

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

**NUOVO COPOLIMERO STATISTICO A BASE DI
POLI(BUTILENE SUCCINATO) BIOCAMPATIBILE E
BIORIASSORBIBILE DA UTILIZZARE
NELL'INGEGNERIA TISSUTALE DEL MIOCARDIO**

Elaborato in:

FONDAMENTI DI CHIMICA

Relatore:

Prof.ssa Nadia Lotti

Presentato da:

Luca Pascerini

Correlatori:

Michelina Soccio

Silvia Quattrosoldi

Anno Accademico 2017/18

INDICE

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	1
1.1 Patologie cardiache e terapie tradizionali	1
1.1.1 Terapie e trattamenti maggiormente utilizzati	2
1.2 Ingegneria tissutale	3
1.2.1 Scaffold	3
1.2.2 Elettrofilatura	5
1.2.3 Cellule staminali	7
1.3 Biomateriali	9
1.4 Polimeri	12
1.4.1 Struttura dei polimeri	13
1.4.2 Tecniche di polimerizzazione	14
1.4.3 Proprietà dei polimeri.....	16
1.4.4 Poliesteri alifatici	19
1.4.4.1 Poliesteri alifatici per uso biomedicale	20
1.5 Copolimeri	23
1.5.1 Copolimeri statistici	24
1.6 Polibutilene succinato (PBS)	25
1.6.1 Copolimeri a base di PBS	27
1.7 Neopentil glicole (NG)	27
1.8 Biodegradazione	28
1.9 Biodegradazione idrolitica	29
CAPITOLO 2: SCOPO DELLA TESI	31
CAPITOLO 3: METODI E STRUMENTAZIONI UTILIZZATI	33
3.1 Sintesi del copolimero P(BSNS)	33
3.2 Preparazione film tramite pressofusione	35
3.3 Caratterizzazione dei film	35
3.3.1 Caratterizzazione termica.....	35
3.3.1.1 Termogravimetria (TGA).....	35
3.3.1.2 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	36
3.3.1.3 Diffrazione a Raggi X (WAXS).....	39
3.4 Caratterizzazione meccanica	40
3.4.1 Misure di <i>stress-strain</i>	40
3.4.2 Prove cicliche	43
3.5 Prove di degradazione idrolitica	43
3.6 Caratterizzazione dei campioni parzialmente degradati	44
3.6.1 Cromatografia a permeazione su gel (GPC)	44
3.6.2 Risonanza magnetica nucleare (NMR)	46
3.6.3 Calorimetria differenziale a scansione	48
3.6.4 Diffrazione a Raggi X	48
CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE	49
4.1 Caratterizzazione molecolare	49

4.2 Caratterizzazione termica e strutturale	50
4.3 Diffrazione a Raggi X (WAXS).....	53
4.4 Caratterizzazione meccanica	54
4.5 Studi di degradazione idrolitica in condizioni fisiologiche.....	55
<i>CAPITOLO 5: CONCLUSIONI.....</i>	57
<i>BIBLIOGRAFIA.....</i>	59
<i>RINGRAZIAMENTI.....</i>	64

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 Patologie cardiache e terapie tradizionali

Nel maggio 2017 l'Istituto Nazionale di Statistica ha pubblicato alcuni dati relativi alle cause di mortalità nel periodo 2003-2014: come si può constatare dalla Figura 1.1, le malattie ischemiche al cuore (11,6% del totale), le malattie cerebrovascolari (9,6%) e le altre malattie del cuore (8,3%) sono le tre principali cause di mortalità ⁽¹⁾. Le patologie cardiovascolari, quindi, continuano ad essere le malattie croniche dominanti e si prevede che diventeranno la principale causa di invalidità e di morte, soprattutto a causa dell'invecchiamento della popolazione italiana (+9.773, dati ISTAT). Disfunzioni e patologie cardiache affliggono non solo la popolazione italiana ma risultano una delle principali cause di morte anche nel mondo. Ad esempio, in India, nel 2015, le malattie cardiovascolari hanno provocato più di 2 milioni di morti. In particolare, negli individui con una età compresa tra i 30 e 69 anni, la morte è stata provocata per il 68,4% dei casi da cardiopatia ischemica e nel 28% dei casi da ictus ⁽²⁾.

FIGURA 1. NUMERO DI DECESSI PER LE 10 PRINCIPALI CAUSE DI MORTE IN ITALIA. Anni 2003 e 2014

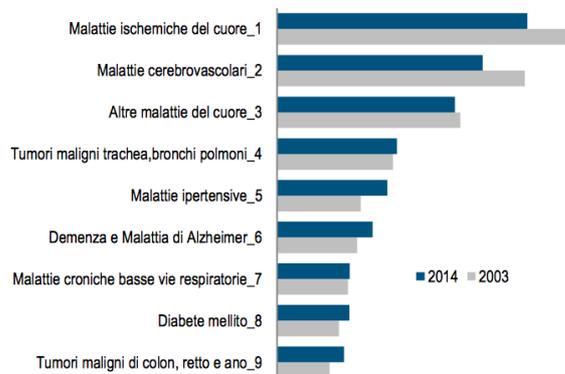


Figura 1.1: Numero di decessi per le 10 principali cause di morte in Italia- Anni 2003 e 2014

La cardiopatia ischemica coinvolge il tessuto miocardico ed è dovuta ad uno squilibrio tra l'apporto ematico e la richiesta di ossigeno da parte del tessuto cardiaco. Tale squilibrio è dovuto ad una riduzione parziale o totale della sezione arteriosa coronarica, a cui consegue una diminuzione del flusso sanguigno. Col passare del tempo si verificano alterazioni complesse nel miocardio come il 'rimodellamento ventricolare', che comprende la formazione di tessuto cicatriziale collageneo non contrattile, per cercare di compensare lo squilibrio dovuto all'ischemia (Figura 1.2). Tuttavia, il cuore possiede solo una limitata capacità rigenerativa, perciò il rimodellamento contribuisce ad una diminuzione della funzione contrattile che può causare anche insufficienza cardiaca.

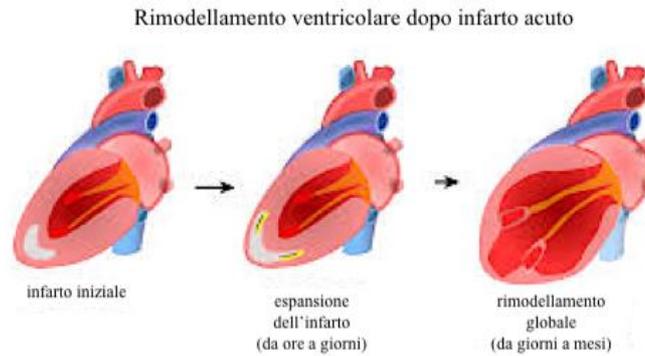


Figura 1.2: Rimodellamento ventricolare post-infartuale

1.1.1 Terapie e trattamenti maggiormente utilizzati

Le attuali terapie per il trattamento di cardiopatie ischemiche prevedono l'utilizzo di farmaci anticoagulanti, come l'eparina a basso peso molecolare o l'aspirina, per prevenire l'ostruzione delle arterie coronariche, e farmaci beta-bloccanti, per rilassare il muscolo cardiaco, rallentare il battito e diminuire la pressione sanguigna ⁽³⁾.

Nel caso in cui la terapia farmacologica non dovesse funzionare, si interviene chirurgicamente via *bypass* coronarico, che prevede l'inserimento di un ponte fra l'aorta e l'arteria coronarica. In questo modo si aggira l'ostruzione e si fa riaffluire al cuore un apporto ottimale di sangue ed ossigeno (Figura 1.3).

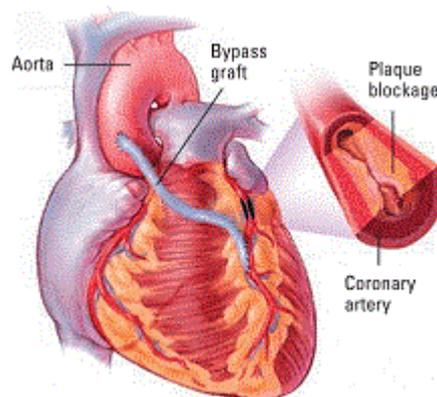


Figura 1.3: Esempio di bypass

Il trattamento più estremo nel caso di insuccesso sia della terapia farmacologica sia del bypass, è il trapianto di cuore ⁽⁴⁾. Ad oggi, la prospettiva di vita in seguito al trapianto di cuore è notevolmente aumentata grazie a diversi fattori: una migliore selezione dei pazienti da trapiantare, una migliore conservazione dell'organo espantato dal donatore e l'ottimizzazione e la specializzazione delle tecniche chirurgiche; purtroppo le complicanze, soprattutto post-operatorie, come il rigetto dell'organo e le complicanze infettive, rimangono comunque frequenti.

Il rigetto, causato dal sistema immunitario, può essere controllato con farmaci immunosoppressivi, che però rendono i pazienti più suscettibili alle infezioni. Infatti, inizialmente il paziente può essere colpito da infezioni ospedaliere causate da batteri e agenti patogeni e favorite dalla terapia immunosoppressiva, poi, in corrispondenza della progressiva riduzione della terapia immunosoppressiva, diventano più frequenti le infezioni extra ospedaliere simili a quelle che si verificano nei pazienti immunocompetenti ⁽⁵⁾.

1.2 Ingegneria tissutale

La carenza di donatori di organi, le complicazioni che si presentano dopo il trapianto e una diminuzione del numero di cardiomiociti, che riduce la capacità di pompaggio, hanno stimolato la ricerca di soluzioni alternative. In particolare, l'ingegneria tissutale si propone come alternativa estremamente interessante ⁽⁶⁾. Questa disciplina applica metodi e principi dell'ingegneria e delle scienze della vita per comprendere a fondo la relazione che esiste tra struttura e funzione nei tessuti viventi normali e patologici, per lo sviluppo di sostituti biologici che possano ripristinare, mantenere e migliorare la funzione tissutale. Il campo dell'ingegneria tissutale è multidisciplinare e raccoglie conoscenze di medicina, ingegneria, scienza dei materiali, genetica, chimica, biologia e scienze della vita ^(6,7). Essa si propone di sviluppare nuovi tessuti ingegnerizzati. Rispetto però ad un tessuto nativo, un innesto di materiale sintetico mostra un maggiore rischio di trombosi, di deposizione di calcio e non ha la capacità di crescere e rigenerarsi. Per questo motivo le strategie attualmente in uso sono indirizzate verso l'utilizzo di cellule staminali e di *scaffold* biocompatibili per supportare la rigenerazione e la crescita di nuovi tessuti e favorire una vascolarizzazione sufficiente per sostenere l'alto metabolismo del costruito ^(8,9).

1.2.1 Scaffold

Gli *scaffold* sono strutture tridimensionali porose, realizzate con materiali biocompatibili e biorisorbibili, i quali supportano la formazione di nuovi tessuti, fornendo una piattaforma strutturale per un nuovo microambiente cellulare, consentendo, quindi, l'adesione, la migrazione, l'organizzazione ed il differenziamento cellulare ⁽¹⁰⁾. La realizzazione di questi costrutti è costituita da diversi step: prelievo delle cellule specifiche per il tessuto dal paziente, espansione delle colture cellulari in vitro, semina delle colture in uno *scaffold* e trapianto dello *scaffold* nel paziente.

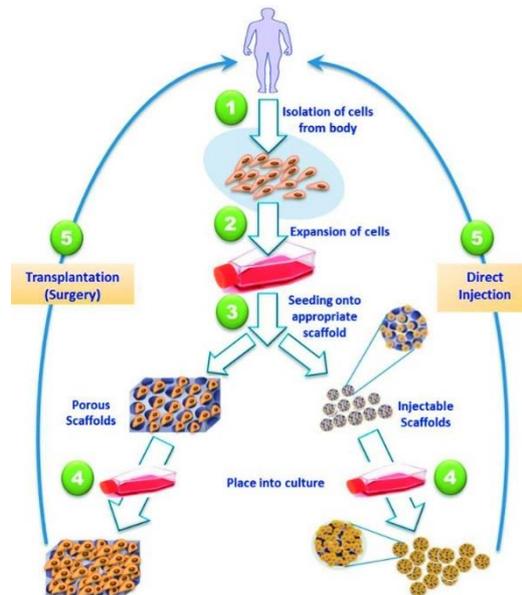


Figura 1.4: Illustrazione schematica dei diversi step per la realizzazione di uno scaffold

Durante la produzione della matrice extracellulare da parte delle cellule impiantate, lo *scaffold* si biodegrada progressivamente, fino alla sua completa sostituzione con il tessuto biologico rigenerato, ripristinando così la funzione compromessa ⁽¹¹⁾. I vantaggi portati dall'utilizzo degli *scaffold* sono principalmente due: si annulla la necessità di reintervenire chirurgicamente per la rimozione dell'elemento protesico ed è possibile iniettare all'interno del costrutto un fattore di crescita o un farmaco che promuova la proliferazione e la differenziazione delle cellule.

Per essere utilizzato con successo nel campo dell'ingegneria tissutale, gli *scaffold* devono soddisfare alcuni requisiti essenziali:

- **Biocompatibilità:** non devono indurre reazioni immunitarie o risposte infiammatorie o alterazioni dannose sia per i tessuti naturali che per i materiali impiegati per la loro costruzione a contatto con tali tessuti.
- **Biodegradabilità:** è necessario che si degradino nel tempo affinché le cellule possano produrre la loro matrice extracellulare ma i prodotti della degradazione non devono risultare tossici o danneggiare l'organismo.
- **Proprietà meccaniche adeguate con il sito anatomico di impianto:** devono resistere ai carichi applicati dall'ambiente fisiologico. Nel campo delle applicazioni cardiovascolari, devono presentare elevata contrattilità e flessibilità, ma allo stesso tempo una buona robustezza per resistere alle elevate pressioni che si generano durante le pulsazioni.
- **Architettura:** devono presentare porosità elevata e di dimensioni adeguate ad assicurare la penetrazione cellulare, la diffusione dei nutrienti all'interno del costrutto e per permettere

l'eliminazione dei prodotti di scarto. Inoltre, sulla superficie del materiale devono essere presenti dei gruppi chimici per permettere l'interazione cellule-*scaffold* chiamati leganti.

- Tecnologia di produzione: la loro produzione deve essere economicamente vantaggiosa e facilmente traslabile su larga scala.

1.2.2 Elettrofilatura

La tecnica attraverso la quale vengono prodotti gli *scaffold* è l'elettrofilatura. Questa è attualmente il migliore metodo per produrre fibre continue di materiale polimerico o inorganico con dimensioni che possono andare da decine di nanometri a qualche micron ⁽¹³⁾. In campo biomedicale è estremamente impiegata in quanto permette di realizzare strutture porose, a pori interconnessi, e fibre di dimensione submicrometrica dall'elevato rapporto superficie volume, non ottenibili attraverso altre tecniche di fabbricazione (Figura 1.5).

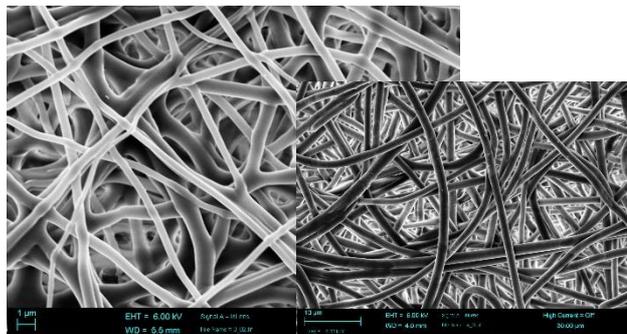


Figura 1.5: Fotografie al microscopio elettronico di fibre elettrofilate

La procedura consiste nel filare un polimero, disciolto in una soluzione altamente viscosa, grazie ad un campo elettrico ad alto potenziale. La comune apparecchiatura sperimentale per elettrofilatura è costituita da: una siringa contenente la soluzione polimerica, collegata ad un capillare metallico, un generatore di tensione ad alto potenziale (10-50 kV) collegato all'ago della siringa mediante un elettrodo, un collettore, costituito da una piastra metallica, posizionato ad una distanza regolabile dall'ago metallico e messa a massa, che svolge la funzione di controelettrodo (Figura 1.6) ⁽¹³⁾.

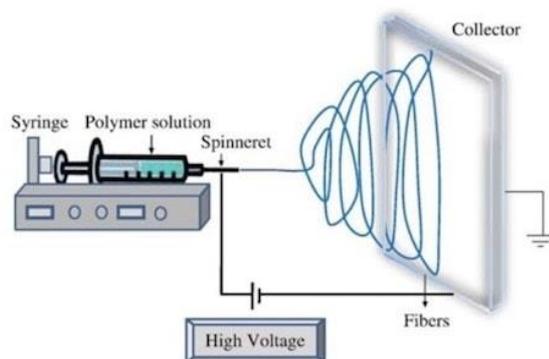


Figura 1.6: Schema del processo di elettrofilatura

Nel processo di elettrofilatura il solvente gioca un ruolo fondamentale: dissolve le molecole polimeriche per formare il getto elettrificato, per questo motivo è importante valutare a priori le interazioni intermolecolari tra i due componenti del sistema polimero-soluzione che possono essere attrattive o repulsive a seconda del solvente scelto. Inoltre, il solvente deve condurre le molecole dissolte verso il collettore; sono quindi importanti alcune caratteristiche quali volatilità, tensione di vapore, tensione superficiale e punto di evaporazione, in quanto determinano la morfologia della fibra. Infatti, la tensione di vapore influenza la velocità e quindi il tempo di evaporazione, la volatilità determina la formazione di nanostrutture, poiché influenza il processo di separazione di fase, mentre velocità del getto e tensione superficiale influenzano la dimensione del diametro della fibra

Il fluido, sottoposto ad una differenza di potenziale, in corrispondenza della punta dell'ago subisce un aumento della carica superficiale, e viene indirizzato nel senso del campo elettrico esterno. Successivamente l'evaporazione del solvente, e quindi la solidificazione della fibra stessa sul collettore, vengono favoriti da fattori di instabilità e dall'elevata area superficiale.

La buona riuscita di un processo di elettrofilatura dipende da parametri che riguardano la soluzione come:

- La concentrazione della soluzione di partenza: se troppo bassa porta alla formazione di fibre e granelli mentre se troppo alta rende impossibile mantenere un flusso costante a livello della punta dell'ago;
- La conduttività/densità superficiale di carica: se alta provoca un aumento del diametro della fibra mentre se bassa non consente l'elongazione del getto e la formazione di una fibra uniforme, con la conseguente formazione di granuli;
- Il peso molecolare: influisce sulle proprietà elettriche, determinando le caratteristiche morfologiche della fibra;
- La viscosità: se troppo bassa rende impossibile ottenere fibre continue mentre se troppo alta rende difficile l'estrusione del materiale.
- La tensione superficiale: se ridotta permette di ottenere fibre prive di granuli ed operare con campi elettrici inferiori.

Durante le operazioni sperimentali bisogna tenere conto anche di parametri riguardanti il processo e le condizioni ambientali, come:

- Il voltaggio applicato.
- La velocità con cui viene alimentata la siringa: influenza la velocità del getto e il processo di evaporazione del solvente.

- Il tipo di collettore: quelli più comuni sono costituiti da piastre di alluminio.
- La distanza tra punta dell'ago e collettore: è necessaria una distanza minima per consentire l'adeguata evaporazione del solvente ma allo stesso tempo non deve essere eccessiva affinché la fibra possa raggiungere agevolmente il collettore.
- La temperatura: aumentandola si provoca una diminuzione della viscosità.
- L'umidità: diminuendola si provoca un aumento della velocità di evaporazione fino a superare la velocità di estrusione dalla punta dell'ago rendendo impossibile il processo di elettrofilatura.

Le classi di materiali che ad oggi vengono sottoposti ad elettrofilatura sono: polimeri naturali, polimeri sintetici, compositi, ceramici e semiconduttori.

1.2.3 Cellule staminali

La scelta delle cellule da impiantare su uno *scaffold* dipende dalla funzione che dovrà svolgere il tessuto ingegnerizzato da trapiantare. Solitamente si scelgono cellule autologhe espianate dai tessuti limitrofi o cellule staminali (Figura 1.7); queste ultime stanno acquistando sempre più importanza nella maggior parte delle nuove strategie di sostituzione dei tessuti ⁽¹⁰⁾.

