- degradazione dell'idrogel con una velocità legata alla struttura chimica (fase possibile solo nel caso in cui l'idrogel considerato sia biodegradabile).

Gli idrogeli vengono classificati in tre categorie: la prima comprende gli idrogeli sensibili alle variazioni di pH, la seconda quelli sensibili alle variazioni di temperatura, mentre la terza quelli sensibili a specifiche biomolecole (Figura 1.36). Questi sistemi sono utilizzati principalmente, grazie alla loro elevata biocompatibilità ed affinità con l'acqua, nell'ambito del *drug delivery*, ma anche per la realizzazione di *scaffold* e matrici vascolarizzate per l'ingegneria tissutale, dal momento che risulta possibile modularne alcune proprietà fisico-chimiche quali la permeabilità, i tempi di reazione, le caratteristiche superficiali, la biodegradabilità e la porosità.

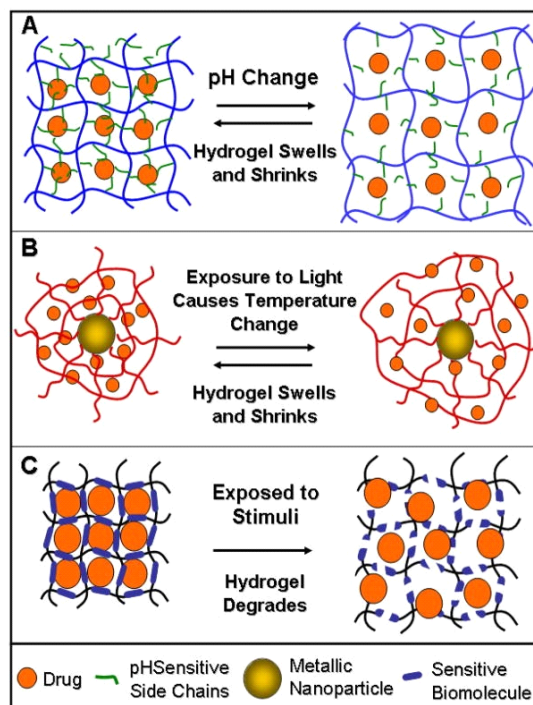


Figura 1.36. (a) Idrogeli sensibili alle variazioni di pH, (b) idrogeli sensibili alle variazioni di temperatura, (c) idrogeli sensibili alla presenza di biomolecole.

Le principali tecniche d'incapsulazione di principio attivo all'interno di microparticelle <sup>(17)</sup> sono:

- Emulsione: le emulsioni sono sistemi dispersi formati da due fasi liquide non miscibili, una delle quali è dispersa nell'altra; il liquido disperso costituisce la fase interna (o dispersa), il liquido disperdente la fase esterna (o disperdente). Un esempio dei due liquidi non miscibili è dato dall'acqua e dall'olio; quando l'olio è la fase esterna si hanno emulsioni *water-in-oil*, ovvero W/O, mentre quando l'acqua è la fase esterna si hanno emulsioni *oil-in-water*, o O/W. Nel caso della *drug delivery* si utilizzano prevalentemente processi O/W, in cui il polimero viene prima disciolto in solvente organico volatile, solitamente diclorometano (DCM), ed, in un secondo momento, viene aggiunto il farmaco in modo da creare un'emulsione; quest'ultima deve essere poi rimossa o per mezzo di un processo di estrazione o con semplice evaporazione, al fine di ottenere delle goccioline solide che andranno lavate, raccolte e asciugate, giungendo così al prodotto finito. Occorre tenere presente, al fine di ottenere le dimensioni desiderate, che il diametro di tali particelle cresce all'aumentare della concentrazione relativa del polimero e in situazioni termiche estreme. Inoltre questa tecnica, nonostante presenti alcuni problemi, tra cui la forte dipendenza dalla temperatura e dalla viscosità relativa tra polimero, solvente e farmaco, si rivela ideale per incapsulare sostanze liposolubili come gli steroidi; per sostanze idrosolubili, come peptidi, proteine e vaccini, si preferisce invece una tecnica W/O.
- Separazione di fase: tecnica che consiste nel diminuire la solubilità del polimero mediante l'aggiunta di un terzo componente alla soluzione organica. Questo porta alla formazione di due fasi separate, una più densa composta dal polimero e l'altra più liquida, in sospensione, carente di materiale polimerico: in questo modo il farmaco che era disperso o dissolto nella soluzione polimerica viene rivestito dal polimero. La presente tecnica, rispetto alla precedente, ha come vantaggio quello di permettere l'incapsulamento di farmaci sia liposolubili che idrosolubili, mentre presenta uno svantaggio legato alla necessità di grandi quantitativi di solvente organico, costosi e difficili da separare dalle microparticelle ottenute.
- Spray a secco: tecnica molto più rapida, conveniente e facile rispetto alle precedenti, dipendente in minore misura dalla solubilità sia del polimero che del farmaco. Consiste in due fasi principali: un primo scioglimento del farmaco che si

desidera incapsulare in solvente, ed una successiva nebulizzazione della sospensione ottenuta in forma di spray a secco. Attraverso questa tecnica si possono ottenere particelle con dimensioni anche inferiori a 5  $\mu\text{m}$ .

- Polimerizzazione interfacciale: riguarda tutti quei processi in cui all'interfaccia tra due liquidi immiscibili si forma chimicamente il polimero che costituirà il rivestimento della particella (che dovrà essere insolubile in entrambi le fasi). Si distinguono due differenti tecniche di polimerizzazione interfacciale:
  - per condensazione, in cui il polimero si forma a partire da due diversi tipi di monomeri (uno solubile in fase organica e l'altro solubile in fase acquosa) che reagiscono all'interfaccia tra una fase acquosa e una fase organica. Farmaco e monomero A sono disciolti nel solvente A, che tramite agitazione meccanica viene suddiviso in goccioline di taglia opportuna, per poi essere mescolato con il solvente B, in cui è disciolto il monomero B. Questi due monomeri reagiscono all'interfaccia formando un polimero insolubile, contenente al suo interno il farmaco;
  - per addizione (detta anche polimerizzazione *in situ*), dove la formazione del polimero si verifica per reazione tra un monomero e un catalizzatore, solubili in due solventi differenti. Anche in questo caso la reazione avverrà all'interfaccia tra una fase acquosa e una fase organica, ed il polimero finale risulterà insolubile nei due solventi

### 1.4.3.3 Nanovettori

La nascita del concetto di nanoparticella, intesa come dispositivo dalle dimensioni dell'ordine dei nanometri, si colloca negli anni '70, quando i primi substrati di trasporto vennero utilizzati per convogliare in siti specifici farmaci contro il cancro e vaccini. Attualmente l'applicazione dei *carrier* nanometrici si è estesa a diversi campi, tra cui il trasporto di farmaci, la diagnosi precoce di patologie e allergie, la cura di scompensi metabolici attraverso l'immissione di proteine ed acidi nucleici trasportati direttamente alle cellule bersaglio, e terapie nel breve e lungo periodo, con rilasci modulati in relazione alle diverse esigenze. La dimensione così ridotta è imposta dalla necessità, da parte del vettore, di poter viaggiare anche nei capillari senza il pericolo di ostruirli, poter penetrare all'interno delle cellule e nello stesso tempo di essere sufficientemente grande da poter superare le difese immunitarie dell'organismo; inoltre, queste particelle sono caratterizzate

da un prolungato tempo di circolazione (dal momento che non vengono né catturate dal fegato né escrete a livello renale), fattore che rende spesso difficile il rilascio di grandi dosi di farmaco. L'elevato rapporto superficie/volume <sup>(18)</sup> consente, inoltre, di legare chimicamente diversi gruppi funzionali come agenti diagnostici e terapeutici, e una tale versatilità permette di realizzare sistemi capaci di riconoscere il sito bersaglio dove è in atto la patologia, garantendo un'elevata specificità di targeting: per questo motivo tali nanostrutture mostrano potenzialità per l'impiego in chemioterapia <sup>(19)</sup>. Le nanoparticelle possono essere progettate, inoltre, per rispondere a specifici stimoli sia chimici (presenza di un attivatore chimico specifico o variazione di pH) sia fisici (cambiamenti di pressione, temperatura o applicazione di onde elettromagnetiche luminose, campi elettromagnetici o ultrasuoni), e possono essere ulteriormente suddivisi in due categorie: particelle biodegradabili, in cui la diffusione del farmaco è possibile dopo la degenerazione polimerica, e nanogel, nei quali la fuoriuscita di principio attivo è favorita da un rigonfiamento della matrice (*swelling*), e dal conseguente allargamento dei pori di uscita. Allo stesso modo delle microparticelle, i nanovettori vengono preparati mediante emulsione e separazione di fase, sia *oil-in-water* che *water-in-oil*, ma anche tramite nanoprecipitazione, che consiste in un primo scioglimento del polimero e del farmaco in acetone (portato poi in soluzione acquosa), e nella successiva evaporazione a bassa pressione del solvente.

#### **1.4.3.3.1 Contributo dei polimeri ai nanovettori**

I copolimeri anfifilici (dove per anfifilico s'intende un materiale contenente gruppi sia idrofilici che idrofobici, caratteristica che permette alle molecole, se inserite in ambiente acquoso, di riarrangiarsi in modo tale da formare un doppio strato caratterizzato all'esterno dalla presenza delle teste idrofiliche, e all'interno dalle code idrofobiche) risultano materiali chiave per la realizzazione di micelle e nanoparticelle. Il ruolo del nucleo interno idrofobico è quello di dissolvere e proteggere i farmaci idrofobici, mentre il guscio idrofilo, invece, non solo stabilizza le nanodispersioni, ma, soprattutto, è responsabile delle interazioni con i liquidi fisiologici e con i tessuti viventi. La composizione chimica dei copolimeri anfifilici utilizzati risulta di primaria importanza in relazione alle performance finali dei nanovettori, sulla base delle quali si può effettuare una distinzione tra nanovettori di prima, seconda e terza generazione <sup>(20)</sup>:

- nanovettori di prima generazione: questa categoria comprende tutti i sistemi nanostrutturati con la semplice funzione di *carrier*;
- nanovettori di seconda generazione: presentano, rispetto ai primi, alcune funzionalità che consentono loro di raggiungere il sito specifico e di rilasciare il principio attivo in maniera controllata;
- nanovettori di terza generazione: sono costituiti da *nanocarrier* multifunzionali, che possono contenere al loro interno diverse tipologie di farmaci da rilasciare in tempi diversi, oppure che possono svolgere contemporaneamente diverse funzioni (come ad esempio diagnosi e terapia).

#### *Contributo di poliesteri alifatici funzionali ai nanovettori di "prima generazione"*

Poiché offrono nello stesso tempo biocompatibilità e biodegradabilità, PLA e PCL risultano i principali candidati per la realizzazione di nanovettori di prima generazione, anche se la loro idrofobicità intrinseca presenta un notevole inconveniente: tali dispositivi vengono riconosciuti, da parte del sistema immunitario, come corpi estranei. Questo perché numerose proteine plasmatiche, le opsonine, vengono assorbite sulla superficie dei nanovettori attraverso interazioni idrofobiche, e gli organismi macrofagi del sistema immunitario, che possiedono recettori specifici per le opsonine, respingono tali nanodispositivi principalmente nel fegato.

#### *Contributo del poliossietilene e dei copoliesteri ai nanovettori di "seconda generazione"*

Al fine di limitare l'assorbimento di opsonine da parte della superficie dei nanovettori, si può ricorrere alla modifica superficiale, che potrebbe portare all'inibizione delle interazioni idrofobiche. Fino ad ora, i migliori risultati sono stati ottenuti innestando sulla superficie catene di poliossietilene (POE), o glicole polietilenico (PEG), un polimero idrofilico, neutro e flessibile (Figura 1.37). Il POE (PEG) è, infatti, un repellente per le proteine, proprietà che implica per i *nanocarrier* tempi di permanenza più lunghi nel vano sistemico. Sebbene non degradabile, il PEG con peso molecolare inferiore a 20.000 g/mol può essere facilmente eliminato dai reni.



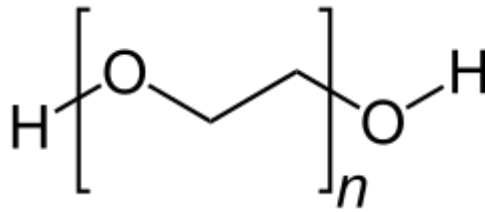


Figura 1.37. Struttura del glicole polietilenico.

#### *Contributo di copoliesteri funzionali ai nanovettori di “terza generazione”*

Il *targeting* selettivo di tessuti o cellule specifiche richiede che i nanovettori di seconda generazione siano ulteriormente modificati collegando ligandi specifici (quali anticorpi, peptidi, zuccheri, acido folico) alle loro superfici; i ligandi ideali risultano quelli che riconoscono selettivamente i recettori sulla superficie delle cellule bersaglio. Una volta che l'interazione tra i ligandi e recettori sovraespressi è stata stabilita, il passo successivo è l'endocitosi nella cellula, seguita dal rilascio intracellulare del farmaco e l'espressione della sua attività terapeutica.

#### **1.4.4 Polimeri nel drug delivery**

Ingegnere i mezzi a rilascio modulato significa trovare biomateriali che possano garantire il raggiungimento di diversi obiettivi; una possibile scelta ricade sui materiali polimerici, che permettono di superare due grandi problemi legati alla diffusione tradizionale: da una parte è possibile limitare l'interazione tra farmaco e cellule sane grazie alla grande specificità del sito attivo di legame (*linking* preferenziale), dall'altra si garantisce il raggiungimento, da parte del farmaco, di specifici siti bersaglio, anche quelli impossibili da raggiungere attraverso i mezzi di infusione tradizionali (si pensi ad esempio ai farmaci agenti sulle cellule cerebrali, che devono attraversare la barriera emato-encefalica). Occorre però ricordare che le varie tecniche di polimerizzazione presentano l'inconveniente di fornire un prodotto finale inquinato da sostanze residue indesiderate, in alcuni casi anche tossiche, per cui è necessario effettuare a valle operazioni di separazione e purificazione, come filtrazioni e lavaggi, che vanno a incidere sul costo finale del preparato e che creano sottoprodotti difficili da smaltire.

Le caratteristiche che questa ingegnerizzazione permette di ottenere sono:

- maggior stabilità nei fluidi fisiologici;
- degradazione nei naturali prodotti di scarto dell'organismo <sup>(14)</sup>;
- possibilità di terapia endovenosa e orale;

- caratteristiche chimico-fisiche ottimali (elasticità, piccole dimensioni, ecc.).

Per quanto riguarda le tipologie di polimeri maggiormente utilizzati in questo campo, si devono citare le polianidridi, le poliammidi, i poliortoesteri, e i poliesteri, tra cui l'acido polilattico, l'acido poliglicolico, l'acido polilattico-co-glicolico, il poli-ε-caprolattone e il poli(butilene/trietilene succinato).

## 1.5 Tissue engineering

L'ingegneria tessutale (Figura 1.38) è definita come “una scienza multidisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e della medicina allo scopo di realizzare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorare le funzioni di un tessuto o di un intero organo” (Skalak and Fox, 1988). Questo settore di ricerca è caratterizzato da una forte interdisciplinarietà: sono necessari contributi delle scienze di base, della bioingegneria, delle biotecnologie, della biologia molecolare e, ovviamente, della medicina.

Essa prevede due tipologie di approcci: quelli sostitutivi, il cui scopo è, appunto, quello di costruire *ex vivo* tessuti o organi del tutto simili a quelli utilizzati nei trapianti, e quelli istioconduttivi o istioinduttivi *in vivo*, avente lo scopo di ottimizzare la struttura e la composizione di materiali di origine naturale o (semi)sintetica e di indurre la proliferazione di cellule in vivo. In ogni caso, l'approccio dell'ingegneria tissutale è sostanzialmente differente 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 (M.S. Rizvi et al., 2012).

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

A seconda dell'organismo dal quale originano è inoltre possibile distinguere tre tipi di impianti:

1. *allograft*: le cellule, i tessuti o i tessuti ingegnerizzati derivano da un altro individuo della stessa specie;
2. *xenograft*: derivazione di cellule, tessuti o tessuti ingegnerizzati da un'altra specie;
3. *autograft*: derivazione di cellule, tessuti o tessuti ingegnerizzati dallo stesso individuo.

La metodologia 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 (e ripetibili) per generare un tessuto il più possibile omogeneo. Infine, lo *scaffold* contenente le cellule, viene impiantato nel paziente, dove nel tempo subirà il processo di degradazione. Il supporto viene quindi progressivamente riassorbito dall'organismo e sostituito con tessuto rigenerato dalle cellule sane impiantate.

Nel caso siano state usate cellule autologhe per la coltura *in vitro* del tessuto, al fine di impiantarli sul paziente una volta rigenerato, si elimina qualsiasi reazione immunitaria, sempre presente (tranne in alcuni limitati casi) quando parti di tessuto od organi vengano trapiantati tra individui diversi, anche della stessa specie.

La premessa di base dell'ingegneria tissutale consiste, dunque, nel combinare la giusta tipologia cellulare con il giusto materiale per la loro proliferazione, in condizioni che permettano la formazione di un tessuto. La natura del biomateriale e le sue proprietà chimiche e fisiche sono fondamentali per creare le condizioni favorevoli alla formazione del tessuto (E. Lavik and R. Langer, 2004).

È noto, infatti, che le cellule possiedono un potenziale innato ad organizzarsi in tessuti ed organi, se fornite dell'ambiente appropriato e di opportuni segnali biochimici. Per questo, un elemento fondamentale nell'ambito delle tecniche di ingegneria tissutale è l'impiego di molecole segnale, quali fattori di crescita o proteine di adesione, in grado di fornire alle cellule il corretto stimolo a colonizzare e diffondere all'interno del materiale adoperato per la realizzazione dello *scaffold*. Inoltre, allo *scaffold* possono essere applicati differenti stimoli biofisici, tipicamente attraverso un bioreattore, necessari alla corretta rigenerazione del tessuto.

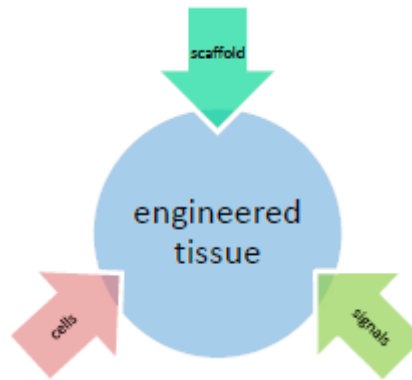


Figura 1.38. Ingegneria tissutale: cellule, segnali e scaffold.

### 1.5.1 Cellule

Il processo di sintesi di un costrutto ingegnerizzato ha inizio con la selezione del tipo cellulare necessario alla generazione dello pseudotessuto 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 allogeniche: isolate da un organismo della stessa specie di quello in cui saranno reimpiantate;
- cellule xenogeniche: isolate da individui di altra specie;
- cellule isogeniche: 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 ed 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 (dove per fenotipo si intende il frutto dell'interazione tra ambiente e genotipo, quest'ultimo consistente nella costituzione genetica di un individuo o di un organismo vivente) 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:

- embrionali, ricavate dalle cellule interne di una blastocisti (pluripotenti), ovvero un embrione ad uno stadio di sviluppo avanzato corrispondente ai 5 giorni successivi alla fecondazione;
- 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.

### 1.5.2 Scaffold

Come detto, la riparazione dei tessuti nell'ambito dell'ingegneria tissutale prevede la progettazione di un supporto artificiale appropriato il quale deve possedere caratteristiche particolari che lo rendano efficace per sostituire tessuti specifici e per la crescita di certi tipi di cellule (Appelman T.P. et al., 2009). Gli *scaffold* (Figura 1.39) sono, infatti, strutture altamente sofisticate, studiate per favorire l'attacco, l'adesione e la distensione (spreading) cellulare, ed, in seguito, la deposizione di nuovo tessuto.

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, ovvero non deve scatenare la formazione di trombi o una risposta immunitaria, nonché risultare angiogenico e suturabile; deve

essere riconoscibile e rimodellabile dalle cellule tissutali del sito d'impianto e dagli enzimi della matrice extracellulare;

- biorisorbibilità, con velocità di degradazione modulabile e compatibile con i tempi di rigenerazione del tessuto vivente e produzione di cataboliti (residui della demolizione dei nutrienti) atossici;
- elevata porosità, con pori interconnessi (di diametro tipicamente compreso tra i 200 e i 500  $\mu\text{m}$ ) che permettano la diffusione e la crescita cellulare, il trasporto di sostanze nutritive 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;
- lavorabilità e riproducibilità in geometrie e dimensioni variabili.

Gli *scaffold* non sono, dunque, supporti meccanici passivi, ma partecipano attivamente al processo di ricostruzione del tessuto, provvedendo alla stabilità meccanica della struttura, necessaria per la corretta organizzazione tridimensionale delle cellule in proliferazione.

In genere gli *scaffold* vengono fabbricati con materiali polimerici, eccetto quelli destinati alla rigenerazione del tessuto osseo, il quale richiede in aggiunta la presenza di una matrice inorganica. È stata sperimentata una varietà di polimeri, sia naturali che di sintesi, per la costruzione dei supporti; quelli di origine naturale includono polisaccaridi (ad esempio acido ialuronico) e proteine (come il collagene), mentre quelli sintetici comprendono: la famiglia di poliesteri alifatici derivanti dall'acido lattico e glicolico, i poliidrossialcanoati (poliesteri, caratterizzati dalla ripetizione del monomero [-O-CHR-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO-], prodotti in natura attraverso fermentazione batterica di zuccheri o lipidi), il policaprolattone, le polianidridi, i poliortoesteri e i policarbonati.

Il principale svantaggio derivante dall'impiego di polimeri sintetici per la realizzazione di *scaffold* risulta, in generale, la ridotta bioattività; i polimeri di origine naturale, benché molto biocompatibili e biologicamente attivi, come limitazione presentano, invece, delle 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. Vista l'impossibilità sia dei polimeri naturali che dei sintetici di coniugare le diversificate proprietà richieste dalle applicazioni in ingegneria tissutale, la ricerca di biomateriali per *scaffold* si è, recentemente, spostata sui copolimeri, che, come già evidenziato, sono caratterizzati da un'elevata modulabilità delle proprietà, mediante la

combinazione di più unità comonomeriche. Tra i copolimeri più utilizzati nell'ambito dell'ingegneria tissutale troviamo alcuni copoliesteri alifatici, come l'acido polilattico-co-glicolico, PLGA.

I supporti tridimensionali più all'avanguardia, in fase di sperimentazione, contengono molecole bioattive, come i fattori di crescita, che vengono rilasciati dalla matrice polimerica per degradazione e/o diffusione allo scopo di promuovere la proliferazione cellulare all'interno dello *scaffold*. In alcuni casi la superficie del supporto esposta all'interazione con le cellule viene fisicamente o chimicamente modificata per inserire sequenze polipeptidiche segnale.

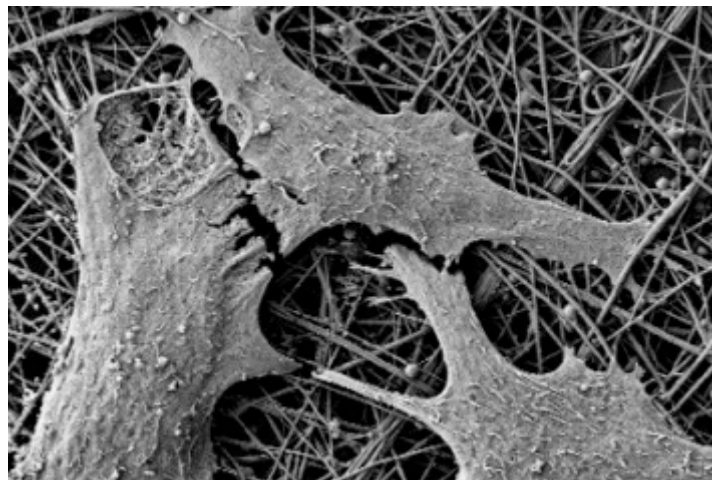


Figura 1.39. Immagine al microscopio di alcune cellule adese ad uno *scaffold*.

### 1.5.3 Distribuzione dei segnali in ingegneria tissutale

Per favorire la rigenerazione del tessuto non è sufficiente la corretta combinazione di cellule e *scaffold*, ma è necessario fornire alle cellule stesse opportuni segnali che ne regolino la differenziazione, la migrazione e la proliferazione. Questi segnali sono forniti dai fattori di crescita, particolari peptidi che, legandosi con i recettori transmembrana specifici della cellula bersaglio, forniscono l'informazione necessaria al nucleo per indurre un certo tipo di risposta nella cellula. Tipicamente questi polipeptidi esibiscono un range d'azione limitato, dovuto al difficoltoso processo di diffusione attraverso la matrice cellulare. L'ingegneria ha per questo sviluppato strategie distinte per il trasporto di questi fattori di crescita: l'immobilizzazione chimica all'interno di una matrice polimerica o l'incapsulamento fisico all'interno di una membrana, anch'essa polimerica. Entrambi i metodi si basano su diffusione e rilascio programmati nel tessuto circostante, facilitati

dall'impiego degli *scaffold* a pattern tridimensionali, che consentono un alto livello di controllo sulla distribuzione del segnale, dato che a questi sono ancorate le cellule bersaglio.

Le due tecniche principali usate per coniugare i fattori di crescita ai biomateriali (sintetici o naturali), rendendoli disponibili alle cellule che verranno in contatto con la matrice, si basano:

- sull'adsorbimento fisico dovuto a legami a idrogeno o ad interazioni idrofobiche con molecole eccipienti (approccio non covalente);
- sull'immobilizzazione covalente dei fattori di crescita (o molecole che ne mimano il funzionamento) alla matrice (approccio covalente).

L'adsorbimento dei fattori di crescita sfrutta in genere interazioni secondarie dipolo-dipolo o legami a idrogeno tra questi e le matrici, o interazioni indirette attraverso proteine intermedie o altre molecole biologiche: proteine e piccoli oligopeptidi possono essere rivestite chimicamente o fisicamente per fornire siti specifici in grado di immobilizzare i fattori di crescita o morfogeni. I materiali usati per percorrere questa strategia sono essenzialmente gel biopolimerici o una varietà di idrogel sintetici, data la loro capacità di riprodurre la membrana extracellulare.

L'approccio covalente permette ai fattori di crescita legati alla matrice di degradarsi molto più lentamente, consentendo un rilascio prolungato. I fattori vengono coniugati ai polimeri tramite gruppi funzionali precedentemente incorporati durante il processo di copolimerizzazione o tramite trattamenti chimici o fisici. Questa strategia non è immune da limitazioni, come la difficoltà nell'assegnazione del sito di accoppiamento sulla proteina e la possibile perdita di bioattività delle proteine a causa dell'immobilizzazione o del danneggiamento dei gruppi funzionali. È importante notare come l'ingegneria tissutale sfrutti meccanismi tipici del *drug delivery* per il trasporto dei fattori di crescita (al posto dei farmaci) come i meccanismi diffusionali, il *linking* alle matrici polimeriche, il rilascio controllato da fattori esterni come pH, temperatura e pattern tridimensionale dello *scaffold*.



## 1.6 Stato dell'arte del poli(butilene succinato), del poli(trietilene succinato) e dell'acido polilattico

### 1.6.1 PBS: struttura e proprietà dell'omopolimero

Il poli(butilene succinato), o PBS, è un poliestere alifatico caratterizzato da alto peso molecolare, marcata cristallinità (tra il 35% e il 45% <sup>(22)(23)</sup>) e consistenza solida a temperatura ambiente, in forma di polvere opaca dal colore giallo chiaro.

Generalmente il PBS, recentemente approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per utilizzi in ambito biomedicale, viene sintetizzato tramite policondensazione dell'acido succinico e dell'1,4-butandiolo. Il processo di sintesi consiste in una policondensazione in massa a due stadi: il primo consiste nell'esterificazione dell'acido succinico con formazione di oligomeri e rimozione di acqua (Figura 1.41); nella seconda fase, condotta sottovuoto, gli oligomeri formati nella prima subiscono trans-esterificazione con ottenimento del polimero ad alto peso molecolare ed eliminazione del glicole in eccesso (Figura 1.42)<sup>(22)</sup>.

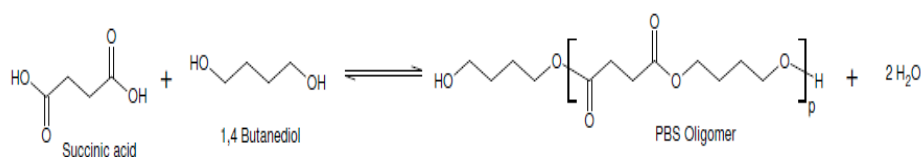


Figura 1.41. Esterificazione di acido succinico e 1,4-butandiolo.

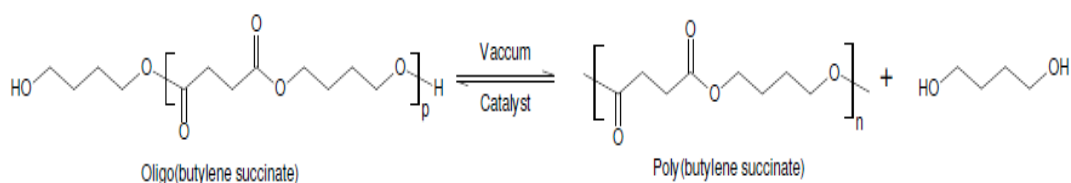


Figura 1.42. Trans-esterificazione degli oligomeri.

Questo materiale polimerico presenta bassi costi di produzione, semplicità di sintesi, e proprietà facilmente modulabili attraverso la copolimerizzazione con differenti tipi e quantità di monomeri <sup>(23)-(31)</sup>. Tra le sue proprietà peculiari figurano:

- buona lavorabilità, mediante le tecniche di estrusione, stampaggio a iniezione e termoformatura;
- alto modulo elastico (300-500 MPa <sup>(22)(23)</sup>), elevata rigidità, resistenza agli urti;

- bassa temperatura di transizione vetrosa (tra -34 °C e -15 °C <sup>(32)</sup>);
- carattere idrofobico, particolarmente utile nell'assorbimento delle proteine;
- elevata cristallinità ( $T_m$  è di circa 130 °C <sup>(32)</sup>) e simmetria molecolare;
- tempi di degradazione lunghi in condizioni fisiologiche e facilmente controllabili;
- possibilità di sintetizzare il polimero a partire da monomeri derivati da fonti rinnovabili con conseguente produzione di un polimero *bio-based*.

