

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
DIPARTIMENTO DI
INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E DELL'INFORMAZIONE
"GUGLIELMO MARCONI"

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**SCAFFOLD ELETTROFILATI BIODEGRADABILI A BASE
DI PBS E CHERATINA PER APPLICAZIONI IN
INGEGNERIA TISSUTALE**

Elaborato in:
FONDAMENTI DI CHIMICA

Relatore:

Prof.ssa Nadia Lotti

Presentata da:

Benedetta Noemi Polignieri

Correlatori:

Dr.ssa Annalisa Aluigi

Ing. Giulia Guidotti

Dr.ssa Michelina Soccio

Sessione terza
Anno Accademico 2017/2018

INDICE

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	1
1.1 Ingegneria tissutale	1
1.1.1 <i>Scaffold</i>	3
1.1.1.1 Elettrofilatura.....	4
1.1.2 Fonti cellulari e cellule staminali.....	9
1.1.3 Fattori di crescita	11
1.2 Biomateriali	12
1.2.1 Definizione	13
1.2.2 Classificazione	14
1.3 Biomateriali polimerici	17
1.3.1 Struttura	18
1.3.2 Cristallinità.....	19
1.3.3 Peso molecolare.....	20
1.3.4 Proprietà termiche	22
1.3.5 Strategie sintetiche.....	24
1.3.6 Processi di degradazione	26
1.4 Poliesteri.....	29
1.4.1 Poliesteri alifatici.....	29
1.4.1.1 Poliesteri alifatici per uso biomedicale	30
1.4.1.2 Poli(butilene succinato).....	33
1.5 Polimeri di origine naturale	35
1.5.1 Cheratina.....	36
CAPITOLO 2: SCOPO DELLA TESI	41
CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI	43
3.1 Sintesi di poli(butilene succinato) (PBS) ad alto peso molecolare	43
3.1.1 Purificazione del PBS.....	44
3.2 Caratterizzazione molecolare	46
3.2.1 Risonanza magnetica nucleare (NMR)	46
3.2.2 Cromatografia a permeazione su gel (GPC)	50
3.3 Realizzazione di <i>scaffold</i>	52
3.4 Caratterizzazione morfologica	54

3.4.1 Microscopia elettronica a scansione (SEM)	54
3.5 Caratterizzazione termica	56
3.5.1 Calorimetria a scansione differenziale (DSC).....	56
3.5.2 Analisi termogravimetrica (TGA)	59
3.6 Caratterizzazione meccanica.....	61
3.7 Studi di degradazione enzimatica	66
3.8 Studi di biocompatibilità	66
CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONI.....	68
4.1 Sintesi e caratterizzazione molecolare.....	68
4.2 Caratterizzazione morfologica degli <i>scaffold</i>	70
4.3 Caratterizzazione termica	71
4.4 Caratterizzazione meccanica.....	74
4.5 Studi di degradazione enzimatica.....	76
4.6 Studi di biocompatibilità.....	77
CAPITOLO 5: CONCLUSIONI.....	79
BIBLIOGRAFIA.....	81
RINGRAZIAMENTI.....	85

CAPITOLO 1:

INTRODUZIONE

1.1 Ingegneria tissutale

L'enorme progresso delle conoscenze nel campo della biologia cellulare e delle Biotecnologie ha consentito, negli ultimi anni, lo sviluppo di tecnologie mirate alla coltivazione ed alla ricostruzione in vitro di tessuti o organi, definendo una nuova branca di scienze biomediche conosciuta con il termine di "ingegneria tissutale". Questo termine venne ufficialmente introdotto durante il primo *Tissue Engineering Symposium* (California, 1998), per indicare "l'applicazione dei principi e dei metodi dell'ingegneria e delle scienze della vita per comprendere a fondo la relazione che esiste tra struttura e funzione nei tessuti viventi normali e patologici, per lo sviluppo di sostituti biologici che possano ripristinare, mantenere e migliorare la funzione tissutale".