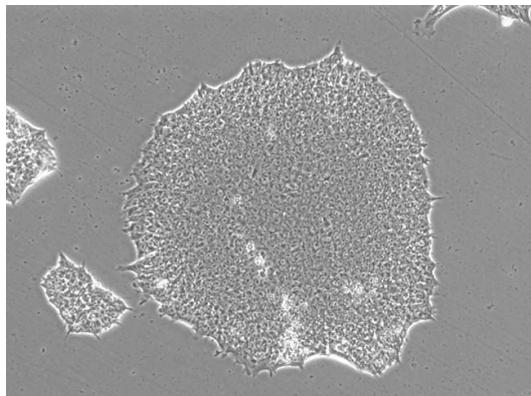


Figura 1.7: Colonia di cellule staminali embrionali in cultura

Le cellule staminali hanno la capacità di dividersi dando origine a due cellule figlie diverse tra di loro: la prima mantiene le caratteristiche di staminalità ed è uguale alla cellula madre, l'altra, invece, è precursore di una progenie cellulare destinata a differenziarsi e a dar vita a tessuti e organi. Le cellule staminali sono clonogeniche (capaci di produrre esatti duplicati), autorinnovanti (capaci di dividersi indefinitamente) e potenti (capaci di differenziarsi in multiple linee cellulari). Proprio tramite questa ultima loro caratteristica è possibile classificarle in:

- Totipotenti: in grado di differenziarsi in ogni tessuto embrionale ed extraembrionale.
- Pluripotenti: capaci di generare i tre strati germinali che costituiscono la matrice embrionale di tutte le cellule del corpo (endoderma, mesoderma ed ectoderma), ma non il trofoblasto.

- Multipotenti: danno origine ad un singolo strato germinale e si formano nel feto e nello stadio precoce di vita postnatale, quando è già definita l'espressione genica delle singole cellule. La loro funzione è quella di andare a sostituire le cellule differenziate che vengono perse a causa di danneggiamenti cellulari. Le cellule staminali adulte, somatiche o progenitrici, considerate multipotenti, sono presenti in diversi siti corporei dell'individuo adulto come midollo osseo, sangue, muscolo, epidermide e cervello.
- Unipotenti: possono dar luogo ad un unico tipo di cellula e possiedono la caratteristica di auto-rinnovarsi, garantendo la riparazione ed il mantenimento dei tessuti sani. Dopo un numero molto limitato di divisioni cellulari, tali cellule iniziano a differenziarsi e a dare origine a cellule di tessuti specifici.

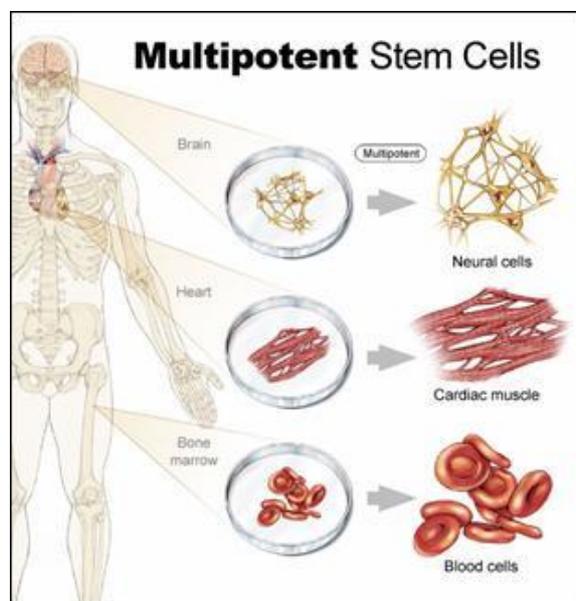


Figura 1.8: Cellule staminali multipotenti

Grazie alle loro proprietà le cellule staminali trovano applicazione in vari campi della medicina. In ambito cardiologico vengono utilizzate per proteggere il miocardio da danni causati da ischemia e per la rigenerazione delle cellule cardiache ⁽¹⁴⁾. Di grande tendenza sono le cellule staminali embrionali, ottenute da cellule degli embrioni umani ai primissimi stadi dello sviluppo, detti blastociti, e hanno la capacità di generare ogni altro tipo di cellula del corpo come ad esempio i cardiomiociti. Il differenziamento di queste cellule in cardiomiociti avviene attraverso tre stadi: precoce, in cui sono prodotte cellule con attività contrattile, intermedio, nel quale si sviluppano cellule atriali, ventricolari e cellule del sistema di conduzione ed infine tardivo, nel quale sono ben distinguibili miofibrille e dischi intercalati che contengono desmosomi e *gap junction*.

Sebbene diversi studi abbiano mostrato che i cardiomiociti differenziati in vitro abbiano proprietà elettrofisiologiche, strutturali e contrattili identiche a quelle dei cardiomiociti adulti e capaci di

integrarsi elettromeccanicamente nel tessuto miocardio ospite, il loro utilizzo è limitato da conseguenze post-operatorie come il rigetto. Inoltre, sono caratterizzate da un'elevata tumorigenicità dovuta alla loro elevata capacità proliferativa. A causa di queste problematiche e agli aspetti etici riguardanti l'utilizzo di embrioni umani, sono state cercate ulteriori fonti di cellule per la terapia rigenerativa del miocardio come ⁽¹⁵⁾:

- Mioblasti scheletrici, cellule che risiedono nei muscoli scheletrici e che normalmente vengono reclutate per riparare un danno subito dal tessuto muscolare, per la loro origine autologa, per l'alta capacità proliferativa e per la loro relativa resistenza all'ischemia.
- Cellule staminali multipotenti contenute nel midollo osseo per la facile accessibilità del midollo osseo, l'origine autologa delle cellule e la loro capacità di differenziarsi in cardiomiociti e cellule endoteliali.
- Cellule staminali adulte del cuore perché in grado di generare cardiomiociti e cellule endoteliali sia in vitro che in vivo.

1.3 Biomateriali

La prima definizione del termine “biomateriale” venne stabilita nel 1976 dall'*European Society for Biomaterials* (ESB), all'interno della *Consensus Conference on Definitions in Biomaterials Science*; venne identificato come biomateriale qualsiasi “materiale non vivente utilizzato in un dispositivo medico e finalizzato all'interazione con sistemi biologici” ⁽¹⁶⁾. Tale definizione è stata più volte rivista e modificata, e ad oggi quella ufficiale è la seguente: “*materiale finalizzato all'interazione con un sistema biologico allo scopo di valutare, trattare, aumentare o sostituire qualsiasi tessuto, organo o funzione corporea*” ⁽⁶⁾. Da tale definizione sono pertanto esclusi i materiali viventi quali gli organi trapiantati, ma inclusi i tessuti di origine biologica trattati e non più viventi; inoltre non si fa riferimento alla durata del contatto tra il materiale e il tessuto vivente dell'organismo ospite, ma si richiede che tale contatto avvenga affinché il materiale sia un biomateriale ⁽¹²⁾.

Le applicazioni dei biomateriali nella fabbricazione di protesi, organi artificiali e dispositivi medici sono molto vaste e per darne una panoramica indicativa è possibile fare riferimento a categorie. È opportuno dunque mettere in luce come alcune di tali applicazioni prevedano la totale impiantabilità, altre sono completamente esterne anche se in contatto diretto con tessuti viventi e altre ancora sono parzialmente impiantate. Altre applicazioni sono permanenti, altre sono temporanee e altre sono periodiche. La classificazione, più tradizionale, dei biomateriali è quella relativa alle classi di materiali basate su aspetti chimico strutturali. Secondo tale classificazione è possibile raggruppare i diversi materiali in cinque categorie (Figura 1.9) ⁽¹²⁾:

- **Materiali metallici:** sono utilizzati per gli impieghi più svariati e vanno da componenti di apparecchiature ad intere protesi o loro parti. La maggior parte trova applicazione nella fabbricazione di protesi ortopediche e dentali e di mezzi di osteosintesi. Infatti i materiali metallici si prestano bene a risolvere i problemi legati alla sostituzione di tessuti duri quali ossa e denti. Ciò dipende dalle loro proprietà meccaniche che rendono possibile la realizzazione di protesi in grado di sopportare carichi elevati con piccole sezioni. I vantaggi portati dal loro utilizzo sono: elevate caratteristiche meccaniche, elevata resistenza all'usura e un'ottima conduttività elettrica e termica; purtroppo si corrodono facilmente in ambiente fisiologico, sono rigidi e hanno una densità maggiore rispetto a quella della maggior parte dei tessuti umani. I principali metalli utilizzati in ambito biomedico sono: acciaio inossidabile, leghe di cobalto-cromo (CoCrMo, CoNiCrMo) e leghe di titanio (Ti6Al4V) ⁽¹²⁾.
- **Materiali ceramici:** nelle applicazioni biomediche, l'impiego dei ceramici riguarda impianti utilizzati nei settori odontoiatrico e ortopedico grazie alla loro buona biocompatibilità, all'inerzia chimica, all'elevata resistenza a compressione e alla resistenza alla corrosione. Purtroppo, a differenza dei metalli hanno una bassa affidabilità meccanica e una bassa resistenza a trazione ma come loro hanno una densità molto alta rispetto ai tessuti biologici. Inoltre, essendo materiali fragili, sono difficili da lavorare ⁽¹²⁾.
- **Materiali polimerici:** sono materiali tenaci con una bassa densità e facili da lavorare; purtroppo subiscono una degradazione nel tempo e hanno una bassa resistenza meccanica. Le loro applicazioni nel campo biomedico sono innumerevoli e includono: innesti vascolari, valvole cardiache e fili di sutura ⁽¹²⁾. I materiali polimerici verranno ampiamente trattati successivamente.
- **Materiali biologici:** sono tessuti di origine umana o animale, sia duri che molli come le vene, il pericardio o le valvole cardiache. I primi vengono impiegati principalmente nel settore cardiovascolare, per la realizzazione di protesi valvolari e tratti di vasi sanguigni. Hanno un'ottima biocompatibilità ma naturalmente, prima di essere impiegati, devono essere sottoposti ad una complessa serie di trattamenti di devitalizzazione cellulare, al fine di non innescare alcuna risposta immunitaria nell'organismo ospite. I tessuti duri invece vengono utilizzati principalmente in ortopedia per il riempimento di lacune causate da difetti ossei ⁽¹²⁾.
- **Materiali compositi:** vengono utilizzati per realizzare protesi valvolari cardiache (carbonio pirolitico su grafite) e protesi di ginocchio (polietilene con fibre di carbonio). Sono formati da due o più costituenti chimicamente distinti, come ad esempio metalli rivestiti con

ceramici e matrici rinforzate con fibre. Godono di una buona compatibilità, inerzia chimica, buone caratteristiche meccaniche e resistenza alla corrosione tuttavia spesso sono soggetti a scarsa coesione tra i componenti e difficile lavorabilità ⁽¹²⁾.

<i>Materiali</i>	<i>Vantaggi</i>	<i>Svantaggi</i>	<i>Applicazioni</i>
Metallici (acciai, titanio e leghe, leghe di cobalto)	Elevate caratteristiche meccaniche, resistenza alla usura	Scarsa biocompatibilità, alta densità di massa, facilità di corrosione in ambiente fisiologico	Mezzi di osteosintesi, protesi per ortopedia e odontoiatria
Polimerici (siliconi, poliuretani, polietilene, acrilati, fluorurati, poliesteri)	Tenacia, bassa densità, facilità di lavorazione	Bassa resistenza meccanica, degradabilità nel tempo	Suture, cateteri, drenaggi, protesi cardiovascolari, cementi per ossa, dispositivi per il trattamento del sangue
Ceramici (ossidi di alluminio, alluminati di calcio, ossidi di titanio, carboni)	Buona biocompatibilità, inerzia chimica, elevata resistenza alla compressione, resistenza alla corrosione	Bassa affidabilità meccanica, bassa resistenza alla trazione impulsiva, alta densità di massa, fragilità, difficoltà di lavorazione	Protesi d'anca, protesi dentali, dispositivi percutanei
Compositi (metalli rivestiti con ceramici, matrici rinforzate con fibre)	Buona biocompatibilità, inerzia chimica, buone caratteristiche meccaniche, resistenza alla corrosione	Scarsa coesione tra i componenti, difficoltà di lavorazione	Protesi valvolari cardiache, protesi di ginocchio
Biologici (vene, pericardio, valvole cardiache)	Ottima biocompatibilità	Scarsa affidabilità meccanica, difficoltà di trattamento e conservazione	Protesi vascolari, protesi valvolari, rivestimenti

Figura 1.9: Principali vantaggi, svantaggi e applicazioni di ciascuna tipologia di biomateriali

Esistono tuttavia dei requisiti che, indipendentemente dal tipo di struttura chimica, tutti i materiali per uso biomedico devono possedere:

- **Biocompatibilità:** vale a dire *“la capacità di un materiale di determinare una reazione favorevole del sistema vivente a cui è associato, alla sua presenza, in una specifica applicazione”*. Oltre alla compatibilità biologica, occorre anche tenere conto di quella morfologica e di quella funzionale. Con la prima si intende la capacità del materiale di interfacciarsi con il tessuto limitrofo, sia dal punto di vista della geometria, sia da quello della massa e della forma. Il biomateriale, nella sua forma finale, deve inoltre essere compatibile funzionalmente: è necessario dunque che il ruolo svolto dall'impianto nel suo complesso presenti caratteristiche tali da rispondere alla funzione per cui è stato progettato.
- **Biofunzionalità:** il materiale deve soddisfare i requisiti di progettazione, in termini fisici e meccanici, nella sua destinazione d'uso.
- **Atossicità:** i materiali non devono rilasciare sostanze nocive per l'organismo.

- Proprietà meccaniche: quali durezza, modulo elastico, resistenza alla trazione, tenacità compatibili con quelle del sito di impianto.
- Progettazione e fabbricazione adeguate: i biomateriali devono essere facilmente lavorabili e modellabili, ed un'adeguata progettazione è necessaria per garantire la qualità dei dispositivi.
- Elevata resistenza alla corrosione: è un aspetto importante soprattutto nella selezione dei biomateriali metallici, che possono andare incontro a corrosione se a contatto con i fluidi corporei, rilasciando ioni tossici per l'organismo. Inoltre, a causa della corrosione, si potrebbe ridurre la durata del dispositivo impiantato, situazione che richiederebbe un intervento chirurgico.
- Elevata resistenza all'usura: la bassa resistenza all'usura, accompagnata da un elevato coefficiente di attrito, si traduce in un allentamento dell'impianto. La corrosione dovuta all'attrito causa, oltre al rilascio di ioni metallici nocivi alla salute, una grave risposta infiammatoria, che potrebbe compromettere l'impianto.
- Elevata resistenza a fatica: essa è correlata alla risposta del materiale ai carichi ciclici ripetuti, come avviene, ad esempio, nel caso della protesi dell'anca. Le caratteristiche di resistenza a fatica dipendono fortemente dalle microstrutture presenti all'interno del materiale, che possono essere minimizzate con particolari trattamenti termici e superficiali.

1.4 Polimeri

I polimeri sono macromolecole organiche, formate da semplici unità strutturali ripetitive, i monomeri, legati tra di loro da legami chimici covalenti. I polimeri sono ottenuti tramite un processo chiamato "polimerizzazione". Questi materiali possono essere classificati in base alla natura dei loro costituenti: si parla di omopolimero se la macromolecola è formata da unico tipo di monomero, e di copolimero quando le catene sono costituite da monomeri differenti. In particolare, la presenza di due, tre o quattro unità diverse, determina la formazione rispettivamente di dimeri, trimeri e tetrameri. Una differente classificazione è basata sul grado di polimerizzazione, che è un indice relativo al numero di volte in cui il monomero si ripete in catena. In funzione di questo i polimeri si dividono in oligomeri (molecole costituite da un massimo di 1500 unità), in polimeri a basso peso molecolare (costituiti da 1500 fino a 5000 unità) e in polimeri ad alto peso molecolare (se vengono superate le 10000 unità).

I polimeri presentano particolari vantaggi rispetto alle altre classi di materiali. Ad esempio, hanno una grande varietà di composizione, che permette di modulare le proprietà fisico-meccaniche in

maniera ottimale per le specifiche applicazioni, bassi coefficienti di attrito, facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture complesse e la possibilità di modificarne chimicamente e/o fisicamente la superficie. Questo permette di ottenere polimeri dalla struttura molto simile ai polimeri naturali presenti nei tessuti, garantendo ottima biocompatibilità.

1.4.1 Struttura dei polimeri

Un altro possibile criterio per classificare i polimeri si basa sulla struttura delle catene. Esistono quattro tipi di catena polimerica: lineare, ramificata, a legami trasversali e reticolata.

La struttura lineare è caratterizzata da monomeri che si susseguono uno dopo l'altro creando lunghe macromolecole filiformi. Queste macromolecole poi si legano tramite dei legami di tipo *Van der Waals*, legami a idrogeno ed interazioni dipolo-dipolo.



Figura 1.10: Struttura lineare dei polimeri

La struttura ramificata è caratterizzata da una catena principale di tipo lineare, da cui partono delle ramificazioni laterali, legate tramite legami deboli alla catena lineare.



Figura 1.11: Struttura ramificata dei polimeri

La struttura a legami trasversali è caratterizzata dall'unione di catene lineari adiacenti, tramite delle ramificazioni che formano legami covalenti, creando in questo modo una struttura tridimensionale.



Figura 1.12: Struttura a legami trasversali dei polimeri

La struttura reticolata è caratterizzata da monomeri che formano tre o più legami covalenti attivi, creando reti tridimensionali. Il polimero è tipicamente una macromolecola reticolata.

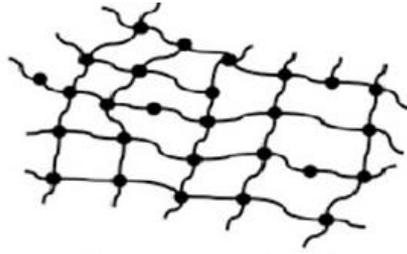


Figura 1.13: Struttura reticolata dei polimeri

I polimeri con catena lineare o ramificata hanno proprietà meccaniche inferiori rispetto ai polimeri reticolati. Infatti, le catene lineari e ramificate sono legate fra loro da legami deboli del tipo *Van der Waals* e interazioni dipolo-dipolo che consentono, quando il polimero è sottoposto ad una sollecitazione, lo scorrimento delle catene l'una rispetto all'altra. Tale scorrimento, di tipo viscoso, è responsabile del comportamento viscoelastico dei polimeri a catena lineare o ramificata. Nel caso dei polimeri reticolati, invece, la massa del polimero è assimilabile ad una sola macromolecola che si estende tridimensionalmente con una rigidità e con proprietà meccaniche superiori. Infatti, si generano tra le catene dei veri e propri ponti con legami covalenti tali per cui non è più possibile avere lo scorrimento viscoso.

1.4.2 Tecniche di polimerizzazione

Le principali tecniche di polimerizzazione sono sostanzialmente due:

- Polimerizzazione a catena: avviene per addizioni successive, e in genere non sono presenti sottoprodotti, quindi si tratta in genere di una polimerizzazione per addizione. Questa si verifica quando la molecola di monomero contiene legami doppi (o tripli) fra gli atomi di carbonio. Infatti, rompendo il doppio legame è possibile rendere attivo il monomero il quale a sua volta addiziona a sé altri monomeri fino a quando, disattivandosi, la macromolecola diventa stabile. La reazione può iniziare per mezzo del calore, della luce, o di una sostanza chimica appositamente aggiunta al monomero chiamata iniziatore. L'iniziatore può essere un radicale libero (polimerizzazione radicalica), un carbocatione (polimerizzazione cationica) oppure un carbanione (polimerizzazione anionica) (Figura 1.14).