Grazie alle sue proprietà meccaniche, lavorabilità e resistenza al calore, il PBS e suoi copolimeri vengono utilizzati in una vasta gamma di applicazioni in diversi settori: nell'agricoltura, nella pesca, nella silvicoltura, nell'ingegneria civile e nel settore dell'imballaggio. In ambito biomedicale viene utilizzato per la realizzazione di impianti in chirurgia vascolare o ortopedica, per la sintesi di membrane semplici o strutture porose, e come matrice impiantabile per il rilascio controllato di farmaci chemioterapici all'interno del corpo, in forma di film e nano- o micro-particelle; inoltre, in materia di *tissue engineering*, il PBS è risultato un buon materiale per la realizzazione di *scaffold* per la rigenerazione di tessuti ossei e della cartilagine.

Al fine di essere utilizzato in contatto con le cellule del corpo, il polimero deve necessariamente essere biocompatibile: in questa direzione sono stati compiuti diversi test, sia *in vitro* sia *in vivo*, che hanno evidenziato buoni risultati. Nelle analisi *in vitro* sono state prese in considerazione alcune cellule animali e umane poste in contatto diretto o indiretto con la base polimerica, mentre nelle analisi *in vivo* il componente sintetizzato è stato impiantato chirurgicamente in piccoli roditori (topi e conigli). Per quanto riguarda gli studi *in vitro*, sono state adoperate diverse tipologie cellulari (sia nel caso di cellule animali che umane): cellule staminali, fibroblasti (responsabili della sintesi di alcuni componenti della matrice extracellulare, tra cui il collagene), osteoblasti (cellule che sintetizzano il tessuto osseo), condrociti (appartenenti al tessuto cartilagineo), splenociti (specifiche cellule della milza), cardiomiociti e cardiomioblasti (provenienti dal muscolo cardiaco).

Gli studi di citotossicità indiretta non hanno evidenziato alcuna differenza tra il controllo negativo e i polimeri studiati, confermando la biocompatibilità da contatto indiretto. Contemporaneamente si sono svolti studi di immunoistochimica (tecnica grazie alla quale si possono individuare specifiche molecole o strutture intra- e extra-cellulari), per determinare il grado di mutazione cellulare indotta dal film polimerico, che hanno dato esito negativo (le cellule poste in contatto con polimeri PBS-*based* mantengono inalterati i marker caratteristici dei cardiomiociti). Negli studi *in vivo*, strutture omo- o co-

polimeriche a base di PBS sono state impiantate in piccole cavie. In seguito all'impianto chirurgico, a fronte di una iniziale risposta infiammatoria, si è riscontrata una successiva stabilizzazione della zona d'impianto, a conferma della biocompatibilità anche *in vivo*. Nonostante tutti gli studi confermino la biocompatibilità e l'utilità del PBS, quest'ultimo non è stato ancora approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per utilizzi in ambito biomedicale.

### 1.6.2 PTES: aggiunta in copolimeri e modulazione di proprietà

Il PTES, poli(trietilene succinato), (Figura 1.43), ha una struttura chimica simile al PBS: entrambi sono caratterizzati da gruppi estere distribuiti lungo una catena alifatica satura. La differenza consiste nella presenza nel TES di una sub-unità PEG-like contenente due atomi di ossigeno etero (Figura 1.44). Il procedimento di sintesi, pertanto, è analogo a quello descritto per il PBS ad eccezione della tipologia di glicole (trietilenglicole in questo caso) che viene fatto reagire con l'acido succinico.

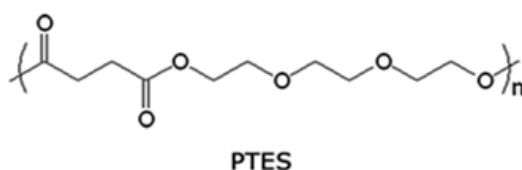


Figura 1.43. Unità ripetitiva del PTES.

La sub-unità viene chiamata *PEG-like* poiché presenta una struttura simile al glicole polietilenico, ovvero il PEG.

Il PTES risulta completamente amorfo, con temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) di  $-33$  °C. L'incapacità a cristallizzare può essere ascritta alla presenza degli atomi di ossigeno etero che riducono la simmetria della catena. Il PTES risulta inoltre molto idrofilico, proprio grazie alla presenza della sub-unità *PEG-like*.

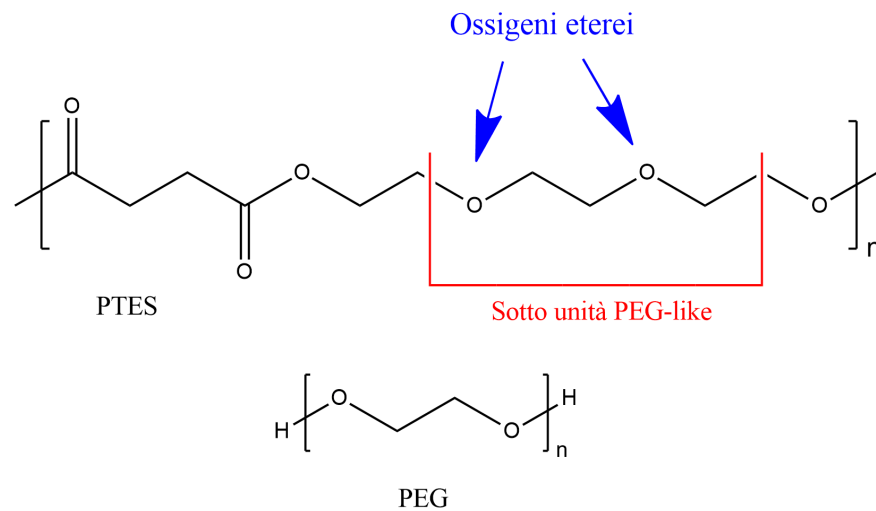


Figura 1.44. Unità di TES dove si evidenziano gli ossigeni eterei e la sotto unità PEG-like comparata alla struttura di PEG.

Tra i copolimeri precedentemente sintetizzati dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Lotti presso i laboratori LAMAC del DICAM dell'Università degli Studi di Bologna, meritano particolare attenzione i copolimeri a blocchi poli(butilene/trietilene succinato) (P(BSTES)) (Figura 1.45)<sup>(23)(33)</sup>.

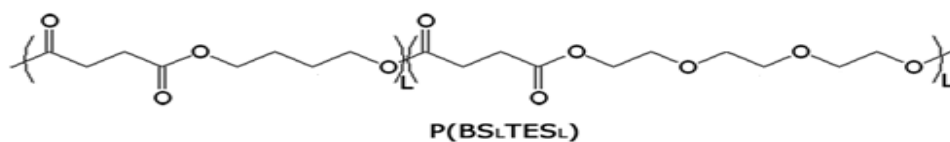


Figura 1.45. Struttura chimica del P(BSTES) ("L" indica la lunghezza della sequenza (blocco) di BS e di TES).

Tali copolimeri sono stati ottenuti per miscelazione reattiva: tempi di mescolamento brevi permettono di ottenere copolimeri a blocchi, la cui lunghezza può essere facilmente modulata allungando il tempo di reazione, fino ad arrivare, per tempi sufficientemente lunghi, ad una distribuzione statistica delle unità comonomeriche (copolimero random). I copolimeri P(BSTES) risultano semicristallini, con la fase cristallina del PBS. La temperatura di transizione vetrosa risulta intorno ai -30 °C, mentre la temperatura di fusione decresce al diminuire della lunghezza dei blocchi<sup>(23)</sup>.

Le proprietà meccaniche cambiano significativamente per copolimerizzazione: nel PBS, materiale con un elevato modulo elastico ed una bassa deformazione a rottura,

l'introduzione delle sequenze PTES provoca una significativa diminuzione del modulo elastico e un parallelo significativo aumento dell'allungamento a rottura. Il copolimero con le sequenze più corte (copolimero random) si comporta come un elastomero con allungamenti a rottura che arrivano al 700%. Le sequenze TES contribuiscono ad aumentare l'idrofilicità del materiale finale e l'effetto risulta più marcato per sequenze lunghe. Tale comportamento può essere spiegato assumendo una veloce riorganizzazione spaziale delle sequenze, che porta quelle TES a contatto con l'acqua. Anche la cinetica di degradazione idrolitica dei copolimeri P(BSTES) risulta dipendere marcatamente dalla lunghezza dei blocchi. In particolare, la velocità di degradazione è massima per il copolimero a blocchi più lunghi<sup>(23)</sup>.

I copolimeri non sono risultati citotossici, al contrario si sono rilevati in grado di supportare l'adesione e la crescita cellulare di fibroblasti. Studi di cinetica di rilascio da film pressofusi di una molecola modello hanno mostrato risultati interessanti: innanzitutto la cinetica di rilascio dei copolimeri è significativamente diversa da quella dell'omopolimero PBS. Tenuto conto che il rilascio è controllato dalla diffusione del farmaco, l'andamento osservato può essere interpretato sulla base dell'idrofilicità, della cristallinità e mobilità delle catene polimeriche: il PBS, il più idrofobo e cristallino tra quelli studiati, è caratterizzato da un rilascio più lento. È interessante notare come il copolimero a blocchi più lunghi rilasci più lentamente degli altri copolimeri, a causa della presenza in tale campione di un maggior contenuto di fase cristallina, peraltro caratterizzata da un maggior grado di perfezione, che agisce come barriera nei confronti della diffusione del farmaco. A tempi lunghi il comportamento del copolimero a blocchi lunghi si uniforma a quello degli altri. Tale comportamento è stato attribuito ad un diverso meccanismo di rilascio: a tempi lunghi il rilascio non è più controllato dalla diffusione, bensì dalla erosione del film, la cui velocità è strettamente correlata alla velocità di degradazione idrolitica. Quest'ultima, dagli esperimenti condotti, è risultata molto maggiore per il copolimero a blocchi lunghi rispetto a quello statistico (ovvero caratterizzato da blocchi corti).

### **1.6.3 Acido polilattico (PLA)**

L'acido polilattico (o PLA) è uno dei poliesteri alifatici maggiormente studiati e impiegati a livello mondiale, grazie alle sue proprietà di biodegradabilità e biocompatibilità, e in quanto può essere ottenuto da risorse rinnovabili.

Il PLA, FDA approved, si ottiene, principalmente, dall'apertura dell'estere ciclico dell'acido lattico (lattide) tramite la Ring Opening Polimerizzazione (ROP) e a sua volta l'acido lattico proviene dalla fermentazione degli zuccheri (destrosio essenzialmente, ma anche glucosio e saccarosio) da farina di granturco, barbabietole da zucchero o amido di frumento. Il processo è a carico di microrganismi diversi, per cui ci si riferisce a fermentazione omolattica ed eterolattica. La prima conduce solo ad acido lattico ed è propria di molti batteri e bacilli, lattobacilli (*Lactobacillus delbrueckii*, *L. casei*, *L. leichmannii*), streptococchi, mentre nell'altra c'è anche produzione d'alcol etilico, acido acetico, CO<sub>2</sub> etc. In genere i batteri omofermentativi producono acido L-lattico e gli eterofermentativi acido D-lattico. La sequenza delle reazioni, una volta convertiti gli zuccheri in glucosio, è identica a quella della glicolisi anaerobica. Industrialmente l'operazione si compie partendo, per esempio, da melassa addizionata a carbonato di calcio e seminato con colture attive dei vari microrganismi e lasciando procedere per alcuni giorni il processo di fermentazione a temperatura fra 40 e 50 °C. Si preferisce partire da zuccheri raffinati piuttosto che dai meno costosi (melassa o il siero) poiché la purificazione dopo fermentazione è più costosa. L'acido lattico è convertito nel dimero (lattide) che è purificato e polimerizzato poi (metodo dell'apertura dell'anello) ad acido polilattico senza bisogno di solventi (Figura 1.46) <sup>(36)</sup>.

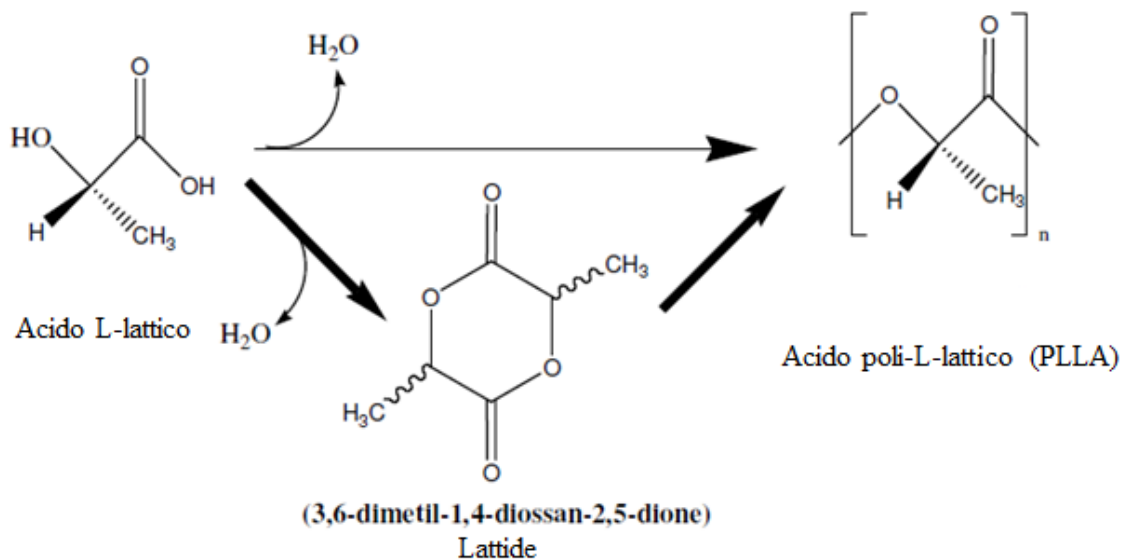


Figura 1.46. Sintesi per ottenere il PLA.

L'acido lattico è una molecola enantiomerica poiché esiste nelle due forme L (levogira) e

D (destrogiro). Non considerando la stereochimica del lattide, il meccanismo d'apertura d'anello è mostrato in Figura 1.47:

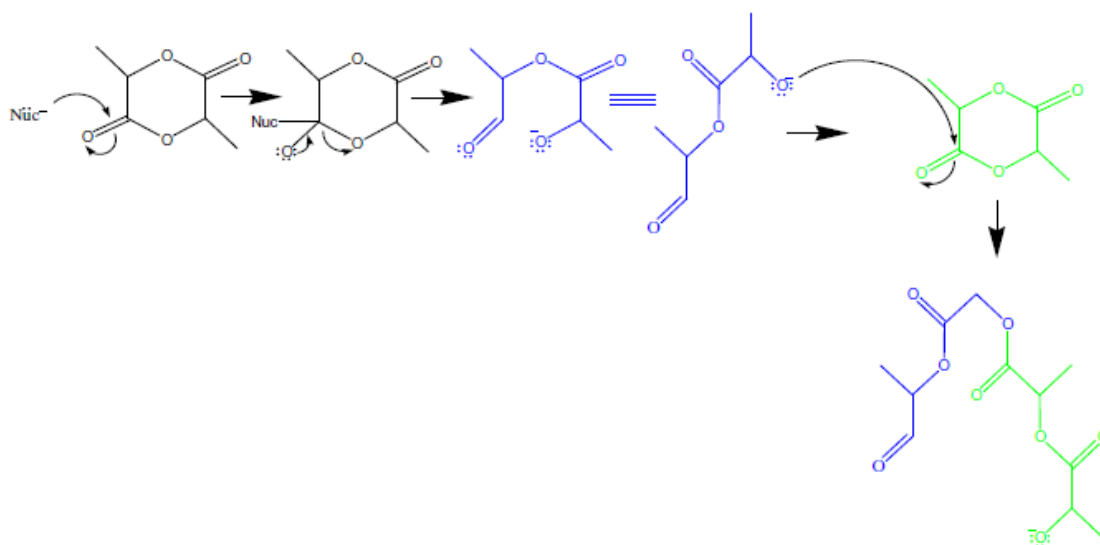


Figura 1.47. Meccanismo d'apertura d'anello.

Le quantità di enantiomeri che si ottengono sono differenti poiché la forma D è prodotta rapidamente, ma l'isomero-L è la forma biologicamente attiva e sintetizzata in maggioranza dai microrganismi. In particolare, le quantità di enantiomeri che si ottengono sono il 99,5% in forma L-isomero e per lo 0,5% in forma D-isomero.

Gli esteri ciclici che si ottengono (lattidi) (Figura 1.48), sono 3:

- 1) L-lattide (otticamente attivo);
- 2) D-lattide (otticamente attivo);
- 3) Meso-lattide (otticamente inattivo).

La polimerizzazione del lattide verso polimeri ricchi di L-isomero dà prodotti cristallini, mentre quelli che contengono più del 15% di D-isomero sono più amorfi.

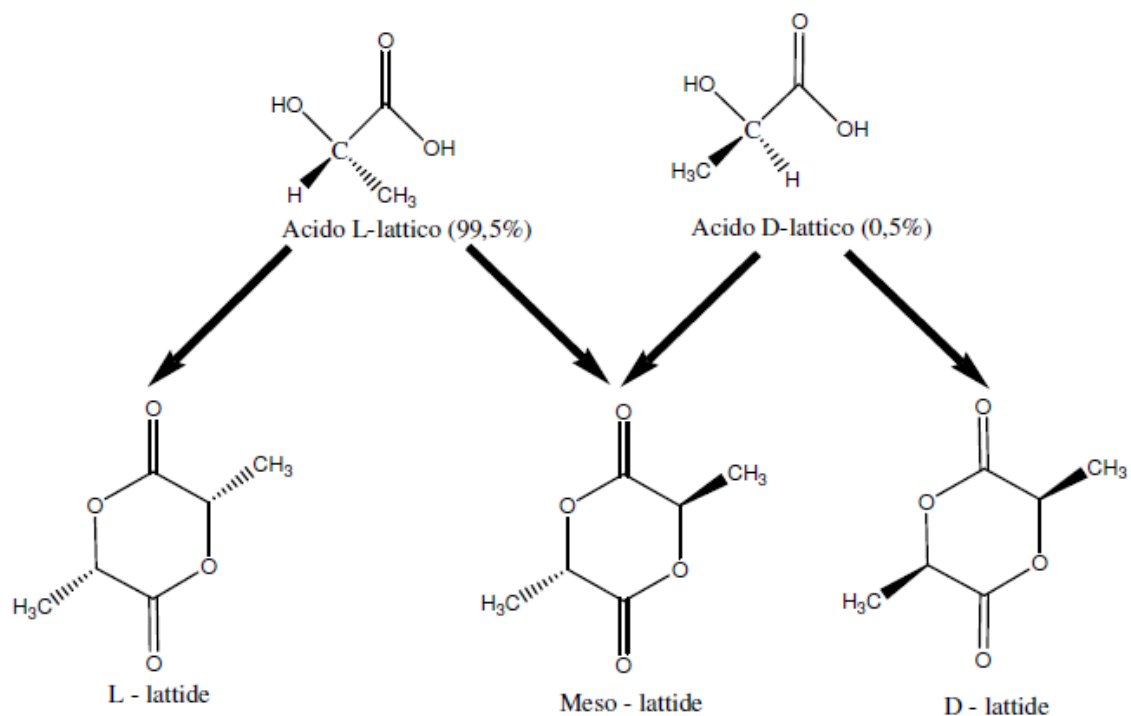


Figura 1.48. Enantiomeri dell'acido lattico e forme cicliche corrispondenti.

Per quanto riguarda la formazione dei polimeri, il PDLLA (poli-DL-acido lattico) indica la miscela racemica dei due (50%-50%). È amorfo, ha una temperatura di fusione tra i 150 e 160 °C, presenta una sola temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) a circa 60 °C ed è insolubile in acqua. Il PLLA (poli-L-acido lattico) indica il polimero costituito esclusivamente dall'enantiomero L ed è un materiale semicristallino, rigido, con un'elevata temperatura di fusione (170-180 °C), ha una  $T_g$  di 53 °C, insolubile in acqua e presenta un valore di cristallinità pari al 37%. Questo materiale è rigido, trasparente con un allungamento a rottura tra l'85% e il 105% e una resistenza a trazione pari a 45-70 MPa. Il PDLA (poli-D-acido lattico), costituito esclusivamente dall'enantiomero D, è semicristallino con una temperatura di fusione pari a 180 °C e una  $T_g$  di 60 °C<sup>(37)</sup>.

Lavorabile tramite stampaggio a iniezione, estrusione, soffiaggio e termoformatura, l'acido polilattico venne studiato per la prima volta come possibile materiale per il rilascio controllato di farmaci nel 1971, anche grazie alle sue eccellenti proprietà di biodegradabilità, variabile a seconda del grado di cristallinità, e biocompatibilità. Attualmente, oltre che nel *drug delivery*<sup>(38)</sup>, viene impiegato in vari settori della medicina, in particolare per suture riassorbibili, fissaggio ortopedico, e recentemente in ingegneria tissutale come supporto poroso temporaneo allo scopo di favorire la rigenerazione di tessuti quali ossa, cartilagini, tendini e nervi.



Rigidezza, ridotta stabilità termica ed elevati costi, limitano il suo sviluppo quale generica plastica, nonostante risulti un ottimo candidato per la sostituzione dei materiali tradizionali a base di petrolio. Notevoli sforzi della ricerca sono volti a diminuire la rigidità del PLLA: ad oggi la strategia più plausibile risulta la sintesi di copolimeri mediante l'introduzione, nella sua catena, di componenti flessibili <sup>(39)</sup>.

## CAPITOLO 2: Scopo

I recenti progressi nel campo della biomedicina sono sempre di più legati alla ricerca e allo sviluppo dei *biomateriali*. Un biomateriale è un materiale che s'interfaccia con i sistemi biologici, provocando una risposta dell'organismo, che a sua volta causa un processo di degradazione nel biomateriale stesso. Un biomateriale deve possedere pertanto il requisito fondamentale della biocompatibilità unitamente a quello della biodegradabilità. Tra i vari materiali impiegati in campo biomedicale il 50% risulta essere di natura polimerica. I maggiori vantaggi che i polimeri di sintesi presentano rispetto alle altre classi di materiali (metalli, ceramiche, compositi, etc.) sono una maggiore biocompatibilità, la possibilità di modificarne ampiamente composizione e proprietà fisico-meccaniche, bassi coefficienti di attrito, facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture complesse, possibilità di modificarne chimicamente e/o fisicamente la superficie, possibilità di immobilizzare cellule o biomolecole al loro intorno o sulla superficie.

I principali ambiti di utilizzo dei biomateriali polimerici sono:

- ingegneria tissutale, che utilizza materiali estranei all'organismo al fine di porre rimedio, in via provvisoria o definitiva, al deficit di una determinata funzione fisiologica. In particolare, la realizzazione di materiali con proprietà chimico-fisiche *ad hoc*, soprattutto in termini di risposta meccanica e velocità di degradazione idrolitica, è di fondamentale importanza per la riparazione/sostituzione del tessuto danneggiato;
- rilascio controllato di farmaci, che si propone di ovviare ai problemi associati ai metodi classici di somministrazione mediante la messa a punti di nuovi sistemi che permettano la somministrazione di farmaci inalterati in punti mirati del corpo rilasciandoli in modo controllato a seconda del regime di trattamento richiesto. L'incapsulamento all'interno di sistemi micro- e nano-dimensionati contribuisce al raggiungimento di questo obiettivo. La progettazione del vettore contenente il farmaco è fondamentale per ottenere la corretta localizzazione cellulare e tissutale delle molecole da somministrare ed eseguire un rilascio adeguato.

In questo contesto, i poliesteri alifatici costituiscono una classe di polimeri davvero promettente, in quanto le variegature chimiche che li caratterizzano permettono di soddisfare un'ampia gamma di esigenze.

Tra i poliesteri alifatici risultano già commercializzati per la realizzazione di dispositivi biomedicali l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA), il poli( $\epsilon$ -caprolattone) (PCL) e i loro copolimeri (PLGA, PGC, PLC), approvati dalla Food and Drug Administration (FDA). Tale popolarità è legata alla loro biodegradabilità, biocompatibilità e all'ottima resistenza meccanica.

Tuttavia, nell'ambito dell'ingegneria tissutale questi materiali, ed in particolare il PLA, risultano troppo rigidi per la realizzazione di dispositivi deputati alla rigenerazione di alcuni tipi di tessuti e sono, inoltre, caratterizzati da un profilo di degradazione idrolitica non sempre idoneo rispetto all'applicazione.

Nel campo del *drug delivery*, invece, l'estrema idrofobicità di questi materiali spesso determina basse efficienze di incapsulamento e un meccanismo in tre fasi: alto rilascio all'inizio, una fase cosiddetta lag e un terzo momento legato alla degradazione del polimero. Il PLA inoltre, probabilmente a causa dell'elevata idrofobicità e della mancanza di gruppi funzionali appropriati, mostra una bassa citocompatibilità.

In quest'ottica, la copolimerizzazione è senza dubbio lo strumento più interessante per modulare e migliorare le proprietà del PLA, senza andare a detrimento di quelle già soddisfacenti. Mediante copolimerizzazione è, infatti, possibile ottenere una nuova classe di polimeri con un'ampia gamma di proprietà, modulabili in base al tipo, alla quantità e alla distribuzione delle unità comonomeriche lungo la catena macromolecolare.

Tenuto conto di quanto detto, il presente lavoro di ricerca è stato rivolto alla preparazione e alla caratterizzazione di nuovi sistemi polimerici a base di PLA potenzialmente applicabili in ambito biomedico, sia per la rigenerazione dei tessuti che per la veicolazione di farmaci.

Il gruppo di ricerca presso il quale è stata condotta la presente Tesi ha una esperienza consolidata nella sintesi e caratterizzazione di copolimeri a diversa architettura molecolare e da quindici anni ha indirizzato le proprie ricerche verso i polimeri contenenti eteroatomi, in particolare ossigeno etero.

Dai risultati ottenuti è stato appurato che l'introduzione di tali atomi lungo la catena di un omopolimero può avere diversi effetti sulle proprietà allo stato solido del materiale, più specificamente:

- la temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) può:
  1. diminuire perché la catena polimerica diventa più flessibile;
  2. aumentare, a causa di forti interazioni intercatena.

Il primo effetto prevale se gli eteroatomi vengono introdotti lungo la catena polimerica di un polimero rigido.

- il punto di fusione e la tendenza a cristallizzare diminuiscono, a causa di una riduzione della simmetria della catena;
- l'idrofilicità superficiale aumenta, poiché la maggiore elettronegatività degli atomi di ossigeno rispetto a quelli di carbonio comporta la formazione di legami polari C-O.

Al fine di ridurre la rigidità e i tempi di degradazione del PLA si è scelto di introdurre lungo la sua catena principale atomi di ossigeno etero.

Tra i vari sistemi copolimerici studiati, sono risultati particolarmente interessanti per applicazioni in ambito biomedico i copolimeri a blocchi poli(butilene/trietilene succinato) P(BSTES), che si sono rivelati biocompatibili e idroliticamente degradabili, con profilo cinetico controllabile agendo semplicemente sulla lunghezza dei blocchi.

Tenuto conto di tale scenario, il presente lavoro di ricerca si è focalizzato sulla sintesi e sulla caratterizzazione di due nuovi copoliesteri alifatici a base di PLA, con il duplice obiettivo di migliorarne le proprietà sia per applicazioni nel campo dell'ingegneria tissutale che per il *drug delivery*.

A tale scopo sono stati sintetizzati e caratterizzati copolimeri con un'architettura triblocco **A-B-A**, dove **A**, rappresenta l'acido polilattico (PLA) e **B**, è un sistema copolimerico alifatico "PEG-like" ad elevata flessibilità a base di poli(butilene succinato) (PBS) biodegradabile e biocompatibile, precedentemente studiato dal gruppo di ricerca presso cui è stata condotta la Tesi. Di quest'ultimo sono stati considerati due copolimeri a diversa lunghezza dei blocchi: **B<sub>B</sub>** caratterizzato da sequenze lunghe delle co-unità, e **B<sub>R</sub>** caratterizzato da una distribuzione statistica delle unità comonomeriche.

Dai polimeri oggetto della presente Tesi sono state realizzate micro-e nano-particelle, all'interno delle quali è stato incapsulato il desametasone, farmaco corticosteroide, appartenente alla classe degli antinfiammatori steroidei.

Parallelamente, per raggiungere pesi molecolari elevati tali da garantire buone proprietà meccaniche, è stato sintetizzato un altro copolimero in cui al copoliestere **-A-B<sub>R</sub>-A-** (dove **B<sub>R</sub>** è il copolimero statistico) è stato aggiunto l'esametilendiisocianato (HDI), noto estensore di catena. Grazie ad esso, si realizzano legami di tipo uretanico tra i gruppi terminali ossidrilici delle catene.

L'attività di ricerca di seguito illustrata è stata svolta presso i laboratori LAMAC del Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali (DICAM) dell'Università di Bologna e si è articolata nelle seguenti fasi:

- Ricerca bibliografica sugli studi condotti in passato per acquisire conoscenza sull'argomento ed essere aggiornati sui vari processi di sintesi e di caratterizzazione;
- Sintesi dei due omopolimeri di riferimento mediante policondensazione in massa a due stadi da cui saranno sintetizzati i due copolimeri  $B_B$  e  $B_R$ ;
- Sintesi dei due copolimeri  $B_B$  e  $B_R$  idrossil terminati tramite miscelazione reattiva;
- Sintesi dei copolimeri triblocco  $-A-B_B-A-$  e  $-A-B_R-A-$ ;
- Sintesi del copolimeri triblocco  $-A-B_R-A-$  ad elevato peso molecolare;
- Caratterizzazione molecolare dei campioni sintetizzati, tramite risonanza magnetica nucleare (NMR) e cromatografia a permeazione su gel (GPC);
- Caratterizzazione termica mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC), analisi termogravimetrica (TGA);
- Analisi strutturale mediante diffrattometria a raggi X (WAXS);
- Realizzazione di micro- e nano-particelle mediante tecnica oil/water vuote e contenenti il farmaco;
- Determinazione delle dimensioni medie delle particelle mediante microscopio ottico e misure di potenziale zeta;
- Analisi della cinetica di rilascio di desametasone dalle micro- e nano-particelle;
- Caratterizzazione meccanica dei film tramite misure di trazione;
- Studi di degradazione idrolitica in condizioni fisiologiche;
- Caratterizzazione dei film parzialmente degradati mediante valutazione gravimetrica delle perdite di peso, cromatografia a permeazione su gel (GPC), analisi NMR e analisi termica (DSC);
- Analisi dei risultati ottenuti ed estrapolazione di correlazioni proprietà-struttura.

## CAPITOLO 3: Materiali e metodi

Il seguente lavoro di Tesi di Laurea si è svolto presso i laboratori di Sintesi e Caratterizzazione di Materiali Macromolecolari (LAMAC) del Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali dell'Università di Bologna (DICAM).

### 3.1 Sintesi

#### 3.1.1 Reagenti

##### *Dimetilsuccinato*

Il dimetilsuccinato (DMS) è un diestere che a temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore, la cui struttura chimica è riportata in Figura 3.1.

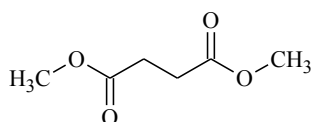


Figura 3.1. Struttura del dimetilsuccinato.

##### *Trietilenglicole*

Il trietilenglicole (TEG) è un diolo ottenuto dalla condensazione, con conseguente eliminazione di due molecole d'acqua, di tre glicoli etilenici, la cui struttura chimica è riportata in Figura 3.2. A temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore e inodore.

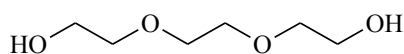


Figura 3.2. Struttura del trietilenglicole.

##### *1,4-Butandiolo*

L'1,4-butandiolo è un diolo costituito da quattro atomi di carbonio, la cui struttura è riportata in Figura 3.3.

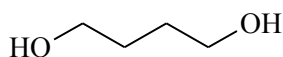


Figura 3.3. 1,4-butandiolo.

### *Titanio (IV) tetrabutossido*

Il titanio tetrabutossido (TBT) viene impiegato come catalizzatore in fase di sintesi. A temperatura ambiente si presenta come un liquido trasparente, dal colore giallo chiaro. La sua struttura (Figura 3.4) è la seguente:

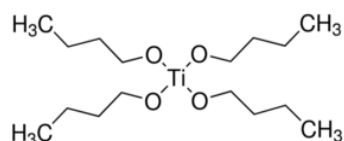


Figura 3.4. Struttura del titanio tetrabutossido.

### *Stagno ottanoato*

Nei processi industriali lo stagno ottanoato ( $\text{Sn}(\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_2)_2$ ) (Figura 3.5) è il catalizzatore più utilizzato per la polimerizzazione attraverso l'apertura d'anello, considerata la sua elevata attività e una notevole efficacia nel ridurre l'insorgenza di reazioni di transesterificazione parallele innescate dall'elevata temperatura.

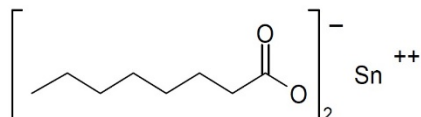


Figura 3.5. Unità strutturale dello stagno ottanoato.

### *Esametilendiisocianato*

L'esametilendiisocianato, o HDI (Figura 3.6), è un estensore di catena contenente due gruppi isocianato alle proprie estremità che, reagendo con i gruppi ossidrilici terminali delle catene polimeriche, rendono possibile l'estensione della catena attraverso formazione del legame uretanico.

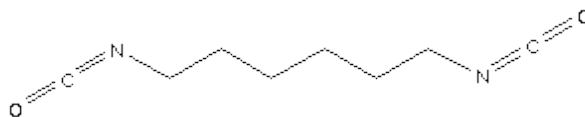


Figura 3.6. Esametilendiisocianato.

### 3.1.2 Descrizione della sintesi dei polimeri

#### 3.1.2.1 Sintesi del PBS-OH

La sintesi è stata eseguita tramite policondensazione in massa a due stadi, utilizzando come monomeri di partenza il dimetilsuccinato (DMS) e l'1,4-butandiolo. Si è lavorato in condizioni di eccesso (50%) del diolo rispetto al diestere.

Tutti i reagenti e il catalizzatore sono stati caricati nel reattore di polimerizzazione simultaneamente all'inizio del processo di sintesi.

Il primo stadio della reazione è stato condotto alla temperatura di 185 °C, sotto flusso controllato di azoto e con un'agitazione di 100 giri al minuto. In questa prima fase (Figura 3.7) hanno luogo le reazioni di transesterificazione diretta con successiva eliminazione di specie a basso peso molecolare, nel caso in esame molecole di metanolo, allo scopo di spostare l'equilibrio della reazione verso i prodotti. Il primo stadio dura circa 2 ore. Il secondo stadio (Figura 3.8) ha inizio quando almeno il 90% del metanolo teorico è raccolto nella trappola di condensazione mediante distillazione. Qui avvengono le reazioni di transesterificazione degli oligomeri che, mantenendo i tempi di reazione non molto lunghi, portano alla formazione di polimeri a basso peso molecolare. Durante questa fase la temperatura viene aumentata di 10 °C ogni 30 minuti, fino al raggiungimento di 220 °C. Contemporaneamente, la pressione all'interno del reattore viene ridotta fino a 0,07 mbar grazie all'impiego di una pompa da vuoto, al fine di rimuovere, tramite distillazione, l'eccesso di diolo. Una volta raggiunti i valori desiderati di temperatura e pressione, questi vengono mantenuti costanti fino al termine della reazione (circa 3 ore). Il catalizzatore impiegato nella sintesi è il tetrabutossido di titanio  $Ti(OBu)_4$  (TBT), in quantità pari a 200 ppm per grammo di polimero teoricamente ottenibile.

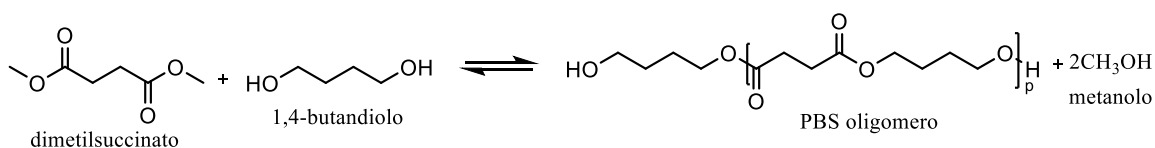


Figura 3.7. Transesterificazione di dimetilsuccinato e 1,4-butandiolo.



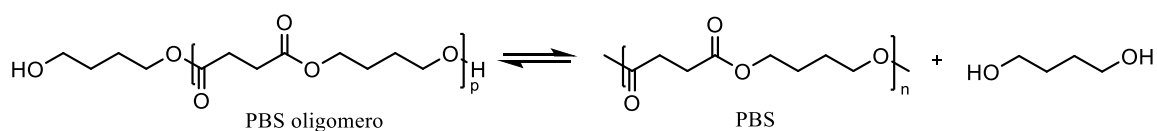


Figura 3.8. Transesterificazione degli oligomeri.

Il sistema finale per eseguire la reazione è mostrato in Figura 3.9:

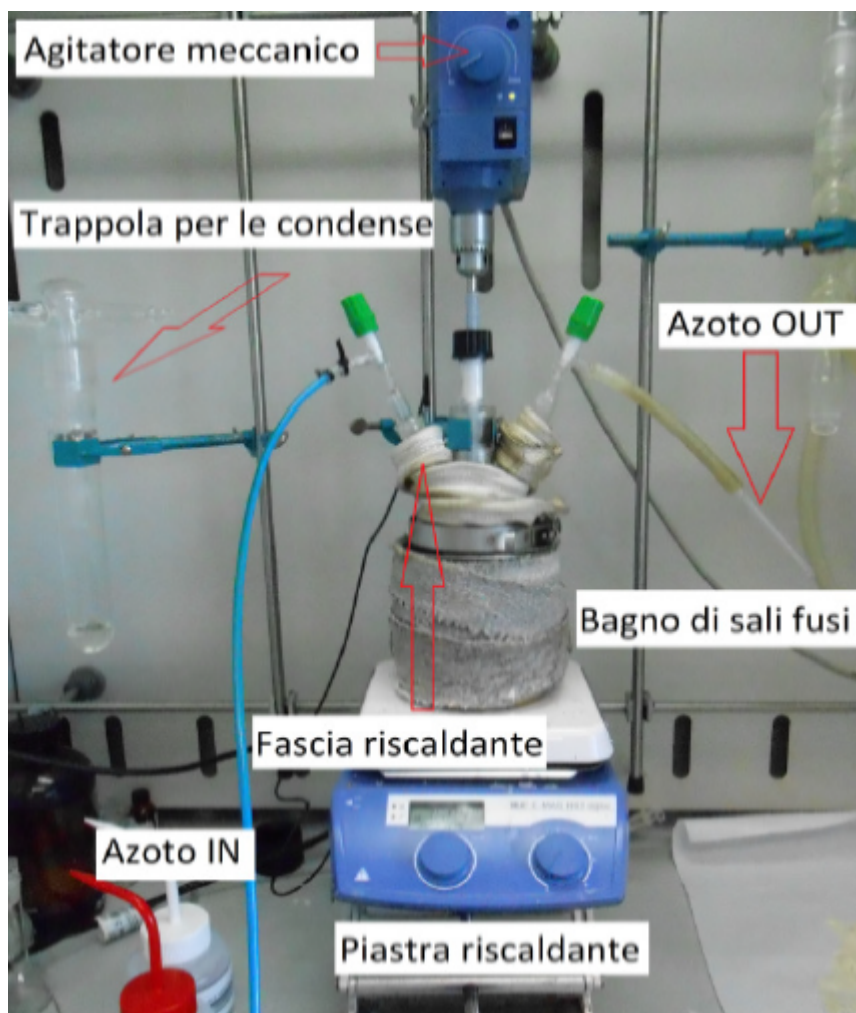


Figura 3.9. Impianto per la sintesi.

La strumentazione utilizzata si compone di un reattore in vetro a tre colli, immerso in un bagno di sali inorganici (nitrati e nitriti di potassio e sodio) che garantiscono il mantenimento di una temperatura uniforme e costante. Il sistema di agitazione dei reagenti è di tipo meccanico, formato da un albero motore su cui sono attaccati degli estensimetri che misurano il momento torcente necessario a mantenere costante la rotazione delle pale. Esse, infatti, a causa dell'aumento della viscosità del fluido dovuta all'incremento del peso

molecolare, incontrano maggiore resistenza al procedere della polimerizzazione. Temperatura e torque vengono costantemente monitorati durante la reazione.

Non è stato utilizzato nessun solvente durante la sintesi.

Alla fine della reazione si è aperto il pallone e si è lasciato raffreddare fino a temperatura ambiente.

### 3.1.2.2 Sintesi del PTES-OH

Il procedimento è identico a quello descritto per il PBS ad eccezione della tipologia di glicole che viene fatto reagire con il dimetilsuccinato. In questo caso, infatti, è stato usato il trietilenglicole e non il butandiolo.

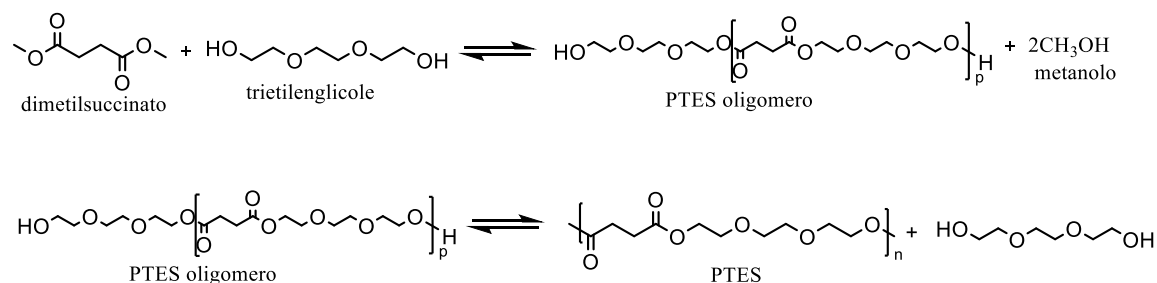


Figura 3.10. Transesterificazione di dimetilsuccinato e trietilenglicole seguita da transesterificazione degli oligomeri.

### 3.1.2.3 Sintesi del PLLA

L'omopolimero acido poli-L-lattico (PLLA) è stato sintetizzato a partire dal L-lattide (LL) e dal butandiolo (BD), utilizzando come catalizzatore stagno ottanoato ( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ). Sono stati inseriti nel reattore 30 g di LL e circa 10 mg di BD, in modo da avere un rapporto in mole di 1/2000 e 100 ppm per grammo di polimero teorico di catalizzatore. La sintesi è stata condotta all'interno di un reattore in vetro, immerso in un bagno caldo di olio di silicone, con temperatura e torque costantemente controllati. All'interno del reattore viene fatto fluire azoto per rendere inerte l'ambiente. Il reattore utilizzato per la sintesi è analogo a quello mostrato nel paragrafo 3.1.2.1.

Lo schema della sintesi è riportato in Figura 3.11: inizialmente sono stati inseriti LL, BDe ( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ) a 170 °C e lasciati a reagire per 3 ore. Il butandiolo consente l'apertura dell'anello del lattide, agevolata dallo stagno ottanoato che fa "avvicinare" le due molecole.

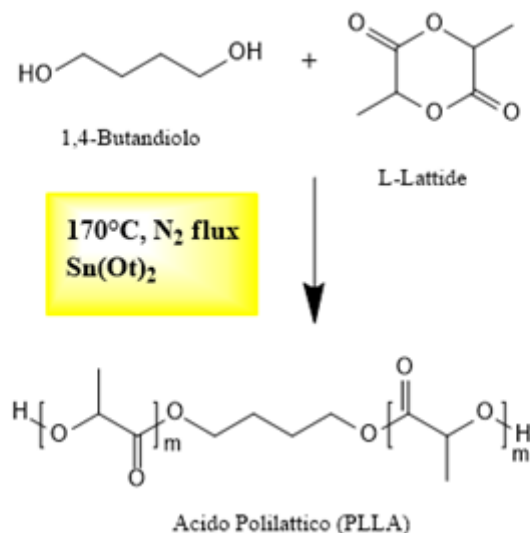


Figura 3.11. Schema di sintesi del PLLA.

### 3.1.2.4 Sintesi del copolimero P(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>)-OH

Il copolimero a blocchi poli(butilene/trietilene succinato) è stato ottenuto mediante miscelazione reattiva (reactive blending) degli omopolimeri PBS e PTES (in rapporto molare 1:1) in un reattore di vetro da 250 mL a 225 °C. Sono stati applicati un flusso controllato di azoto, per prevenire la degradazione, e un'agitazione costante di 50 rpm. Tutti i reagenti e il catalizzatore (titanio tetrabutossido, in quantità pari a 100 ppm per grammo di copolimero teoricamente ottenibile) sono stati caricati nel reattore di polimerizzazione simultaneamente all'inizio del processo di sintesi. Il processo è durato 10 minuti.

### 3.1.2.5 Sintesi del copolimero P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-OH

Il procedimento per la sintesi del copolimero statistico è identico a quello descritto per il copolimero a blocchi ad eccezione della durata della reazione e dell'agitazione. In questo caso, infatti, è stata applicata un'agitazione di 100 rpm e il processo è durato 80 minuti.

### 3.1.2.6 Sintesi del copolimero PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>)

Il copolimero triblocco **-A-B<sub>B</sub>-A-**, dove **A** indica i blocchi di PLA e **B<sub>B</sub>** i blocchi di P(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>), è stato ottenuto mediante polimerizzazione ad apertura d'anello (Figura 3.12) a partire dall'L-lattide e dal copolimero a blocchi P(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>)-OH (in rapporto in peso 40:60), precedentemente sintetizzato e purificato, in un reattore di vetro da 200 mL. In un primo momento nel reattore è stato inserito solo il copolimero ed è stato applicato il

vuoto, mantenendo un'agitazione costante di 100 rpm ed una temperatura di 160 °C. Dopo circa 30 minuti, sono stati aggiunti anche l'L-lattide ed il catalizzatore, in questo caso stagno ottanoato, in quantità pari a 100 ppm per grammo di polimero teoricamente ottenibile. La reazione è poi proseguita per circa 3 ore alla temperatura costante di 160 °C: durante questa fase, avviene la reazione di apertura ad anello *in situ* dell'L-lattide, ad opera dei gruppi terminali –OH del copolimero PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>).

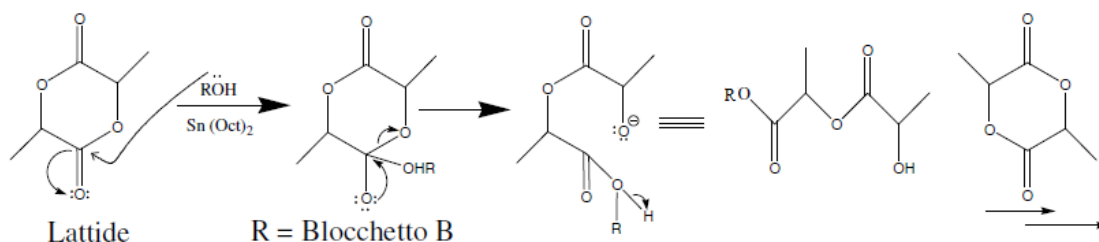


Figura 3.12. Polimerizzazione ad apertura d'anello a partire dall'L-lattide e dal copolimero a blocchi (Blocchetto B).

### 3.1.2.7 Sintesi del copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)

Il procedimento di sintesi del triblocco **-A-B<sub>R</sub>-A-**, dove **A** indica i blocchi di PLA e **B<sub>R</sub>** i blocchi di P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>), è identico a quello descritto per il copolimero PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>).

### 3.1.2.8 Sintesi del PLLA-CE

La sintesi del PLLA-CE è stata effettuata analogamente a quella del PLLA riportata nel paragrafo 3.1.2.3, aggiungendo al processo descritto lo step di allungamento di catena (*chain-extension (CE)*) inserendo esametilendiisocianato (HDI) in modo da avere un eccesso del 20% rispetto alle moli di BD, quindi circa 60 µL. Questa seconda fase è durata circa 2 ore.

L'HDI possiede due gruppi isocianato -NCO all'estremità della catena carboniosa che reagiscono con i gruppi ossidrilici terminali di PLLA. Questo consente alle catene distinte di PLLA, di potersi congiungere, attraverso legami uretanici, e formare una catena ancor più lunga, a più alto peso molecolare. In questo stadio (Figura 3.13) si osserva che il torque, azzerato prima dell'inserimento del HDI, raggiunge circa 9-10 N·cm, a conferma dell'aumento di peso molecolare.

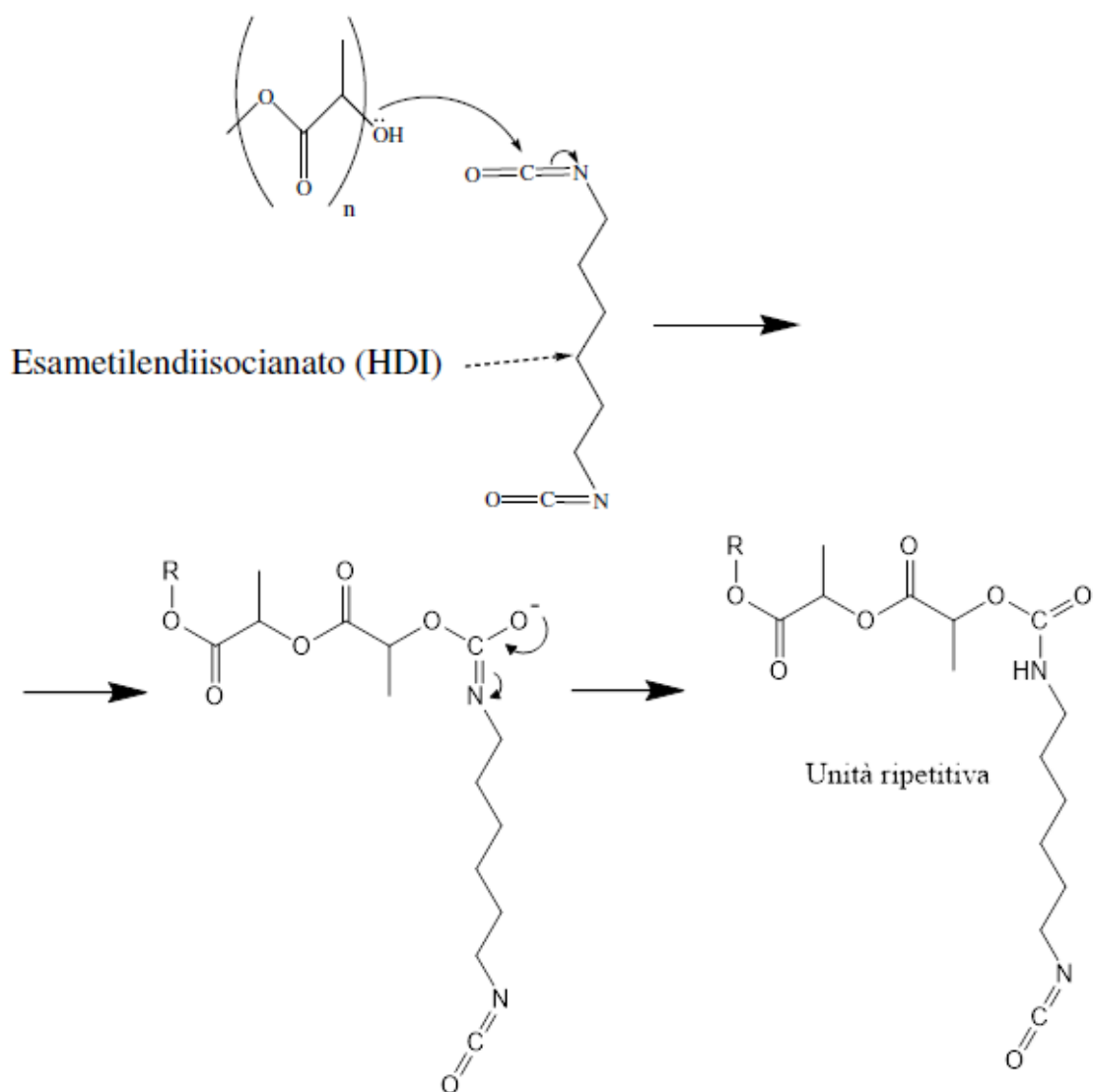


Figura 3.13. Meccanismo di *chain-extension* (CE).

### 3.1.2.9 Sintesi del copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE

Il copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE è stato sintetizzato a partire dal L-Lattide e dal P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>) con Sn(Oct)<sub>2</sub> come catalizzatore. La sintesi è stata condotta anche questa volta all'interno di un reattore in vetro, immerso in un bagno caldo di olio di silicone, con temperatura e torque costantemente controllati. Lo schema della sintesi è riportato in Figura 3.14: all'interno del reattore si è inserito il copolimero P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>) e la temperatura è stata portata a 170 °C, in atmosfera inerte. Una volta che il materiale è risultato fuso è stato applicato il vuoto, in modo che il solvente residuo presente nel copolimero P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>) fosse eliminato dal reattore. Sono stati poi aggiunti il lattide ed il catalizzatore, quest'ultimo in quantità pari a 100 ppm per grammo di polimero teorico. Durante questa

fase, della durata di 3 ore, avviene la reazione di apertura dell'anello *in situ* del L-Lattide, ad opera dei gruppi terminali -OH del blocco centrale B (P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)). Nella seconda fase, della durata di circa 90 minuti, per favorire la crescita del peso molecolare è stata effettuata la *chain-extension*, inserendo 60 µl di HDI; anche in questo caso, dopo l'inserimento del HDI, il torque è aumentato sino a circa 7 N·cm.

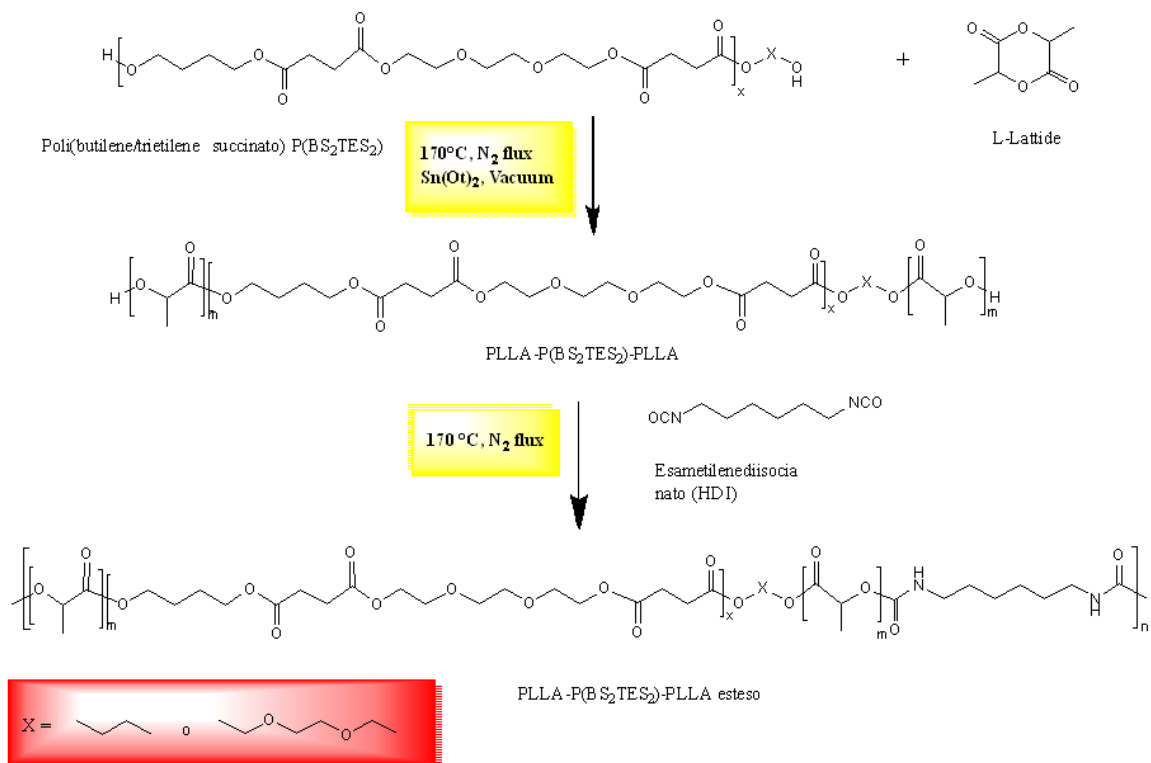


Figura 3.14. Schema delle reazioni per la sintesi del copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE.

### 3.1.3 Purificazione dei polimeri ottenuti

Per eliminare residui monomerici, oligomeri e sottoprodotti indesiderati, i polimeri sono stati sciolti in cloroformio, mantenendo la soluzione in agitazione. Tale soluzione è stata poi fatta sgocciolare in un becher contenente un largo eccesso di metanolo, un non solvente: le catene più lunghe del polimero, a contatto con il metanolo, precipitano sul fondo del becher, mentre in soluzione restano le catene a più basso peso e le impurezze. Per recuperare il precipitato si è proceduto alla filtrazione con l'utilizzo di un filtro Büchner, collegato ad una pompa per l'applicazione del vuoto (Figura 3.15). Il polimero filtrato è stato infine lasciato a riposo per qualche giorno, in modo tale da permettere l'evaporazione del metanolo residuo.



Figura 3.15. Filtro Büchner con PLLA-CE.

### 3.1.4 Preparazione delle microparticelle

Le microparticelle, sia vuote che contenenti il desametasone (massa molecolare 392.461 g/mol, formula bruta  $C_{22}H_{29}FO_5$ ), farmaco corticosteroide appartenente alla classe degli antinfiammatori steroidei, sono state realizzate tramite miniemulsione “oil-in-water”.

Il polimero (100 mg) disciolto in  $CHCl_3$  (5 mL) è stato aggiunto ad una soluzione acquosa di sodio dodecil solfato SDS (0.3 wt%, 10 mL). L'emulsione della fase organica in quella acquosa è stata ottenuta tramite agitazione magnetica a temperatura ambiente per 30 min. Successivamente, mantenendo sempre il sistema in agitazione, il cloroformio è stato lasciato evaporare completamente per 50 minuti ottenendo così un'emulsione di microsfele in acqua.

L'emulsione è stata centrifugata a 1000 rpm per 3 minuti a 0 °C per separare microparticelle dal mezzo acquoso contenente le particelle di minori dimensioni. La scelta sia del tempo di evaporazione che dei giri della centrifuga effettuata sono frutto di un'ottimizzazione del processo di preparazione. Le particelle contenenti il farmaco sono state ottenute nelle stesse condizioni appena descritte, ma usando come solvente organico una soluzione di desametasone in  $CHCl_3$  (1 wt%).

### 3.1.5 Preparazione delle nanoparticelle

Nella presente Tesi sono state preparate sia le nanoparticelle vuote che quelle contenenti il farmaco, il desametasone (massa molecolare 392.461 g/mol, formula bruta  $C_{22}H_{29}FO_5$ ), farmaco corticosteroide appartenente alla classe degli antinfiammatori steroidei. Le particelle nanometriche sono state realizzate tramite miniemulsione “oil-in-water”.

Il polimero (50 mg) disciolto in  $CHCl_3$  (5 mL) è stato aggiunto ad una soluzione acquosa di sodio dodecil solfato SDS (0.3 wt%, 10 mL). L'emulsione della fase organica in quella

acquosa è stata ottenuta tramite agitazione magnetica a temperatura ambiente per 30 min. Successivamente, mantenendo sempre il sistema in agitazione, il cloroformio è stato lasciato evaporare completamente per 50 minuti ottenendo così un'emulsione di nanosfere in acqua.

L'emulsione è stata centrifugata a 1000 rpm per 3 minuti a 0 °C per separare le particelle più grandi da quelle più piccole, che rimangono sospese nel mezzo acquoso. La scelta sia del tempo di evaporazione che dei giri della centrifuga effettuata sono frutto di un'ottimizzazione del processo di preparazione. Le particelle contenenti il farmaco sono state ottenute nelle stesse condizioni appena descritte, ma usando come solvente organico una soluzione di desametasone in  $\text{CHCl}_3$  (1 wt%).

### **3.1.6 Preparazione di film polimerici**

La preparazione dei campioni sotto forma di film sottili è stata effettuata tramite pressofusione, utilizzando una pressa idraulica da laboratorio dotata di piastre in alluminio raffreddate ad acqua (*Carver Laboratory Press*, Figura 3.16). Circa 2,5 g di polimero sono stati inseriti tra due piastre di teflon con interposta una maschera di alluminio teflonato (per garantire film dallo spessore uniforme di circa 0,2 mm), le quali a loro volta sono state posizionate nella pressa precedentemente scaldata ad una temperatura di circa 30°C superiore alla temperatura di fusione del materiale (190°C per l'omopolimero PLLA-*CE* ad alto peso molecolare e 80°C per il copolimero triblocco PLLAP( $\text{BS}_2\text{TES}_2$ )-*CE*). Una volta fuso, il materiale è stato sottoposto all'effetto di una pressione costante del valore di 1,5 ton/m<sup>2</sup>, applicata per tre minuti; successivamente le piastre, mantenute in pressione, sono state raffreddate con acqua corrente fino a temperatura ambiente, in modo da garantire una veloce solidificazione del campione nella nuova forma. Prima delle prove di caratterizzazione e degradazione, il film del copolimero triblocco è stato tenuto a temperatura ambiente in essiccatore per almeno 4 settimane, per consentire al materiale di sviluppare una fase cristallina stabile.





Figura 3.16. Pressa da laboratorio Carver® su cui sono stati preparati i film.