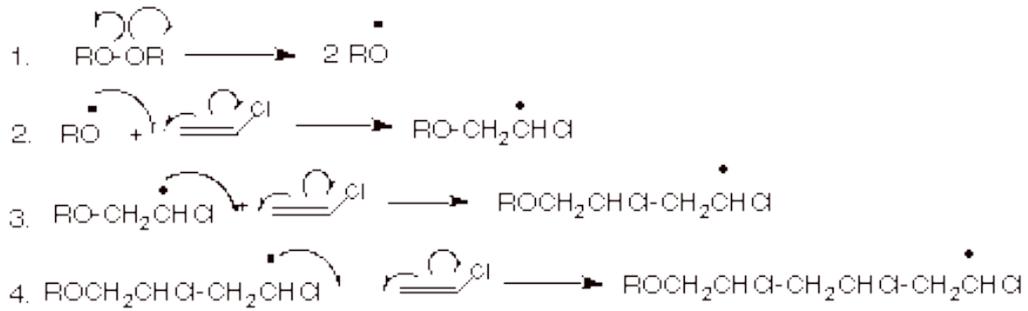


Figura 1.14: Schema di polimerizzazione per poliaddizione

Il processo di poliaddizione è suddiviso in quattro periodi:

1. Periodo iniziale: consiste nell'attivazione delle molecole tramite l'iniziatore.
2. Periodo di propagazione: prevede la crescita del monomero e la creazione della catena polimerica.
3. Periodo di chiusura: consiste nella fase in cui termina la crescita della catena polimerica e può avvenire tramite un diretto accoppiamento tra due molecole o tramite l'attaccamento di un radicale o con uno scambio di un atomo di idrogeno.
4. Trasferimento di catena: una molecola in crescita può disattivarsi ed arrestare il suo accrescimento attivando una molecola di monomero o una catena che si era già chiusa.

Le poliaddizioni sono caratterizzate dall'assenza di altri prodotti di reazione. Inoltre, i pesi medi molecolari possono raggiungere valori anche molto elevati. Tra i principali polimeri che si ottengono per poliaddizione si possono citare, per esempio, polietilene, polimetilmetacrilato, polistirene e polivinilcloruro.

- Polimerizzazione a stadi: è possibile nel caso in cui tra i monomeri siano presenti almeno due gruppi funzionali reattivi. Se la polimerizzazione è accompagnata dall'eliminazione dei prodotti secondari come l'acqua, il metanolo, il cloruro di sodio e l'acido cloridrico, si parla di policondensazione (Figura 1.15).

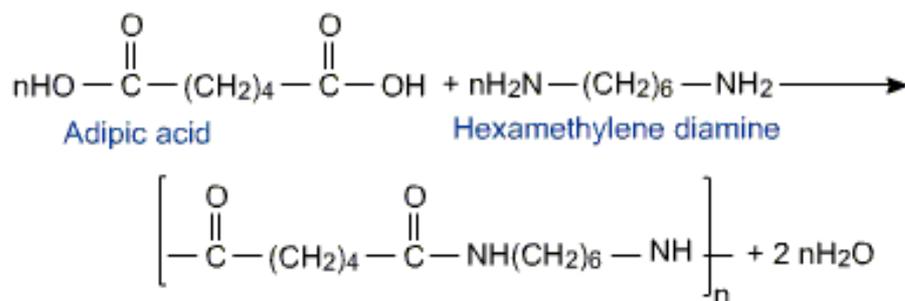


Figura 1.15: Esempio di polimerizzazione per poliaddizione

Con queste polimerizzazioni, la composizione del polimero finale è diversa da quella dei monomeri di partenza. Questo processo di sintesi presenta alcuni aspetti negativi in quanto risulta abbastanza lento e i materiali ottenuti hanno pesi molecolari non particolarmente elevati. Fanno parte dei polimeri ottenuti tramite policondensazione poliesteri, poliammidi, poliuretani e polisilossani.

1.4.3 Proprietà dei polimeri

Oltre al processo di sintesi, il grado di polimerizzazione e la struttura, esistono altre proprietà tramite le quali è possibile andare a classificare i polimeri come la cristallinità, il peso molecolare e le proprietà termomeccaniche.

Il peso molecolare di un polimero è uguale al peso molecolare del monomero moltiplicato per il grado di polimerizzazione. Quest'ultimo è definito come il numero di unità monomeriche che costituiscono la macromolecola. A seguito della complessità dei meccanismi coinvolti in una reazione di polimerizzazione, la massa di polimero di solito non contiene una sola macromolecola, ma molte, e il grado di polimerizzazione non è uguale per tutte. Proprio per questo motivo si definiscono il grado di polimerizzazione medio, dato dal rapporto tra il numero di unità monomeriche di un certo tipo e il numero totale di macromolecole polimeriche presenti nel sistema, e il peso molecolare medio.

Per calcolare il peso molecolare medio delle macromolecole si può far riferimento a due diversi valori:

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

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

dove N_i indica il numero di molecole di peso molecolare M_i .

- Peso molecolare medio ponderale (M_w): esprime 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 viene influenzato soprattutto dalle molecole di grandi dimensioni, mentre M_n da quelle più piccole. Le differenze tra i valori delle medie statistiche dipendono dall'ampiezza e dalla forma della distribuzione (Figura 1.16).

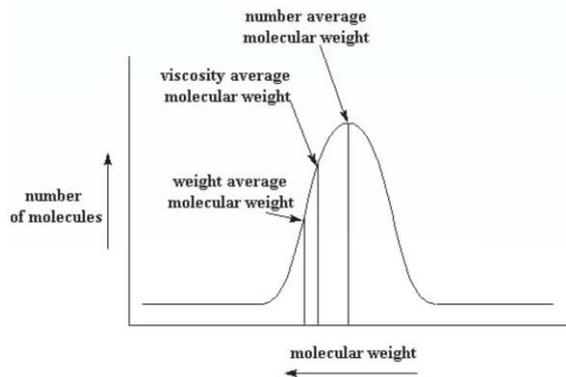


Figura 1.16: Distribuzione del peso molecolare

Si definisce infine indice di polidispersità (PD), rappresentativo della larghezza della distribuzione dei pesi molecolari, come il rapporto:

$$PD = M_w/M_n$$

Se $PD=1$ si parla di polimero monodisperso, ovvero costituito interamente da molecole con lo stesso peso molecolare. Nella pratica, per i polimeri sintetici il limite inferiore della polidispersità difficilmente arriva ad 1, ma solitamente è compreso tra 1.5 e 2.5. In campo biomedicale si richiedono polimeri ad alto peso molecolare e con un indice PD relativamente basso, fattori che assicurano buone proprietà meccaniche, in quanto queste sono ampiamente influenzate dal peso molecolare (Figura 1.17). Buone prestazioni meccaniche sono garantite anche da una bassa distribuzione dei pesi molecolari.

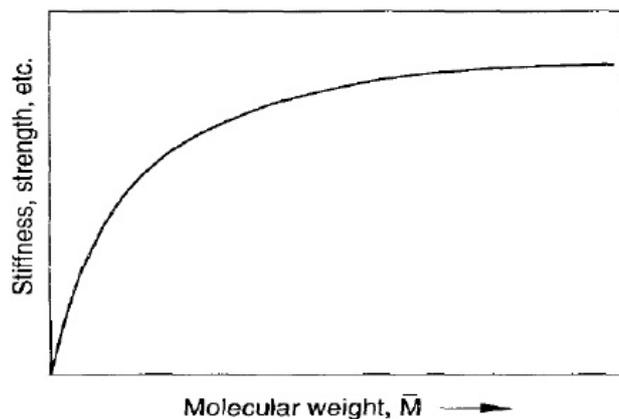


Figura 1.17: Influenza del peso molecolare sulle proprietà meccaniche

Dal punto di vista dell'organizzazione delle catene all'interno del materiale, i polimeri presentano una struttura a due fasi, una amorfa ed una cristallina. Nelle zone cristalline le catene del polimero sono disposte ordinatamente e si ripetono nello spazio, mentre nella porzione amorfa, sempre

presente, le catene presentano una disposizione disordinata simile ad un gomitolo a più fili (Figura 1.18).

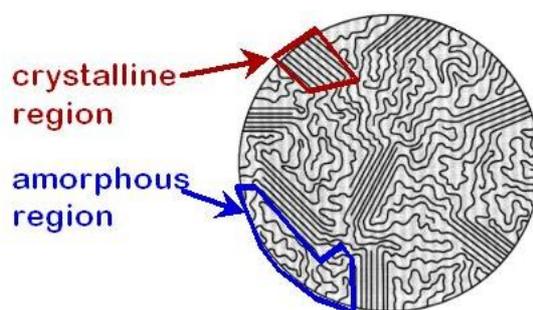


Figura 1.18: Fasi cristalline e amorfe di un polimero

È possibile definire un “grado di cristallinità” definito come il rapporto percentuale del peso di sostanza in forma cristallina rispetto al peso totale. Nei materiali polimerici questo valore è compreso tra il 5% ed il 45%, e risulta maggiore per polimeri a catena lineare poiché nei polimeri con monomeri fortemente asimmetrici, fortemente ramificati o con frequenti legami trasversali presentano gruppi funzionali che ostacolano l’allineamento. In generale un maggior grado di cristallinità determina un aumento della densità, un aumento della rigidità, soprattutto ad alte temperature, un minor coefficiente di attrito e quindi una miglior resistenza all’usura e al *creep*.

Un’altra possibile classificazione dei materiali polimerici è quella basata sul comportamento meccanico al variare della temperatura. I polimeri si possono suddividere in termoplastici e termoindurenti. I primi, a catena lineare o ramificata, sono modellabili plasticamente un numero praticamente illimitato di volte, purché ciò avvenga in un certo campo di temperature. I secondi invece, a catena reticolata, oltre un certo stadio del processo di ottenimento non sono più modellabili e anzi è proprio il calore che determina inevitabilmente l’indurimento del polimero.

È possibile anche rappresentare l’andamento con la temperatura del modulo elastico di diversi materiali polimerici (Figura 1.19). Nel caso in cui il materiale sia lineare amorfo, all’aumentare della temperatura si osservano due transizioni in corrispondenza di due successivi intervalli di temperatura. Il primo, nell’intorno della temperatura di transizione vetrosa (T_g), segna il passaggio da stato vetroso, ossia fragile e scarsamente deformabile, a stato gommoso, caratterizzato da bassa rigidità ed elevata deformabilità e tenacità. Il valore di questa temperatura risulta inferiore per i materiali termoplastici rispetto a quelli termoindurenti. Il secondo intervallo, nell’intorno della temperatura di rammollimento (T_r), divide il campo di proprietà di un polimero gommoso da quello di un polimero liquido, quindi lavorabile anche se molto viscoso. Oltre la temperatura limite di stabilità chimica (T_1), il polimero si degrada in quanto si rompono i legami chimici e quindi si è in presenza di un altro materiale. Nel caso di un materiale polimerico parzialmente cristallino la transizione vetrosa modifica poco le proprietà meccaniche che invece cadono moltissimo alla

temperatura di fusione (T_m), a causa della rottura dei legami della fase cristallina. Nel caso di un polimero reticolato termindurente non ci sono significative variazioni di proprietà con la temperatura fino al limite di stabilità chimica e di conseguenza risulta impossibile stabilire esattamente i valori di T_g e T_m .

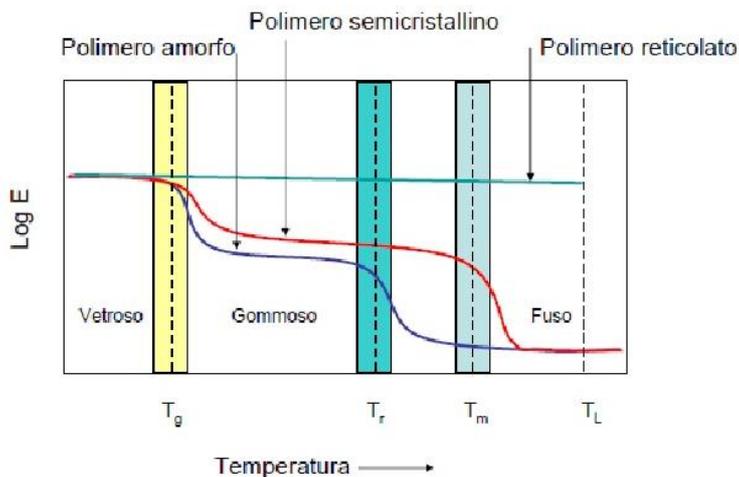


Figura 1.19: Andamento del modulo elastico, in funzione della temperatura, per polimeri a differente struttura

1.4.4 Poliesteri alifatici

I poliesteri sono polimeri contenenti gruppi esterei (Figura 1.20) nella catena principale, che vengono ottenuti tramite policondensazione di uno o più acidi carbossilici polifunzionali con uno o più alcoli polifunzionali ⁽²¹⁾. Questi polimeri possono essere suddivisi in alifatici o aromatici, a seconda della presenza o meno di anelli aromatici nella catena.

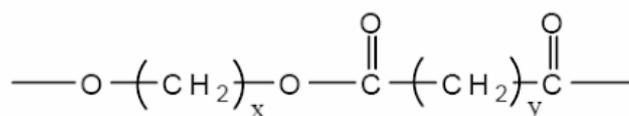


Figura 1.20: Struttura generale di un poliesteri alifatico

I poliesteri alifatici grazie alle loro eccellenti biocompatibilità, biodegradabilità e resistenza meccanica risultano essere la classe di maggior successo e diffusione commerciale tra tutti i polimeri biodegradabili. In particolare, in ambito biomedico vengono utilizzati come suture biorassorbibili, protesi e *stent* vascolari e protesi per legamenti e alle non sempre idonee proprietà fisiche e meccaniche e velocità di degradazione. Una strategia vincente per migliorare le proprietà non soddisfacenti consiste nella copolimerizzazione, ovvero nell'inserimento lungo la catena di un ompolimero di unità comonomeriche diverse, scelte opportunamente.

1.4.4.1 Poliesteri alifatici per uso biomedicale

I poliesteri maggiormente utilizzati per applicazioni biomediche sono polimeri termoplastici lineari aromatici o alifatici come il polietilentereftalato (PET), l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA) ed il poli(butilene succinato) (PBS). Di quest'ultimo si parlerà ampiamente in seguito.

- Acido poliglicolico (PGA): appartiene alla famiglia di poliesteri lineari alifatici (Figura 1.21), risulta semicristallino (densità dei cristalli pari a $1,69 \text{ g/cm}^3$), presenta una temperatura di transizione vetrosa tra $35\text{-}40 \text{ }^\circ\text{C}$ e un punto di fusione compreso tra $224\text{-}227 \text{ }^\circ\text{C}$. Dal punto di vista meccanico, esso risulta piuttosto rigido, con modulo di Young di circa 12.5 GPa . Questo polimero è insolubile in pressoché qualunque solvente organico (acetone, diclorometano, cloroformio, acetato di etile e tetraidrofurano); solventi contenenti un elevato numero di atomi di fluoro, come l'1,1,1,3,3,3-esafuoro-2-propanolo, sono tuttavia in grado di dissolvere l'acido poliglicolico, rendendo possibile la preparazione di fibre e film ⁽¹⁷⁾.

Un esempio di applicazione in ortopedia di tale polimero biodegradabile è quello delle viti, placche e chiodi intramidollari che, invece che essere rimossi quando hanno esaurito la loro funzione stabilizzante delle ossa fratturate, vengono assorbiti ed eliminati dall'organismo ospite. Il principale problema che si riscontra è il controllo della velocità di degradazione che deve essere adeguata al processo di guarigione dell'osso, in modo che il peggioramento delle proprietà meccaniche del polimero corrisponda alla contemporanea mineralizzazione dell'osso.

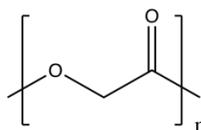


Figura 1.21: Struttura dell'acido poliglicolico

- Acido polilattico (PLA): è un polimero biodegradabile (Figura 1.22), che può essere preparato sia mediante condensazione dell'acido lattico sia mediante ROP del lattide.

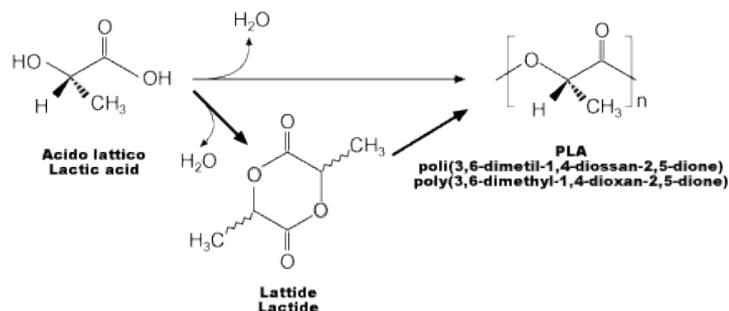


Figura 1.22: Vie sintetiche per la polimerizzazione dell'acido lattico

Siccome l'acido lattico è una molecola chirale esistente sotto forma di due isomeri L e D, il termine acido polilattico si riferisce a 4 diversi polimeri: acido poli-L-lattico (PLLA), acido poli-D-lattico (PDLA) e poli-D,L-lattico (PDLLA, copolimero dei primi due) e l'acido meso-polilattico.

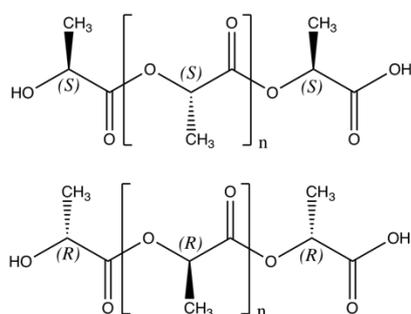


Figura 1.23: Struttura dell'acido polilattico (L e D)

Inizialmente i prodotti a base di acido polilattico vennero commercializzati per dispositivi di sutura riassorbibili, dopodiché vennero sviluppati diversi dispositivi protesici impiantabili. Di questi prodotti, i più studiati in ambito biomedico sono il PLLA e il PDLLA; in particolare, il PLLA ha riscontrato un notevole successo grazie alle sue caratteristiche meccaniche e di biocompatibilità. Esso infatti è caratterizzato da una cristallinità del 37% con un punto di fusione di circa 173-178°C e una temperatura di transizione vetrosa di circa 60-65°C. Possiede un'elevata resistenza a trazione ed elevato modulo elastico, che lo rendono particolarmente adatto per l'utilizzo in dispositivi che devono reggere carichi importanti. Il PLLA è stato inoltre impiegato nell'ingegneria tissutale nella costruzione di *scaffold* per la rigenerazione di tessuto osseo, vascolare, neurale e tendineo. Il PDLLA è un polimero amorfo (a causa della disposizione casuale dei suoi due monomeri isomerici) con T_g intorno ai 55-60°C e che possiede, rispetto al PLLA, una resistenza a trazione minore, un allungamento a rottura maggiore e tempi di degradazione più rapidi (anche se comunque

non inferiori ad un anno), fattori che lo rendono idoneo per la realizzazione di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci e di *scaffold*.

- Acido polilattico-co-glicolico (PLGA): è un copolimero sintetico ottenuto dalla polimerizzazione tra PLA (nelle sue due forme D,L-lattico e L-lattico) e PGA (Figura 1.24). I due omopolimeri presentano caratteristiche molto diverse tra loro, perciò, a seconda della composizione del copolimero, possono essere ottenuti PLGA con proprietà molto diverse. Il PLGA viene utilizzato per la fabbricazione di suture e impianti, per la realizzazione di nano e microparticelle biodegradabili per il rilascio controllato di particelle come proteine, vaccini, farmaci chemioterapici, antibiotici, analgesici, antinfiammatori e RNA. Inoltre, questo polimero favorisce l'adesione e la proliferazione cellulare: rappresenta, quindi, un materiale ideale per la realizzazione di supporti per la rigenerazione di tessuto osseo, cartilagineo, tendineo, pelle, fegato e tessuto nervoso.

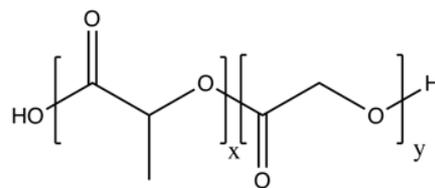


Figura 1.24: Struttura dell'acido polilattico-co-glicolico

- Policaprolattone (PCL): è un polimero semicristallino (Figura 1.25) ottenuto tramite ROP del monomero ciclico ϵ -caprolattone. Il PCL presenta una T_m di 55-69°C e una T_g di circa -60°C⁽¹⁸⁾. Per quanto concerne le proprietà meccaniche, si ha: modulo elastico di circa 23 MPa e allungamento a rottura del 4700%. Tali valori fanno del PCL un biomateriale altamente elastico. Queste caratteristiche, insieme all'elevata processabilità, lo rendono adatto per la realizzazione di *scaffold* per la rigenerazione di ossa, legamenti, cartilagine, pelle, tessuto nervoso e vascolare⁽¹⁹⁾. I tempi di degradazione sono lunghi (circa 2 anni), proprietà che ne consente l'utilizzo per la realizzazione di dispositivi impiantabili a rilascio controllato.

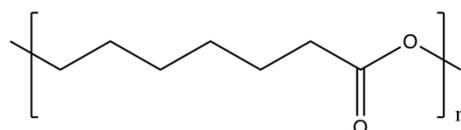


Figura 1.25: Struttura del policaprolattone

- Polietilentereftalato (PET): è un poliesteri (Figura 1.26) termoplastico aromatico che può esistere sia in forma amorfa (densità dei cristalli di 1,37 g/cm³) sia in forma semi-cristallina (densità dei cristalli di 1,46 g/cm³). Ha una temperatura di fusione di 260°C e una

temperatura di transizione vetrosa di circa 79°C. Può essere utilizzato come semplice PET oppure per creare fibre di Dacron, la cui produzione prevede quattro fasi: la resinatura, a base di formaldeide in modo da plastificarlo, il fissaggio tramite calore, la calandratura per aumentare la compattezza del tessuto e l'appretto per migliorare la finitura superficiale.

Il PET viene utilizzato come suture non riassorbibili mentre il Dacron viene utilizzato in ortopedia, impregnato con altre sostanze quali ad esempio le gomme siliconiche, per la sostituzione di tendini e legamenti, nel settore cardiovascolare per fabbricare protesi vascolari e anelli di sutura per protesi vascolari cardiache e per rinforzare tessuti danneggiati come nel caso delle ernie addominali o inguinali.

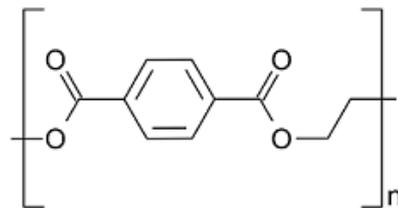


Figura 1.26: Struttura chimica del PET

1.5 Copolimeri

I copolimeri sono dati dall'unione di due o più tipi di monomeri. La natura dei monomeri, la loro distribuzione nelle macromolecole e la loro percentuale relativa sono variabili e permettono, quindi, di modificare e modulare le proprietà finali del copolimero. Una prima classificazione dei copolimeri si può effettuare in base alla disposizione dei diversi monomeri all'interno della catena polimerica:

- Copolimeri statistici (o random): in cui le unità monomeriche si dispongono casualmente, senza un ordine preciso (Figura 1.27).

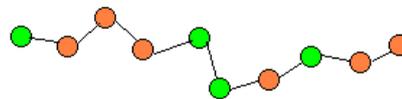


Figura 1.27: Copolimero statistico

- Copolimeri alternati: in cui le unità monomeriche si dispongono in maniera alternata (Figura 1.28).

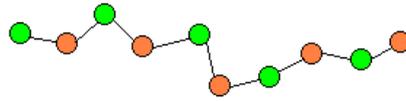


Figura 1.28: Copolimero alternato

- Copolimeri aggraffati (o ad innesto): in cui nella catena principale, costituita dallo stesso tipo di unità monomeriche, sono innestate catene laterali di diversa lunghezza di un altro monomero (Figura 1.29).

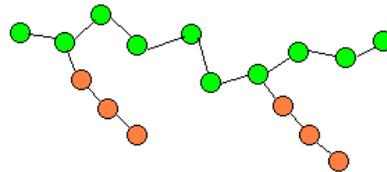


Figura 1.29: Copolimero ad innesto

- Copolimeri a blocchi: in cui una catena più o meno lunga dello stesso monomero è unita ad un'estremità ad una catena dell'altro monomero (Figura 1.30).

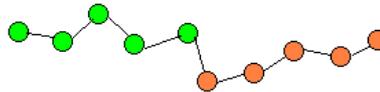


Figura 1.30: Copolimero a blocchi

1.5.1 Copolimeri statistici

Nei copolimeri statistici le diverse unità comonomeriche sono disposte in maniera casuale e indipendente dalla natura delle unità adiacenti ⁽²⁰⁾. I copolimeri statistici vengono ottenuti mediante processi di poliaddizione radicalica, ionica o di coordinazione, o mediante policondensazione delle diverse subunità comonomeriche. Essendo la reattività dei monomeri in continua variazione durante la reazione, non è facile determinare la composizione del copolimero associato, nota anche quella iniziale dei monomeri. Proprio per questo motivo, è possibile affermare che la composizione di un copolimero è istantanea e definibile come l'esito di conversioni infinitesime di monomeri ⁽²⁰⁾. Anche per i copolimeri si possono definire la temperatura di fusione della fase cristallina, T_m , e quella di transizione vetrosa della componente amorfa, T_g .

La transizione vetrosa dei copolimeri statistici varia in maniera monotona con la composizione e, nel caso in cui una o entrambe le unità monomeriche siano in grado di cristallizzare, la transizione

vetrosa caratteristica della fase amorfa si manifesta ad una temperatura T_g intermedia rispetto a quelle proprie dei due monomeri. Al fine di descrivere l'andamento di T_g al variare della composizione polimerica, sono state formulate diverse equazioni, tra le quali figura quella di Fox:

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

in cui w_A e w_B rappresentano le frazioni in peso dei rispettivi monomeri.

Oltre ad essa è stata messa a punto anche un'equazione per andamenti regolari di T_g (equazione di Couchman). In entrambi i casi però si delinea un andamento monotono crescente di T_g al variare della composizione. Questo non è sempre verificato dal punto di vista sperimentale, in quanto alcuni copolimeri mostrano un massimo o un minimo di T_g a composizioni intermedie. Quindi le equazioni sopracitate non descrivono correttamente l'andamento dei dati sperimentali. A tale scopo è stata messa a punto una correzione dell'equazione di Fox.

Un copolimero statistico composto da due diversi tipi di monomero, A e B, può cristallizzare in due diversi modi: in un caso si forma un sistema a due fasi, in cui la fase cristallina è composta interamente da unità di A ed è in equilibrio con una fase amorfa mista di unità di A e di unità di B non cristallizzabili. In alternativa, l'unità del monomero B può entrare a far parte del reticolo cristallino, sia in forma di difetti, sia in condizioni di equilibrio. Anche per la temperatura di fusione esistono diverse equazioni, tra cui quelle di Flory e di Baur (nel caso di esclusione di B), e modelli come quello di Sanchez-Eby e di Wendling-Suter (nel caso di inclusione di B), che permettono di delineare un andamento della T_m in funzione della composizione.

1.6 Polibutilene succinato (PBS)

Il polibutilene succinato è un poliesteri alifatico biodegradabile (Figura 1.31), ad alto peso molecolare, solubile in cloroformio e ad alta capacità di cristallizzazione. Sebbene la sua commercializzazione sia principalmente rivolta agli imballaggi biodegradabili, ha recentemente attirato notevole attenzione in campo biomedico per le sue interessanti proprietà ⁽²²⁾.

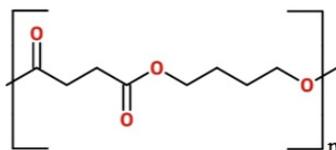


Figura 1.31: Struttura del poli(butilene succinato)

Infatti, da un punto di vista termico, la temperatura di fusione è di circa 115°C e la temperatura di transizione vetrosa è ben al di sotto della temperatura ambiente, garantendo così un ampio intervallo di lavorabilità che ne consente l'estrusione, lo stampaggio a iniezione e la termoformatura. Anche

da un punto di vista delle materie prime e della produzione, è un materiale assai interessante poiché i costi sono moderati. Infine, per quanto riguarda la biocompatibilità e la biodegradabilità, già comprovata, sono stati effettuati diversi studi, sia in vitro sia in vivo; nel primo caso, cellule animali e umane (cellule staminali, fibroblasti, osteoblasti, condrociti, splenociti, cardiomiociti) sono state 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). Dagli studi di citotossicità indiretta non è emersa alcuna differenza tra il controllo negativo ed il materiale studiato, confermando la biocompatibilità da contatto indiretto, ed anche gli studi di immunostochimica (tecnica grazie alla quale è possibile determinare il grado di mutazione cellulare indotta dal film polimerico) hanno dato esito negativo. Negli studi in vivo, strutture omo- o co-polimeriche a base di PBS sono state impiantate in piccole cavie. A seguito della pratica chirurgica, si è osservato un primo stadio di risposta infiammatoria e una successiva stabilizzazione della zona di impianto, confermando anche la biocompatibilità in vivo.

Attualmente, in ambito biomedicale, viene utilizzato nella produzione di *stents*, involucri compatibili con la sterilizzazione a vapore, componenti per la diagnostica a immagini, sistemi biodegradabili da impiantare per il rilascio di farmaci e nell'ingegneria tissutale.

Nella sintesi di PBS sono utilizzati come monomeri acido succinico e 1,4-butandiolo, che sono comunemente ottenuti da risorse fossili e sono facilmente reperibili sul mercato. Entrambi, però, possono essere ottenuti anche da fonti rinnovabili, ad esempio attraverso la fermentazione di zuccheri, rendendo il PBS un copolimero completamente bio-based e sostenibile ⁽²²⁾. L'esterificazione diretta dell'acido succinico con 1,4-butandiolo è il modo più utilizzato per produrre PBS (Figura 1.32).

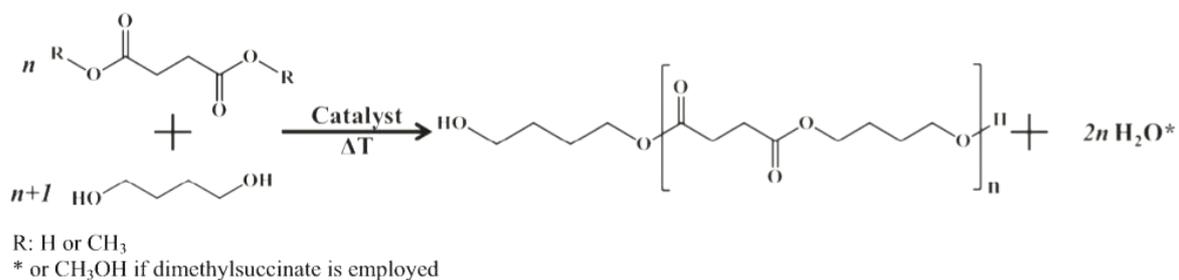


Figura 1.32: Policondensazione per la produzione del PBS

Questo processo è costituito da due fasi: nella prima si verifica un'esterificazione con rimozione di acqua, mentre nella seconda, condotta a temperatura più elevata e a pressione ridotta, viene rimosso il glicole in eccesso, promuovendo contemporaneamente le reazioni di transesterificazione che permettono di ottenere alti pesi molecolari. La reazione richiede la presenza di un catalizzatore appropriato come titanio, zirconio o stagno.

1.6.1 Copolimeri a base di PBS

Come detto in precedenza, una delle applicazioni biomediche del PBS è l'ingegneria tissutale, in cui questo tipo di materiale viene impiegato sia sotto forma di film sia come *scaffold*. A seconda, poi, della specifica applicazione, per migliorare le proprietà dell'omopolimero di riferimento, si effettua la copolimerizzazione, cercando di non alterare le sue caratteristiche già soddisfacenti; in particolare, i copolimeri a base PBS vengono realizzati allo scopo di diminuire la cristallinità, migliorare le proprietà meccaniche in termini di flessibilità, poiché questo materiale mostra un comportamento fragile, con allungamenti a rottura estremamente ridotti, e aumentarne il tasso di biodegradabilità. Attraverso le principali strategie sintetiche di copolimerizzazione, la copolicondensazione, la miscelazione reattiva e la chain extension, è stato possibile ottenere rispettivamente copolimeri statistici a diversa composizione, copolimeri multiblocco con blocchi a diversa lunghezza (semplicemente variando il tempo di miscelazione), e copoliesteri-uretani multiblocco ad alto peso molecolare ⁽²²⁾.

In questa direzione si è sviluppata una notevole attività di ricerca, a cui contribuisce anche il gruppo di ricerca della Prof.ssa Lotti, relatrice della presente tesi: il PBS è stato copolimerizzato con altri poliesteri alifatici contenenti legami eterici e tio-eteri, come poli(butilene tiodiglicolato), poli(tiodietilene succinato), poli(trietilene succinato), poli(dietilene succinato) e poli(butilene diglicolato). Oltre a ciò la ricerca si è mossa anche nella direzione di subunità derivanti dal glucosio, quali mannitolo e sorbitolo. Sono stati realizzati, inoltre, diversi compositi ottenuti miscelando il PBS con materiali organici come chitosano, il secondo polisaccaride più abbondante sulla terra che vanta applicazione in campo biomedicale grazie alla sua biodegradabilità e biocompatibilità. Un fronte di ricerca molto attivo riguarda poi copolimeri a base di idrossiapatite e fluoroapatite. L'idrossiapatite è un materiale ceramico contenente fosfato di calcio ed è il principale componente delle ossa e dei denti, tale materiale è bioattivo e mostra un'eccellente biocompatibilità con i tessuti duri, in più è in grado di promuovere la crescita delle ossa ⁽²³⁻²⁹⁾.

1.7 Neopentil glicole (NG)

Il neopentil glicole (NG) è un polialcololo (o glicolo) poiché contiene due o più gruppi alcolici (-OH) nella catena alifatica (Figura 1.33).

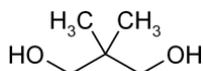


Figura 1.33: Struttura chimica del neopentil glicole (NG)

La principale caratteristica di questo glicole è che, nonostante conservi una dimensione limitata, presenta due pendagli metilici. Questa caratteristica strutturale esplica un duplice effetto: da un lato abbatta la cristallinità del prodotto finale, in quanto i due gruppi laterali disturbano l'organizzazione delle macromolecole; d'altro canto i gruppi metilenici aumentano la rigidità del glicole, provocando un aumento della temperatura di transizione vetrosa. Questo avviene poiché l'energia necessaria per mettere in rotazione i legami carbonio – carbonio, in presenza di sostituenti, è maggiore. Oltre a ciò, il neopentil glicole apporta vantaggi legati alla stabilità termica nei prodotti polimerizzati, in quanto il meccanismo di β -scissione, con cui procede la degradazione, viene impedito dai gruppi metilici presenti. Il neopentil glicole è già noto alla comunità scientifica nella produzione di poliesteri, sono infatti riportati esempi di polimerizzazioni con diacidi come sebacati o adipati ^(30,31). Interessanti sono anche gli studi svolti relativamente a copolimeri a base di neopentil glicole, che trovano applicazione in vari campi come food packaging ⁽³³⁾ ma anche per la produzione di lenti plastiche ⁽³²⁾.

1.8 Biodegradazione

La biodegradazione consiste nell'alterazione chimica e fisica che un materiale subisce in ambiente biologico. Il fenomeno pertanto interessa anche i biomateriali di natura polimerica che vengono impiantati nell'organismo. Può essere voluta, come nel caso dei polimeri utilizzati per il rilascio controllato di farmaci e per mezzi di osteosintesi riassorbibili, come viti, placche e chiodi intramidollari, oppure può essere del tutto indesiderata come nel caso di protesi che devono durare per molti anni o addirittura per tutta la vita del paziente. In quest'ultimo caso, il processo di biodegradazione può essere molto pericoloso per la salute del paziente perché si scatena improvvisamente, inducendo nel materiale caratteristiche di deformabilità o di fragilità, e nel caso porti a rottura del materiale, potrebbe provocare la perdita di frammenti che risultino tossici per l'organismo ⁽³⁴⁾.

Le condizioni fisiologiche a cui sono sottoposti i biomateriali inseriti nell'organismo sono: valori di pH intorno alla neutralità, temperature intorno ai 37°C e basse concentrazioni saline. Proprio l'ambiente salino può innescare modificazioni di carattere chimico e fisico nei materiali polimerici. I principali fenomeni che possono portare al deterioramento di protesi impiantabili costruite con materiali polimerici possono essere di natura chimica, come l'ossidazione, oppure essere ricondotti a modificazioni chimiche innescate da processi di termolisi, fotolisi e radiolisi. Per quanto riguarda le modificazioni di carattere più propriamente fisico si possono avere diversi fenomeni, tra cui la cristallizzazione e il rammollimento. Inoltre, la degradazione può essere provocata da fattori meccanici come tensioni dovute a carichi costanti o ciclici. Nella maggior parte dei casi, la

degradazione del biomateriale è dovuta alla combinazione di più meccanismi che operano contemporaneamente sul materiale.

L'organismo ha capacità autonome di difendersi da situazioni che possano danneggiarlo in qualche sua parte. Questa situazione risulta critica in quanto i biomateriali vengono considerati oggetti estranei, perché la loro accettazione avviene sulla base di un riconoscimento della natura da parte dei tessuti piuttosto che sulla valutazione della funzione che devono svolgere all'interno dell'organismo nel suo insieme. Per garantire, quindi, la funzionalità e la durata delle protesi impiantabili è indispensabile una vasta sperimentazione preclinica dei materiali e delle procedure seguite per la fabbricazione dei manufatti. Questa sperimentazione preventiva risulta molto difficile nel caso di impianti destinati a durare per anni, in condizioni d'uso variabili da paziente a paziente. Inoltre, simulazioni classiche, come ad esempio l'accelerazione artificiale dei processi di invecchiamento e usura, non sono in grado di prevedere tutte le variabili che possono portare ad un prematuro calo delle prestazioni. Pertanto, è senz'altro auspicabile, e spesso necessario, il monitoraggio nel tempo delle condizioni e delle prestazioni delle protesi in vivo.

I principali tipi di biodegradazione che presentano i materiali polimerici sono i seguenti:

1. Biodegradazione chimica e biochimica.
2. Biodegradazione idrolitica.
3. Processi idrolitici indotti dall'organismo ospite.
4. Biodegradazione ossidativa.
5. Ossidazione diretta da parte dell'organismo.
6. Ossidazione indotta da ioni metallici.
7. Ossidazione mediata dall'ambiente esterno.
8. Rottura per sollecitazione meccanica.
9. Sterilizzazione.

1.9 Biodegradazione idrolitica

Il processo di idrolisi comporta la scissione di legami chimici ad opera dell'acqua. La velocità di idrolisi tende ad aumentare al crescere del numero di gruppi funzionali idrolizzabili (ad esempio, nel caso dei poliesteri il legame estereo), al diminuire della cristallinità, con la mancanza o lo scarso numero di legami trasversali, e anche con la sollecitazione meccanica. Le strutture porose, a causa dell'elevato rapporto tra area superficiale e volume, sono particolarmente suscettibili all'idrolisi. Fattori che, al contrario, tendono a ridurre l'idrolisi sono la presenza nel polimero di zone idrofobiche, la reticolazione, una elevata cristallinità, bassi valori di sollecitazione meccanica e forme compatte.

La degradazione può essere monitorata attraverso la misurazione delle variazioni di peso molecolare, derivanti dalla scissione dei legami, o di perdita di peso, imputabile al passaggio in soluzione di molecole a basso peso molecolare. Inoltre, la degradazione può provocare anche variazione a livello della fase cristallina e alterazione delle proprietà meccaniche ⁽³⁵⁾.

CAPITOLO 2: SCOPO DELLA TESI

In Europa, in questi 25 anni, si è verificato un calo drastico della mortalità cardiovascolare, che in alcuni Paesi si è più che dimezzata. Nonostante questa riduzione le malattie cardiovascolari sono tuttora la prima causa di morte in Europa, rappresentando il 45% della mortalità generale. Si tratta, in termini assoluti di 1,8 milioni di decessi all'anno nell'Unione europea.