## 3.2 Caratterizzazione

### 3.2.1 Caratterizzazione molecolare

#### 3.2.1.1 Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)

La spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) è una particolare tecnica d'indagine grazie alla quale è possibile determinare la struttura molecolare dei materiali. Essa si basa sul principio secondo il quale i nuclei dotati di spin non intero (come  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , i quali presentano spin pari a  $\frac{1}{2}$ ), se sottoposti ad un intenso campo magnetico esterno  $B_0$ , tendono ad orientarsi secondo la direzione del campo, alla stregua di piccoli magneti. I possibili orientamenti permessi sono due, uno parallelo al campo esterno (disposizione a bassa energia), l'altro antiparallelo (ad alta energia). L'orientamento assunto non è fisso ma, al contrario, è possibile passare da una disposizione all'altra attraverso la cessione o l'assorbimento di una quantità precisa di energia ( $E$ ), fornita attraverso un impulso elettromagnetico ad una determinata frequenza  $\nu$ . In corrispondenza di queste transizioni i nuclei si dicono in "risonanza" con la radiazione applicata; la frequenza necessaria per la risonanza dipende sia dall'intensità del campo magnetico esterno che dal tipo di nucleo in esame. Il segnale di output viene detto spettro NMR ed è costituito da picchi in

corrispondenza di frequenze più o meno elevate proprio a seconda dell'intorno chimico dell'atomo: un atomo di idrogeno, infatti, a seconda della elettronegatività dell'atomo a cui è legato, può essere più o meno immerso nei propri elettroni di legame, particelle cariche che, quando sono sottoposte al campo magnetico  $B_0$ , generano un piccolo campo magnetico indotto  $\beta_i$ , opposto a quello molto più forte applicato. Se l'idrogeno è legato ad atomi poco elettronegativi si trova più immerso negli elettroni di legame e sente un campo magnetico indotto  $\beta_i$  più intenso, che fa diminuire di più il campo applicato ( $B = B_0 - \beta_i$ ) e quindi subisce la transizione ad una frequenza minore. Se, invece, il protone è legato ad atomi più elettronegativi è meno schermato dagli elettroni di legame ed è investito da un campo indotto  $\beta_i$  più debole: esso sentirà quindi un campo effettivo più intenso ( $B = B_0 - \beta_i$ ) ed assorbirà a frequenze maggiori. La variazione di frequenza assorbita viene chiamata spostamento chimico; per quantificare tale spostamento è necessario individuare un idrogeno di riferimento al quale associare il valore zero della scala. Per convenzione lo zero è stato attribuito agli idrogeni del tetrametilsilano o TMS ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ), che sono tra i più fortemente schermati a causa della bassa elettronegatività del silicio, così che gli spostamenti chimici delle normali molecole organiche risultino sempre positivi.

Lo spostamento chimico assoluto è la differenza tra la frequenza (in Hz) assorbita dell'idrogeno in esame e quella dell'idrogeno del TMS (tetrametilsilano), che viene preso come riferimento:

$$\text{spostamento chimico assoluto} = \text{Hz (H in esame)} - \text{Hz (H TMS)}.$$

Lo spostamento chimico assoluto è proporzionale al campo applicato  $B_0$ , quindi strumenti che utilizzano campi magnetici diversi producono spostamenti chimici diversi. Per evitare errori si utilizza un'altra grandezza, lo spostamento chimico relativo  $\delta$  (misurato in ppm, cioè Hz/MHz), indipendente dal campo applicato, e definito come:

$$\delta = \Delta\nu/\nu_r,$$

dove  $\Delta\nu$  rappresenta la differenza tra la frequenza di risonanza  $\nu$  dell'atomo considerato e  $\nu_r$ , frequenza di risonanza dello standard. Tipicamente viene usato l' $^1\text{H}$ , e non il  $^{13}\text{C}$ , in quanto quest'ultimo, essendo un isotopo scarsamente presente in natura (solo lo 0.11% del carbonio esistente), darebbe origine a spettri dal basso rapporto segnale/rumore. Per  $^1\text{H}$ -NMR, la scala  $\delta$  si estende da 0 a 12 ppm; mentre per  $^{13}\text{C}$ -NMR è molto più grande e copre l'intervallo 0-220 ppm.

Un'ulteriore caratteristica della spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$  è il fatto che l'intensità del segnale è proporzionale al numero di idrogeni che generano il segnale stesso: l'integrale dell'area dei picchi è direttamente proporzionale al numero di idrogeni che lo hanno prodotto. Valutando l'area sottesa da ogni picco (relativamente all'area totale sottesa dalla curva del segnale) è possibile determinare il rapporto tra i vari atomi di idrogeno presenti. Dividendo poi tale area per il numero di idrogeni corrispondenti, si ottengono valori confrontabili con quelli dati dalla formula chimica del polimero.

Gli spettri sono stati ottenuti utilizzando uno spettrometro NMR Varian XL-400 (Figura 3.17). Le soluzioni sono state preparate sciogliendo circa 10 mg di polimero in cloroformio deuterato (0.03%). L'acquisizione è avvenuta a temperatura ambiente utilizzando una concentrazione dei polimeri pari al 0,5 wt% (con tempo di rilassamento di 0 s e tempo di acquisizione di 1 s per 100 ripetizioni).



Figura 3.17. Strumentazione per l'indagine NMR.

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

La cromatografia a permeazione di gel (GPC) è una tecnica di separazione fisica che consente di determinare la distribuzione del peso molecolare di un polimero. Il cromatografo è costituito da una pompa volumetrica, una colonna contenente particelle porose (polistirene reticolato con divinilbenzene), che fungono da setaccio chimico, e un rivelatore, generalmente a indice di rifrazione. I gel utilizzati per l'impaccamento delle colonne lavorano con il principio del "setaccio molecolare": il soluto che passa attraverso la colonna subisce un rallentamento proporzionale alle dimensioni delle particelle e alle dimensioni dei pori. Poiché non vi è alcun tipo di legame chimico tra soluto e gel, i primi picchi in uscita saranno quelli relativi alle molecole a peso molecolare maggiore (che non

passano attraverso i pori e quindi escono rapidamente); seguiranno i picchi relativi alle catene di peso inferiore le quali, permeando i percorsi creati dalla porosità del gel, impiegheranno un tempo maggiore a percorrere la colonna (Figura 3.18).

Il metodo di analisi dei campioni si basa sulla creazione di curve di taratura attraverso standard di polimeri a peso noto e su una successiva analisi per confronto.

Durante la scansione, in colonna scorre un solvente con portata volumetrica costante. I campioni da analizzare vengono sciolti nello stesso solvente che scorre in colonna, filtrati con una siringa (in modo da eliminare eventuali corpuscoli insolubili che ostruirebbero i pori), ed il filtrato viene dunque iniettato.

La soluzione uscente dalla colonna viene analizzata istante per istante da un rilevatore, che ha come output un segnale proporzionale alla concentrazione del soluto disciolto. Tale output è costituito da un grafico che riporta l'intensità del segnale in funzione del tempo. La conversione dalla scala temporale alla scala di pesi molecolari si ottiene mediante confronto con le curve di taratura.

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

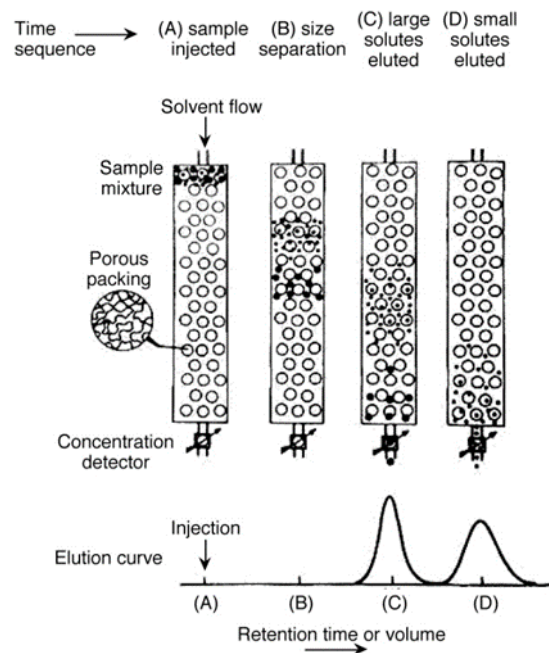


Figura 3.18. Principio di funzionamento delle colonne con gel.

### 3.2.2 Caratterizzazione termica

#### 3.2.2.1 Calorimetria differenziale a scansione

La calorimetria differenziale a scansione è una tecnica utilizzata per studiare le transizioni termiche dei materiali e determinarne le proprietà termodinamiche, in particolare temperatura di transizione vetrosa, punto di fusione e calore di fusione. Il principio di base consiste nel ricavare informazioni sul materiale attraverso un riscaldamento (o raffreddamento) controllato, ed il confronto con un riferimento sottoposto al medesimo programma termico.

La macchina (Figura 3.19) viene predisposta mettendo sugli alloggiamenti due crogioli identici scelti in modo da resistere alle temperature di prova senza interagire con il campione in esame. Uno dei due crogioli rimarrà vuoto, in quanto servirà come riferimento per la misura differenziale. Queste due celle sono microcalorimetri che, durante l'analisi, vengono mantenuti in atmosfera di azoto inerte. Durante tutto l'arco dell'esperimento, un sistema di termocoppie raccoglie i dati di temperatura e li invia ad un elaboratore, che mediante un apposito software li elabora per generare l'output.

Durante la scansione, quando non si verificano fenomeni di transizione di fase, campione e riferimento rimangono alla stessa temperatura; in caso contrario, si verificano degli squilibri termici, che vengono misurati dalle termoresistenze. Queste sono responsabili

della regolazione della potenza elettrica fornita ai microcalorimetri: il flusso di energia che viene fornito o sottratto è finalizzato a riportare il campione ed il riferimento alla medesima temperatura.

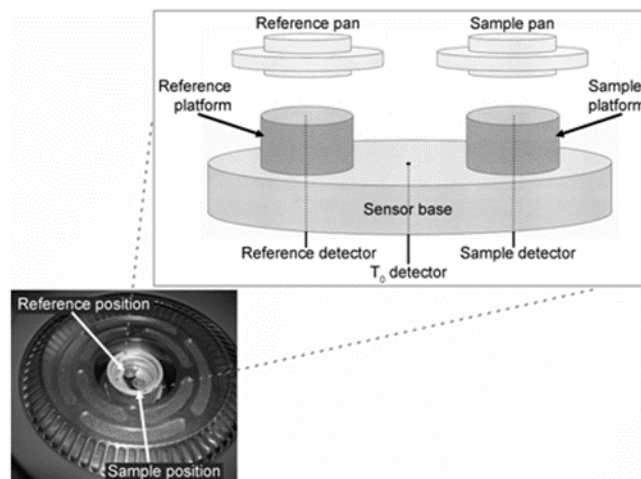


Figura 3.19. Schema degli alloggiamenti della DSC.

Per quanto riguarda l'analisi del termogramma, di cui un esempio è riportato in Figura 3.20, è possibile operare in endo-up o in endo-down; nel caso si operi in endo-up, per la fusione (fenomeno endotermico), sul termogramma si osserverà un picco rivolto verso l'alto che corrisponde all'aumento del flusso di calore in quanto, oltre una certa temperatura, l'agitazione molecolare è tale da vincere le forze di coesione nei cristalli, i quali fondono assorbendo calore. Per la cristallizzazione (fenomeno esotermico), si osserverà invece un picco rivolto verso il basso che corrisponde alla diminuzione del flusso di calore in quanto il materiale, ricristallizzando, cede energia. L'area sottesa al picco di fusione corrisponde al calore di fusione  $\Delta H_m$  [J/g], un parametro direttamente proporzionale al grado di cristallinità del polimero. Il rapporto tra quest'ultima grandezza ed il calore di fusione del polimero completamente cristallino costituisce il grado di cristallinità del materiale.

È inoltre possibile osservare la temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ), un parametro caratteristico dei solidi polimerici, rappresentante la soglia termica oltre la quale si verifica il passaggio dallo stato vetroso a quello gommoso, in cui sono permessi i movimenti di torsione e rotazione all'interno della catena polimerica. Si manifesta come una variazione endoterma della linea di base, ed il valore di  $T_g$  è determinato in corrispondenza della metà della variazione di calore specifico associata alla transizione. L'entità della variazione di

calore specifico associato alla transizione vetrosa, proporzionale alla componente amorfa presente nel materiale, è pari alla distanza verticale tra le linee di base da cui si estrapola la  $T_g$ :

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

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

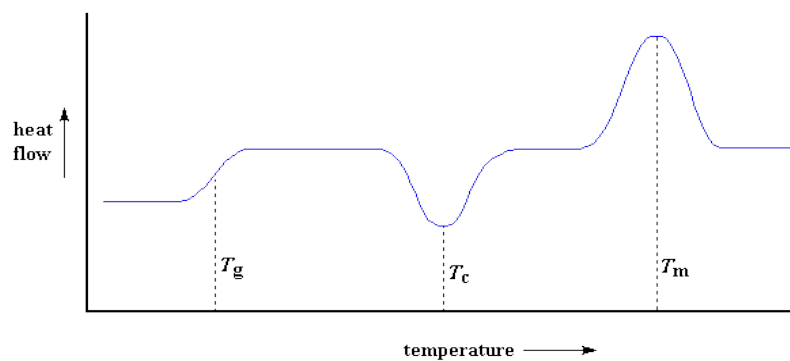


Figura 3.20. Esempio di termogramma.

Le misure DSC sono state ottenute con un DCS6 Perkin-Elmer equipaggiato di accessori per il raffreddamento a temperature minori di  $0^{\circ}\text{C}$  e calibrato con standard ad elevata purezza.

La capsula campione è stata riempita con circa 10 mg di materiale e, insieme alla capsula di riferimento lasciata vuota, è stata sottoposta ad un programma termico ben definito:

- prima scansione: isoterma della durata di 1 min a  $-70^{\circ}\text{C}$ , riscaldamento da  $-70^{\circ}\text{C}$  a  $200^{\circ}\text{C}$  con velocità di  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , raffreddamento rapido con velocità di  $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (il raffreddamento veloce impedisce la ricristallizzazione, perciò la seconda scansione verrà effettuata sullo stesso materiale ma in uno stato completamente amorfo) fino a  $-70^{\circ}\text{C}$ ;
- seconda scansione: riscaldamento in analoghe condizioni di temperatura e velocità.

### 3.2.2.2 Analisi termogravimetrica (TGA)

Mediante l'analisi termogravimetrica è possibile ottenere informazioni sia sulla cinetica del processo di decomposizione che sulla stabilità termica del materiale. Tali informazioni sono di fondamentale importanza per definire il valore di temperatura che non deve essere

oltrepastato nel trattamento del polimero, per non incorrere nella sua degradazione. Questa tecnica registra le variazioni di peso del campione quando viene sottoposto ad un graduale aumento di temperatura, in atmosfera controllata ( $N_2$ ,  $O_2$ , aria). I cambiamenti di peso sono dovuti a perdite di sostanze volatili in seguito a processi fisici o chimici che modificano la natura del composto; nel caso dei polimeri, i prodotti di decomposizione sono anidride carbonica e acqua.

La strumentazione utilizzata per la termogravimetria è composta da quattro parti: una bilancia termica, un forno, un sistema di gas di spurgo che assicura un ambiente inerte o reattivo a seconda del caso, ed un computer per il controllo dello strumento.

La curva termogravimetrica per un polimero ha l'andamento tipico illustrato in Figura 3.21. Tra le informazioni importanti che si possono dedurre da essa vi sono:

- $T_{5\%}$ : temperatura in corrispondenza della quale è avvenuta una perdita di peso pari al 5% del peso totale;
- $T_{max}$ : temperatura alla quale si ha la massima velocità di perdita di peso.

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

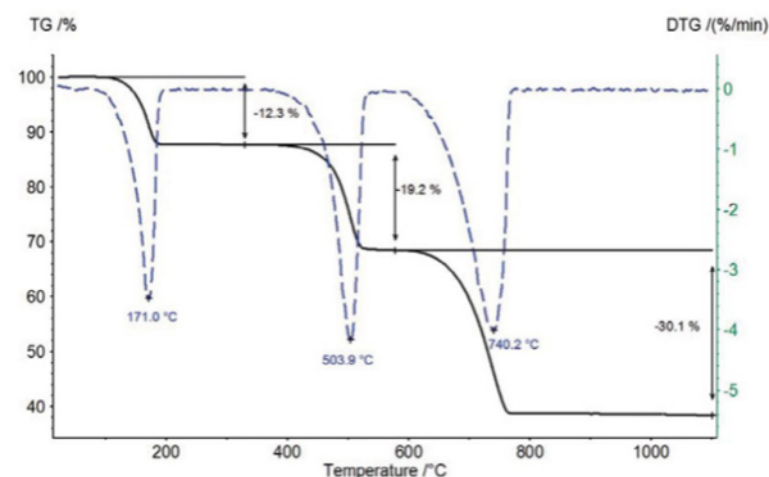


Figura 3.21. Curva termogravimetrica.

### 3.2.3 Analisi diffrattometrica a raggi X (WAXS)

La diffrattometria a raggi X (WAXS) è una tecnica analitica non distruttiva che permette la misura della distanza tra i piani reticolari di un materiale, parametro peculiare di ogni sostanza cristallina; tale tecnica fornisce informazioni, quindi, sulla struttura cristallina di



un materiale (grado di cristallinità, parametri della cella elementare, possibili polimorfismi e isomorfismi) studiando gli effetti dell'interazione tra un fascio di raggi X e la materia.

Il diffrattometro è costituito da un tubo generatore di raggi X, alcuni filtri monocromatori (che isolano una specifica lunghezza d'onda utile  $\lambda$ ) e collimatori, per convogliare le onde elettromagnetiche prodotte in una direzione preferenziale, un piatto porta-campione che viene investito dal fascio di onde, uno specchio monocromatore secondario ed, infine, un rivelatore.

Il principio di funzionamento della diffrattometria si basa sulla legge di Bragg:

$$n\lambda = 2d\sin(\theta),$$

dove  $n$  è un numero intero,  $\lambda$  è la lunghezza d'onda del raggio,  $d$  è la distanza tra i piani reticolari e  $\theta$  è l'angolo di incidenza (Figura 3.22) <sup>(20)</sup>. Questa formula descrive l'interazione tra il piano cristallino e la radiazione incidente, nelle ipotesi che i raggi incidenti siano tutti paralleli ed in fase tra loro, in modo da creare un'interferenza costruttiva, e permette di determinare la distanza di legame  $d$ , conoscendo la lunghezza d'onda selezionata e misurando l'angolo di incidenza.

I pattern di diffrazione a raggi X sono stati ottenuti utilizzando un diffrattometro PANalitycal X'PertPro equipaggiato con un rivelatore allo stato solido X'Celerator, che utilizza la  $\lambda$  del rame ( $\lambda = 0,15418$  nm). La frequenza in ascissa dei dati è descritta dal passo di  $0,10^\circ$  sul range  $[5-60^\circ]$  nell'intervallo  $2\theta$ .

Gli indici di cristallinità  $\chi_c$  si ricavano applicando la formula:

$$\chi_c = A_c/A_t,$$

dove  $A_c$  rappresenta l'area di diffrazione cristallina e  $A_t$  l'area totale del profilo di diffrazione.  $A_c$  è stata calcolata sottraendo all' $A_t$  la componente amorfa, modellata e approssimata come picco a campana sulla linea di base. È stato inoltre considerato lo scattering non coerente.

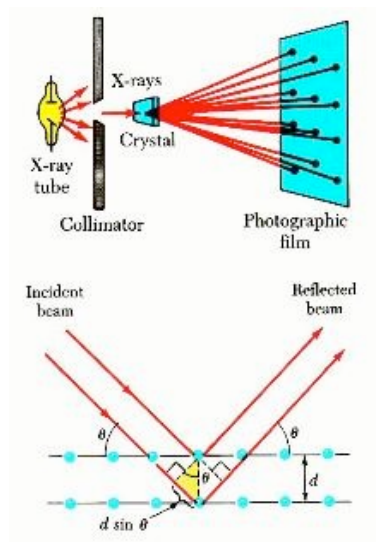


Figura 3.22. Legge di Bragg.

### 3.2.4 Caratterizzazione delle particelle

#### 3.2.4.1 Microscopia ottica (caratterizzazione microparticelle)

L'analisi dimensionale delle microparticelle è stata condotta mediante microscopia ottica in luce polarizzata. È stato utilizzato un microscopio Axioscop 2 Zeiss, equipaggiato con un tavolino riscaldante Linkam TMS94 e una telecamera montata direttamente sul microscopio e collegata al computer, tramite la quale è possibile acquisire immagini in tempo reale.

La sospensione di microparticelle è stata depositata su un vetrino da microscopio e, una volta evaporata l'acqua di sospensione, analizzata a temperatura ambiente.

#### 3.2.4.2 Light scattering dinamico (caratterizzazione nanoparticelle)

La dispersione della luce, o scattering, è una conseguenza dell'interazione della luce con il campo elettrico di una piccola particella o molecola. Un fotone incidente induce un dipolo oscillante nella nuvola di elettroni: con la variazione del dipolo, l'energia viene irradiata in tutte le direzioni; questa energia irradiata è chiamata "luce diffusa". La dispersione prodotta da particelle molto piccole, i cui diametri sono minori di un decimo della lunghezza d'onda del laser, è isotropa, cioè uguale in tutte le direzioni, e l'intensità della luce prodotta da queste è proporzionale a  $d^6$ , dove  $d$  è il diametro delle particelle.

Il *dynamic light scattering* (DLS) è una tecnica non invasiva, ormai affermata, chiamata anche *Photon Correlation Spectroscopy* (PCS) o *Quasi-Elastic Light Scattering* (QELS)

per la misura della dimensione di molecole, nanoparticelle o colloidi tipicamente sub-micrometrici, attraverso la rilevazione delle fluttuazioni della luce diffusa dovute al moto diffusionale di particelle sospese in un fluido (gas o soluzione).

L'interpretazione di un esperimento di DLS è basata sulle seguenti assunzioni:

- il volume di scattering contiene un elevato numero di particelle, così che l'ampiezza del campo elettrico di scattering è una variabile casuale Gaussiana complessa;
- l'intensità della luce di scattering proveniente dal solvente e piccole molecole è trascurabile rispetto allo scattering delle particelle di soluto;
- la luce incidente è polarizzata perpendicolarmente al piano di scattering e la luce diffusa ha la stessa polarizzazione;
- le particelle sono sufficientemente piccole e/o sferiche cosicché l'intensità di scattering individuale sia indipendente dal tempo.

Nelle misure DLS il campione viene illuminato da un raggio laser, e le variazioni d'intensità della luce diffusa vengono misurate in funzione del tempo. Le variazioni d'intensità misurate dal detector sono generate dal movimento browniano delle particelle (cioè il movimento casuale dovuto a collisioni causate dai bombardamenti delle molecole di solvente che le circondano), che entrano ed escono continuamente dal volume di misura, determinando oscillazioni dell'intensità, all'origine dello scattering. A parità di temperatura e di viscosità le particelle 'piccole' si muovono rapidamente, generando delle variazioni rapide dell'intensità di scattering, mentre le particelle 'grosse' si muovono più lentamente, generando delle variazioni d'intensità più lente (Figura 3.23). Grazie ad un'auto correlatore, la velocità delle variazioni d'intensità viene misurata, ed il coefficiente di diffusione delle particelle (D) calcolato dalla funzione di correlazione. L'equazione di Stokes Einstein:

$$D = k_B T / 6\eta\pi R_h,$$

con  $k_B$  = costante di Boltzmann, T = temperatura assoluta,  $\eta$  = viscosità del solvente, consente di convertire il coefficiente di diffusione in raggio idrodinamico ( $R_h$ ), che è il raggio di una sfera solida che diffonde alla stessa velocità della particella o della molecola esaminata.

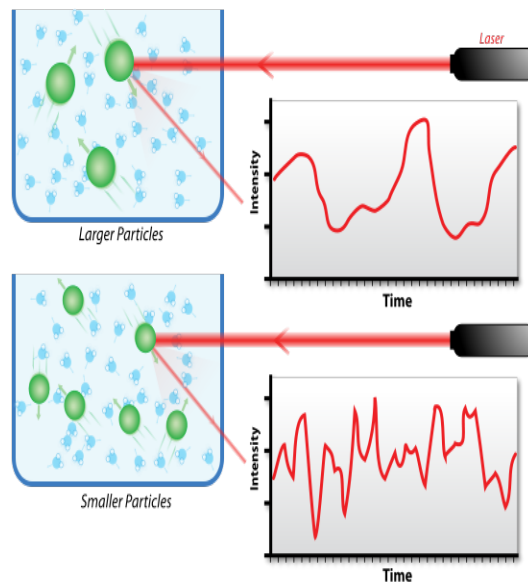


Figura 3.23. Ipotetica dispersione dinamica della luce per due campioni: le particelle più grandi sulla parte superiore e le particelle più piccole sul fondo.

La distribuzione primaria delle dimensioni viene visualizzata su un grafico dell'intensità relativa della luce diffusa dalle particelle in funzione delle varie classi dimensionali, che sono distanziate in scala logaritmica. Questa misura è sensibile alla presenza di grandi particelle, aggregati o polvere. Dalla distribuzione per intensità si possono ricavare anche le distribuzioni per volume e per numero (Figura 3.24).

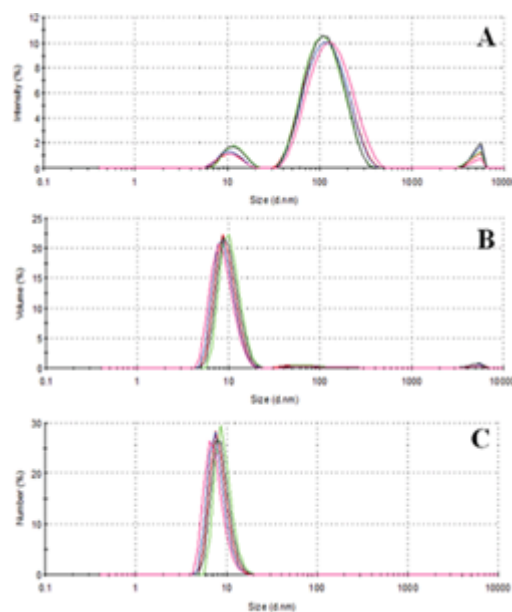


Figura 3.24. Distribuzione delle dimensioni per intensità (A), volume (B) e numero (C).

Un problema nelle misurazioni DLS può essere rappresentato dalla sedimentazione delle particelle: il tasso di sedimentazione dipende dalle dimensioni e dalla densità relativa delle particelle, nonché dal mezzo di sospensione. Per una buona misura, quindi, la velocità di sedimentazione dovrebbe essere molto più bassa rispetto a quella di diffusione.

Il DLS offre notevoli vantaggi rispetto alle tecniche classiche di *'light scattering'*, che sono inadeguate per descrivere sistemi che si presentano come aggregati non sferici. Il DLS non necessita, a differenza delle altre tecniche ottiche (*laser-induced incandescence*, LII, scattering statico, misure di estinzione), della conoscenza dell'indice di rifrazione della particella esaminata per l'analisi quantitativa dei dati. Per aggregati non sferici di particelle, questa tecnica fornisce la sola informazione del diametro, senza informazioni dirette sulla morfologia.

La distribuzione dei diametri idrodinamici ( $d_H$ ) delle particelle è stata ottenuta mediante misure DLS utilizzando lo strumento Malvern Nano ZS, dotato di un diodo laser (633nm). I campioni sono stati inseriti in cuvette di polistirene monouso aventi una lunghezza del cammino ottico di 1 cm. Tali cuvette sono state poi riempite di acqua. L'ampiezza della distribuzione del diametro idrodinamico è indicata dall'indice di polidispersità, o PDI; in caso di distribuzione monomodale (Gaussiana), questo valore è dato da:

$$PDI = [\sigma / Z_{AVG}]^2,$$

dove  $\sigma$  è l'ampiezza della distribuzione e  $Z_{AVG}$  il diametro medio della popolazione di particelle.

### 3.2.4.3 Cinetica di rilascio del farmaco (caratterizzazione micro- e nano-particelle)

Lo studio della cinetica di rilascio di una molecola nel tempo è articolata in tre fasi:

- mantenimento del polimero in ambiente controllato;
- prelievo di campioni di soluzione a intervalli di tempo ben definiti (la frequenza di prelievo è maggiore nelle prime ore di esame);
- determinazione dell'assorbanza delle soluzioni.

Durante la prima fase, la sospensione in mezzo acquoso delle particelle trattate con desametasone è stata inserita in una membrana per dialisi, precedentemente lavata in acqua distillata, immersa in 400 mL di soluzione tampone (pH 7.4) e incubata in agitatore termico impostato alla temperatura di 37°C e frequenza di 70 giri/min. A cadenza regolare sono stati prelevati 1,5 mL di soluzione, la quale è stata poi rimpiazzata con la medesima quantità di buffer puro. Le aliquote prelevate sono state analizzate allo spettrofotometro

Cary 1E (Figura 3.25), a lunghezza d'onda di 197/198 nm (analisi di assorbanza). Attraverso una curva di calibrazione, è stato possibile risalire ai valori di concentrazione di desametasone rilasciato dalle particelle.

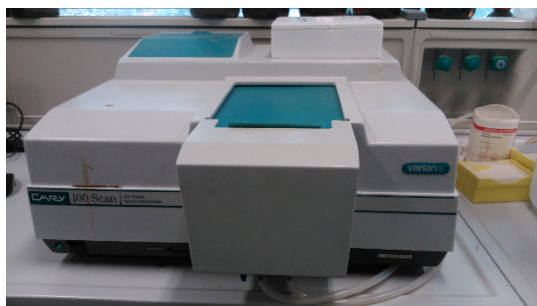


Figura 3.25. Spettrofotometro Cary 1E.

#### 3.2.4.3.1 Spettrofotometro a doppio raggio

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 (200 – 350 nm).

Per quanto riguarda gli spettrofotometri UV-visibile, i tipi più comuni sono quelli a “monoraggio” e a “doppio raggio”: i sistemi monoraggio vengono impiegati per le analisi qualitative, mentre gli spettrofotometri a doppio raggio, più complessi e costosi, consentono di effettuare anche analisi quantitative.

In generale, uno spettrofotometro è costituito da 5 componenti principali: sorgente di luce, selettore di lunghezza d'onda, portacampione, rivelatore, sistema di elaborazione dei dati. Per quanto riguarda la sorgente, si fa uso di raggi policromatici a spettro continuo, poi separati tramite monocromatori nelle varie componenti (radiazioni monocromatiche). Il campione viene inserito in una cuvetta di quarzo e collocato nel portacampione. Negli spettrofotometri a doppio raggio (Figura 3.26) si fa uso di due raggi, identici per frequenza e intensità, uno che attraversa il campione, l'altro che attraversa il “bianco”: in questo modo si ha un confronto continuo tra l'assorbanza dei due campioni.