Per quanto concerne l'Italia, le malattie cardiovascolari rappresentano ancora la principale causa di morte nel nostro paese, essendo responsabili del 44% di tutti i decessi. In particolare, la cardiopatia ischemica è la prima causa di morte in Italia, rendendo conto del 28% di tutte le morti, mentre gli accidenti cerebrovascolari sono al terzo posto con il 13%, dopo i tumori. Chi sopravvive a un attacco cardiaco diventa un malato cronico. La malattia modifica la qualità della vita e comporta notevoli costi economici per la società. In Italia la prevalenza di cittadini affetti da invalidità cardiovascolare è pari al 4,4 per mille (dati Istat). Il 23,5% della spesa farmaceutica italiana (pari all'1,34 del prodotto interno lordo), è destinata a farmaci per il sistema cardiovascolare (Relazione sullo stato di salute del Paese, 2000). Attualmente le terapie per il trattamento di queste problematiche includono interventi farmacologici e procedure chirurgiche, come l'impianto di dispositivi di assistenza ventricolare. Tuttavia, tali approcci servono a ripristinare la funzione o a limitare in qualche misura la progressione della malattia, ma non sono sempre efficaci a lungo termine e l'unico vero trattamento curativo è tutt'ora rappresentato dal trapianto di cuore. Questo presenta, però, diverse rilevanti complicanze, tra cui la scarsa disponibilità di organi da trapiantare, il fallimento dell'innesto primario, le complicanze infettive e, non da ultimo, il rigetto. Per superare questi problemi, la ricerca si sta focalizzando sempre più sullo studio di nuovi materiali biocompatibili e biodegradabili per la realizzazione di strutture porose tridimensionali in grado di supportare la crescita e l'adesione cellulare. Per creare queste strutture ci si avvale prevalentemente di materiali di natura polimerica in quanto rispetto agli altri biomateriali godono di una maggior biocompatibilità, di bassi coefficienti di attrito, di una facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture complesse, possono essere modificati chimicamente e/o fisicamente in superficie e possono immobilizzare cellule o biomolecole al loro interno o sulla superficie. All'interno di questa ampia famiglia, la classe di maggior interesse ad oggi risulta essere quella dei poliesteri alifatici; tra questi, il poli(butilene succinato) (PBS), già da tempo presente in commercio ed utilizzato nel campo degli imballaggi, sta suscitando un forte interesse anche in campo biomedicale, come testimoniato dai numerosi lavori apparsi recentemente in letteratura. Esso presenta infatti buone proprietà di biocompatibilità, stabilità termica ed elevata temperatura di fusione (115°C), una delle più alte tra i poliesteri alifatici ottenuti per policondensazione. Tuttavia, i principali svantaggi sono

legati al suo elevato grado di cristallinità (45-50%), che conferisce al materiale proprietà meccaniche non ottimali per alcune applicazioni in campo biomedicale, ovvero quelle in cui si richiede un basso modulo elastico ed un elevato allungamento a rottura e soprattutto un ritorno elastico significativo, come nel caso dell'ingegneria dei tessuti molli.

In tale contesto si inserisce il presente lavoro di Tesi, che ha come scopo la realizzazione di un nuovo copolimero statistico a base di PBS, caratterizzato auspicabilmente da un comportamento meccanico idoneo all'applicazione di interesse e da un diverso profilo di degradazione. Nello specifico, per la sintesi del nuovo materiale, realizzata in fuso, sono stati impiegati il dimetil succinato e due diversi glicoli, l'1,4-butandiolo ed il neopentil glicole.

La ricerca si è articolata nelle seguenti fasi:

- preliminare analisi bibliografica per focalizzare gli sviluppi recenti sull'argomento trattato;
- sintesi tramite policondensazione in massa del copolimero contenente la subunità neopentilglicole;
- verifica della struttura chimica e della composizione effettiva tramite risonanza magnetica nucleare (NMR);
- determinazione del peso molecolare del copolimero tramite cromatografia a permeazione su gel (GPC);
- stampaggio in film sottili del polimero sintetizzato mediante pressofusione;
- caratterizzazione termica mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC) e analisi termogravimetrica (TGA) del film;
- analisi diffrattometrica a Raggi X del film;
- caratterizzazione meccanica del campione mediante prove a trazione a rottura del film;
- analisi dei risultati ottenuti ed estrapolazione di correlazioni proprietà struttura.

CAPITOLO 3: METODI E STRUMENTAZIONI UTILIZZATI

3.1 Sintesi del copolimero P(BSNS)

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

Il polimero oggetto del presente elaborato è stato ottenuto tramite la usuale procedura di policondensazione in massa a due stadi, utilizzando come catalizzatore un composto organometallico.

Come mostrato in Figura 3.1, l'apparecchiatura impiegata è costituita da un pallone di vetro a tre colli da 250 mL con un sistema di refrigerazione che lascia ricadere i sottoprodotti della reazione in una trappola di raccolta. Il pallone è immerso in un bagno di sali termostatati inorganici (nitrati e nitriti di potassio e sodio) ed il sistema è tenuto in agitazione mediante un agitatore meccanico formato da un albero motore su cui sono posti degli estensimetri per la misura del momento torcente, necessario a mantenere costante la rotazione delle pale. Queste, infatti, a causa dell'aumento della viscosità del fluido, legato all'incremento del peso molecolare, incontrano maggiore resistenza al procedere della polimerizzazione. Temperatura e torque vengono costantemente monitorati durante la reazione. L'impiego di una pompa da vuoto facilita l'eliminazione delle specie a basso peso molecolare.

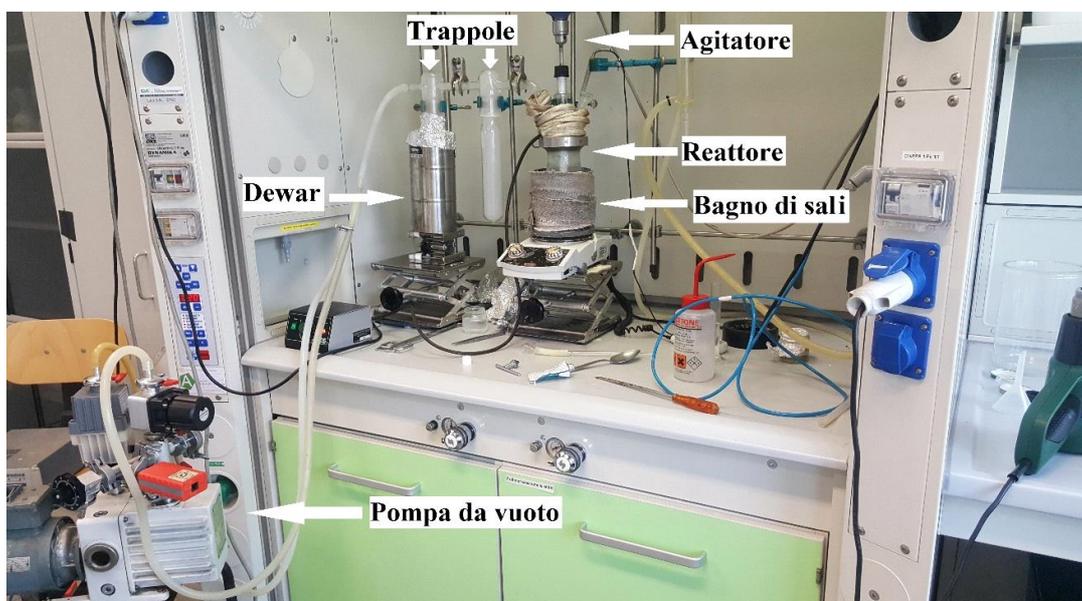


Figura 3.1: Schema dell'apparecchiatura per la polimerizzazione

Il copolimero statistico P(BSNS) è stato ottenuto tramite policondensazione in massa a due stadi, utilizzando come reagenti di partenza dimetil succinato (DMS), 1,4-butandiolo (BD) e neopentil

glicole (NG). In questo caso si è lavorato con un eccesso del 20% di miscela di glicoli, per assicurare la formazione preferenziale dei terminali idrossilici. Tutti i reagenti, le cui strutture chimiche sono riportate in Figura 3.2 si presentano in forma di liquido incolore.

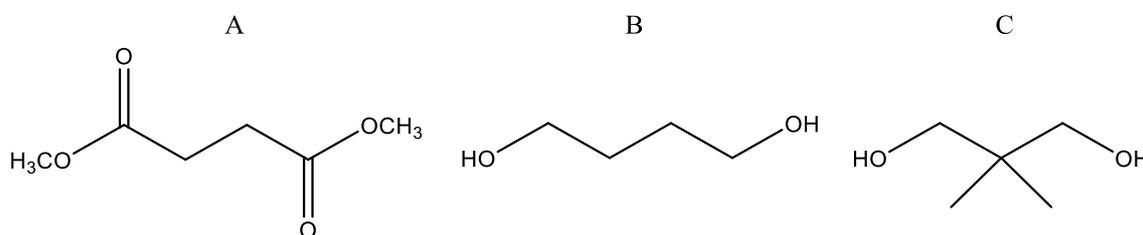


Figura 3.2: Struttura chimica del dimetil succinato (A), dell'1,4-butandiolo (B), neopentil glicole (C)

In aggiunta ai reagenti, si è utilizzato come catalizzatore il titanio(IV)tetrabutossido ($\text{Ti}(\text{OBU})_4$, TBT), in quantità pari a 400 ppm/grammo di polimero teoricamente ottenibile. 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 190°C , sotto flusso controllato di azoto e con un'agitazione di 100 giri al minuto. In questa prima fase hanno luogo le reazioni di transesterificazione diretta con successiva eliminazione di specie a basso peso molecolare, nel caso in esame molecole di metanolo.

Il secondo stadio ha inizio quando almeno il 90% del metanolo teorico è raccolto nella trappola di condensazione mediante distillazione. In questa fase avvengono ulteriori reazioni di transesterificazione tra gli oligomeri ottenuti precedentemente; dopo tempi di reazione non molto lunghi, si giunge alla formazione di polimeri a basso peso molecolare. Durante questo stadio la temperatura viene aumentata di 10°C ogni 30 minuti, fino al raggiungimento di 230°C . Contemporaneamente, la pressione all'interno del reattore viene ridotta fino a 0,09 mbar con una pompa da vuoto, al fine di rimuovere, tramite distillazione, l'eccesso di diolo e spostare l'equilibrio di reazione verso i prodotti. Raggiunti i valori desiderati di temperatura e pressione, questi vengono mantenuti costanti fino al termine della reazione. Il processo ha avuto una durata totale di circa 5 ore.

La reazione è stata eseguita in un reattore da 200 mL, all'interno del quale sono stati caricati i reagenti in modo da avere un rapporto molare 70:30 di PBS:PNS. Il copolimero P(BSNS) è risultato essere un materiale trasparente ed elastico.

3.2 Preparazione film tramite pressofusione

La pressofusione è la tecnica attraverso la quale si realizzano i film, utilizzando una pressa con piastre in alluminio. Per avere un film delle dimensioni di 10x10cm generalmente si utilizzano 2 grammi di materiale, che viene inserito tra due piastre di teflon per garantire film dallo spessore uniforme (circa 0,1-0,2 mm). Per ciascuna prova, la temperatura della pressa è stata impostata ad un valore superiore di 40 °C a quella di fusione del polimero, al fine di permetterne la completa fusione; successivamente è stata applicata una pressione costante del valore di $20 \cdot 10^3$ N per due minuti. Infine, le piastre sono state raffreddate in pressione, in modo da garantire la solidificazione del campione nella nuova forma.

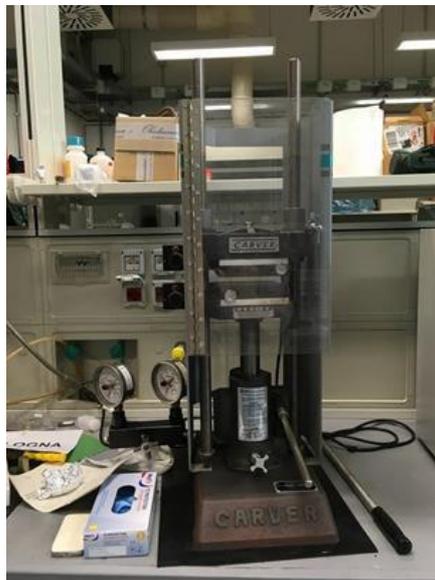


Figura 3.3: Pressa utilizzata per la preparazione dei film

3.3 Caratterizzazione dei film

Dopo la formazione dei film, tramite la tecnica sopraelencata, è stato possibile caratterizzarli, da un punto di vista termico, tramite le tecniche di termogravimetria (TGA), calorimetria differenziale a scansione (DSC) e la diffrattometria a raggi X (WAXS); da un punto di vista meccanico, attraverso le prove a sforzo costante e ciclico; da un punto di vista molecolare, tramite la risonanza magnetica nucleare (NMR) e la cromatografia a permeazione su gel (GPC). Tutte queste tecniche vengono descritte in seguito.

3.3.1 Caratterizzazione termica

3.3.1.1 Termogravimetria (TGA)

La termo gravimetria (TGA) è una tecnica che consiste nella misurazione continua nel tempo della massa di un campione mentre essa è soggetta ad un riscaldamento controllato, in presenza di gas

(ossigeno, azoto, aria) e che permette di ottenere informazioni sia sulla stabilità termica, sia sulla cinetica di decomposizione. Grazie a queste informazioni, è possibile ottenere il valore di temperatura a cui la decomposizione del materiale ha inizio e la temperatura alla quale la degradazione raggiunge la velocità massima.

La strumentazione è composta da una bilancia analitica (dalla portata in genere compresa tra 5 e 20 mg), da un forno che riscalda a velocità controllata, da un sistema di gas di spurgo che assicura un'atmosfera inerte, e da un elaboratore per il controllo dello strumento, l'acquisizione e la visualizzazione dei dati.

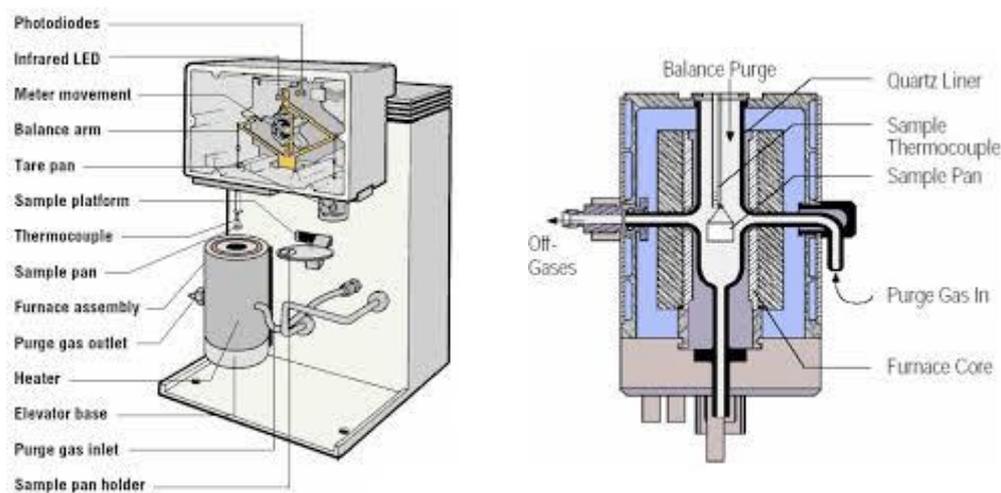


Figura 3.4: Struttura della TGA

Il risultato di tale analisi è un grafico, detto termogramma o curva di decomposizione termica, nel quale viene riportata la perdita di peso in percentuale (asse y) in funzione della temperatura (asse x). Dal termogramma è possibile ricavare:

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

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

3.3.1.2 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

La calorimetria differenziale a scansione è una delle principali tecniche di analisi termiche utilizzabile per ricavare informazioni su molti materiali, tra cui i polimeri, come la temperatura ed il flusso di calore associati alla transizione vetrosa, alla fusione e alla cristallizzazione. Il principio di

base consiste nel ricavare informazioni sul materiale riscaldandolo o raffreddandolo in maniera controllata, in particolare misurando la differenza di flusso termico tra il campione in esame e quello di riferimento mentre i due sono vincolati ad una temperatura variabile definita da un programma prestabilito.

La strumentazione è costituita da due piatti dedicati all'alloggiamento di altrettante capsule, l'una contenente il campione (10 mg circa), l'altro contenente il riferimento (solitamente si utilizza una capsula vuota).

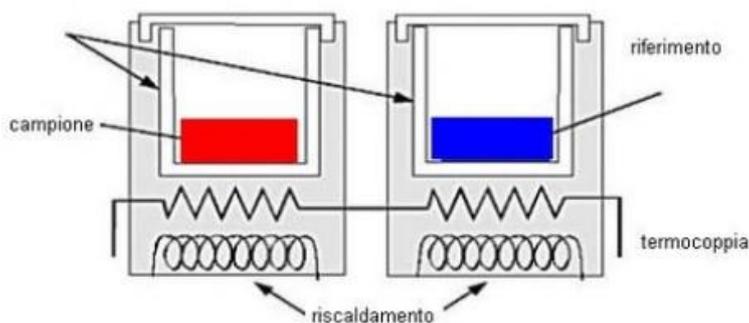


Figura 3.5: Schema di funzionamento della DSC

Gli alloggiamenti costituiscono dei microcalorimetri, mantenuti in atmosfera inerte con un flusso continuo ed uniforme di azoto. Un computer regola i flussi di calore, sottoponendo le due celle al medesimo programma termico: quando, per effetto delle transizioni che avvengono nel materiale al variare della temperatura, il recipiente contenente il campione si trova ad una temperatura diversa rispetto al riferimento, al microcalorimetro contenente il riferimento viene fornita energia sufficiente per riportare campione e riferimento alla stessa temperatura. Il computer interfacciato allo strumento permette sia di impostare il programma, sia di rilevare ed elaborare i dati.

La temperatura di transizione vetrosa (T_g) è una temperatura caratteristica dei polimeri alla quale si verifica il passaggio da uno stato solido vetroso ad uno gommoso; 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.

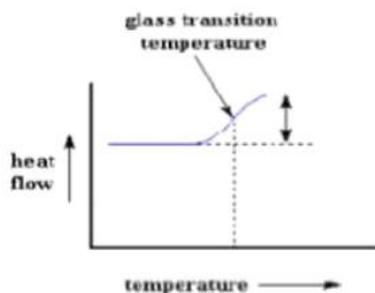


Figura 3.6: Calcolo della T_g

La temperatura di fusione T_m è la temperatura alla quale si verifica il passaggio dallo stato solido a quello fuso e, nel tracciato DSC, si presenta come un picco endotermico. Il valore di T_m si riferisce

all'ascissa del picco, mentre l'area sottesa ad esso corrisponde al calore di fusione ΔH_m (J/g), proporzionale alla cristallinità del polimero; il rapporto tra quest'ultima grandezza e il calore di fusione del polimero completamente cristallino costituisce il grado di cristallinità del materiale.

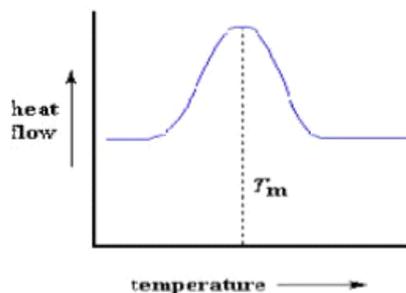


Figura 3.7: Calcolo della T_m

Se, infine, il polimero tende a formare delle strutture cristalline ordinate, si verifica una cessione di calore da parte del materiale, che si evidenzia come una diminuzione del flusso di calore. Si individua quindi una temperatura di cristallizzazione, T_c , insieme ad un relativo calore di cristallizzazione ΔH_c .

Le misure DSC sono state ottenute con un DCS6 Perkin-Elmer equipaggiato di accessori per il raffreddamento a temperature minori di 0°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: riscaldamento da -70°C a 180°C a velocità di $20^\circ\text{C}/\text{min}$, mantenimento a 180°C per 4 minuti;
- raffreddamento rapido (velocità di $100^\circ\text{C}/\text{min}$) fino a -70°C ;
- mantenimento del campione a -70°C per 12 minuti;
- seconda scansione: riscaldamento in condizioni di temperatura e velocità analoghe alla prima scansione.

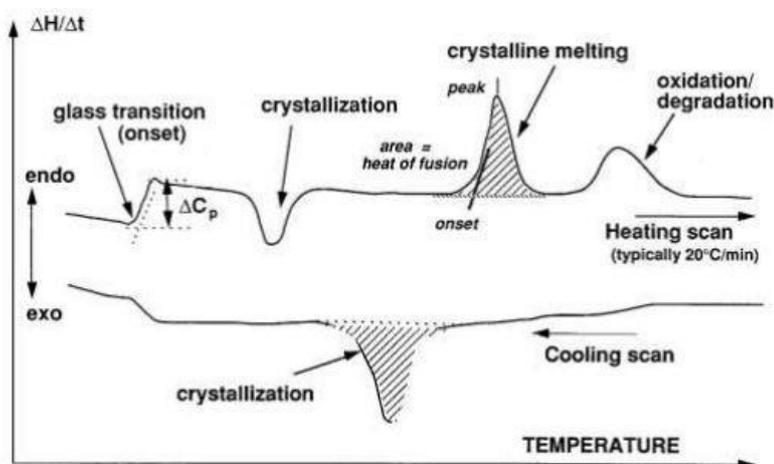


Figura 3.8: Esempio di curva DSC

3.3.1.3 Diffrazione a Raggi X (WAXS)

La diffrazione a raggi X è una tecnica non distruttiva che consente di determinare la struttura e la morfologia dei materiali, tramite l'individuazione del grado di cristallinità e la fase cristallina presente. L'analisi viene condotta con l'ausilio di un diffrattometro, il quale emette una radiazione indirizzata verso il cristallo. Lo strumento è composto principalmente da cinque parti:

- un tubo generatore di raggi X;
- alcuni filtri monocromatori, che isolano una specifica lunghezza d'onda λ , e collimatori, che convogliano il fascio in una direzione preferenziale;
- piatto porta-campione, su cui viene posizionato il materiale da analizzare;
- un filtro collimatore secondario, che viene investito dalla radiazione diffratta dal materiale;
- rivelatore detector finale che traduce l'onda elettromagnetica diffratta nell'output XRD.