Se una soluzione a concentrazione incognita è attraversata da una radiazione monocromatica (ad una determinata  $\lambda$ ) di intensità  $I_0$ , al rivelatore arriverà una radiazione di intensità  $I$ , che sarà minore di  $I_0$  se una parte della radiazione è stata assorbita, o uguale ad  $I_0$  se invece non si è verificato alcun assorbimento.

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

$$T = I/I_0.$$

Questa grandezza esprime la frazione di luce incidente che ha attraversato il campione senza essere assorbita, e può assumere valori compresi tra 0 e 1; tale rapporto è tanto più piccolo quanto maggiore è stato l'assorbimento. L'entità della radiazione assorbita è detta invece assorbanza (A), ed è pari all'opposto del logaritmo della trasmittanza:

$$A = - \ln T.$$

Riportando i valori registrati in un grafico lunghezza d'onda-assorbimento, si ottiene lo spettro di assorbimento della sostanza esaminata.

L'assorbimento è anche funzione della concentrazione: quando una radiazione attraversa una soluzione, essa viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione più o meno elevata della soluzione stessa; in funzione di questo principio è possibile effettuare anche analisi quantitative.

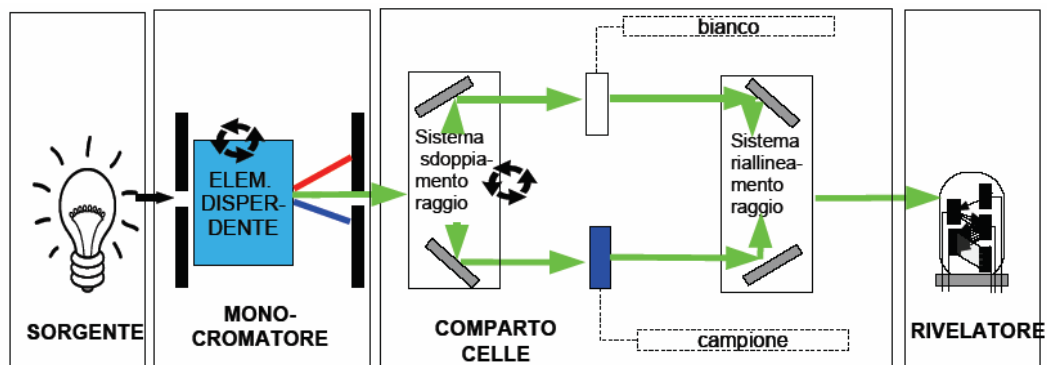


Figura 3.26. Spettrofotometro a doppio raggio.

### 3.2.5 Caratterizzazione meccanica

Le misure di resistenza meccanica vengono utilizzate per studiare il comportamento dei materiali polimerici in presenza di sollecitazioni di diverso tipo. Nelle prove tensili si definisce *stress* (tensione) il rapporto tra lo sforzo normale e l'area della sezione del provino a riposo:

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

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

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

Durante le prove meccaniche si misura l'allungamento in funzione del carico applicato. Il risultato viene riportato in un grafico tensione-deformazione, dove nell'asse delle ascisse si trova la deformazione  $\varepsilon$ , mentre nelle ordinate la tensione applicata  $\sigma$ . La curva ottenuta, di cui un esempio è riportato in Figura 3.27, è caratteristica del tipo di materiale e consente di estrapolarne informazioni quali il modulo elastico, la tensione e l'allungamento a rottura, la tensione di snervamento e la tenacità.

Durante la prima parte della curva l'andamento risulta sempre lineare: il materiale in questo tratto segue la legge di Hooke:

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

dove  $E$  è il modulo elastico o modulo di Young, il cui valore dà indicazione della "rigidezza" di un materiale. Il valore massimo della tensione per cui vale la legge di Hooke è detto limite di proporzionalità del materiale. Nel caso di materiali duttili, il limite di proporzionalità coincide con il limite di snervamento, che è il punto in cui il materiale inizia a deformarsi in maniera permanente, anche dopo la rimozione del carico, a causa dello scorrimento dei piani reticolari. Se il materiale duttile non supera questo limite, tolto il carico, torna alla sua forma originaria. Nel caso di materiali fragili, invece, la rottura si verifica in assenza di deformazione significativa. Se al campione continua ad essere applicato un carico crescente, si giunge a rottura, e la tensione corrispondente viene detta tensione di rottura.



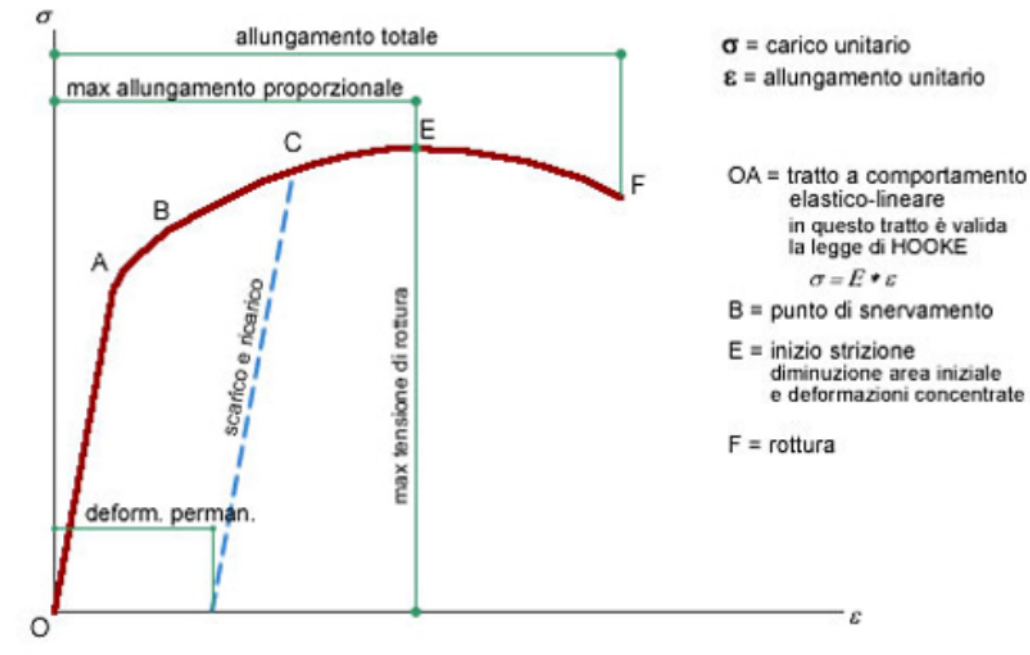


Figura 3.27. Esempio di curva *stress-strain*.

Dall'area sottesa alla curva  $\sigma$ - $\epsilon$  ottenuta è possibile determinare la tenacità del materiale. Occorre tenere presente che i dati ottenuti, oltre ad essere funzione del materiale, risentono anche delle condizioni ambientali, quali temperatura e umidità, e delle condizioni sperimentali, come velocità di scorrimento, forma e dimensioni dei provini.

Le prove meccaniche sono state condotte utilizzando un dinamometro Instron 4465 con cella di carico di 100 N. Lo strumento è costituito da una struttura rigida di base e una traversa mobile posta nella parte superiore. A partire dai film polimerici, sono state ottenute striscioline rettangolari dalle dimensioni di 5x41 mm, il cui spessore è stato misurato in tre punti diversi per mezzo di un micrometro: lo spessore utilizzato ai fini dell'analisi è stato ottenuto operando una media sulle tre misure. I provini sono stati dunque fissati per mezzo di agganci, in modo tale da presentare un tratto utile di 20 mm, e l'applicazione del carico è avvenuta tramite il movimento verso l'alto della struttura superiore; il valore della forza impressa è stato misurato dalla cella di carico, mentre l'allungamento è stato determinato sulla base della distanza percorsa dalla traversa mobile. Le prove sono state condotte a temperatura ambiente, su 5 provini diversi per ogni campione, con velocità pari a 5 mm/min. Il modulo elastico, calcolato dalla pendenza del tratto iniziale della curva sforzo-deformazione ottenuta, è stato riportato come valore medio  $\pm$  deviazione standard delle 5 prove.

### *Misure meccaniche stress-strain e cicliche*

Le misure meccaniche stress-strain e cicliche sono state eseguite utilizzando il Texture della Zwick/Roell.

I campioni di film, delle dimensioni di 50 mm x 5 mm (altezza x larghezza), sono stati posti fra due morsetti in gomma. La distanza tra i morsetti è stata fissata pari a 23 mm.

Lo spessore dei campioni è stato determinato con il misuratore digitale.

I parametri utilizzati per seguire le misure stress-strain sono:

- pre-load: 1 MPa
- velocità del pre-load: 5 mm/min
- tempo di attesa al pre-load: 30 sec
- velocità del test: 50 mm/min
- cella di carico: 500 N

I parametri utilizzati per eseguire le prove cicliche:

- pre-load: 1 MPa
- velocità del pre-load: 5 mm/min
- tempo di attesa al pre-load: 30 sec
- numero di cicli: 20

### **3.2.6 Studi di degradazione idrolitica**

Gli studi di degradazione idrolitica permettono di verificare il comportamento dei polimeri, in particolare la loro velocità di degradazione, in un ambiente simile a quello corporeo (37°C e pH 7.4). Gli esperimenti sono stati effettuati sui film polimerici purificati, che sono stati pesati (15-20 mg circa) e poi inseriti in 4 mL di tampone fosfato (preparato aggiungendo a 800 ml di acqua distillata 8 g di NaCl, 0.2 g di KCl, 1.44 g di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0.24 g di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; il pH della soluzione è stato aggiustato al valore di 7.4 per aggiunta di HCl e il volume finale portato ad 1 litro). I campioni sono stati inseriti all'interno di un incubatore (Julabo SW22) e mantenuti a 37 °C con agitazione di 100 rpm per periodi di tempo variabili. Nel presente lavoro di tesi sono state preparate e incubate 18 provette per ciascun polimero.

Periodicamente i campioni sono stati rimossi dalla soluzione, lavati con acqua distillata ed essiccati sotto vuoto a temperatura ambiente fino a raggiungere un peso costante. I campioni, prelevati in triplicato a diversi tempi di degradazione, sono stati pesati per misurare la perdita di peso e analizzati tramite GPC, NMR e DSC.

### 3.2.7 Determinazione dell'angolo di contatto

"Le misure dell'angolo di contatto sono generalmente utilizzate per determinare la bagnabilità di una superficie.

L'angolo di contatto è una grandezza termodinamica definita come l'angolo compreso tra il solido e la tangente formata dal profilo della goccia nel punto di contatto. Deponendo una goccia di un liquido sulla superficie liscia di un solido, a seconda della bagnabilità del liquido nei confronti di quel solido, la goccia formerà un determinato angolo di contatto con il solido. Per convenzione si definiscono idrofobiche le superfici aventi un angolo di contatto con l'acqua maggiore di 90 °C, idrofiliche le superfici con angoli minori di 90°C.

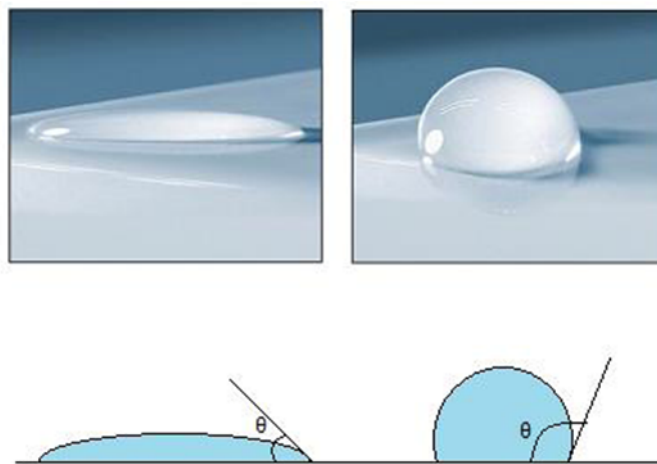


Figura 3.28. Correlazione bagnabilità superficiale-angolo di contatto: elevata bagnabilità per  $\theta < 90^\circ$ , ridotta bagnabilità per  $\theta > 90^\circ$ .

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 (Gene Whyman *et al*, 2008):

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

Le misure dell'angolo di contatto sono state effettuate mediante lo strumento DAS 03, formato da un banco ottico costituito da una sorgente di luce ad intensità regolabile, una telecamera digitale dotata di zoom ottico con funzione di rivelatore (in quanto riprende la caduta e la deposizione della goccia sul campione) e da un piatto portacampione mobile

interposto tra le due. Sopra al portacampione è installato un sistema dosatore del liquido ad elevata precisione, comandato elettronicamente. 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. I campioni da analizzare sono stati precedentemente sottoposti a una serie di lavaggi consecutivi con una soluzione al 70% v/v EtOH/H<sub>2</sub>O e con acqua distillata, per rimuovere eventuali residui grassi dalla superficie, ed essiccati sotto vuoto, a temperatura ambiente, per mezzo di P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Per ogni campione sono state depositate 5 gocce di acqua deionizzata da 4 µL ciascuna, ad una velocità di 100 µL/min, in punti del provino sempre diversi, al fine di evitare il contatto con superfici già bagnate. Le prove sono state condotte a temperatura ambiente. I dati di angolo di contatto per ogni provino sono espressi come valori medi ricavati dalle 5 misure ± deviazione standard." <sup>(40)</sup>

## CAPITOLO 4: Risultati e discussioni

### 4.1 Sintesi e caratterizzazione molecolare

A temperatura ambiente tutti i campioni a basso peso molecolare (non CE) si presentano come solidi semicristallini di colore bianco, ad eccezione di PTES-OH che è una gomma di colore giallo chiaro.

L'acido poli-L-lattico *chain* esteso (PLLA-CE) appena sintetizzato si presenta, a temperatura ambiente, come un solido bianco semitrasparente e piuttosto rigido. Dopo la purificazione, lo stesso materiale assume una forma a “fiocchi” sempre di colore bianco, come evidente dalla Figura 3.15 del paragrafo 3.1.3. Il film ottenuto dai “fiocchi” di PLLA-CE per pressofusione risulta un solido bianco, rigido e molto fragile.

Il copolimero triblocco PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE appena sintetizzato è invece un solido gommoso, opaco e di colore marrone chiaro. Come si può notare dalla Figura 4.1, il materiale stirato si allunga notevolmente, dopo il rilascio ha un buon recupero di forma anche se non ritorna del tutto alla sua dimensione originaria. Il processo di purificazione nel caso del PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE ha determinato uno schiarimento del materiale: da marrone chiaro a giallo.



Figura 4.1. PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE appena scaricato dal reattore e stirato a temperatura ambiente.

Tutti i materiali oggetto della presente Tesi risultano caratterizzati da una buona solubilità nei più comuni solventi organici, quali cloroformio, diclorometano e tetracloroetano. Nella Tabella 4.1 sono riportati i dati della caratterizzazione molecolare dei polimeri idrossil-terminati sintetizzati:

<b>Polimeri</b>	<b>M<sub>n</sub></b>	<b>BS (mol%)</b>	<b>TES (mol%)</b>	<b>b</b>	<b>L<sub>BS</sub></b>	<b>L<sub>TES</sub></b>
PBS-OH	4900	100	-	-	-	-
PTES-OH	14100	-	100	-	-	-
P(BS <sub>13</sub> TES <sub>12</sub> )-OH	15900	53	47	0.16	13	12
P(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> )-OH	16700	53	47	1	2	2

Tabella 4.1. Caratterizzazione molecolare di PBS-OH, PTES-OH, P(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>)-OH e P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-OH: dati ottenuti da analisi NMR.

La struttura chimica, la composizione, il peso molecolare e la distribuzione delle sequenze, sono stati determinati tramite spettroscopia <sup>1</sup>H-NMR. Gli spettri ottenuti sono risultati coerenti con la struttura prevista, permettendo di escludere la presenza di reazioni secondarie durante la polimerizzazione.

Lo spettro in Figura 4.2 mostra i segnali caratteristici del PBS-OH. A δ 4.19 ppm e a δ 1.70 ppm sono registrati i segnali dei protoni metilenici della subunità glicolica, *b* e *c* rispettivamente, mentre a δ 2.61 ppm si trova il singoletto ascrivibile agli idrogeni della subunità acida, *a*. Oltre ai segnali sopracitati, che sono relativi alle unità ripetitive interne, nello spettro è anche possibile distinguere la presenza di altri due picchi, *b'* e *c'*, dovuti ai protoni metilenici delle subunità glicoliche esterne.

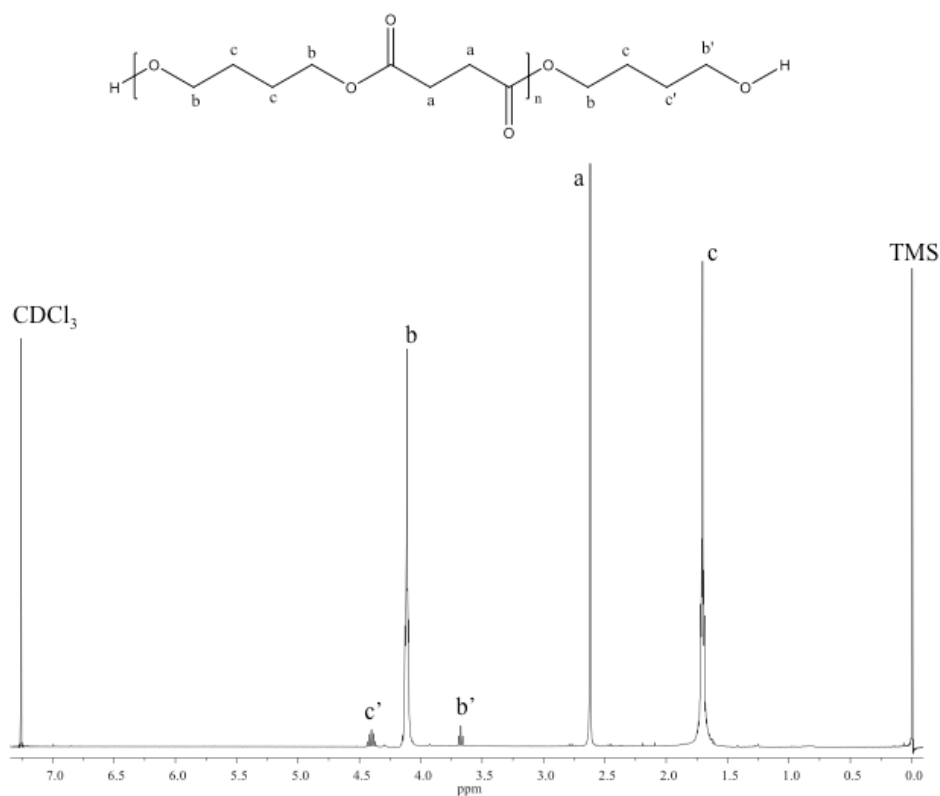


Figura 4.2. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del PBS-OH con attribuzione dei picchi.

Dall'analisi NMR è stato inoltre possibile calcolare il peso molecolare medio delle catene polimeriche ( $M_n$ ), utilizzando la formula:

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

dove  $W_{ur}$  e  $W_{glicole}$  sono rispettivamente il peso molecolare dell'unità ripetitiva e del glicole, e DP corrisponde a:

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

in cui  $I_b$  è l'area sottesa dai segnali dei protoni delle unità glicoliche esterne  $b'$ , mentre  $I_{b'}$  è l'area dei segnali metilenici delle stesse unità interne  $b$ .

Il peso molecolare medio per il PBS-OH, determinato tramite  $^1\text{H-NMR}$ , è risultato pari a 4900 g/mol (vedi Tabella 4.1).

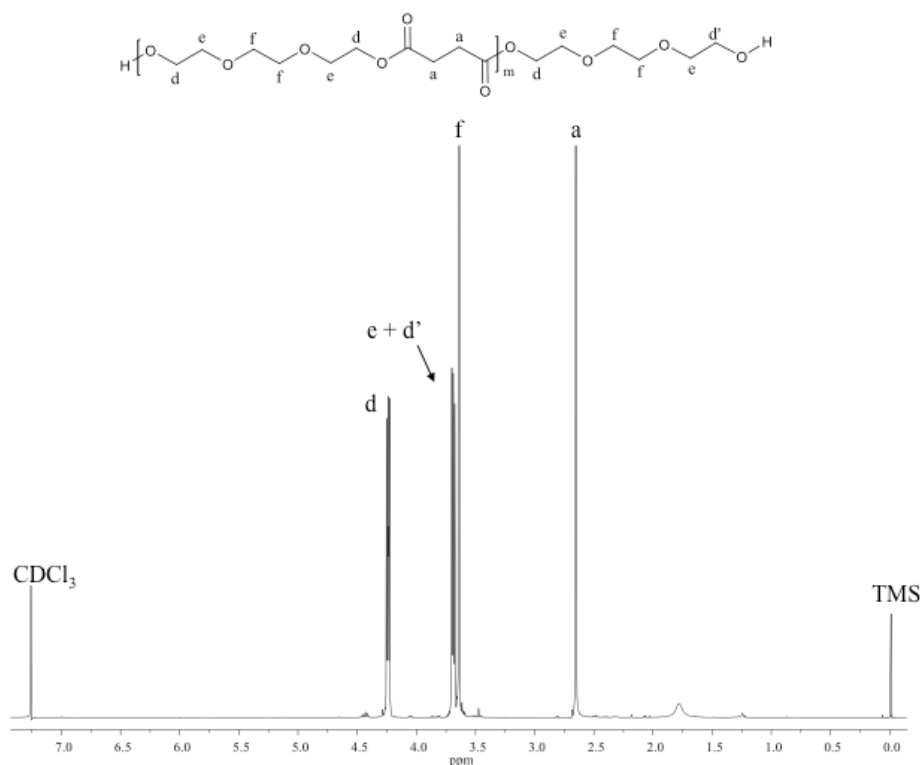


Figura 4.3. Spettro <sup>1</sup>H-NMR del PTES-OH con attribuzione dei picchi.

Lo spettro in Figura 4.3 mostra i segnali caratteristici del PTES-OH. A  $\delta$  4.25 ppm, a  $\delta$  3.70 ppm e a  $\delta$  3.64 ppm sono registrati i segnali dei protoni metilenici della subunità glicolica, rispettivamente *d*, *e* ed *f*, mentre a  $\delta$  2.65 ppm si trova il singoletto ascrivibile agli idrogeni della subunità acida, *a*. Oltre ai segnali sopracitati, che sono relativi alle unità ripetitive interne, nello spettro è presente anche il contributo *d'*, dovuto ai protoni metilenici delle subunità glicoliche esterne, che cadono nella stessa zona dei protoni *e*. Anche per il PTES-OH è stato possibile calcolare il peso molecolare medio delle catene polimeriche ( $M_n$ ) dall'analisi NMR, secondo la formula:

$$M_n = DP * W_{ur} + W_{glicole},$$

dove  $W_{ur}$  e  $W_{glicole}$  sono rispettivamente il peso molecolare dell'unità ripetitiva e del glicole, e DP corrisponde a:

$$DP = \left[ \frac{I_d/2}{I_{d'}} \cdot 2 \right] + 1$$

in cui  $I_{d'}$  è l'area sottesa ai segnali dei protoni delle unità glicoliche esterne *d'*, mentre  $I_d$  è l'area dei segnali metilenici delle stesse unità interne *d*. Per determinare il contributo di *d'* si è sottratta all'area del picco totale *e + d'*, l'area del picco *d* in quanto quest'ultima è uguale all'area del segnale dei soli protoni *e*.



Il peso molecolare medio per il PTES-OH, determinato tramite  $^1\text{H-NMR}$ , è risultato pari a 14100 g/mol (vedi Tabella 4.1).

Come descritto nella Parte Sperimentale, i due omopolimeri idrossil-terminati, PBS-OH e PTES-OH, sono stati copolimerizzati tramite miscelazione reattiva per ottenere due copolimeri con la stessa composizione equimolare ma con diversa lunghezza dei blocchi. In Figura 4.4 è riportato lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  del copolimero  $\text{P}(\text{BS}_{13}\text{TES}_{12})\text{-OH}$ . Nell'inserto della stessa figura è riportata la zona relativa ai protoni *a* sia del copolimero  $\text{P}(\text{BS}_{13}\text{TES}_{12})\text{-OH}$  che del copolimero  $\text{P}(\text{BS}_2\text{TES}_2)\text{-OH}$ .

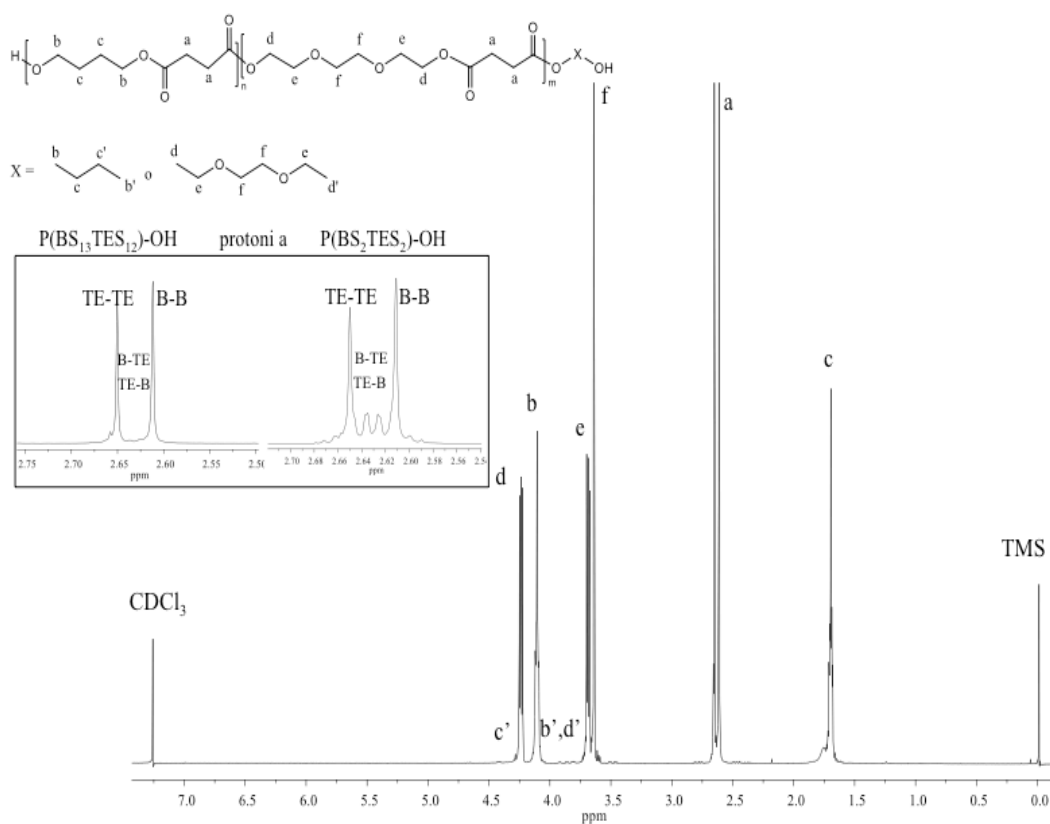


Figura 4.4. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del  $\text{P}(\text{BS}_{13}\text{TES}_{12})\text{-OH}$  con attribuzione dei picchi. Nell'inserto è evidenziata la zona dei protoni *a* sia del  $\text{P}(\text{BS}_{13}\text{TES}_{12})\text{-OH}$  che del  $\text{P}(\text{BS}_2\text{TES}_2)\text{-OH}$ .

Dallo spettro è possibile notare la presenza dei segnali corrispondenti sia alle unità butilene succinato (BS) che alle unità trietilene succinato (TES). L'analisi NMR ha permesso di determinare la composizione dei due copolimeri dall'area dei picchi dei protoni *b* della subunità butandiolo a  $\delta$  4.19 ppm e dall'area del segnale dei metileni *d* della subunità trietileneglicole a  $\delta$  4.25 ppm.

La composizione molare per entrambi i copolimeri, riportata in Tabella 4.1, risulta molto vicina a quella di alimentazione (BS: 53 mol%; TES: 47 mol%).

I due copolimeri differiscono però nella lunghezza dei blocchi BS e TES, come si può notare dalla zona tra 2.65 e 2.61 ppm corrispondente ai metileni *a* dell'unità succinica (vedi inserto Figura 4.4). I picchi dei protoni *a* dell'unità acida dei segmenti BS sono rilevabili a 2.61 ppm, mentre quelli dei segmenti TES a 2.65 ppm. Oltre al segnale dei suddetti protoni, è possibile evidenziare anche la presenza di picchi nella zona intermedia tra 2.65 e 2.61 ppm, dovuti alla risonanza dei protoni *a* delle forme miste (in cui l'unità succinica è legata al butandiolo da una parte e al trietilene glicole dall'altra), la cui intensità aumenta con il tempo di miscelazione.

La microstruttura del copolimero è stata dedotta dal grado di staticità **b**. È ben noto che **b** è uguale a 1 per i copolimeri random, 2 per i copolimeri alternati e compreso tra 0 e 1 per i copolimeri a blocchi, in funzione della loro lunghezza. Il calcolo di **b**, per il quale si è fatto riferimento ai picchi di risonanza degli idrogeni della subunità succinica, può essere espresso come:

$$\mathbf{b} = P_{\text{TE-B}} + P_{\text{B-TE}},$$

dove  $P_{\text{TE-B}}$  e  $P_{\text{B-TE}}$  corrispondono rispettivamente alla probabilità di trovare un'unità trietilene accanto ad una butilene e alla probabilità di trovare un'unità butilene accanto ad una trietilene. Tali probabilità possono essere espresse nella forma:

$$P_{\text{TE-B}} = [(I_{\text{TE-B}} + I_{\text{B-TE}})/2] / [(I_{\text{TE-B}} + I_{\text{B-TE}})/2 + I_{\text{TE-TE}}],$$

$$P_{\text{B-TE}} = [(I_{\text{TE-B}} + I_{\text{B-TE}})/2] / [(I_{\text{TE-B}} + I_{\text{B-TE}})/2 + I_{\text{B-B}}],$$

dove  $I_{\text{TE-B}}$ ,  $I_{\text{B-TE}}$ ,  $I_{\text{TE-TE}}$ ,  $I_{\text{B-B}}$  sono le intensità integrate dei picchi di risonanza dei protoni *a* relativi rispettivamente alle sequenze TE-B, B-TE, TE-TE e B-B. La lunghezza dei blocchi è definita come:

$$L_{\text{TES}} = 1/P_{\text{TE-B}},$$

$$L_{\text{BS}} = 1/P_{\text{B-TE}}.$$

I valori di lunghezza dei blocchi BS ( $L_{\text{BS}}$ ) e TES ( $L_{\text{TES}}$ ) e del grado di statisticità **b** nei due copolimeri preparati sono riportati in Tabella 4.1. Dai risultati si può notare come la lunghezza media del blocco diminuisca all'aumentare del tempo di miscelazione; il grado di statisticità, al contrario aumenta con il tempo di mescolamento, a riprova di un avanzamento delle reazioni di transesterificazione.