Figura 3.9: Strumentazione per analisi diffrattometrica a raggi X

Alla base di questa tecnica vi è un'interazione tra l'onda incidente, in questo caso i raggi X, ed un reticolo cristallino, secondo la legge di Bragg, che permette di ricavare la distanza di legame imponendo una certa lunghezza d'onda e misurando l'angolo di incidenza:

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

dove λ è la lunghezza d'onda, d è la distanza di legame, n è l'ordine della riflessione e θ è l'angolo di incidenza. La geometria del fenomeno comporta che la differenza di cammino tra raggi riflessi da due piani sia $2d \sin \theta$: solo quando questa differenza è pari ad un numero intero di lunghezze d'onda λ , si osserva un'interferenza costruttiva.

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

cristallinità χ_c sono stati calcolati in base ai diagrammi di diffrazione, effettuando il rapporto tra l'area di diffrazione cristallina, ovvero l'area data dalla frazione di materiale cristallino (A_c), e l'area totale del profilo di diffrazione (A_t), tenendo conto della radiazione diffusa e secondo l'equazione:

$$\chi_c = A_c / A_t$$

L'area di diffrazione cristallina è stata ottenuta sottraendo all'area totale la curva dovuta alla diffusione del materiale amorfo, modellata come picco a campana sulla linea di base.

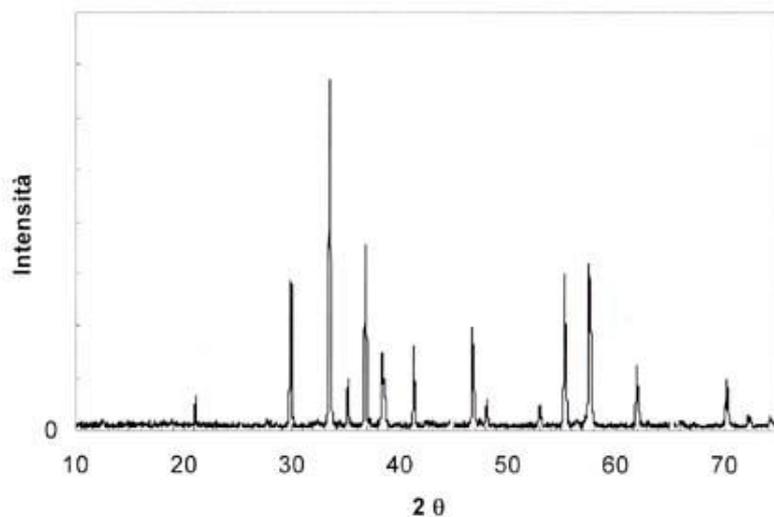


Figura 3.10: Esempio di diffrattogramma

3.4 Caratterizzazione meccanica

3.4.1 Misure di *stress-strain*

Le misure di resistenza meccanica vengono utilizzate per studiare il comportamento dei materiali polimerici in presenza di sollecitazioni di diverso tipo. Per quanto riguarda le prove tensili, nelle quali il provino viene sottoposto a trazione, si possono definire due diversi valori:

- *stress* (tensione, σ): rapporto tra il carico applicato in direzione normale N e l'area della sezione del provino resistente a riposo, A :

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

- *strain* (deformazione, ε): indica l'allungamento del provino, indicato con Δl , rapportato alla lunghezza iniziale l :

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

La strumentazione con cui si effettuano queste prove, è costituita da un dinamometro schematizzabile in alcuni sottocomponenti:

- una base rigida con aggancio rigido;
- due aste laterali di sostegno;
- una traversa orizzontale con aggancio superiore che può spostarsi verticalmente lungo le barre laterali;
- un attuatore meccanico che controlla il moto della struttura superiore;
- un pannello di controllo;
- un visualizzatore a video.

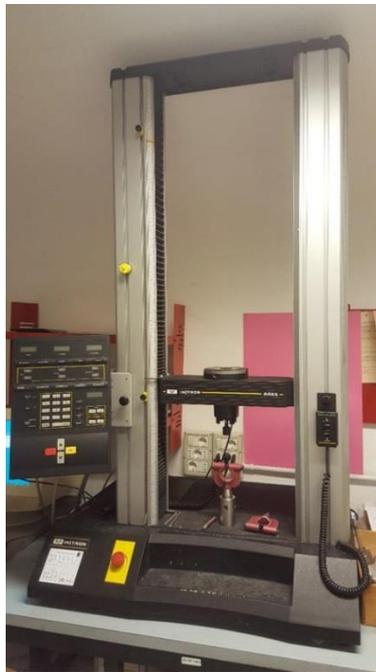


Figura 3.11: Strumentazione per prove meccaniche

Il carico viene applicato dall'attuatore e concretizzato nel movimento verso l'alto della traversa; durante la prova viene misurato il valore dell'allungamento in funzione del carico applicato. I risultati vengono poi importati su un diagramma che presenta in ascissa ϵ ed in ordinata σ , al fine di tracciare la curva sforzo-deformazione, caratteristica del materiale.

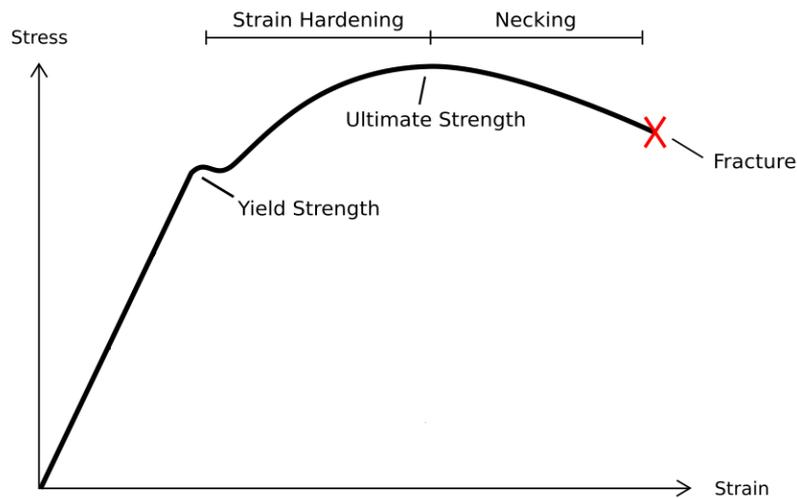


Figura 3.12: Esempio di curva sforzo-deformazione

Questo grafico è costituito da quattro diverse zone: regione elastica-lineare, *yielding*, *strain hardening* e *necking*. Nel primo tratto, detto campo elastico, la curva risulta essere lineare in quanto il materiale segue, fino al raggiungimento di un punto detto limite elastico, la legge di Hooke:

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

dove la costante di proporzionalità E indica il modulo elastico di Young, il cui valore corrisponde, per definizione, alla pendenza del tratto iniziale rettilineo della curva sforzo-deformazione. In corrispondenza di carichi contenuti all'interno di questo primo tratto, il materiale presenta allungamenti elastici, cioè reversibili una volta che il carico viene riportato a zero. All'aumentare della deformazione si entra nella regione plastica, in cui la deformazione subita dal materiale è permanente e irreversibile, anche a seguito della rimozione del carico; il punto in corrispondenza del quale avviene il passaggio tra le due regioni è detto di snervamento (*yielding*), ed è causato dallo scorrimento dei piani reticolari all'interno del materiale. Successivamente si riscontra la zona di *strain hardening* in cui sia l'allungamento che la tensione crescono, fino a raggiungere un apice corrispondente alla tensione di rottura (σ_{rott}). Il campo plastico viene infine completato dall'ultimo tratto, il *necking* (regione di strizione) in cui tipicamente la tensione diminuisce ma la deformazione continua e si rende più marcata in un punto particolare del provino (collo di strizione). L'ultimo punto della curva è detto punto di rottura. Un'ulteriore informazione che si può ricavare misurando l'area sottesa all'intera curva è la tenacità, che è una misura dell'energia necessaria per portare a rottura il materiale. Occorre tenere presente che i dati ottenuti, oltre ad essere funzione del materiale utilizzato nel test, 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 stati ottenuti campioni di forma rettangolari

dalle dimensioni di 5x40 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 maniera 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 a rottura sono state condotte a temperatura ambiente, su 6 provini diversi, con velocità pari a 10 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 6 prove.

3.4.2 Prove cicliche

Se la tensione applicata non supera il limite elastico del materiale, esso ritorna nelle sue condizioni iniziali quando viene tolto il carico. Per questo motivo si potrebbe concludere che un dato carico può essere ripetuto infinite volte, purché le tensioni rimangano nel campo elastico. In realtà, nel caso in cui si abbiano migliaia/ milioni di ripetizioni di carico, la rottura si avrà per una tensione molto inferiore rispetto alla resistenza statica di rottura; questo fenomeno è conosciuto come fatica. La fatica deve essere considerata nei progetti di tutti i componenti di macchine e strutture che sono sottoposti a carichi ripetuti o ciclici. Per quanto riguarda le prove cicliche effettuate, queste vengono condotte su 6 provini, deformando il provino al 50% della dimensione del tratto utile iniziale e successivamente riportandolo alla condizione iniziale (0,01MPa) ad una velocità di 50mm/min.

3.5 Prove di degradazione idrolitica

Le prove di degradazione idrolitica sono state condotte sui campioni di P(BSNS) filmati. I campioni preparati per le analisi avevano un peso di circa 40 mg e sono stati preparati in doppietta. È poi stata preparata una soluzione tampone seguendo la procedura di seguito riportata: in 800 mL di acqua distillata sono stati disciolti 8 g di NaCl, 0,2 g di KCl, 1,44 g di Na₂HPO₄ e 0,24 g di KH₂PO₄; il pH della soluzione è stato aggiustato al valore di 7,4 per aggiunta di HCl e il volume finale portato ad 1 litro. Essi sono stati posti in vial di vetro sigillati, contenenti 5ml in una soluzione acquosa a pH 7.40 (condizioni fisiologiche) composta da tampone fosfato precedentemente preparato, ad una temperatura costante di 37°C.

I flaconi sono stati tenuti all'interno di un bagno termostatico Stuart ScientificShaker bath SBS 30 con scuotimento e alla temperatura sopra citata.

Per analizzare i cambiamenti provocati dal processo di degradazione nel tempo, si è stabilito un calendario dei prelievi. Nei giorni fissati è stato prelevato un campione dal bagno. Il trattamento di ciascun campione dopo il prelievo ha previsto:

- lavaggio con acqua distillata per eliminare i sali della soluzione tampone;
- asciugatura del campione con carta assorbente;
- essiccamento sottovuoto per eliminare l'acqua residua;
- misura del peso finale di ciascun campione.

3.6 Caratterizzazione dei campioni parzialmente degradati

3.6.1 Cromatografia a permeazione su gel (GPC)

La cromatografia a permeazione su gel è una tecnica di separazione fisica in cui, le molecole del campione che passano attraverso una specifica colonna, subiscono un rallentamento proporzionale alle dimensioni delle particelle e ciò consente di determinare la distribuzione di peso molecolare in un polimero. Il metodo di analisi è basato sulla creazione di curve di taratura attraverso standard polimerici a peso noto, e su un successivo confronto tra queste ed i segnali provenienti dai campioni.

La strumentazione consiste in una pompa volumetrica, per spingere il solvente attraverso lo strumento, una porta di iniezione per introdurre il campione, una colonna contenente la fase stazionaria, uno o più rilevatori, ed un software per elaborare e visualizzare i risultati.

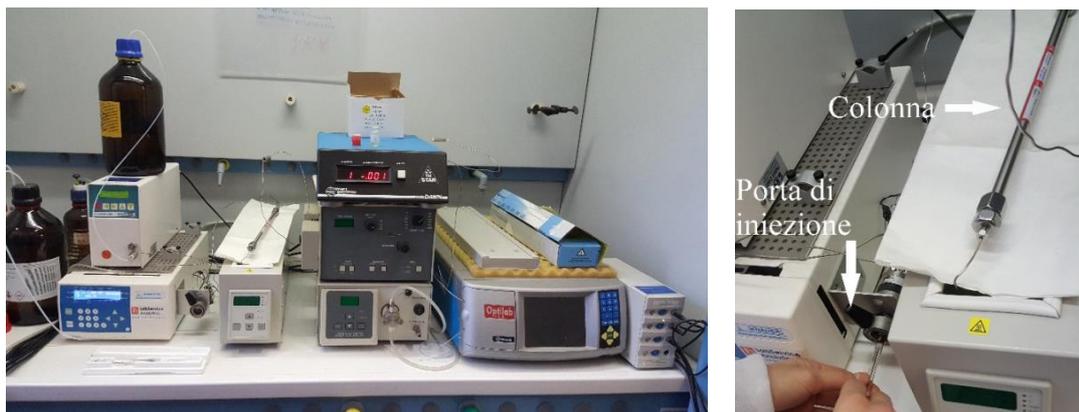


Figura 3.13: Strumentazione GPC

La colonna è riempita di resine porose (polistirene reticolato con divinilbenzene); durante la scansione in colonna viene fatto circolare un solvente con portata volumetrica costante e i campioni da analizzare vengono sciolti in solvente, filtrati per mezzo di un'apposita siringa, al fine di eliminare eventuali particelle non solubili che potrebbero ostruire i pori, e quindi iniettati.

Il meccanismo di separazione è basato sulla differente dimensione delle molecole polimeriche: se le molecole di polimero sono molto più grandi dei pori, esse vengono trasportate direttamente alla fase

mobile mentre, se sono molto piccole, possono entrare potenzialmente in tutti i pori occupando la fase stazionaria. Di conseguenza, le molecole a più basso peso molecolare impiegheranno più tempo per passare attraverso la colonna rispetto a quelle a più alto peso molecolare, che lasceranno per prime la colonna.

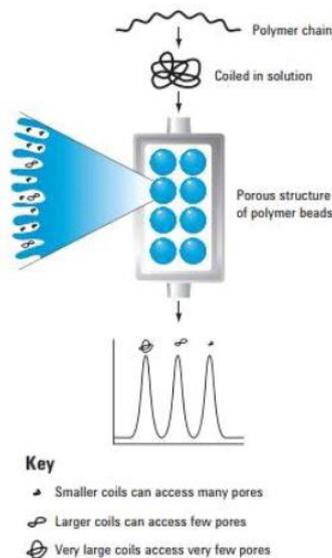


Figura 3.14: Meccanismo di separazione della colonna

La soluzione in uscita dalla colonna viene analizzata da un sensore che fornisce, istante per istante, un segnale di intensità proporzionale alla concentrazione del soluto. Nel caso di polimeri alifatici, il detector utilizzato è l'indice di rifrazione, mentre per gli aromatici viene impiegato uno spettrofotometro UV-Vis. Il risultato dell'analisi è un grafico relativo all'andamento dell'intensità del segnale in funzione del tempo; per convertire i tempi in pesi molecolari è necessario fare riferimento alle curve di taratura, ottenute analizzando i campioni standard di peso molecolare noto. Le misure di GPC sono state ottenute a 30 °C con un cromatografo HP Series 1100 HPLC per mezzo di una colonna PL gel 5µm MiniMIX-C (rapporto lunghezza/diametro in mm interno 250/4.6). I cromatogrammi sono stati registrati con HP Chemstation versione A.05.04 ed elaborati con GPC Calculator 7.6 software sviluppato dalla General Electric Company. Come eluente è stato utilizzato cloroformio, con flusso in colonna pari a 0.3 mL/min, precedentemente filtrato e fatto fluire attraverso un degassatore, al fine di rimuovere le particelle gassose che, analogamente a quelle non solubili, potrebbero ostruire i pori del gel. Tutte le soluzioni utilizzate contenevano una concentrazione di polimero pari a 2 mg/ml. Per costruire la curva di taratura sono stati impiegati vari standard di polistirene con peso molecolare variabile tra 2000 e 100000, per mezzo di una curva del terzo ordine. Il software associato al cromatografo calcola automaticamente, in base alla distribuzione ottenuta, il peso molecolare medio numerico (M_n) e l'indice di polidispersità (PD) del campione.

3.6.2 Risonanza magnetica nucleare (NMR)

La risonanza magnetica nucleare è una tecnica utilizzata per determinare la struttura chimica dei materiali, sfruttando il principio per cui i nuclei di alcuni elementi, se sottoposti ad un campo magnetico esterno intenso e stazionario, si orientano nella stessa direzione di tale campo. Questo fenomeno è osservabile solo se l'atomo possiede spin non intero perché permette che i nuclei, ruotando, diano origine ad un campo magnetico elementare che li rende simili a piccoli magneti. Gli atomi utilizzati tipicamente sono ^1H e ^{13}C (che possiedono spin $1/2$). Quando un nucleo dotato di spin viene immerso in un campo magnetico è sottoposto ad una coppia di forze che lo fanno ruotare al fine di allinearlo col campo esterno. Per un nucleo con spin $1/2$, sono due gli orientamenti permessi: uno parallelo al campo (bassa energia) e uno antiparallelo (alta energia).

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

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

dove h è la costante di Planck, ν è la frequenza della radiazione elettromagnetica assorbita, μ è il momento magnetico che descrive lo spin del nucleo e B rappresenta l'intensità del campo magnetico.

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

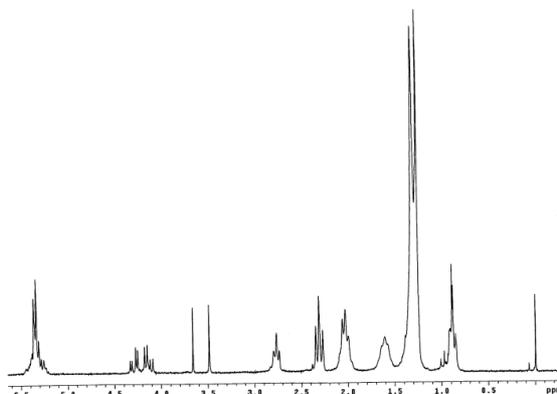


Figura 3.15: Esempio di un tracciato NMR

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

$$\delta \text{ (ppm)} = \frac{\nu_r - \nu}{\nu_r}$$

Tipicamente per il nucleo dell'atomo ^1H , e per gran parte delle molecole organiche, δ è compreso nell'intervallo tra 0 e 10 ppm. L'analisi sul nucleo ^{13}C è possibile, ma vista la bassa quantità di tale isotopo presente in natura (il 99,89% è ^{12}C) solo pochi atomi di carbonio si orienterebbero, riducendo il rapporto segnale rumore. In uno spettro ^1H -NMR, ad atomi di idrogeno con intorni chimici (reticoli) diversi corrispondono picchi diversi; considerando l'area sottesa da ogni picco, valutandola in termini relativi, risulta possibile determinare il rapporto tra i vari tipi di atomi di idrogeno presenti. L'area di un picco è infatti indipendente dalla struttura a cui è legato l'atomo di idrogeno, in quanto legato unicamente alla frequenza con cui tale atomo è ripetuto all'interno della molecola. Dividendo poi l'area di ogni picco per il numero di idrogeni a cui corrisponde, si ottengono valori perfettamente confrontabili con quelli dati dalla formula chimica del polimero analizzato.