Anche per i copolimeri P(BSTES)-OH è stato possibile calcolare il peso molecolare medio delle catene polimeriche ( $M_n$ ) dall'analisi NMR, secondo la formula:

$$M_n = DP * W_{ur} + W_{glicole},$$

dove  $W_{ur}$  e  $W_{glicole}$  sono rispettivamente il peso molecolare dell'unità ripetitiva e del glicole, e DP corrisponde a:

$$DP = \left[ \frac{(I_b)/2 + (I_d)/2}{I_b I_d} * 2 \right] + 1$$

in cui  $I_b$  e  $I_d$  sono l'area sottesa dai segnali dei protoni delle unità glicoliche esterne  $b'$  e  $d'$ , mentre  $I_b$  e  $I_d$  rappresentano l'area dei segnali metilenici delle stesse unità interne  $b$  e  $d$ . Per determinare il contributo di  $d'$  si è sottratta all'area del picco totale  $e + d'$ , l'area del picco  $d$  in quanto quest'ultima è uguale all'area del segnale dei soli protoni  $e$ .

Il peso molecolare medio per il copolimero a blocchi P(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>)-OH, è risultato pari a 15900 g/mol, mentre quello del copolimero statistico P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-OH a 16700 g/mol.

Come descritto nella Parte Sperimentale, i copolimeri P(BSTES)-OH sono stati copolimerizzati, tramite reazione di apertura d'anello, con l'L-lattide. Tale strategia sintetica ha permesso di ottenere due copolimeri triblocco di tipo -**A-B-A**- in cui il blocco **A** è formato da unità di acido poli-L-lattico e il blocco **B** è formato alternativamente dai due copolimeri, a blocchi (**B<sub>B</sub>**) o statistico (**B<sub>R</sub>**), P(BSTES)-OH. I materiali ottenuti sono stati indicati come PLLAP(BS<sub>L</sub>TES<sub>L</sub>), dove L = 13,12 nel caso del copolimero a blocchi, L = 2 nel caso del copolimero statistico.

Lo spettro <sup>1</sup>H-NMR del l'acido poli-L-lattico (PLLA), omopolimero di riferimento, è riportato in Figura 4.5 insieme all'attribuzione dei segnali.

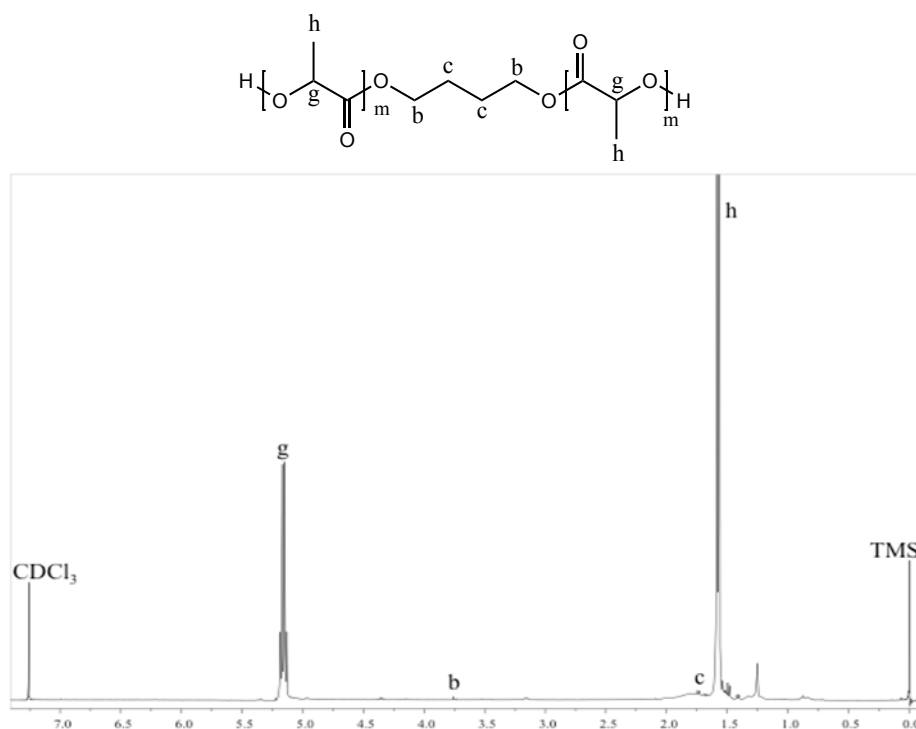


Figura 4.5. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del PLLA con attribuzione dei picchi.

Oltre alla presenza dei segnali del solvente  $\text{CHCl}_3$  e del riferimento TMS, sono presenti i picchi di risonanza dell'unità ripetitiva dell'acido polilattico: il quadrupletto a  $\delta$  5.21 ppm corrispondente all'idrogeno *g* e il doppietto a  $\delta$  1.59 ppm relativo al gruppo metilico *h*. Inoltre, è possibile evidenziare la presenza dei picchi *b* e *c*, ascrivibili all'iniziatore (butandiolo).

La Figura 4.6 riporta lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  del copolimero triblocco PLLAP( $\text{BS}_2\text{TES}_2$ ). Si possono osservare, oltre ai picchi *a*, *b*, *c*, *d*, *e* ed *f* relativi ai segmenti del copolimero statistico  $\text{P}(\text{BS}_2\text{TES}_2)\text{-OH}$ , anche i segnali *g* e *h* corrispondenti agli idrogeni presenti nella subunità lattica.

La percentuale in peso dei segmenti di acido polilattico PLLA rispetto alla componente copolimérica  $\text{P}(\text{BSTES})$  è stata calcolata facendo riferimento all'area del picco *g* per il PLLA e all'intensità del picco *a* per il blocco centrale  $\text{P}(\text{BSTES})$ . I risultati sono riportati in Tabella 4.2.

La composizione per entrambi i copolimeri risulta molto simile a quella di alimentazione.

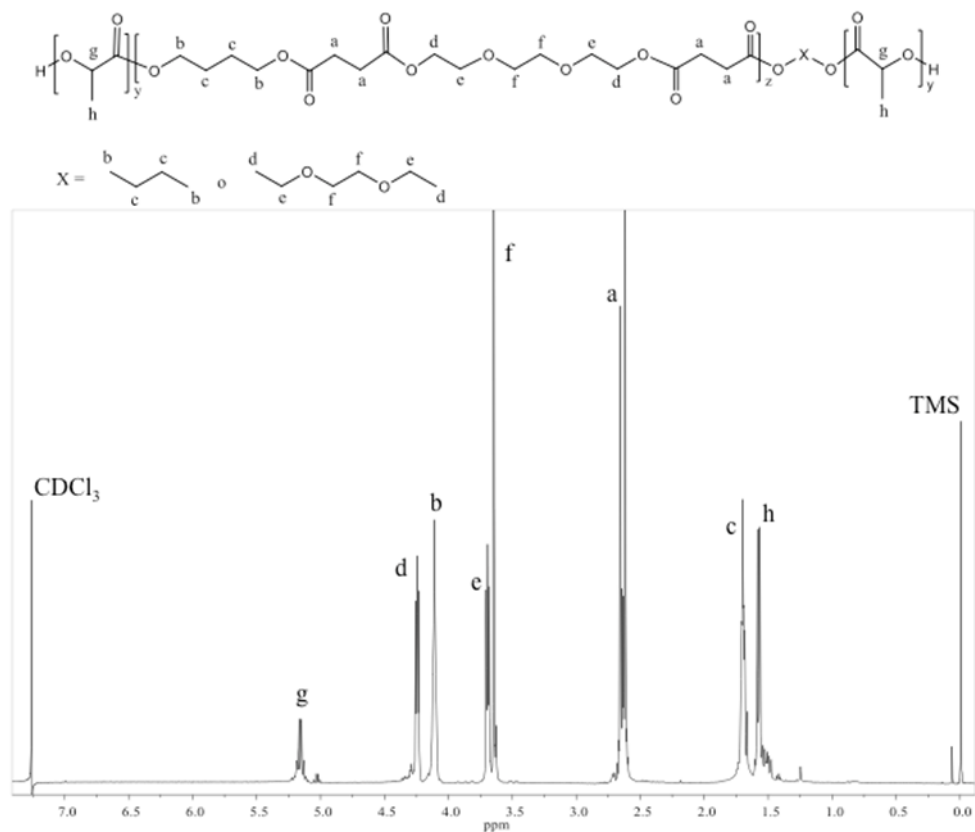


Figura 4.6. Spettro <sup>1</sup>H-NMR del copolimero triblocco PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>) con relativa attribuzione dei picchi.

In Figura 4.7 è riportato lo spettro <sup>1</sup>H-NMR del PLLA *chain* esteso (PLLA-CE), con relativa assegnazione dei picchi. Oltre ai segnali dovuti al cloroformio (CDCl<sub>3</sub>) e al riferimento (TMS), risultano ben visibili, il quadrupletto a δ 5.19 ppm e il doppietto a δ 1.57 ppm relativi ai protoni **g** e **h** dell'unità ripetitiva di acido lattico. Molto meno intensi, ma comunque visibili, i segnali ascrivibili all'iniziatore butandiolo, **b** e **c**, che cadono rispettivamente a δ 3.76 e δ 1.74 ppm, e i picchi dovuti all'estensore esametilene diisocianato, **i**, **k** e **j**, che si manifestano rispettivamente a δ 3.18 e a δ 1.55 ppm.

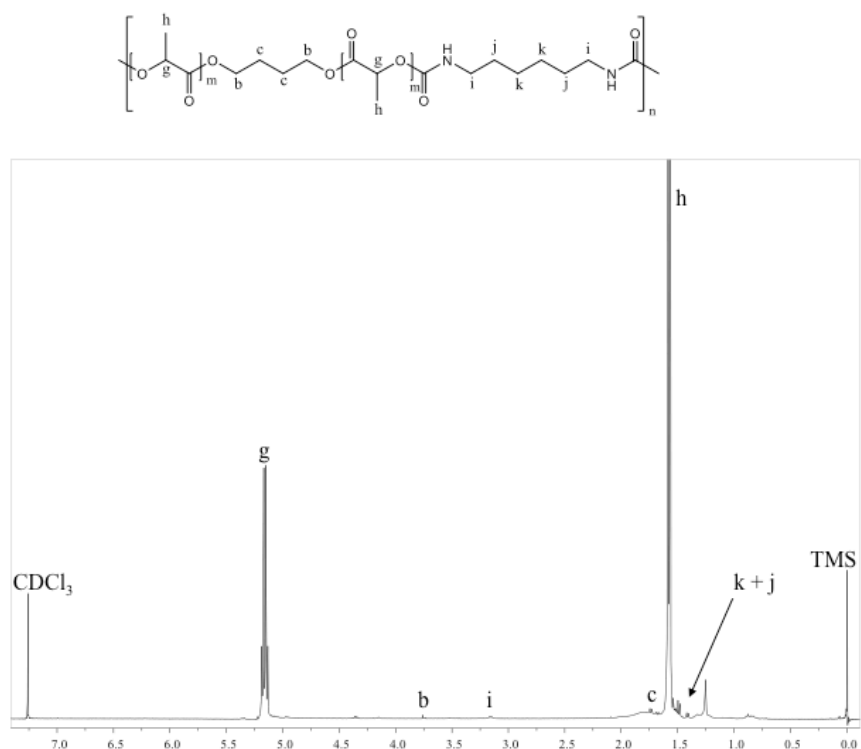


Figura 4.7. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  dell'acido poli-L-lattico *chain* esteso (PLLA-CE) con assegnazione dei picchi.

In Figura 4.8 è riportato lo spettro del copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE insieme all'attribuzione dei segnali. Per il copolimero triblocco *chain* esteso, oltre alla presenza dei picchi caratteristici dell'unità ripetitiva di acido lattico (**g** e **h**) e ai segnali dovuti ai protoni **i**, **k** e **j**, ascrivibili al HDI, si distinguono anche i picchi dovuti alle unità butilene succinato (BS) e trietilene succinato (TES). In particolare, è possibile rilevare i multipletti **b** e **c** dell'unità butilenica a  $\delta$  4.19 e a  $\delta$  1.73 ppm, insieme ai tripletti **d** ed **e**, e il singoletto **f** dell'unità trietilenica a  $\delta$  4.25, a  $\delta$  3.70 e a  $\delta$  3.65 ppm, rispettivamente. Per quanto riguarda la componente acida, il segnale degli idrogeni **a** relativi alla subunità succinica, presente sia nei segmenti BS che in quelli TES, è localizzato nella zona tra 2.65 e 2.61 ppm. L'analisi NMR ha permesso di determinare la composizione del blocco centrale P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>) dall'area dei picchi dei protoni **b** della subunità butandiolo a  $\delta$  4.19 ppm e dall'area del segnale dei metileni **d** della subunità trietileneglicole a  $\delta$  4.25 ppm. La percentuale molare delle due unità ripetitive all'interno del blocco centrale è risultata essere: BS 53 mol% e TES 47 mol%.

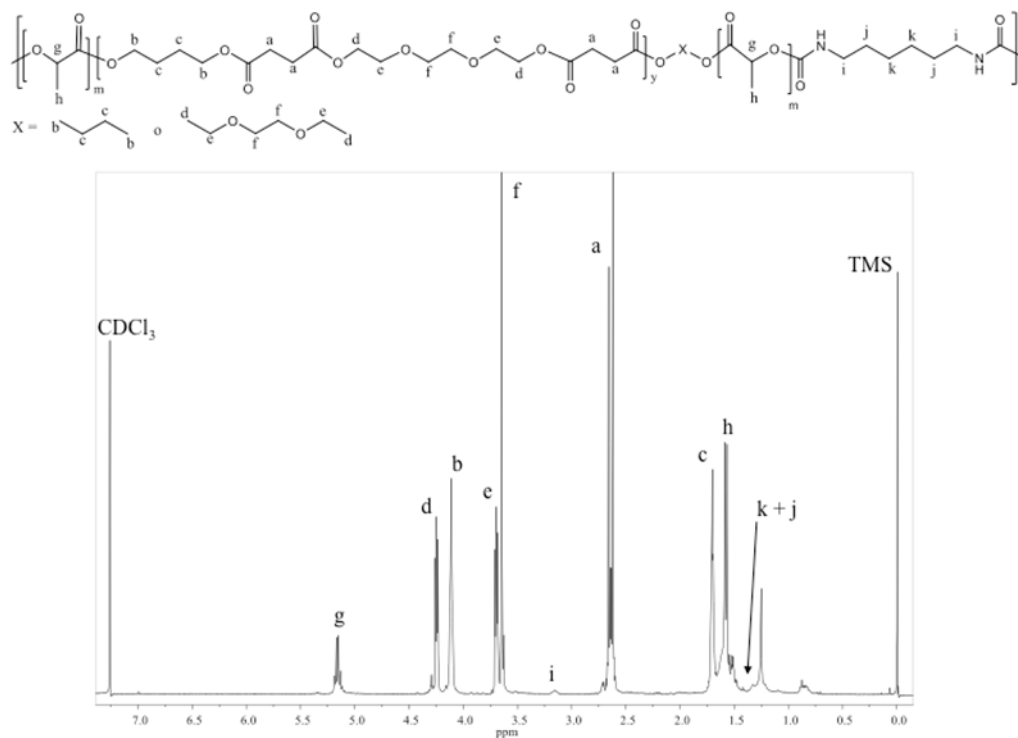


Figura 4.8. Spettro del PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE con assegnazione dei picchi.

Mediante analisi <sup>1</sup>H-NMR è stata calcolata anche la composizione del blocco centrale P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>) rispetto ai blocchi PLLA. In questo caso si è fatto riferimento all'area dei picchi di risonanza dei protoni **g** della sub-unità LLA (localizzati a δ 5.19 ppm) e dei protoni **a** della sub-unità succinica dei segmenti BS e TES (localizzati nella zona tra 2.65 e 2.61 ppm). La composizione in peso del blocco PLLA e del blocco P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>) è riportata in Tabella 4.2.

In Tabella 4.2 sono riportati i pesi molecolari dei polimeri sintetizzati, dotati di bassa polidispersità *D*, ottenuti da misure GPC: i campioni non *chain* estesi sono contraddistinti da pesi molecolari confrontabili tra loro, mentre i polimeri sottoposti ad estensione di catena possiedono un peso molecolare accettabilmente alto, a riprova di un buon controllo delle condizioni di reazione.

Polimeri	M <sub>n</sub> (g/mol)*	D*	PLLA (wt%)**	P(BSTES) (wt%)**	WCA (°)
PLLA	19300	1.2	100	-	95±3
PLLAP(BS <sub>13</sub> TES <sub>12</sub> )	16600	1.4	30	70	80±4
PLLAP(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> )	17500	1.4	33	67	89±3
PLLA-CE	31200	1.2	100	-	-
PLLAP(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> )-CE	36200	1.2	24	76	-

Tabella 4.2. Dati di caratterizzazione molecolare dell'omopolimero PLLA e dei copolimeri triblocco: \*dati ottenuti da analisi GPC e \*\*dati ottenuti da analisi NMR.

Come evidenziato dai dati riportati in Tabella 4.2, i due copolimeri risultano più idrofili dell'omopolimero PLLA, e l'effetto risulta più consistente per il copolimero PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>), in cui il blocco centrale è costituito dal copolimero P(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) con architettura a blocchi. Per quanto concerne l'aumento di idrofilicità osservato nei copolimeri rispetto all'omopolimero, questo è ascrivibile alla presenza nel blocco centrale di atomi di ossigeno etero, che, essendo elettronegativi, rendono le macromolecole più polari. Riguardo l'effetto più marcato nel caso del copolimero a blocchi, il risultato è in perfetto accordo con i dati precedentemente ottenuti dal gruppo di ricerca presso cui è stata condotta la presente Tesi sui copolimeri PBSPTES a diversa architettura molecolare<sup>(23)</sup>: nel copolimero a blocchi lunghi le sequenze idrofile TES si accumulano sulla superficie per maggiore affinità con l'acqua. Nel copolimero statistico le sequenze TES e BS sono troppo corte perché tale riorganizzazione possa avere luogo.

#### 4.2 Caratterizzazione termica e diffrattometrica

La caratterizzazione dei materiali è proseguita sottoponendoli alle seguenti analisi:

- analisi termogravimetrica (TGA);
- analisi calorimetrica (DSC);
- analisi diffrattometrica ai raggi X (WAXS).

Le curve TGA dei polimeri studiati sono riportate in Figura 4.9. I campioni PBS-OH, PTES-OH, P(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>)-OH e P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-OH (Figura 4.9 a)) sono caratterizzati da simile stabilità termica, nettamente superiore a quella del PLLA. Per tutti questi polimeri, la perdita di peso avviene in un unico stadio ed è praticamente del 100%, eccezion fatta per il PTES, che presenta un residuo di circa l'8%. Le curve TGA dei due copolimeri



triblocco si collocano tra quella del PLLA e quelle dei polimeri a base PBS e PTES e presentano una perdita di peso a due step, la cui altezza è legata alla composizione dei copolimeri. Il primo stadio è ascrivibile alla degradazione del PLLA (l'intensità dello step che si manifesta a temperatura più bassa aumenta all'aumentare del contenuto di PLLA presente nel copolimero), mentre il secondo al copolimero P(BSTES). Il PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) risulta termicamente più stabile del PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>). Le curve TGA del PLLA-CE e del copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE sono riportate in Figura 4.9 b). I polimeri *chain* estesi hanno entrambi una buona stabilità termica che risulta però diversa nei due casi: il PLLA risulta meno stabile (temperatura di inizio decomposizione pari a 250 °C) del copolimero che inizia a degradare superati i 300 °C. Anche in questo caso la perdita di peso avviene in un unico stadio per l'omopolimero e in due stadi per il copolimero. L'altezza di tali stadi è legata alla composizione del copolimero. Il primo stadio è riconducibile alla degradazione del PLLA, mentre il secondo a quella del blocco centrale poli(butilene/trietilene succinato). In conclusione, la copolimerizzazione del PLLA ne migliora la stabilità termica.

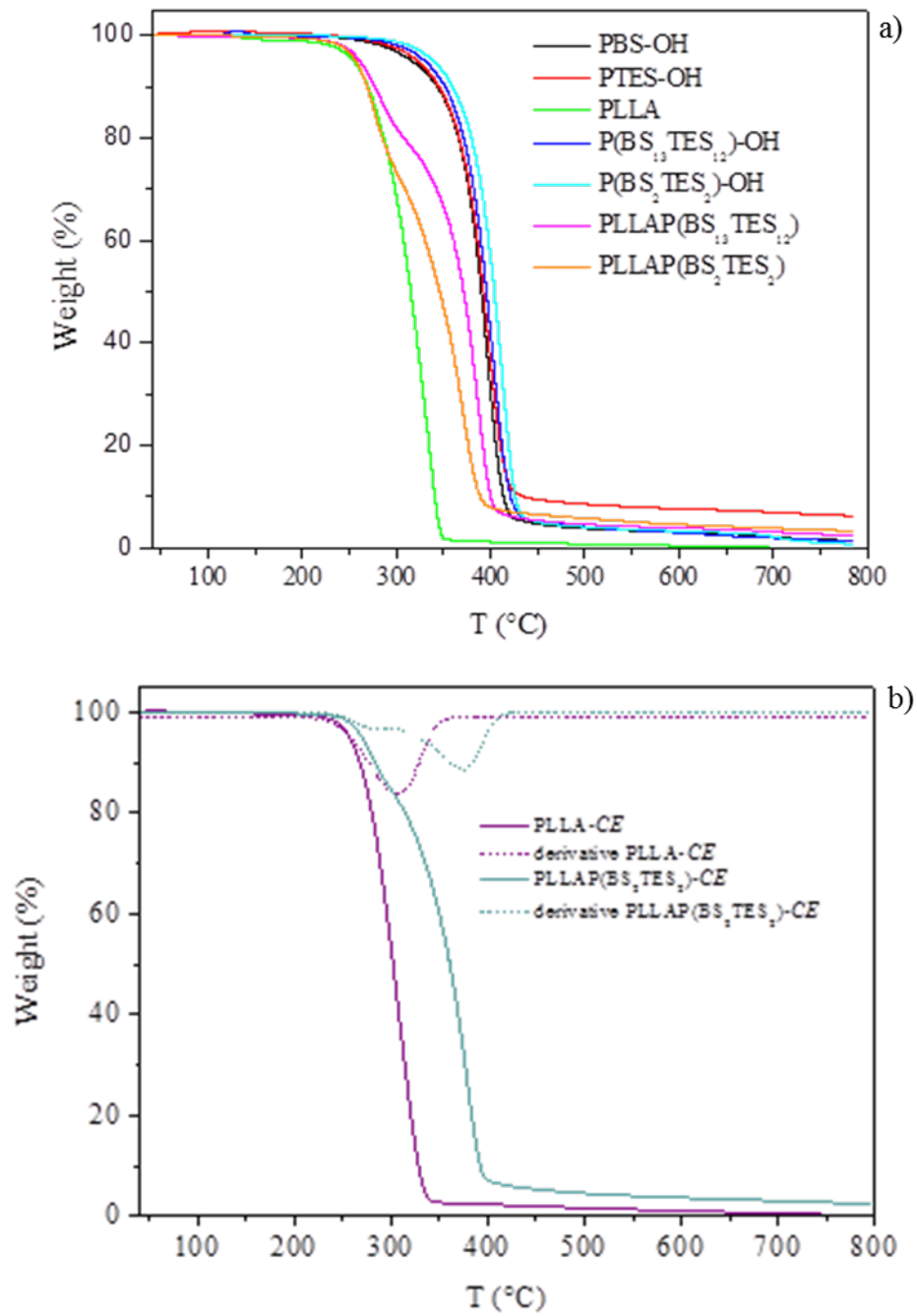


Figura 4.9. Curve TGA in atmosfera di N<sub>2</sub>: omopolimeri e copolimeri non *chain* estesi (a); PLLA-CE e triblocco PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE con relative derivate (b).

Successivamente i campioni sono stati sottoposti ad analisi calorimetrica. I dati relativi alle curve calorimetriche di prima e seconda scansione sono riportati in Tabella 4.3.

Polimeri	I scan						II scan						X <sub>c</sub> %
	T <sub>g</sub> °C	Δc <sub>p</sub> J/g°C	T <sub>m</sub> °C	ΔH <sub>m</sub> J/g	T <sub>c</sub> °C	ΔH <sub>c</sub> J/g	T <sub>g</sub> °C	Δc <sub>p</sub> J/g°C	T <sub>m</sub> °C	ΔH <sub>m</sub> J/g	T <sub>c</sub> °C	ΔH <sub>c</sub> J/g	
PBS-OH	-22	0.275	115	82	-	-	- 23	0.254	115	63	-	-	41
PTES-OH	-33	0.914	-	-	-	-	- 33	0.853	-	-	-	-	-
P(BS <sub>13</sub> TES <sub>12</sub> )-OH	-30	0.473	113	42	-	-	- 27	0.448	113	37	-	-	25
P(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> )-OH	-32	0.832	61	39	-	-	- 31	0.568	-	-	-	-	24
PLLA	40	0.277	165	56	-	-	20	0.489	121	40	68	39	50
PLLAP(BS <sub>13</sub> TES <sub>12</sub> )	-18	0.357	106	30	-	-	-	0.462	105	24	29	10	28
	40	0.132	132	3	-	-	16	-	132	3	-	-	-
PLLAP(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> )	-28	0.458	55	9	-	-	-	0.508	142	13	82	2	24
			144	13	-	-	19						
PLLA-CE	57	0.389	156 163	37	109	29	52	0.478	156 163	42	110	41	13
PLLAP(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> )-CE	-20	0.541	39 54	27	-	-	- 21	0.819	-	-	-	-	20

Tabella 4.3. Dati di caratterizzazione termica e diffrattometrica dei materiali sintetizzati.

Tutti i campioni a basso peso molecolare oggetto della presente Tesi, ad eccezione del PTES-OH puro, risultano semicristallini, come evidenziato dalla presenza di processi endotermici di fusione nella traccia DSC (Figura 4.10). Tenuto conto della natura amorfa dell'omopolimero PTES il processo endotermico osservato nei copolimeri può certamente essere ricondotto alla fusione della fase cristallina di PBS.

Nei copolimeri P(BSTES)-OH, la posizione e l'intensità del picco di fusione dipendono dalla lunghezza dei blocchi BS e TES: la T<sub>m</sub>, così come l'area sottesa, si abbassano al diminuire della lunghezza dei segmenti. Inoltre, l'endoterma di fusione appare più larga rispetto all'omopolimero di riferimento e questo suggerisce la presenza di cristalliti con un'ampia distribuzione di gradi di perfezione. La traccia DSC del copolimero a blocchi P(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>)-OH è caratterizzata da un picco di fusione che, seppure meno intenso, presenta un valore di T<sub>m</sub> molto vicino a quello dell'omopolimero: 115°C per il PBS-OH e 113°C per il P(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>)-OH. Questo risultato suggerisce che la lunghezza dei segmenti BS è sufficientemente lunga da non essere inficiata in modo significativo dalla presenza delle sequenze TES. La curva calorimetrica del copolimero statistico P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-OH presenta endoterme multiple ascrivibili a processi di fusione e ricristallizzazione che avvengono durante la scansione e che sono tipici dei poliesteri.

I copolimeri triblocco PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) e PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>), presentano più picchi endotermici di fusione che si manifestano in regioni molto diverse di temperatura: a temperatura più bassa si osserva l'endoterma di fusione della fase cristallina dei segmenti di PBS, mentre a temperatura più alta fondono i cristalli dei blocchi di PLLA. Come si può

notare dai dati riportati in Tabella 4.3, le temperature di fusione dei due copolimeri triblocco non si discostano moltissimo da quelle dei polimeri di riferimento, benchè il calore di fusione diminuisca significativamente. Questo risultato conferma il buon controllo del processo di polimerizzazione ROP, nel quale si ha essenzialmente l'apertura dell'anello del L-lattide senza che intervengano reazioni di transesterificazione sia tra le unità BS e TES che con le unità di acido poli-L-lattico che si formano.

Per quanto riguarda il fenomeno di transizione vetrosa, caratteristico della porzione amorfa del materiale, nelle curve DSC di tutti i campioni non *chain* estesi è rilevabile una variazione endotermica della linea di base associata al fenomeno stesso. Gli omopolimeri PBS-OH e PTES-OH presentano un valore di  $T_g$  sotto temperatura ambiente, a riprova dell'alta mobilità della fase amorfa, diversamente dal PLLA, che essendo caratterizzato da una di  $T_g$  pari a 40 °C, a temperatura ambiente è caratterizzato da una fase amorfa vetrosa rigida. I copolimeri P(BSTES)-OH sono caratterizzati da una  $T_g$  simile a quella dei due omopolimeri di riferimento. Ciò non sorprende considerato che i due omopolimeri di riferimento PBS e PTES hanno  $T_g$  molto simili <sup>(23)</sup>.

Per quanto concerne i copolimeri triblocco, ed in particolare il copolimero PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>), sono state evidenziate due  $T_g$  a diversa temperatura, ad indicare la presenza in questo campione di due fasi amorfiche a diversa mobilità. La  $T_g$  che si manifesta a più alta temperatura corrisponde in valore a quella del puro PLLA e dunque è relativa ad una fase amorfa pura di PLLA. La  $T_g$  a più bassa temperatura si manifesta ad una temperatura decisamente superiore (-18 °C) rispetto a quella del blocco centrale P(BSTES) ( $\approx$  -30 °C) ad indicare una fase parzialmente miscibile ricca in P(BSTES). Una situazione analoga dovrebbe caratterizzare anche il copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>): in questo caso, la  $T_g$  ad alta temperatura non è visibile in quanto celata dal picco di fusione a più bassa temperatura. In seconda scansione dopo tempra, in entrambi i casi, si osserva un unico fenomeno di transizione vetrosa a temperatura intermedia, ad indicare la totale miscibilità nella fase amorfa.

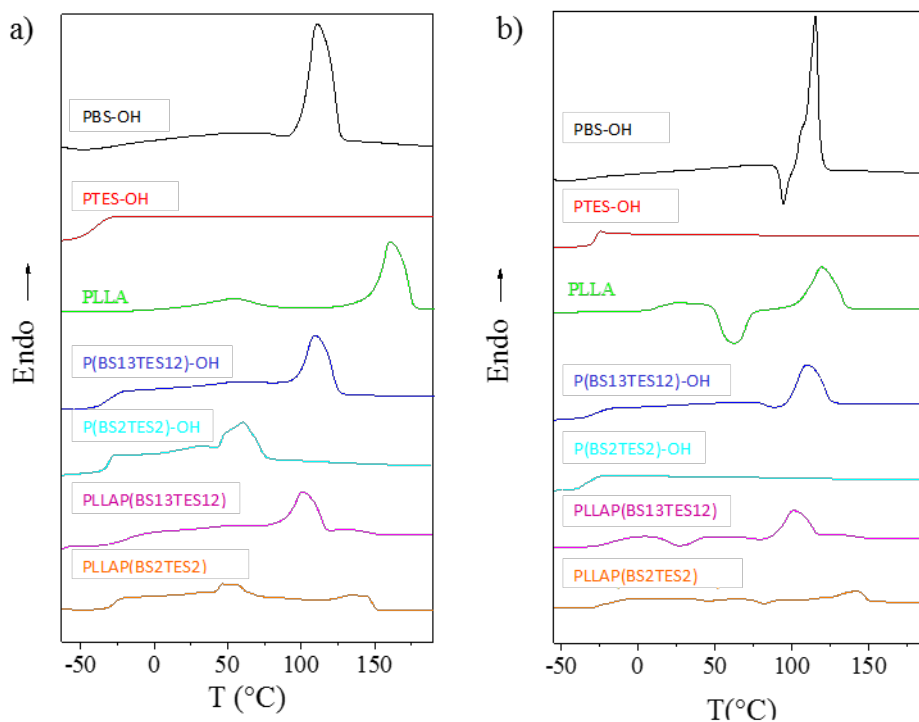


Figura 4.10. Curve DSC dei campioni non *chain* estesi: a) I scan (20 °C/min); b) II scan (20 °C/min) dopo rapido raffreddamento dal fuso.

Nel caso del PLLA-*CE*, l'analisi calorimetrica è stata effettuata subito dopo purificazione e filmatura. Come ben noto, infatti, l'acido poli-L-lattico è caratterizzato da una temperatura di transizione vetrosa ben al di sopra di temperatura ambiente e pertanto a questa temperatura le sue catene polimeriche risultano bloccate nello stato vetroso e non possono riorganizzarsi durante la permanenza a  $T_{amb}$ . Il copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-*CE* risulta invece caratterizzato da una temperatura di transizione vetrosa inferiore a temperatura ambiente e pertanto le catene macromolecolari possono cristallizzare per permanenza a  $T_{amb}$ . Si è dunque ritenuto importante analizzare il comportamento termico dei film dopo 0, 7 e 30 giorni di permanenza a temperatura ambiente. In Figura 4.11 sono riportate le corrispondenti curve calorimetriche di I scansione. La curva calorimetrica del campione appena filmato è tipica di un polimero semicristallino con un'intensa variazione endotermica della linea di base intorno a -20 °C, associata al fenomeno della transizione vetrosa, seguita da un doppio picco di fusione a temperatura più alta; dopo 7 giorni la forma del tracciato DSC è notevolmente cambiata: l'altezza del gradino in corrispondenza alla  $T_g$  risulta più basso e spostato a temperature più alte, mentre il picco di fusione diventa più intenso con i due massimi ben definiti. Entrambi gli effetti indicano un incremento di

cristallinità all'interno del materiale. Infatti, come si evince dall'inserito del grafico in Figura 4.11, l'area sottesa dal picco di fusione, cioè il calore di fusione  $\Delta H_m$ , proporzionale alla porzione di fase cristallina, aumenta, mentre la variazione di calore specifico  $\Delta C_p$  diminuisce. L'evoluzione della curva calorimetrica dopo 30 giorni è molto simile a quella ottenuta dopo 7 giorni di permanenza a  $T_{amb}$ , benchè si osservi un ulteriore aumento del valore di  $\Delta H_m$  e una diminuzione del  $\Delta C_p$  (insetto Figura 4.11).

La forma a doppio picco del processo di fusione può essere dovuto a fenomeni di fusione/ricristallizzazione/fusione dei cristalli previamente formati che fondono e ricristallizzano in forme più perfette durante la scansione calorimetrica.

Per quanto concerne il fenomeno della transizione vetrosa, si osserva nel copolimero un'unica e ampia variazione endotermica della linea di base, e ciò comprova la miscibilità dei blocchi PLLA e P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>) nello stato amorfo.

La permanenza per tempi più lunghi a temperatura ambiente non comporta ulteriori variazioni della curva calorimetrica, permettendo di individuare in 30 giorni a  $T_{amb}$  un periodo sufficientemente lungo per permettere al materiale di sviluppare fasi stabili.

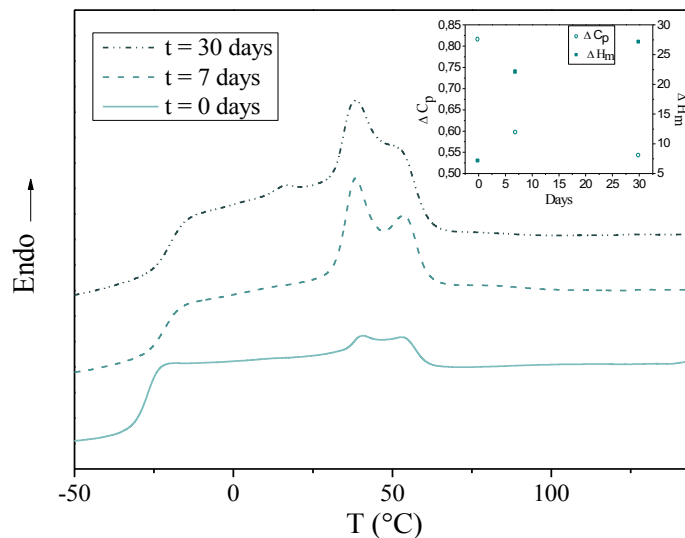


Figura 4.11. Curve DSC (I scan) del copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE in forma di film dopo diverso tempo di permanenza a temperatura ambiente.

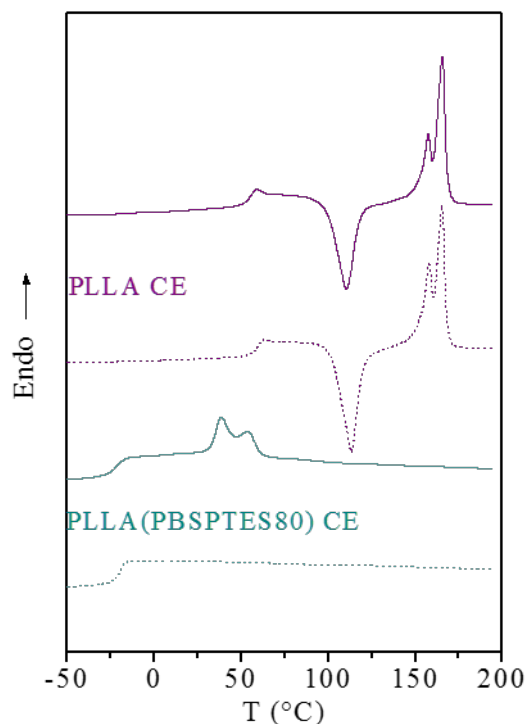


Figura 4.12. Curve DSC, di prima (curva continua) e seconda scansione (curva tratteggiata), del PLLA-*CE* e del copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-*CE* mantenuto a 25 °C per 30 giorni.

In Figura 4.12 sono riportate le curve DSC, di primo e secondo scan, del PLLA-*CE* e del copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-*CE* mantenuto a 25 °C per 30 giorni. I risultati ottenuti sono riassunti in Tabella 4.3.

Dalla Figura 4.12 si nota che entrambi i materiali presentano un profilo tipico di un polimero semicristallino: una variazione endotermica della linea di base a bassa temperatura in corrispondenza della transizione vetrosa e un picco endotermico a temperatura più alta dovuto alla fusione della componente cristallina. Nel caso del PLLA-*CE*, tra i due fenomeni sopracitati si evidenzia anche la presenza di un picco esotermico che indica un processo di cristallizzazione in scansione. Come si può notare dai dati in Tabella 4.3, l'aria sottesa dal picco di cristallizzazione ( $\Delta H_c$ ) è comunque minore del calore di fusione ( $\Delta H_m$ ) a dimostrare la natura semicristallina dell'omopolimero. Pur essendo entrambi i materiali cristallini, sia la temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) che la temperatura di fusione ( $T_m$ ) del PLLA-*CE* sono molto più elevate di quelle del copolimero. Queste differenze sono ascrivibili alla diversa struttura delle unità ripetitive dei segmenti PLLA e del blocco P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>). In particolare, la  $T_g$  del copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-*CE* si trova ad una temperatura intermedia rispetto a quella del PLLA-*CE* e quella del

copolimero statistico  $P(\text{BS}_2\text{TES}_2)$ , mentre la  $T_m$  è molto simile a quella del copolimero random  $P(\text{BS}_2\text{TES}_2)$ .

Al fine di analizzare la natura della fase cristallina presente nei polimeri analizzati e determinare il loro grado di cristallinità è stata eseguita l'analisi a raggi X. I diagrammi di diffrazione dei materiali in esame sono riportati in Figura 4.13, mentre il grado di cristallinità  $X_c$  è riportato in Tabella 4.3.

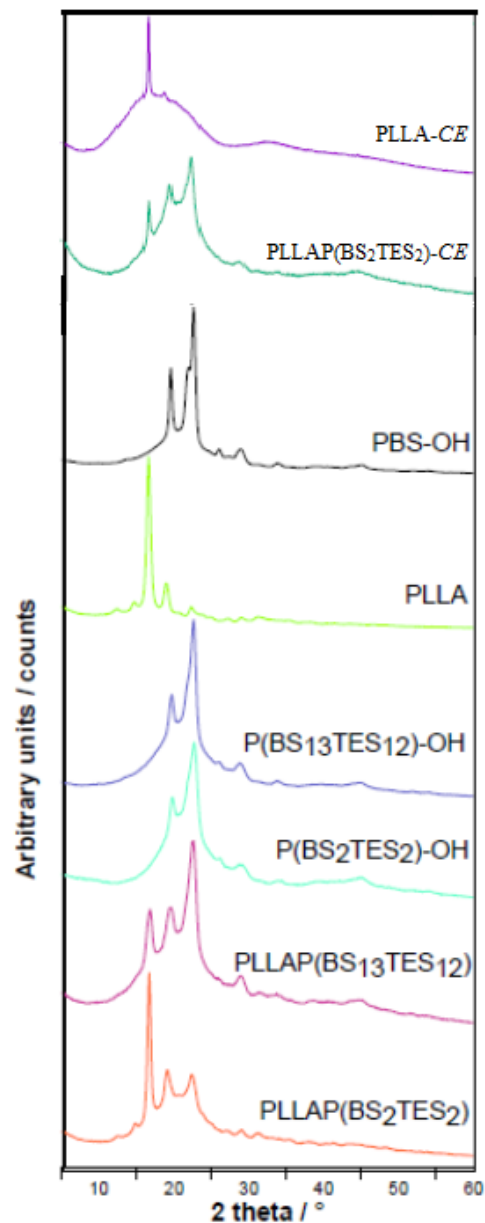


Figura 4.13. Curve diffrattometriche dei campioni in esame.



Il diffrattogramma di tutti i campioni analizzati è tipico dei materiali semicristallini: i profili mostrano alcuni riflessi ben evidenti dovuti alla componente ordinata del materiale, sovrapposti ad una linea di base a campana dovuta alla porzione di materiale amorfo. Il profilo di diffrazione dei copolimeri,  $P(\text{BS}_{13}\text{TES}_{12})\text{-OH}$  e  $P(\text{BS}_2\text{TES}_2)\text{-OH}$ , è molto simile a quello del PBS a riprova del fatto che in questi copolimeri è presente la sola fase cristallina del PBS. La presenza della co-unità TES determina un aumento della larghezza complessiva dei picchi che allo stesso tempo diventano meno intensi: in effetti si osserva una diminuzione del grado di cristallinità  $X_c$  (vedi Tabella 4.3). In entrambi i casi, la posizione dei riflessi rimane uguale a quella che si osserva nello spettro del PBS, ad indicare la completa esclusione della co-unità amorfa TES dal reticolo cristallino del PBS. Per quanto riguarda i copolimeri triblocco  $\text{-A-B-A-}$ ,  $\text{PLLAP}(\text{BS}_{13}\text{TES}_{12})$  e  $\text{PLLAP}(\text{BS}_2\text{TES}_2)$ , nei corrispondenti profili di diffrazione si osservano sia picchi caratteristici del PLLA che quelli tipici del PBS. Ciò indica che in tali campioni è presente sia la fase cristallina del PLLA che quella del PBS. Tuttavia, l'intensità relativa dei picchi delle due fasi cristalline cambia: nel copolimero triblocco  $\text{PLLAP}(\text{BS}_{13}\text{TES}_{12})$  i riflessi dovuti al PBS sono più intensi di quelli dovuti al PLLA; nel  $\text{PLLAP}(\text{BS}_2\text{TES}_2)$  invece, la situazione risulta invertita. Tale risultato è in linea con i risultati calorimetrici riportati in Tabella 4.3. Entrambe le tecniche indicano che per il copolimero  $\text{PLLAP}(\text{BS}_{13}\text{TES}_{12})$  la fase cristallina prevalente è quella del PBS, mentre per il  $\text{PLLAP}(\text{BS}_2\text{TES}_2)$  i cristalli sono costituiti principalmente da PLLA. Come già notato in precedenza per i copolimeri  $P(\text{BSTES})\text{-OH}$ , gli spettri dei triblocchi mostrano un allargamento dei riflessi dovuto alla difficoltà di rigettare la co-unità amorfa dalla fase cristallina, che si traduce in un aumento delle distanze interplanari. Il grado di cristallinità  $X_c$  dei due copolimeri triblocco risulta comunque più basso dei due omopolimeri di riferimento (vedi Tabella 4.3), essendo pari al 28% per il  $\text{PLLAP}(\text{BS}_{13}\text{TES}_{12})$  e 24% per il  $\text{PLLAP}(\text{BS}_2\text{TES}_2)$ .

L'omopolimero  $\text{PLLA-CE}$  presenta uno spettro caratterizzato da un unico riflesso intenso a  $17^\circ$  ed ha un grado di cristallinità pari al 13%.

Come evidente dalla Figura 4.13, il diffrattogramma del copolimero triblocco  $\text{PLLAP}(\text{BS}_2\text{TES}_2)\text{-CE}$  è caratterizzato dalla contemporanea presenza dei picchi tipici sia della fase cristallina del PBS che di quella del PLLA, con un grado di cristallinità complessivo del 20%. Il grado di perfezione delle due fasi cristalline, come peraltro indicato dal basso valore di  $T_m$ , risulta però inficiato dalla presenza delle co-unità.

I campioni sono stati anche sottoposti a una seconda scansione calorimetrica dopo rapido raffreddamento “*quenching*” dal fuso. Questo trattamento ha come obiettivo l’ottenimento di un materiale amorfo in seconda scansione. Dalle curve DSC corrispondenti si evidenzia una diversa cinetica di cristallizzazione dei materiali in esame. In particolare, il PBS-OH e il P(BS<sub>13</sub>TES<sub>13</sub>)-OH presentano, anche dopo tempra, una curva tipica di un polimero semicristallino: questo indica che la velocità di raffreddamento dello strumento è inferiore alla velocità di cristallizzazione dei segmenti BS in questi due materiali. Il copolimero statistico P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-OH al contrario presenta in seconda scansione una curva tipica di un materiale amorfo (nella curva DSC è infatti solo presente una variazione endotermica della linea di base legata alla transizione vetrosa), ad indicare che il processo di raffreddamento veloce in questo caso ha permesso di bloccare le catene in una conformazione disordinata.

Il processo di quenching risulta efficace anche per l’omopolimero PLLA. In questo caso però le catene polimeriche una volta superata la temperatura di transizione vetrosa  $T_g$ , acquisiscono sufficiente energia e mobilità per cristallizzare in scansione.

I copolimeri triblocco hanno un comportamento analogo al PLLA nel secondo scan, ma, essendo  $\Delta H_m > \Delta H_c$ , risultano semicristallini e quindi non vetrificati in uno stato completamente amorfo per raffreddamento veloce dal fuso.

Come si evidenzia sia dai dati riportati in Tabella 4.3 che dalle curve DSC di Figura 4.12, entrambi i polimeri *chain* estesi, dopo tempra, risultano amorfi, ad indicare che la velocità di cristallizzazione dei due polimeri è inferiore alla velocità di raffreddamento del calorimetro. Tuttavia, dalle curve DSC si evidenzia una diversa capacità a cristallizzare dei materiali in esame. Infatti, le catene polimeriche del PLLA-CE una volta superata  $T_g$  hanno sufficiente energia e mobilità per cristallizzare in scansione.

Per quanto riguarda invece la componente amorfa, anche nei campioni amorfi la differenza di temperatura di transizione vetrosa rimane molto elevata (52 °C per il PLLA-CE e -20 °C per il copolimero triblocco PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE) a conferma della diversa mobilità delle unità di ripetizione nei due blocchi.

### **4.3 Realizzazione di particelle vuote e contenenti desametasone**

La tecnica della miniemulsione *oil-in-water* è il metodo impiegato in questo lavoro di Tesi per la sintesi delle micro e nanoparticelle polimeriche. Questa tecnica ha il vantaggio di essere estremamente rapida (la sospensione si forma in meno di due minuti), ma

generalmente le nano/micro particelle ottenute hanno un indice di polidispersità (PDI) superiore rispetto a quelle ottenute per precipitazione.

Sono state preparate sia particelle vuote che contenenti desametasone. Il farmaco, essendo idrofobo, viene incapsulato facilmente.

In Figura 4.14 sono riportate a titolo di esempio le microparticelle con e senza farmaco di PLLA e dei copolimeri triblocco.

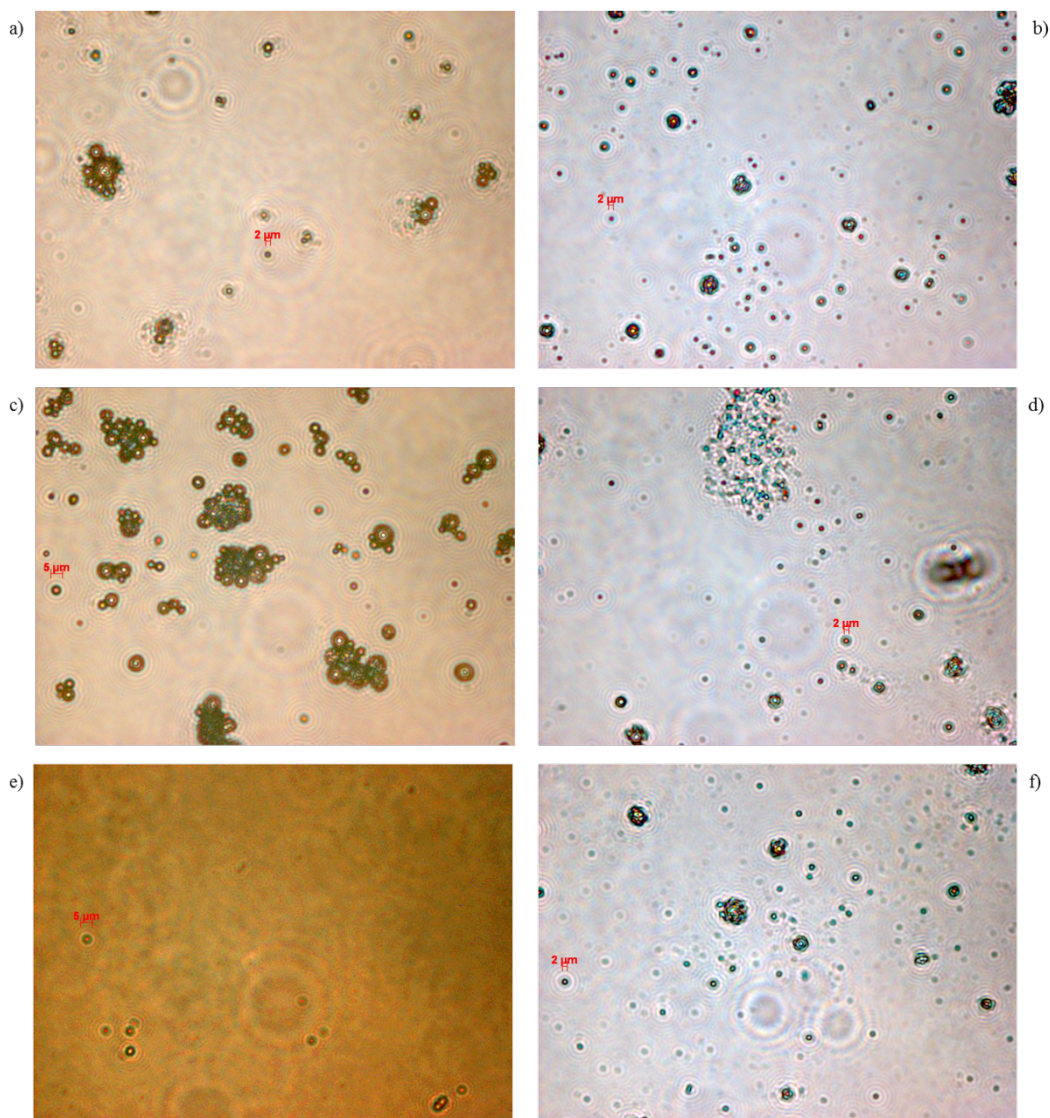


Figura 4.14. Microparticelle al microscopio ottico vuote e caricate con desametasone: PLLA (a); PLLA-d (b); PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) (c); PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>)-d (d); PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>) (e); PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-d (f).

L'analisi dimensionale ha confermato che il diametro delle microparticelle è compreso tra 2 e 5 μm.

In Figura 4.15, sono riportati gli istogrammi che rappresentano la distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle di PLLA e dei copolimeri triblocco, determinati tramite *dynamic light scattering*: i risultati relativi alle nanoparticelle vuote sono mostrati nel pannello superiore, mentre quelli relativi alle nanoparticelle caricate con desametasone nel pannello inferiore.

Il diametro medio delle nanoparticelle risulta simile per tutti i materiali in esame ed è dell'ordine dei 200 nm (vedi Tabella 4.4).

<b>Polimeri</b>	<b>Diametro (nm)</b>
PLLA	223±35 nm
PLLA-d	227±47 nm
PLLAP(BS <sub>13</sub> TES <sub>12</sub> )	220±27 nm
PLLAP(BS <sub>13</sub> TES <sub>12</sub> )-d	258±37 nm
PLLAP(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> )	216±24 nm
PLLAP(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> )-d	210±27 nm

Tabella 4.4. Diametro medio delle nanoparticelle vuote e caricate con desametasone.

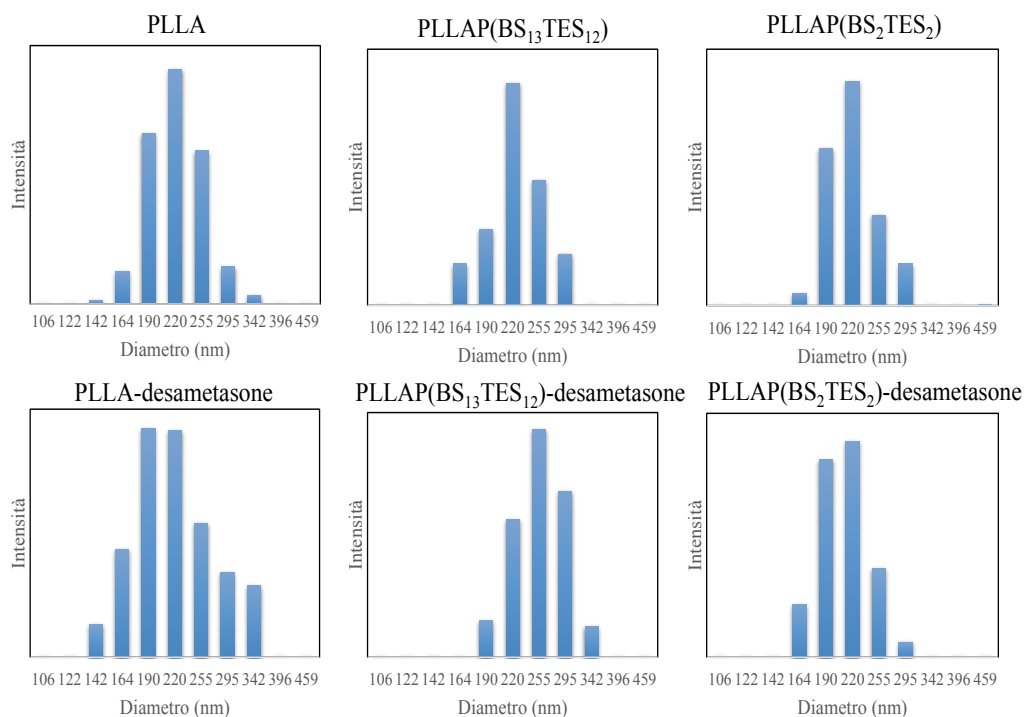


Figura 4.15. Distribuzione del diametro delle nanoparticelle di PLLA e dei copolimeri triblocco: pannello superiore, particelle vuote; pannello inferiore particelle caricate con desametasone.

### 4.3.1 Studi di cinetica di rilascio del farmaco

E' stato valutato l'effetto dell'architettura della matrice polimerica e della grandezza dei dispositivi realizzati sul rilascio prolungato di farmaci in ambiente fisiologico. A tale scopo, si è utilizzato il desametasone, farmaco corticosteroide con solubilità in acqua < 0.1 mg/mL.

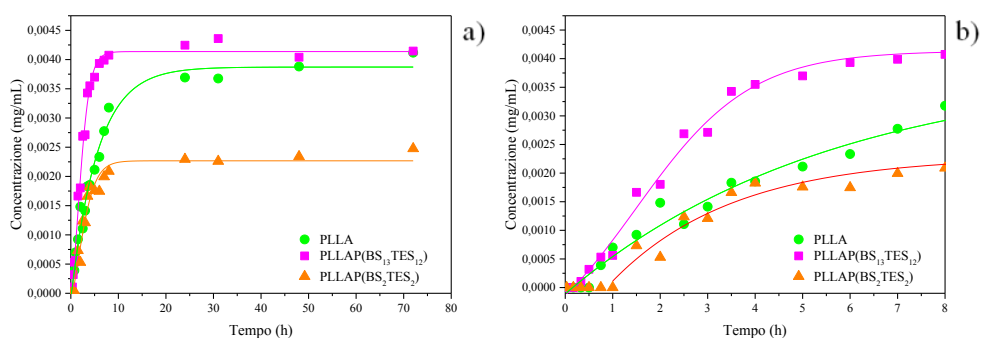


Figura 4.16. Rilascio cumulativo di desametasone in funzione del tempo per le microparticelle di PLLA e dei due copolimeri triblocco: tempo totale (a); prima fase (b).

Come precisato nella parte sperimentale della presente Tesi, la quantità di farmaco rilasciata è stata determinata da misure di assorbanza, previa calibrazione dello strumento con soluzioni a concentrazione nota di desametasone.

La Figura 4.16 a) riporta l'andamento del rilascio cumulativo di desametasone, in funzione del tempo, per le micro-particelle dell'omopolimero di riferimento PLLA e dei due copolimeri triblocco PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) e PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>). È subito evidente come la cinetica di rilascio sia significativamente diversa per i materiali studiati.

Come noto, la velocità di rilascio dipende principalmente dall'idrofilicità, dal grado di cristallinità e dalla mobilità della fase amorfa, fattori che influenzano sia la diffusione delle molecole di acqua all'interno della matrice polimerica che l'erosione idrolitica del materiale.

Nella fase iniziale, cineticamente controllata dalla diffusione (vedi Figura 4.16 b)), è possibile notare come il PLLA e il copolimero PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) presentino un periodo di induzione di circa 30 min prima che il farmaco cominci ad essere rilasciato. Per il copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>), il periodo d'induzione risulta praticamente raddoppiato.

Tale andamento può essere spiegato considerando che il PLLA, seppure più cristallino, è caratterizzato da una maggiore quantità di gruppi esterei idrolizzabili per unità di catena rispetto ai due copolimeri, mentre il copolimero a blocchi lunghi, come indicato anche dai valori di angolo di contatto (Tabella 4.2), presenta una maggiore idrofilicità. Entrambi questi fattori favoriscono la diffusione dell'acqua nella maglia polimerica, accorciando il periodo d'induzione rispetto al copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>).

A tempi maggiori, quando il farmaco comincia ad essere rilasciato, è subito evidente come la velocità del processo sia più alta per il copolimero a blocchi lunghi rispetto al copolimero statistico. La curva corrispondente al PLLA, invece, si colloca in una posizione intermedia. La maggiore velocità di rilascio per il PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) può essere ricondotta alla maggiore idrofilicità e minore grado di cristallinità rispetto all'omopolimero, fattori che favoriscono la diffusione dell'acqua. Il rallentamento del processo di rilascio nel PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>) rispetto al PLLA, invece, è ascrivibile al minore contenuto di gruppi esterei idrolizzabili.

Infine, per entrambi i copolimeri, il processo di rilascio si completa dopo le prime 8 ore di incubazione in condizioni fisiologiche (le curve di rilascio cumulativo raggiungono il plateau). Nel caso del PLLA, anche se la maggior parte del farmaco incapsulato ( $\approx 80\%$ ) viene rilasciato dopo 8 ore, il processo procede con minore velocità fino a 48 ore. Tale

andamento sembra suggerire che nelle micro-particelle dei due copolimeri, il meccanismo di rilascio sia principalmente diffusivo (per questo si conclude già dopo 8 ore), mentre nei micro-dispositivi a base di PLLA, subentra il processo erosivo che, come noto, controlla la seconda fase del processo di rilascio.

Come già descritto nella parte sperimentale della presente Tesi, oltre alle micro-particelle, sono state preparate anche nano-sfere a base dei polimeri in esame.

La Figura 4.17 a) riporta l'andamento del rilascio cumulativo di desametasone, in funzione del tempo, per le nano-particelle dell'omopolimero di riferimento PLLA e dei due copolimeri triblocco PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) e PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>). Anche in questo caso, è evidente come la cinetica di rilascio sia significativamente influenzata dalla struttura chimica. Tale influenza però risulta diversa rispetto a quella già evidenziata per le micro-particelle, ed è quindi ascrivibile alle diverse dimensioni dei dispositivi.

Nella fase iniziale (vedi Figura 4.17 b)), è possibile notare come il PLLA e il copolimero PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) presentino un periodo di induzione di circa 30 minuti prima che il farmaco cominci ad essere rilasciato, mentre per il copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>) si osserva un rilascio di desametasone in soluzione già dai primi minuti di incubazione in condizioni fisiologiche. Tale andamento, inoltre, è opposto rispetto a quello evidenziato per le micro-particelle, per le quali si era evidenziato un periodo di induzione maggiore proprio per il copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>).