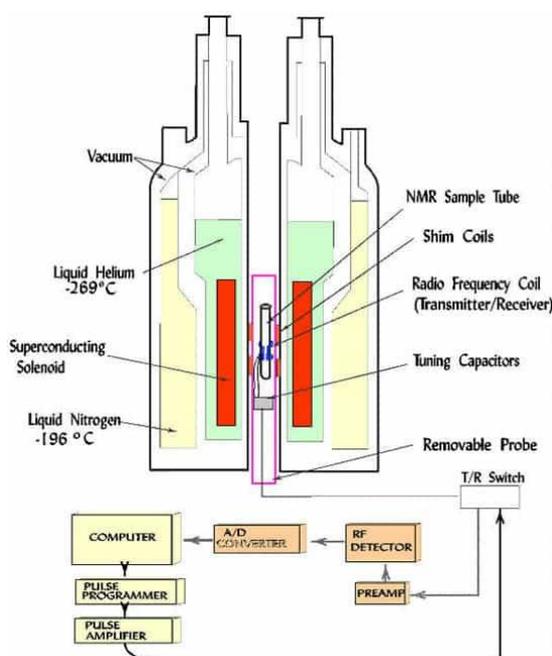


Figura 3.16: Sezione di uno spettrometro NMR

Gli spettri sono stati ottenuti usando uno spettrometro NMR Varian XL-400. Le soluzioni sono state preparate sciogliendo circa 10 mg di polimero in cloroformio deuterato (0.03%); come standard interno è stato utilizzato il tetrametilsilano (TMS). Gli spettri della spettroscopia ^1H -NMR sono stati acquisiti a temperatura ambiente con concentrazione dei polimeri pari al 0.5 wt% (con tempo di rilassamento pari a 0 secondi, tempo di acquisizione di 1 secondo per 100 ripetizioni). Gli spettri ^{13}C -NMR sono stati ottenuti utilizzando una concentrazione dei polimeri pari al 10 wt% (con tempo di rilassamento pari a 1 secondo, tempo di acquisizione di 1 secondo per 700 ripetizioni).



Figura 3.17: Strumentazione NMR

3.6.3 Calorimetria differenziale a scansione

La tecnica utilizzata per l'analisi calorimetrica dei campioni sottoforma di film è in linea con quanto riportato in precedenza.

3.6.4 Diffrazione a Raggi X

La tecnica utilizzata per l'analisi calorimetrica di questi materiali è in linea con quanto riportato in precedenza.

CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo capitolo verranno presentati e discussi i risultati relativi alla caratterizzazione dell'omopolimero PBS e del copolimero statistico P(BS₇₀NS₃₀) sintetizzati secondo il metodo descritto nel capitolo 3, dove “70” e “30” rappresentano rispettivamente la percentuale molare delle co-unità butilene succinato e neopentil glicole succinato nel copolimero.

4.1 Caratterizzazione molecolare

I polimeri sintetizzati si presentano di colore giallo chiaro. I risultati complessivi della caratterizzazione molecolare dei polimeri PBS e P(BS₇₀NS₃₀) sono riportati in Tabella 4.1.

Campione	BS (mol%) alimentazione	BS (mol%) ¹ H- NMR	M _n (g/mol)	D
PBS	100	100	50000	2
P(BS ₇₀ NS ₃₀)	70	72	55000	2.1

Tabella 4.1: Dati della caratterizzazione molecolare del PBS e del copolimero statistico P(BS₇₀NS₃₀)

Gli alti pesi molecolari (M_n) e il basso indice di polidispersità (D), determinati attraverso analisi GPC, indicano un buon controllo del processo di polimerizzazione sia per l'omopolimero che per il copolimero statistico.

L'analisi ¹H-NMR ha permesso di verificare la struttura chimica dei campioni oggetto della presente Tesi, nonché di calcolare la composizione effettiva del copolimero. Gli spettri ottenuti confermano la struttura attesa e l'assenza di altri picchi permette di escludere la presenza di reazioni secondarie durante la polimerizzazione. A titolo di esempio viene riportato lo spettro ¹H-NMR del P(BS₇₀NS₃₀) con la relativa attribuzione dei picchi.

Come evidenziato dalla Figura 4.1, per il calcolo della composizione effettiva sono state considerate l'area relativa del picco di risonanza dei protoni *a* della sub-unità butilene (a 3.90 ppm) e quella del segnale corrispondente ai protoni *d* del segmento neopentil glicole (a 4.11 ppm). La composizione effettiva (espressa in Tabella 4.1 come percentuale molare delle co-unità butilene succinato (BS)) risulta molto vicina a quella di alimentazione, evidenziando un buon controllo del processo di polimerizzazione.

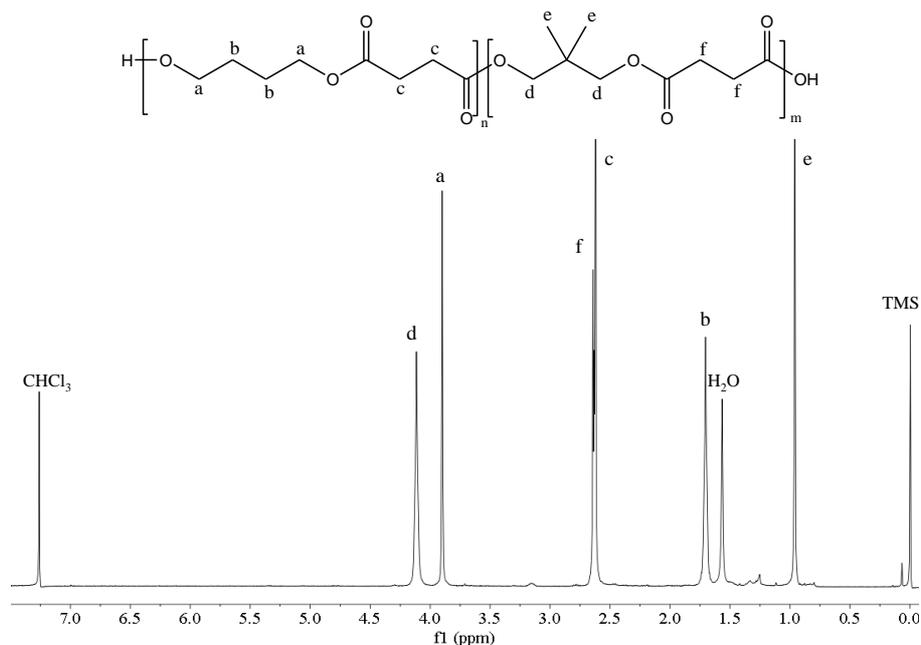


Figura 4.1: Spettro $^1\text{H-NMR}$ del $\text{P}(\text{BS}_{70}\text{NS}_{30})$ con relativa attribuzione dei picchi

4.2 Caratterizzazione termica e strutturale

La stabilità termica dei campioni è stata valutata da misure TGA sotto flusso di azoto. Le temperature di onset (T_{onset}) e di massima velocità di perdita di peso (T_{max}) sono state determinate dalle curve termogravimetriche di Figura 4.2 e raccolte nella Tabella 4.2. In entrambi i casi, la perdita di peso avviene in un unico step ed è del 100%. Entrambi i polimeri studiati hanno mostrato un'ottima stabilità termica, non si osservano infatti apprezzabili perdite di peso prima di 350°C . La T_{max} del copolimero è addirittura più alta di quella del PBS, risultato di interesse applicativo, considerato che la finestra di processabilità del materiale diventa più ampia.

Campione	TGA		I scan DSC				II scan DSC				XRD		
	T_{onset} $^\circ\text{C}$	T_{max} $^\circ\text{C}$	T_g $^\circ\text{C}$	ΔC_p $\text{J/g}\cdot^\circ\text{C}$	T_m $^\circ\text{C}$	ΔH_m J/g	T_g $^\circ\text{C}$	ΔC_p $\text{J/g}\cdot^\circ\text{C}$	T_{cc} $^\circ\text{C}$	ΔH_{cc} J/g	T_m $^\circ\text{C}$	ΔH_m J/g	X_c
PBS	385	407	-34	0.088	114	50	-34	0.192	-	-	114	51	46
$\text{P}(\text{BS}_{70}\text{NS}_{30})$	384	415	-28	0.244	42 77	33	-34	0.456	27	30	79	30	31

Tabella 4.2: Dati di caratterizzazione termica e strutturale del PBS e del copolimero statistico $\text{P}(\text{BS}_{70}\text{NS}_{30})$

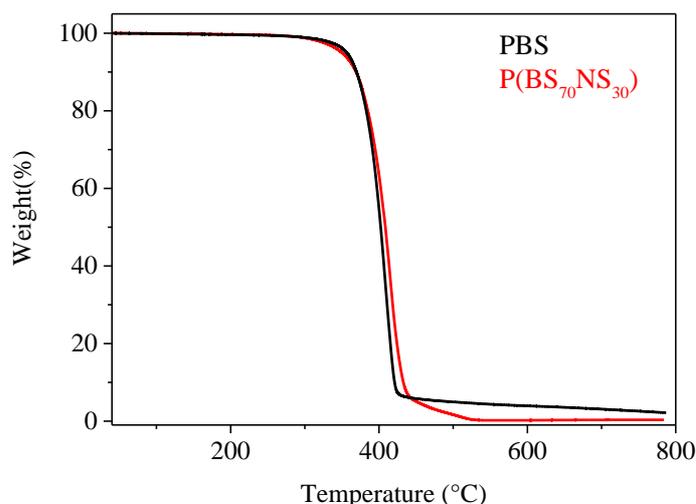


Figura 4.2: Curve TGA (velocità di riscaldamento: 10°C/min sotto flusso di N₂ 40ml/min) del PBS e P(BS₇₀NS₃₀)

Le curve calorimetriche e i relativi dati termici sono riportati in Figura 4.3 e in Tabella 4.2. Si può escludere un'influenza del peso molecolare sulle transizioni termiche dei polimeri sintetizzati, in quanto i campioni presentano pesi molecolari alti e simili.

Come si può vedere dalla prima scansione calorimetrica (Figura 4.3a) entrambi i polimeri sono semicristallini: in effetti a circa -30°C si può notare una variazione endotermica della linea di base associata alla transizione vetrosa, seguita da un picco endotermico attribuibile alla fusione della porzione cristallina. Nel copolimero, l'endoterma di fusione si sposta a temperatura più bassa, e il corrispondente calore di fusione diminuisce (minore ΔH_m), probabilmente in seguito alla formazione di una fase cristallina caratterizzata da un minor grado di perfezione e da una frazione più bassa. Contemporaneamente si osserva un incremento della frazione di fase amorfa evidenziato da un aumento dell'altezza del gradino della transizione vetrosa (aumento dei valori di ΔC_p). La curva DSC del copolimero mostra picchi multipli di fusione, che possono essere ascritti a processi di fusione/ricristallizzazione di cristalli con basso grado di perfezione che generalmente si sviluppano nei sistemi copolimerici a causa dell'effetto di disturbo delle co-unità nel processo di cristallizzazione dell'omopolimero di riferimento ⁽³⁶⁻³⁹⁾.

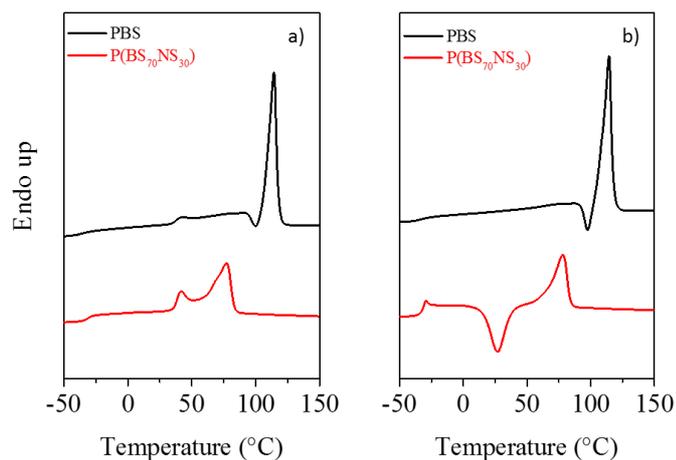


Figura 4.3: Curve calorimetriche (velocità di riscaldamento: 20°C/min) del PBS e P(BS₇₀NS₃₀); (a) I scan; (b) II scan dopo rapido raffreddamento dal fuso

Come noto, un materiale parzialmente cristallino mostra generalmente un comportamento diverso rispetto al suo analogo completamente amorfo. Sebbene in letteratura siano riportati risultati contrastanti⁽³⁶⁾, si ritiene che la cristallinità agisca come punti di reticolazione fisici, provocando un aumento dei valori di T_g . Pertanto, per studiare la dipendenza della transizione vetrosa dalla composizione, è opportuno esaminare il fenomeno in totale assenza di cristallinità. Allo scopo, i campioni sono stati sottoposti a raffreddamento rapido (quenching) dal fuso. Le relative curve DSC e i corrispondenti dati sono mostrati nella Figura 4.3b e raccolti nella Tabella 4.2.

Per quanto concerne l'omopolimero PBS, le curve di I e II scan sono praticamente identiche, a riprova dell'alta velocità di cristallizzazione di questo polimero che, nelle condizioni sperimentali adottate, non riesce ad essere congelato nello stato amorfo. La curva DSC del copolimero P(BS₇₀NS₃₀) invece cambia drasticamente dopo il quenching in azoto liquido. Innanzitutto, il fenomeno della transizione vetrosa diventa più evidente, come conseguenza della maggiore quantità di fase amorfa presente nel campione sottoposto a *quenching*. La copolimerizzazione influenza anche la capacità a cristallizzare del materiale. In particolare, nella curva calorimetrica di seconda scansione del copolimero con l'aumentare della temperatura oltre alla variazione endotermica della linea di base corrispondente alla transizione vetrosa, si rileva anche la presenza di un picco esotermico dovuto alla cristallizzazione ed un picco endotermico di fusione. Questo comportamento è tipico dei materiali che durante la scansione calorimetrica, sono in grado di cristallizzare nella finestra di temperatura tra T_g e T_m e poi fondono a temperatura più alta (T_m). Quindi, per il P(BS₇₀NS₃₀), i risultati calorimetrici evidenziano che le catene copolimeriche sono state bloccate nella fase disordinata tramite *quenching* in quanto la quantità di cristalli che fondono è uguale alla porzione formatasi a T_{cc} ($\Delta H_m = \Delta H_{cc}$).

L'introduzione della co-unità ha un effetto diretto anche sulla mobilità della catena polimerica, come indicato dalla posizione della T_g e dal corrispondente valore di Δc_p riassunti in Tabella 4.2.

Come riportato in letteratura, la presenza di gruppi alchilici laterali ostacola la rotazione attorno al legame σ C-C, a causa del loro elevato ingombro sterico, riducendo la mobilità macromolecolare e provocando un aumento di T_g . In effetti, il salto in corrispondenza alla T_g , piuttosto basso per il PBS semicristallino, aumenta per il copolimero in conseguenza della maggiore porzione di fase amorfa. Inoltre, nel P(BS₇₀NS₃₀), in cui le catene macromolecolari sono state bloccate in uno stato completamente disordinato tramite *quenching*, la posizione della T_g è dovuta unicamente alla mobilità della catena in quanto qualsiasi effetto restrittivo dovuto alla presenza di punti cristallini può essere escluso. È interessante notare che per il copolimero statistico, nonostante l'assenza di domini cristallini, la transizione vetrosa rimane alla stessa temperatura alla quale si presenta la transizione vetro-gomma nel PBS che al contrario risulta essere semicristallino anche in seconda scansione (Tabella 4.2). Questo risultato mette in evidenza quindi la maggiore rigidità impartita dalle sub-unità neopentilglicole. Peraltro, tale effetto era già stato rilevato per sistemi analoghi studiati dal gruppo della Prof.ssa Lotti ^(36,37).

4.3 Diffrazione a Raggi X (WAXS)

L'analisi della fase cristallina dei polimeri oggetto della presente Tesi è stata effettuata attraverso misure WAXS. I profili di diffrazione sono mostrati in Figura 4.4.

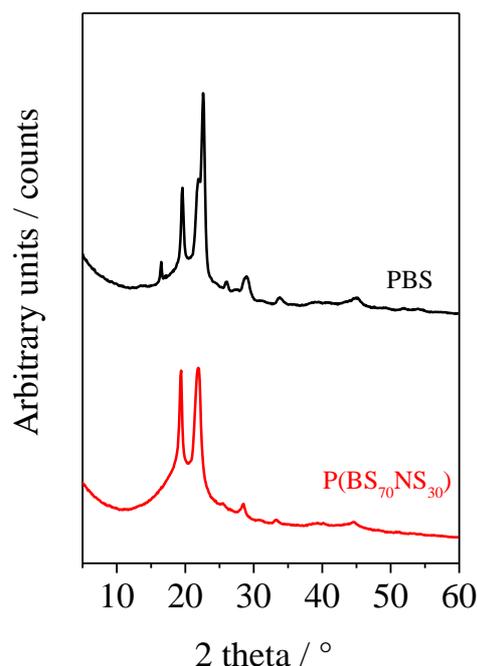


Figura 4.4: Profili XRD dei polimeri analizzati

I riflessi presenti nello spettro WAXS permettono di affermare che in entrambi i campioni è presente la fase cristallina α del PBS ⁽³⁶⁾. L'intensità dei riflessi diminuisce per introduzione della co-unità neopentil glicole succinato, ad indicare una diminuzione del contenuto di fase cristallina presente nel materiale, confermato anche dal valore di grado di cristallinità riportato in Tabella 4.2.

I risultati diffrattometrici sono in linea con quelli ottenuti tramite calorimetria a scansione differenziale.

4.4 Caratterizzazione meccanica

Il PBS e il corrispondente copolimero statistico contenente co-unità NS sono stati sottoposti a misure di trazione per valutarne le *performance* meccaniche. Le relative curve *stress-strain* sono mostrate in Figura 4.5, mentre i dati meccanici (modulo elastico E , sforzo a rottura σ_b , allungamento a rottura ε_b) sono riportati in Tabella 4.3.

Samples	E (MPa)	σ_b (MPa)	ε_b (%)
PBS	301±25	16±2	5±1
P(BS ₇₀ NS ₃₀)	219±12	18±1.0	340±34

Tabella 1.3: Dati di caratterizzazione meccanica del PBS e del copolimero statistico P(BS₇₀NS₃₀)

L'omopolimero PBS si è rivelato il materiale più rigido, essendo caratterizzato da un alto valore di modulo elastico e stress a rottura, e da un basso allungamento a rottura. L'introduzione della co-unità NS comporta un cambiamento della risposta meccanica dell'omopolimero soprattutto in termini di allungamento a rottura ε_b che, dal 5% per l'omopolimero, passa al 340% per il P(BS₇₀NS₃₀). Non c'è invece un forte effetto sul modulo elastico E e sullo stress a rottura σ_b .

L'elevato aumento della plasticità del copolimero (ε_b maggiore) rispetto all'omopolimero è probabilmente legato alla diminuzione del grado di cristallinità, X_c , nel P(BS₇₀NS₃₀), evidenziato sia tramite analisi DSC che XRD. La riduzione della frazione cristallina tuttavia non si riflette nel valore di E e di σ_b che non variano sensibilmente rispetto al PBS. A tale riguardo, bisogna considerare che la presenza di due gruppi $-CH_3$ sul C₂ del neopentil glicole determina, oltre alla diminuzione di cristallinità, un aumento della rigidità di catena. Quest'ultimo fattore potrebbe avere un peso diverso sui parametri E e σ_b , che non variano eccessivamente nel copolimero, ed annullare l'effetto della diminuzione dalla porzione cristallina.

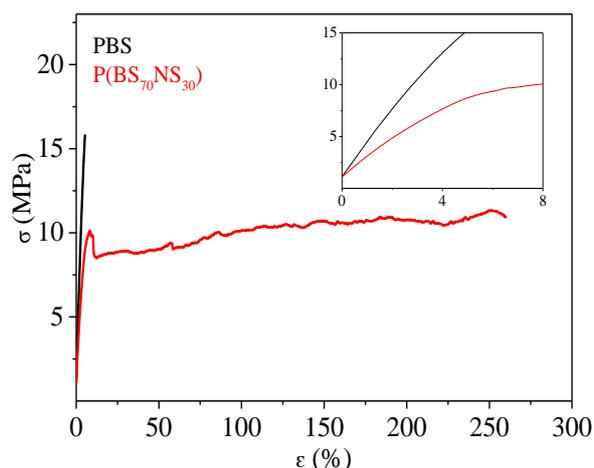


Figura 4.5: Curve stress-strain del PBS e del copolimero P(BS₇₀NS₃₀); nell'ingrandimento è mostrata la regione iniziale delle curve

4.5 Studi di degradazione idrolitica in condizioni fisiologiche

Nella presente Tesi è stata valutata anche la velocità di degradazione idrolitica in condizioni fisiologiche del copolimero statistico P(BS₇₀NS₃₀). Il materiale, sotto forma di film, è stato incubato in tampone fosfato alla temperatura di 37°C e prelevato a tempi diversi, lavato con acqua distillata, ed asciugato sottovuoto per una notte. I campioni degradati sono stati quindi pesati per valutare la perdita di peso gravimetrico, e analizzati tramite GPC per determinare la perdita di peso molecolare.