Questo risultato suggerisce che il meccanismo di rilascio nel sistema nanometrico sia diverso rispetto alle micro-particelle. In queste ultime, come visto precedentemente, il meccanismo di rilascio è principalmente di tipo diffusivo e dipende direttamente dalla capacità dell'acqua di penetrare nella maglia polimerica. Nel caso delle nano-particelle, caratterizzate da un maggiore rapporto superficie/volume, l'effetto dell'erosione potrebbe essere importante già dai primi stadi del processo di rilascio.

In quest'ottica, possiamo ipotizzare che il periodo d'induzione evidenziato per il PLLA e il copolimero PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) sia dovuto al loro maggiore grado di cristallinità rispetto al PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>), che rende la degradazione idrolitica (e quindi l'erosione) più lenta per l'omopolimero e il copolimero a blocchi lunghi.

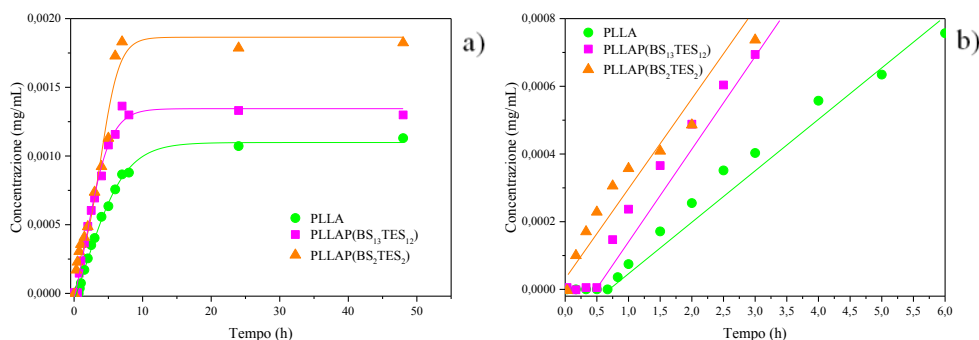


Figura 4.17. Rilascio cumulativo di desametasone in funzione del tempo per le nanoparticelle di PLLA e dei due copolimeri triblocco: tempo totale (a); prima fase (b).

La cinetica di rilascio del copolimero PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>), tuttavia, cambia nel tempo: dopo 90 minuti, i due copolimeri triblocco sono caratterizzati dalla stessa velocità di rilascio. Questo risultato indica che, dopo la prima fase, la maggiore idrofilicità del PLLAP(BS<sub>13</sub>TES<sub>12</sub>) e il minore contenuto di fase cristallina del PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>), fattori che favoriscono la penetrazione dell'acqua e di conseguenza la degradazione idrolitica/erosione superficiale, si equivalgono: le due curve di rilascio risultano infatti praticamente sovrapposte.

Si può inoltre notare che entrambi i copolimeri rilasciano il farmaco più velocemente rispetto al PLLA e ciò può essere spiegato sulla base della loro minore cristallinità e maggiore idrofilicità.

Come già osservato per le micro-particelle, dopo 8 ore di incubazione in tampone fosfato a 37 °C, entrambi i copolimeri triblocco raggiungono un valore di plateau, mentre il PLLA, seppure con una velocità molto più bassa, continua a rilasciare il farmaco fino alle 24 ore. Questo risultato è ancora una volta riconducibile alla più alta velocità di degradazione idrolitica dei copolimeri triblocco rispetto al PLLA.

#### 4.4 Caratterizzazione meccanica

Le misure meccaniche stress-strain sono state eseguite su film di forma 50 x 5 x 0.3 mm, mediante misure di trazione, allungando un provino di forma rettangolare a velocità costante, e misurando la variazione dello sforzo in funzione della deformazione. Sono stati sottoposti a trazione solo i polimeri ottenuti dopo reazione di estensione di catena, e per ogni campione le misure sono state effettuate su cinque provini diversi, riportando il risultato come valore medio delle 5 prove  $\pm$  deviazione standard.



In Figura 4.18 sono rappresentate le curve sforzo-deformazione per i materiali *chain* estesi oggetto di questa Tesi. In Tabella 4.5 sono raccolti i valori di modulo elastico (E), di sforzo ( $\sigma_b$ ) e deformazione ( $\epsilon_b$ ) a rottura, registrati durante le prove meccaniche a trazione.

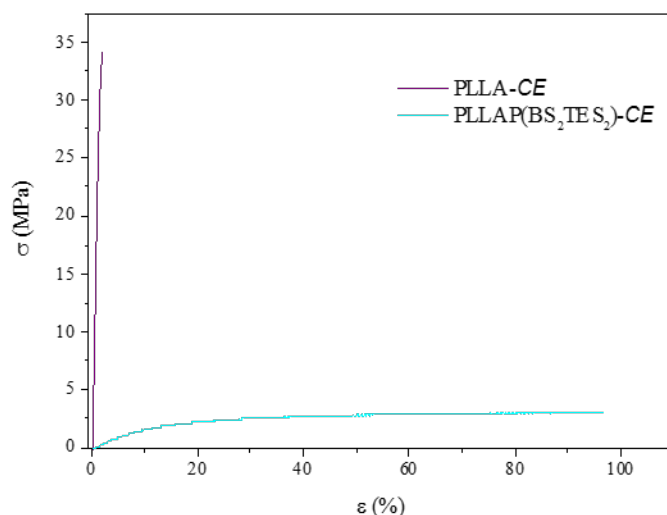


Figura 4.18. Grafico sforzo-deformazione per il PLLA-CE e il copolimero triblocco PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE.

<b>Polimero</b>	<b>E (MPa)</b>	<b><math>\sigma_b</math> (MPa)</b>	<b><math>\epsilon_b</math> (%)</b>
PLLA-CE	2290±300	33.0±1.5	2.0±0.5
PLLAP(BS <sub>2</sub> TES <sub>2</sub> )-CE	25.0±1.7	2.0±0.2	100.0±10

Tabella 4.5. Dati di caratterizzazione meccanica per il PLLA-CE e il copolimero triblocco PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE.

Si può notare come il campione PLLA-CE mostri un valore di modulo elastico (E) e di sforzo a rottura ( $\sigma_b$ ) molto elevati, insieme a una bassissima deformazione a rottura ( $\epsilon_b$ ), a conferma della notevole rigidità del materiale. Questi parametri risultano significativamente diversi nel copolimero triblocco PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE. In particolare, la copolimerizzazione porta a una diminuzione di due ordini di grandezza del modulo elastico accompagnato da un importante abbassamento dello sforzo a rottura (un ordine di grandezza e mezzo). Allo stesso tempo, si assiste ad un significativo miglioramento in termini di allungamento a rottura: dal 2% per l'omopolimero al 100% nel copolimero. Il diverso comportamento del copolimero non può essere spiegato sulla base della diversa cristallinità, che risulta superiore nel copolimero rispetto l'omopolimero. La maggiore

rigidità e fragilità del PLLA-*CE* può essere ricondotta alla presenza in questo materiale di una fase amorfa vetrosa. Nel copolimero, al contrario, la fase amorfa è mobile ed è caratterizzata dalla presenza di atomi di ossigeno etero che, come noto, flessibilizzano particolarmente le catene.

È interessante notare come la curva stress-strain del PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-*CE* sia priva di snervamento come nel caso degli elastomeri termoplastici, proprietà fondamentale per un tipo di applicazione per cui i materiali oggetto della presente Tesi sono stati pensati.

Per valutarne le proprietà elastomeriche e la resistenza alle sollecitazioni di carico-scarico, il PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-*CE* è stato sottoposto a prove cicliche secondo le condizioni riportate nella parte sperimentale. In Figura 4.19 è riportato l'andamento dello sforzo ( $\sigma$ ) in funzione della deformazione ( $\epsilon\%$ ) per allungamenti del 30 (Figura 4.19 a)) e 50% (Figura 4.19 b)). I cicli di carico-scarico sono caratterizzati da un'elevata elasticità, con un recupero di circa 85 e 78%, per rispettivamente allungamenti del 30 e 50%, anche dopo 20 cicli (Figura 4.19).

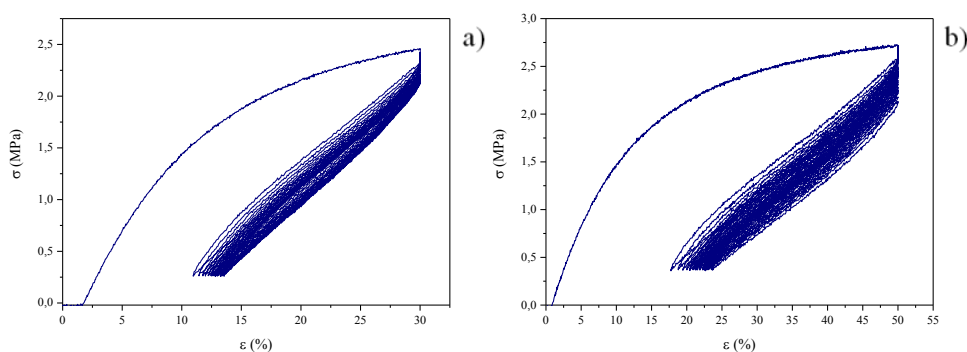


Figura 4.19. Grafico sforzo-deformazione del copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-*CE*: a) 20 cicli su allungamento del 30%; b) 20 cicli su allungamento del 50%.

La differenza tra il primo e il secondo ciclo può essere spiegata sulla base del riorientamento delle macromolecole con conseguente cristallizzazione durante l'allungamento. Dal secondo ciclo, la curva carico-scarico segue un percorso molto simile caratterizzato da una bassa isteresi. Queste caratteristiche rendono il copolimero PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-*CE* un ottimo candidato come dispositivo per la crescita cellulare in condizioni dinamiche.

#### 4.5 Studi di degradazione idrolitica

L'omopolimero di riferimento PLLA-CE e il copolimero triblocco PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE, sono stati sottoposti a esperimenti di degradazione idrolitica in condizioni fisiologiche di temperatura (37 °C) e di pH (7.4). Tali esperimenti sono stati condotti al fine di valutare la tempistica di degradazione di questi polimeri nell'ottica di utilizzarli come biomateriali all'interno dell'organismo.

Lo studio del processo di degradazione idrolitica ha previsto di sottoporre ogni campione incubato per un certo tempo a misura di perdita di peso gravimetrico, analisi GPC per la determinazione del peso molecolare medio numerico, spettroscopia <sup>1</sup>H-NMR per valutare possibili variazioni della composizione, analisi DSC per determinare l'effetto della degradazione sul rapporto tra fase cristallina e amorfa. I test di degradazione sono stati condotti in duplicato. Di ciascun campione incubato a pH 7.4 e a 37 °C è stato calcolato il peso residuo percentuale (sia gravimetrico che molecolare) attraverso la seguente equazione:

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

dove  $m$  è il peso (gravimetrico o molecolare) del campione registrata dopo il processo di degradazione e  $m_{in}$  è il peso (gravimetrico o molecolare) iniziale del campione. Nella Figura 4.20 sono riportati i pesi residui percentuali, sia gravimetrico che molecolare, dei campioni in funzione dei giorni di permanenza in soluzione tampone.

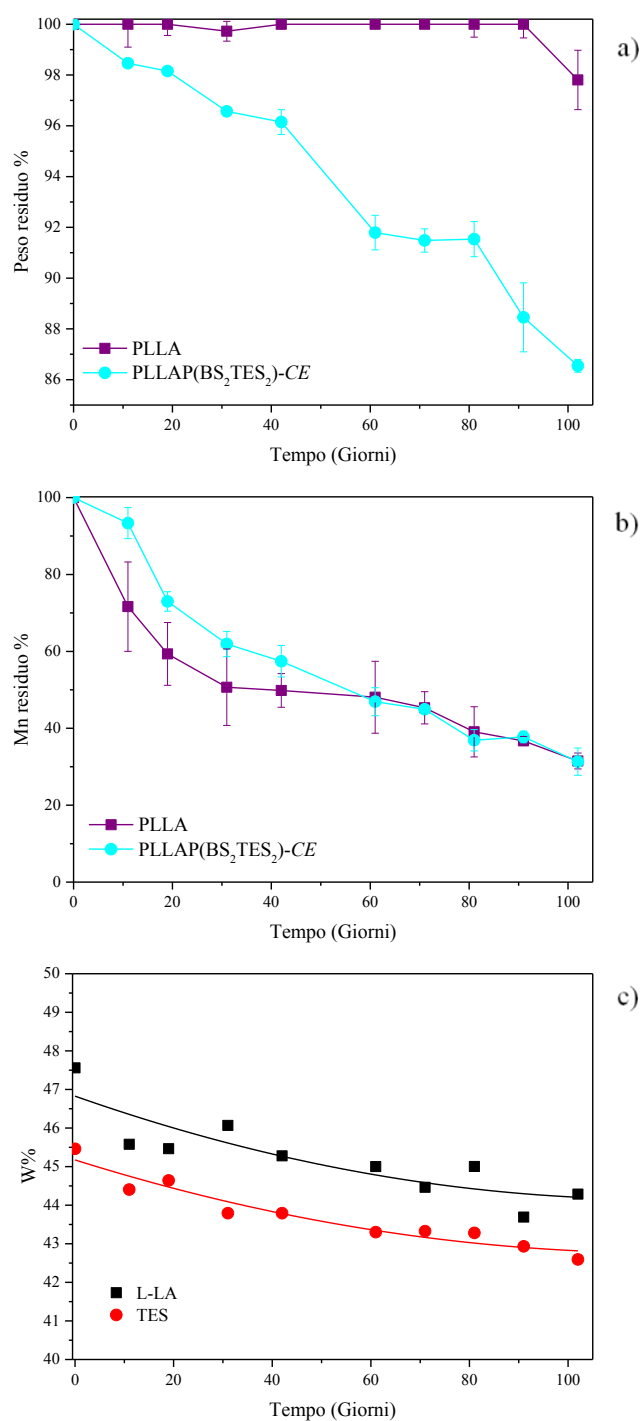


Figura 4.20. Peso residuo percentuale (a); peso molecolare residuo percentuale (b); composizione (c) in funzione del tempo di incubazione in tampone fosfato.

Come si può notare dalla Figura 4.20 (a), per il PLLA-CE la perdita di peso gravimetrico è nulla fino a 90 giorni di permanenza in condizioni fisiologiche e, anche per tempi maggiori, rimane comunque trascurabile ( $\approx 2\%$ ). Tuttavia, dall'analisi GPC (Figura 4.20

(b)) si evince che le catene polimeriche vengono idrolizzate dall'acqua con conseguente diminuzione del peso molecolare, già dopo il primo prelievo (10 giorni) evidenziando un abbassamento del peso molecolare di  $\approx 30\%$ . La diminuzione di  $M_n$  è caratterizzata da una maggiore velocità nelle prime fasi del processo di degradazione idrolitica (fino a 30 giorni di incubazione); a tempi più lunghi si osserva una variazione più graduale che porta a un peso residuo finale, dopo 102 giorni di permanenza in condizioni fisiologiche, pari a circa il 30% di quello iniziale.

Il copolimero triblocco PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE presenta un andamento molto diverso da quello dell'omopolimero PLLA-CE sia in termini di perdita di peso gravimetrico che per quanto riguarda il peso molecolare. Dalla Figura 4.20, si può notare una graduale diminuzione nel tempo del peso gravimetrico che raggiunge un valore pari a  $\approx 87\%$ . Alla diminuzione del peso gravimetrico si associa anche quella, altrettanto graduale, di  $M_n$ , come indicato dai dati GPC riassunti in Figura 4.20.

E' interessante notare come la velocità di diminuzione di  $M_n$ , molto più pronunciata per il PLLA-CE rispetto al copolimero nelle prime fasi, diventi paragonabile per entrambi i campioni dopo 40 giorni d'incubazione.

Come è noto, il processo di degradazione idrolitica è influenzato da diversi fattori quali: peso molecolare, distribuzione dei pesi molecolari, grado di cristallinità, temperatura di fusione, idrofilicità e densità di gruppi esterei. Il bilancio di questi parametri determina la velocità di degradazione. Il PLLA-CE, seppure più idrofobico del PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-CE, è caratterizzato da un minore grado di cristallinità (vedi Tabella 4.3) e da una maggiore densità di gruppi esterei idrolizzabili. Queste ultime caratteristiche sembrano avere un peso determinante e portano il PLLA a degradarsi più velocemente, soprattutto nelle prime fasi. L'analisi DSC condotta sui campioni sottoposti a degradazione idrolitica, ha evidenziato per l'omopolimero un leggero aumento della porzione cristallina, a conferma dell'attacco preferenziale della porzione amorfa, mentre nel caso del copolimero non si è rilevata una variazione significativa del rapporto tra fase cristallina e porzione amorfa (dati non mostrati). Per quanto riguarda invece la composizione, come evidenziato dai dati ottenuti tramite spettroscopia <sup>1</sup>H-NMR e riportati in Figura 4.20 (c), nei campioni sottoposti a degradazione idrolitica si osserva una discreta diminuzione del blocco *hard* (PLLA) rispetto al blocco *soft* (P(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)), ( $\approx 4\%$ ) rispetto alla composizione iniziale, accompagnata anche dalla diminuzione dei segmenti TES rispetto alle sequenze BS nel blocco centrale *soft* ( $\approx 3\%$ ). Tale risultato, in linea con i dati GPC e calorimetrici, conferma

che l'attacco dell'acqua interessa in prima istanza la fase amorfa, costituita prevalentemente del blocco PLLA, e i segmenti a maggior carattere idrofilico, formati dalle sequenze TES. In quest'ottica, la maggiore velocità di degradazione idrolitica dell'omopolimero nella prima fase d'incubazione, può essere spiegata considerando il maggiore contenuto di porzione amorfa (più prona all'attacco delle molecole di H<sub>2</sub>O) nel PLLA-*CE* rispetto al PLLAP(BS<sub>2</sub>TES<sub>2</sub>)-*CE*. Infatti, dopo 30 giorni d'incubazione, il rapporto amorfo/cristallino nell'omopolimero raggiunge un valore simile a quello del copolimero e, per questo motivo, la velocità di degradazione per i due materiali diventa molto simile nella seconda fase del processo (Figura 4.20 (b)).

## CAPITOLO 5: Conclusioni

I biomateriali rivestono un ruolo di grande importanza nel settore biomedicale, soprattutto in campi emergenti quali l'ingegneria tissutale (*soft tissue engineering*) ed il rilascio controllato di farmaci (*controlled drug delivery*). I polimeri, ed in particolare i poliesteri alifatici, sono la classe di materiali che si è rivelata più interessante per le applicazioni sopracitate. Ad oggi però, solo pochi poliesteri sono stati approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per la realizzazione di dispositivi medici impiantabili nel corpo umano; tra questi si possono ricordare l'acido polilattico, l'acido poliglicolico, il policaprolattone e i loro copolimeri. Purtroppo, tali materiali non riescono a soddisfare gli stringenti requisiti fisico/meccanici per ogni diversa applicazione, per cui la sintesi di nuovi materiali polimerici, che offrano garanzie di biocompatibilità e biodegradabilità, o la modifica chimica mirata di quelli già disponibili in commercio e già approvati per uso biomedico, come il PLA, può aprire nuove prospettive in ambiti come l'ingegneria tissutale e il rilascio controllato di farmaci. Il PLA, per esempio, è caratterizzato da una rigidità troppo elevata per la rigenerazione dei tessuti molli, e da una velocità di degradazione poco flessibile, che ne limitano l'uso come materiale per vettori di farmaci all'interno dell'organismo.

Il gruppo di ricerca presso cui è stata condotta la presente Tesi, vanta una esperienza ventennale nella sintesi e modifica chimica di poliesteri, nonché nella estrapolazioni di correlazioni proprietà-struttura fondamentali per il design *ad hoc* di materiali per uso specifico. In particolare, sono stati recentemente sintetizzati poliesteri alifatici biodegradabili e biocompatibili contenenti sequenze *PEG-like*, che si sono rilevati particolarmente interessanti sia dal punto di vista delle proprietà meccaniche, modulabili con la lunghezza dei blocchi sino ad arrivare ad un elastomero con il copolimero a cortissime sequenze, sia dal punto di vista della cinetica di riassorbimento, anch'essa controllabile agendo sull'architettura molecolare, e risultata tanto più lenta quanto minore la lunghezza delle sequenze.

Tenuto conto dello scenario sopra descritto e dei risultati precedentemente ottenuti, il lavoro della presente Tesi è specificamente consistito nella preparazione e caratterizzazione di nuovi copolimeri triblocco **-A-B-A-**, dove **A** è PLLA e **B** è il copolimero a composizione equimolare poli(butilene/trietilene succinato) precedentemente studiato e caratterizzato, con una struttura chimica architettata *ad hoc* da

utilizzarsi per la preparazione di nano e micro particelle per il rilascio di farmaci, con profilo cinetico di rilascio modulabile in modo controllato.

Lo stesso tipo di struttura è stato inoltre valutato per la realizzazione di un nuovo copoliestere alifatico di PLLA con proprietà meccaniche migliorative rispetto a quelle dell'omopolimero di riferimento per applicazioni nell'ambito della *soft tissue engineering*. Dai risultati ottenuti nella presente Tesi si evince come gli obiettivi siano stati raggiunti pienamente.

La diversa architettura molecolare del blocco B si è rivelata strumento efficace nel modulare l'idrofilicità, il grado di cristallinità e la cinetica di degradazione idrolitica del materiale.

Le particelle realizzate con i copolimeri triblocco sintetizzati nella presente Tesi, infatti, hanno una cinetica di rilascio modulabile rispetto a quella del PLLA. Inoltre, la velocità così come il meccanismo di rilascio sono direttamente dipendenti dalle dimensioni dei vettori realizzati. In particolare si è evidenziato che nel caso delle microparticelle il meccanismo di rilascio è prevalentemente di tipo diffusivo, mentre nelle nanoparticelle prevale l'erosione.

Il copolimero triblocco ad alto peso molecolare presenta delle proprietà meccaniche significativamente diverse dal PLLA sintetizzato per necessità di confronto e, soprattutto, migliorative in vista di impieghi del materiale nell'ingegneria dei tessuti molli: infatti, il modulo elastico si è ridotto di due ordini di grandezza, mentre l'allungamento a rottura è aumentato di cinquanta volte.

Per quanto concerne la cinetica di riassorbimento idrolitico, i risultati sembrano molto promettenti: la cinetica del PLLA risulta difatti rallentata per copolimerizzazione.

Da ultimo, ma non meno importante, è da segnalare un miglioramento della stabilità termica del PLLA per copolimerizzazione. Va ricordato che qualunque materiale polimerico per uso biomedico deve poter essere processabile senza incorrere in problemi di degradazione termica durante le fasi di lavorazione per la realizzazione del dispositivo.

I risultati della presente Tesi, seppure incoraggianti, sono da considerarsi preliminari:

- ✓ Sarà interessante andare a modificare il rapporto tra i blocchi A e B e valutare come ciò impatta sulle proprietà finali del materiale;



- ✓ Sarà utile andare a correlare le proprietà meccaniche con il comportamento delle cellule che verranno adese e fatte proliferare su costrutti ingegnerizzati tridimensionali preparati con questi materiali.

## BIBLIOGRAFIA

1. Williams D. F., On the nature of biomaterials, *Biomaterials*, 2009, 5897-5909.
2. O' Brien F. J., *Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering*, *Materials Today*, 2011, Volume 14.
3. Ranieri Cancedda, Riccardo Pietrabissa, "Ingegneria dei tessuti biologici", Bologna Patron, 2002.
4. Stridsberg K.M., Ryner M., Albertsson A.C., "Controlled ring-opening polymerization: Polymers with designed macromolecular architecture", *Adv. Polym. Sci.*, 157, 2001, 41-65.
5. Bourissou D., Martin-Vaca B., Dumitrescu A., Graullier M., LacombeF., "Controlled Cationic Polymerization of Lactide", *Macromolecules*, 38, 9993–9998, 2005.
6. Garlotta D., "A literature review of polylactic acid", *J. Polym. Environ.*, 9 (2), 63– 84, 2002.
7. Baker W. E., Scott C. E., Hu G., "Reactive polymer blending", Hanser Gardner Publications, 2001.
8. Von Burkersroda F., Schedl L., Göpferich A., "Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion", *Biomaterials*, 2002, 23:4221.
9. Göpferich A., "Mechanisms of polymer degradation and erosion", *Biomaterials*, 1996, 17- 103.
10. Mochizuki M., Hiramami M., "Structural Effects on the Biodegradation of Aliphatic Polyesters", *Polym. Adv. Technol.*, 1997, 8:203.
11. Grima S., Bellon-Maurel V., Feuilloley P., Silvestre F., "Aerobic biodegradation of polymers in solid-state conditions: A review", *Journal of Polymers and the Environment*, 2000, 8: 183.
12. Velásquez L., Dussan J., "Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*", *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 167, 713–716.
13. Williams, D.F., "Definitions in Biomaterials. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials", Chester, England, 3–5 March 1986, Vol. 4; Elsevier, New York.

14. A.K. Bajpai, Sandeep K. Shukla, Smitha Bhanu, Sanjana Kankane, "Responsive polymers in controlled drug delivery", *Progress in Polymer Science* 33 (2008) 1088–1118.
15. J. Siepmann, N. Faisant, J. Akiki, J. Richard, J. P. Benoit, "Effect of the size of biodegradable microparticles on drug release: experiment and theory", *Journal of Controlled Release* 96 (2004) 123-134.
16. Allan S. Hoffman, "Hydrogels for biomedical applications", *Advanced Drug Delivery Reviews* 43 (2002) 3-12.
17. Mary Caldorera-Moore, Nicholas A. Peppas, "Micro and nanotechnologies for intelligent and responsive biomaterial-based medical systems", *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2009) 1391-1401.
18. Lisa Brannon-Peppas, "Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery", *International Journal of Pharmaceutics* 116 (1995) 1-9.
19. Kamaly N., Xiao Z., Valencia P.M., Radovic-Moreno A. F., and Farokhzad O. C., "Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation", *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 2971–3010.
20. Jérôme C., "Macromolecular engineering and stimulus response in the design of advanced drug delivery systems", *MRS Bulletin*, 2010, 35, 665-672.
21. Kelly W. Broadhead, Roy Biran, Patrick A. Tresco, "Hollow fiber membrane diffusive permeability regulates encapsulated cell line biomass, proliferation and small molecule release", *Biomaterials* 23 (2002) 4689-4699.
22. Xu J. , Guo B.H., "Poly(butylene succinate) and its copolymers: research, development and industrialization" , *Biotechnology Journal*, 2010, 5(11):1149-1163.
23. Gualandi C., Soccio M., Saino E., Focarete M. L., Lotti N., Munari A., Moroni L. and Visai L., "Easily synthesized novel biodegradable copolyesters with adjustable properties for biomedical applications", *Soft Matter*, 2012,8, 5466-5476.
24. Gigli M., Fabbri M., Lotti N., Gamberini R., Rimini B., Munari A., "Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review", *European Polymer Journal*, 2016, 75, 431–460.
25. Gigli M., Negroni A., Soccio M., Zanaroli G., Lotti N., Fava F., Munari A., "Enzymatic hydrolysis studies on novel eco-friendly aliphatic thiocopolyesters", *Polymer Degradation and Stability*, 2013, 98, 934-942.

26. Gigli M., Negroni A., Soccio M., Zanaroli G., Lotti N., Fava F., Munari A., "Influence of chemical and architectural modifications on the enzymatic hydrolysis of poly(butylene succinate)", *Green Chem.*, 2012, 14: 2885.
27. Gigli M., Lotti N., Gazzano M., Finelli L., Munari A., "Novel eco-friendly random copolyesters of poly(butylene succinate) containing ether-linkages", *Reactive & Functional Polymers*, 2012, 72, 303-310.
28. Soccio M., Lotti N., Gazzano M., Govoni M., Giordano E., Munari A., "Molecular architecture and solid-state properties of novel biocompatible PBS-based copolyesters containing sulphur atoms", *React. Funct. Polym.*, 2012, 72-856.
29. Fabbri M., Soccio M., Gigli M., Guidotti G., Gamberini R., Gazzano M., Siracusa V., Rimini B., Lotti N., Munari A., "Design of fully aliphatic multiblock poly(ester urethane)s displaying thermoplastic elastomeric properties", *Polymer*, 2016, 83, 154-161.
30. Gigli M., Lotti N., Gazzano M., Finelli L., Munari A., "Synthesis and characterization of novel poly(butylene succinate)-based copolyesters designed as potential candidates for soft tissue engineering", *Polymer Engineering & Science*, 2013, 53, 491-501.
31. Gualandi C., Soccio M., Govoni M., Valente S., Lotti N., Munari A., Giordano E., Pasquinelli G., Focarete M.L., "Poly(butylene/diethylene glycol succinate) multiblock copolyester ad a candidate biomaterial for soft tissue engineering: solid-state properties, degradability, and biocompatibility", *J. Bioact. Compat. Pol.*, 2012, 27-244.
32. Zhihua Gan, Hideki Abe, Haruhiko Kurokawa, and Yoshiharu Doi, "Solid-State Microstructures, Thermal Properties, and Crystallization of Biodegradable Poly(butylene succinate)(PBS) and Its Copolyesters", *Biomacromolecules* 2001, 2, 605-613.
33. Soccio M., Lotti N., Gigli M., Finelli L., Gazzano M., Munari A., "Reactive blending of poly(butylene succinate) and poly(triethylene succinate): characterization of the copolymers obtained", *Polym Int* 61 (2012) 1163-1169.
34. Du Boullay OT, Marchal E, Martin-Vaca B, Cossio FP, Bourissou D, *J Am Chem Soc.*, 128:16442–16443, 2006.
35. Kricheldorf H.R., "Syntheses of Biodegradable and Biocompatible Polymers by Means of Bismuth Catalysts", *Chem. Rev.*, 109, 5579–5594, 2009.
36. Calvin Woodings, "Nuovi sviluppi nei nontessuti biodegradabili" Calvin Woodings Consulting, UK, 2001.

37. Fambri, & Migliaresi, 2010.
38. Li C., Zhigang X., Junli H., Xuesi C., Xiabin J., "Enantiomeric PLA-PEG block copolymers and their stereocomplex micelles used as rifampin delivery", *Journal of Nanoparticle Research*, 2007, 9, 777-785.
39. Fabbri M., Soccio M., Costa M., Lotti N., Gazzano M., Siracusa V., Gamberini R., Rimini B., Munari A., Garcia-Fernandez L., Vazquez-Lasa B., "New fully bio-based PLLA triblock copoly(ester urethane)s as potential candidates for soft tissue engineering". *Polymer Degradation and Stability*, 2016, 132, 169-180.
40. Martina Fabbri et al. "The effect of plasma surface modification on the biodegradation rate and biocompatibility of poly(butylene succinate)-based" 2015.