I risultati del P(BS₇₀NS₃₀) sono stati poi confrontati con quelli precedentemente ottenuti per il PBS dal gruppo di ricerca della Prof. Lotti ⁽⁴⁴⁾.

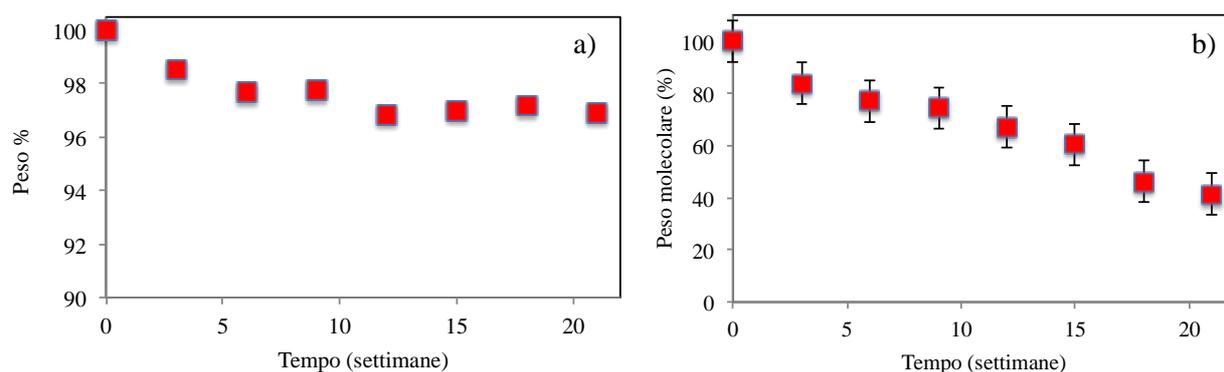


Figura 4.6: Peso gravimetrico residuo percentuale (a) e peso molecolare residuo percentuale (b) del copolimero P(BS₇₀NS₃₀) a diversi tempi di incubazione in condizioni fisiologiche

In Figura 4.6a e 4.6b sono rispettivamente riportati: il peso gravimetrico dei campioni degradati rispetto al loro valore iniziale e il peso molecolare medio numerico rispetto al campione non incubato, entrambi in funzione del tempo di incubazione in condizioni fisiologiche.

Come è possibile notare dal grafico in Figura 4.6a, la perdita di peso gravimetrico anche dopo 21 settimane non è molto elevata (3 %) e paragonabile alla perdita di peso gravimetrico evidenziata per l'omopolimero trattato nelle stesse condizioni (2 %) ⁽⁴⁴⁾. La perdita di peso molecolare al contrario, si mostra più marcata raggiungendo un valore di circa 60% dopo 21 settimane di incubazione. Di nuovo, la perdita di peso molecolare risulta più alta del PBS, per cui era stata determinata una diminuzione di M_n pari al 40 %.

Come ben noto, la velocità di degradazione idrolitica dipende da diversi fattori tra cui: densità di gruppi esterei, flessibilità di catena e grado di cristallinità. In particolare, la velocità di degradazione è direttamente proporzionale alla quantità di gruppi –COOR- e alla mobilità di catena, mentre è inversamente proporzionale alla percentuale di fase cristallina presente.

Come evidenziato dai risultati di caratterizzazione strutturale e termica, l'introduzione della subunità neopentil glicole nella catena polimerica del PBS determina un leggero aumento della rigidità di catena (T_g maggiore), ma soprattutto la diminuzione sia della temperatura di fusione che della percentuale di porzione cristallina (ΔH_m). La densità di gruppi –COOR- invece, essendo le due subunità glicoliche di lunghezza simile, non varia sensibilmente. In quest'ottica, la maggiore perdita di peso, sia gravimetrico che molecolare, del copolimero rispetto all'omopolimero di riferimento, può essere spiegata sulla base del minore grado di cristallinità del P(BS₇₀NS₃₀).

Da ultimo, la maggiore diminuzione di M_n rispetto alla perdita di peso gravimetrico non stupisce se si considera che il fenomeno di degradazione idrolitica è un processo che avviene in *bulk*. Le molecole d'acqua infatti possono penetrare nella massa di polimero determinando idrolisi dei legami esterei con conseguente abbassamento del peso molecolare. Tuttavia, soprattutto nelle prime fasi, i segmenti di catena che si producono per idrolisi non necessariamente si staccano dal campione andando nel mezzo acquoso, e determinando quindi una diminuzione del peso gravimetrico.

CAPITOLO 5: CONCLUSIONI

Negli ultimi trent'anni la ricerca nel settore dei biomateriali ha visto una crescita costante, che ne ha consentito l'impiego in nuove applicazioni, le quali hanno determinato il miglioramento della qualità di vita di milioni di persone. L'obiettivo odierno dei ricercatori è quello di conoscere in maniera sempre più approfondita i meccanismi coinvolti nell'interazione tessuto-biomateriale, in modo da sviluppare biomateriali e prototipi di dispositivi medici con caratteristiche chimico-fisiche che ne garantiscano, in associazione ad una certa funzionalità, un'elevata biocompatibilità. Altro obiettivo della ricerca, ugualmente prioritario, è quello di mettere a punto biomateriali con proprietà altamente specifiche e facilmente modulabili in riferimento a particolari applicazioni.

In questo contesto si inseriscono i polimeri sintetici i cui principali vantaggi, rispetto alle altre classi di materiali, sono proprio una maggiore biocompatibilità, la biodegradabilità, la facile lavorabilità e la compatibilità meccanica con il sito di applicazione.

In particolare, per quanto riguarda l'ingegneria tissutale, la classe di polimeri che si è rivelata più idonea è quella dei poliesteri alifatici, le cui caratteristiche peculiari sono, appunto, la biodegradabilità e la biocompatibilità. Ad oggi l'FDA ha consentito l'uso dei soli PCL, PLA, PGA e dei loro copolimeri per la creazione di dispositivi medici impiantabili nel corpo umano; tali materiali non riescono, però, a soddisfare completamente l'ampia gamma di specifiche proprie delle applicazioni nell'ambito sopracitato. Pertanto, la sintesi di sistemi a base di nuovi poliesteri alifatici, i cui prodotti di degradazione non risultino tossici per l'organismo e caratterizzati da proprietà modulabili in relazione a specifiche applicazioni, può aprire nuove prospettive.

In questo scenario si inserisce il lavoro di ricerca svolto nella presente Tesi, il cui obiettivo è stato la sintesi e successiva caratterizzazione di un nuovo copoliestere alifatico statistico, biodegradabile e biocompatibile: a tale scopo il poli(butilene succinato) ha rappresentato un ottimo punto di partenza per la copolimerizzazione.

In accordo con gli obiettivi prefissati, i risultati evidenziano che l'introduzione di unità comonomeriche NS, contenenti corte ramificazioni, lungo la catena polimerica del PBS ha avuto una notevole influenza sulle caratteristiche chimico-fisiche del materiale risultante, e quindi sulle sue proprietà termiche e meccaniche, nonché sul profilo di degradazione.

In particolare, l'introduzione di corte ramificazioni ha comportato un aumento della stabilità termica, proprietà di particolare interesse in fase di lavorazione del materiale, e una riduzione del grado di cristallinità: di conseguenza, il copolimero presenta una velocità di degradazione idrolitica maggiore a quella del PBS. La copolimerizzazione con l'NS ha determinato anche una maggiore plasticità del copoliestere risultante, spiegabile anch'essa sulla base della ridotta cristallinità.

In conclusione, le proprietà del copoliestere in oggetto risultano estremamente interessanti in vista di possibili applicazioni nel campo dell'ingegneria tissutale e, in particolare, nell'ingegneria tissutale del miocardio. A riprova di ciò, il medesimo polimero, sottoforma di *scaffold*, è stato sottoposto a prove di biocompatibilità presso i laboratori di Translational Cardiomyology, Department of Development and Regeneration, presso la Katholieke Universiteit di Leuven (KUL), in Belgio, svolte da una dottoranda del gruppo di ricerca presso il quale è stata condotta la presente Tesi, sotto la supervisione del Prof. Maurilio Sampaolesi.

Gli esperimenti sono stati eseguiti su cellule staminali umane pluripotenti (*induced Pluripotent Stem Cells*, iPSCs). In primo luogo, è stata valutata la crescita e la proliferazione di tali cellule a sei giorni dalla semina. Parallelamente, sono state effettuate analisi di immunofluorescenza mediante microscopia ottica e microscopia confocale, e di espressione genica mediante analisi quantitativa PCR *real time* (real time qPCR).

Da tali prove, comparando i risultati con quelli relativi al controllo, è possibile affermare che le cellule proliferano e mantengono il loro stato di pluripotenza nell'intervallo di tempo esplorato. Dalle analisi è emerso che le cellule sugli *scaffold* e sul controllo differenziano allo stesso modo fino al giorno 4, corrispondente all'inizio dello stadio di progenitori cardiaci. È importante sottolineare che questi dati risultano di particolare rilievo, in quanto per la prima volta nel gruppo di ricerca presso cui sono state svolte queste prove, è stato possibile far proliferare e addirittura differenziare cellule staminali umane su *scaffold* polimerici. Alla luce degli ottimi risultati finora ottenuti, ulteriori prove verranno condotte al fine di migliorare il processo di differenziamento fino a cardiomiociti.

Tali risultati, seppur incoraggianti, rappresentano solo un punto di partenza verso una reale applicazione del copoliestere qui descritto; rimane ancora da verificare la fattibilità tecnico-economica del trasferimento del processo di sintesi su scala industriale e si rendono necessari studi più approfonditi soprattutto per quanto riguarda la valutazione della biocompatibilità *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

1. Istituto nazionale di statistica, *L'evoluzione della mortalità per causa: le prime 25 cause di morte*, (2017).
2. Ke C, Gupta R, Xavier D, Prabhakaran D, Mathur P., Kalkonde YV, Kolpak P, Suraweera W, Jha P; Million Death Study Collaborators, *Divergent trends in ischaemic heart disease and stroke mortality in India from 2000 to 2015: a nationally representative mortality study*, (2018).
3. Lippi G., Franchini M., Cervellin G., *Diagnosis and management of ischemic heart disease*, (2013).
4. S. Mangini, B. Rubim, A.Odílson, M. Silvestre, P. V. Pires, L. J. T. Pires, M. N. C. Curiati, F. Bacal, *Heart transplantation: review*, (2015).
5. Ozábalová E, Krejčí J, Hude P, Godava J, Honek T, Špinarová L, Pavlík P, Bedáňová H, Němec P, *Heart transplantation and infection*, (2017).
6. F. J. O'Brien, *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*, *Materialstoday* 14, (2011), 88-95.
7. D.S. Kohane, R. Langer, *Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering*, *Pediatric Research* 63, (2008), 487–491.
8. Hirt MN et al. *Circ Res.*, *Cardiac tissue engineering: state of the art*, (2014).
9. Matsuura K et al. *Anat Rec (Hoboken)*, *Cell sheet-based cardiac tissue engineering*, (2014).
10. M. T Alrefai1, D. Murali, A. Paul, K. M. Ridwan, J. M Connell, D. Shum-Tim, *Cardiac tissue engineering and regeneration using cell-based therapy*, *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications* 8, (2015), 81-101.
11. F. J. O'Brien, *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*, (2011).
12. Riccardo Pietrabissa, *Biomateriali per protesi e organi artificiali*, (1996).
13. M. L. Focarete, M. Scandola, *Elettrofilatura: una tecnologia antica per applicazioni innovative su scala 'nano'*, CNES 2007 I Congresso Nazionale di Electrospinning, Milano 4-5 Giugno 2007, 34-41.

14. Terashvili M. et al. *J Cardiothorac Vasc Anesth., Stem Cell Therapies in Cardiovascular Disease*, (2018).
15. M. Centola, K. Schuleri, A. Lardo, J. Hare, *Stem cell therapy for myocardial regeneration: mechanisms and current clinical applications*, (2008).
16. Williams D. F., *On the nature of biomaterials*, *Biomaterials*, 2009, 5897- 5909.
17. Vineet Singh, Meena Tiwari, *Structure-Processing-Property Relationship of Poly (Glycolic Acid) for Drug Delivery Systems 1: Synthesis and Catalysis*, *International Journal of Polymer Science*, (2010).
18. S. Eshraghi, S. Das, *Mechanical and Microstructural Properties of Polycaprolactone Scaffolds with 1-D, 2-D, and 3-D Orthogonally Oriented Porous Architectures Produced by Selective Laser Sintering*, *Acta Biomater.*6, (2010), 2467–2476.
19. Nair L. S., Laurencin C. T., *Biodegradable Polymers as Biomaterials*, *Progress in Polymer Science*, 2007, 762-798.
20. L. Li, K. Raghupathi, C. Song, P. Prasad, S. Thayumanavan, *Self-assembly of Random Copolymers*, *Chem Commun (Camb)* 77A, (2014), 13417–13432.
21. Hiroyuki Shirahama, Yoshihide Kawaguchi, Mohad S. Aludin, Hajime Yasuda, *Synthesis and enzymatic degradation of high molecular weight aliphatic polyesters*, (2001).
22. M. Gigli, M. Fabbri, N. Lotti, R. Gamberini, B. Rimini, A. Munari , *Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review*, *European Polymer Journal* 75, (2016).
23. M. Gigli, M. Fabbri, N. Lotti, R. Gamberini, B. Rimini, A. Munari , *Poly(butylene succinate)- based polyesters for biomedical applications: A review*, *European Polymer Journal* 75, (2016), 431-460.
24. M. Gigli, N. Lotti, M. Gazzano, L. Finelli, A. Munari, *Novel eco-friendly random copolyesters of poly(butylene succinate) containing ether-linkages*, *React. Funct. Polym.* 72, (2012), 303–310.

25. M. Soccio, N. Lotti, L. Finelli, M. Gazzano, A. Munari, *Influence of transesterification reactions on the miscibility and thermal properties of poly(butylene/diethylene succinate) copolymers*, Eur. Polym. J. 44, (2008), 1722–1732.
26. M. Gigli, N. Lotti, M. Gazzano, L. Finelli, A. Munari, *Macromolecular design of novel sulfur-containing copolyesters with promising mechanical properties*, J. Appl. Polym. Sci. 126, (2012), 686–696.
27. C. Gualandi, M. Soccio, E. Saino, M.L. Focarete, N. Lotti, A. Munari, L. Moroni, L. Visai, *Easily synthesized novel biodegradable copolyesters with adjustable properties for biomedical applications*, Soft Matter 8, (2012), 5466–5476.
28. M. Gigli, N. Lotti, M. Gazzano, L. Finelli, A. Munari, *Synthesis and characterization of novel poly(butylene succinate)-based copolyesters designed as potential candidates for soft tissue engineering*, Polym. Eng. Sci. 53, (2013), 491–501.
29. C. Gualandi, M. Soccio, M. Govoni, S. Valente, N. Lotti, A. Munari, E. Giordano, G. Pasquinelli, M.L. Focarete, *Poly(butylene/diethylene glycol succinate) multiblock copolyester as a candidate biomaterial for soft tissue engineering: solid-state properties, degradability, and biocompatibility*, J. Bioact. Compat. Polym. 27, (2012), 244–264.
30. Hua Jiao, S. H. Goh, and S. Valiyaveetil, *Inclusion Complexes of Poly(neopentyl glycol sebacate) with Cyclodextrins*, Macromolecules, 2001, 34 (23), pp 8138–8142.
31. S. H. Goh, D. R. Paul, J. W. Barlow, *Miscibility of poly(neopentyl glycol adipate)/chlorinated polymer blends*, (1982).
32. Akio Ito, Shunsuke Matsuda, Yoshinobu Murakami, Tooru Tamura, *Plastic lens of neopentyl glycol dimethacrylate copolymerized with methoxy diethylene glycol methacrylate or diethylene glycol dimethacrylate*, (1983).

33. Giulia Guidotti, Michelina Soccio, Valentina Siracusa, Massimo Gazzano, Elisabetta Salatelli, Andrea Munari and Nadia Lotti, *Novel Random PBS-Based Copolymers Containing Aliphatic Side Chains for Sustainable Flexible Food Packaging*, *Polymers* 2017, 9, 724.
34. Leo A Wall, Joseph H Flynn, *Degradation of polymers*, *Rubber Chemistry and Technology* 35 (5), (1962).
35. Rajendran Muthuraj, Manjusri Misra, A.K. Mohanty, *Hydrolytic degradation of biodegradable polyesters under simulated environmental conditions*, (2015).
36. Minakov, A.A.; Mordvinsted, D.A.; Schick, C., *Melting and reorganization of poly(ethylene terephthalate) on fast heating (1000 K/s)*, *Polymer*, 2004, 45, 3755-63.
37. Kong, Y.; Hay, J. N., *Multiple melting behaviour of poly(ethylene terephthalate)*, *Polymer* 2003, 44, 623-33.
38. Soccio, M.; Lotti, N.; Finelli, L.; Munari, A., *Effect of transesterification reactions on the crystallization behaviour and morphology of poly(butylene/diethylene succinate) block copolymers*, *Eur. Polym. J.* 2009, 45, 171-81.
39. Soccio, M.; Lotti, N.; Munari, A., *Influence of block length on crystallization kinetics and melting behavior of poly(butylene/thiodiethylene succinate) block copolymers*, *J. Therm. Anal. Calorim.* 2013, 114, 677–6884.
40. Boyer, R. F., *The Relation of Transition Temperatures to Chemical Structure in High Polymers*, *Rubber Chem. Technol.* 1963, 36, 1303–1421.
41. Soccio, M.; Lotti, N.; Finelli, L; Gazzano, M.; Munari, A., *Neopentyl glycol containing poly(propylene azelate)s: Synthesis and thermal properties*, *Eur. Polym. J.* 2007, 43, 3301-3313.
42. Soccio, M.; Lotti, N.; Finelli, L; Gazzano, M.; Munari, A., *Neopentyl Glycol Containing Poly(propylene terephthalate)s: Structure–Properties Relationships*, *J. Polym. Sci. Pol. Phys.* 2008, 46, 170-181.

43. Ichikawa, Y.; Kondo, H.; Igarashi, Y.; Noguchi, K.; Okuyama, K.; Washiyama, J., *Crystal structures of α and β forms of poly(tetramethylene succinate)*, Polymer 2000, 41, 4719-4727; corrigendum Polymer 2001, 42, 8476.
44. Fabbri, M.; Guidotti, G; Soccio, M.; Lotti, N.; Govoni, M.; Giordano, E.; Gazzano, M.; Gamberini R.; Rimini, B; Munari, A., *Novel biocompatible PBS-based random copolymers containing PEG-like sequences for biomedical applications: From drug delivery to tissue engineering*, Poly. Deg. Stab. 2018, 153, 53-62.

RINGRAZIAMENTI

Desidero, in conclusione, ricordare e ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato a raggiungere questo obiettivo così tanto desiderato.

Ringrazio, in primo luogo la mia relatrice, Prof.ssa Nadia Lotti per la disponibilità e la cortesia che fin dai primi giorni di lezione l'hanno sempre contraddistinta. Non solo è stata di grande aiuto durante la stesura della tesi ma, accogliendomi nei laboratori del DICAM a Bologna, mi ha permesso di acquisire nuove conoscenze e di toccare con mano ciò che prima risultava così astratto. Grazie a Michela, che per la sua esperienza, cultura e simpatia è stata indispensabile all'interno del laboratorio e durante la stesura della Tesi.

Grazie a Silvia e Francesca con cui ho condiviso i giorni in laboratorio, i pranzi e che sono state per me un grosso aiuto permettendomi di chiarire tutti i dubbi sempre con il sorriso.

Un sentito ringraziamento ai miei genitori, Bianca e Danilo, senza dei quali non avrei mai potuto raggiungere questo importante obiettivo. Un sostegno morale e di supporto nelle scelte più difficili durante tutto questo percorso.

Grazie a mia sorella Alice che anche in questo percorso si è dimostrata essere una persona su cui contare sempre.

Grazie agli amici che questo percorso mi ha fatto incontrare, in particolare a Davide, Siria, Martina e Nicolas con cui ho condiviso tutto tra un caffè e una risata e grazie agli amici di sempre, Luca e Federico che per me ci sono sempre stati e sempre ci saranno.

Infine, desidero ringraziare Letizia per avermi supportato e sopportato nei momenti difficili, per la fiducia mai mancata e per avere condiviso felicità e delusioni con me.