Gli elementi fondamentali di cui si compone tale approccio multidisciplinare, che unisce competenze chimiche, biologiche, mediche e ingegneristiche, sono le cellule staminali, i fattori di crescita e matrici tridimensionali e biocompatibili, dalle opportune caratteristiche chimiche, meccaniche e fisiche, dette scaffold. Le cellule staminali sono le cellule progenitrici di tutti gli organi e i tessuti degli esseri viventi; esse si trovano in uno stato indifferenziato, ovvero non hanno ancora assunto una specifica tipologia e funzione, ma, in determinate condizioni, possono specializzarsi e differenziarsi in cellule di particolari tessuti e organi. In particolare, opportuni regolatori di crescita, specifici per ciascun tipo di tessuto, possono essere selezionati tra molecole bioattive o proteine morfogeniche per promuovere ed accelerare il processo di differenziamento e proliferazione cellulare. Infine, gli scaffold rappresentano il supporto meccanico e funzionale, in grado di ospitare, supportare e promuovere l'accrescimento e il differenziamento delle cellule in essi impiantate [1].

La procedura che porta alla realizzazione di un nuovo tessuto è costituita da una sequenza di passaggi successivi (Figura 1.1): isolamento delle cellule dall'ambiente biologico naturale, espansione delle colture in vitro, semina su scaffold, ed infine impianto dello scaffold stesso all'interno del corpo del paziente.

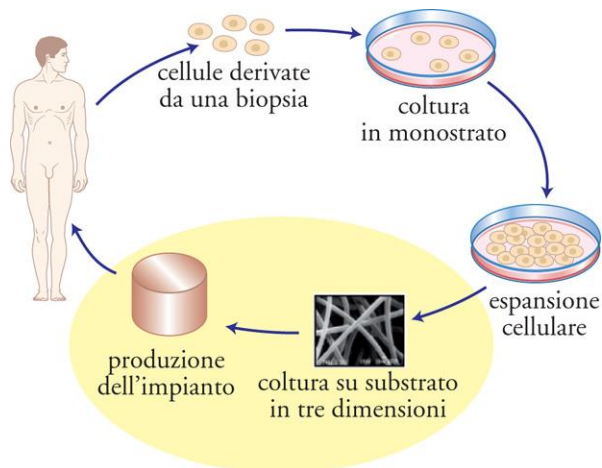


Figura 1.1. Ciclo rappresentativo dell'ingegneria tissutale.

Gli *scaffold*, e più in generale l'ingegneria tissutale, rappresentano la seconda generazione di sistemi di sostituzione di organi e tessuti. La prima generazione era essenzialmente costituita da organi artificiali tradizionali (reni, macchina cuore-polmoni, protesi valvolari cardiache, pacemakers cardiaci, protesi dell'articolazione ileo-femorale e ginocchio), la cui alternativa clinica era il trapianto di organi umani provenienti da donatori. L'ingegneria tissutale rappresenta un'evoluzione di questi interventi terapeutici, consentendo di associare la potenzialità del trapianto di cellule viventi con la tecnologia degli organi artificiali, per la realizzazione di strutture funzionali: i tessuti ingegnerizzati, in caso di successo, sono in grado di integrarsi con quelli del paziente, apportando in tal modo un contributo specifico e duraturo alla cura dello stato patologico, senza richiedere debilitanti e costosi trattamenti farmacologici. Tale strategia richiede perciò lo studio sia delle strutture dei costrutti e delle forze fisiche che su questi agiscono, sia dei fattori biochimici e molecolari della crescita e del differenziamento di cellule e tessuti.

Per quanto riguarda i diversi tipi di tessuti artificiali, se ne possono distinguere tre classi principali:

- composti strutturali in grado di sostituire tessuti nell'organismo, quali ad esempio gli equivalenti della cute (o "pelle artificiale") per il trattamento di ulcere croniche o ustioni;
- sistemi per la rigenerazione della cartilagine o del tessuto osseo;
- impianti per la modulazione immunitaria e di sostituzione di sistemi metabolici quali il pancreas ed il fegato artificiale, oppure impianti per il sistema nervoso centrale atti a rilasciare molecole bioattive e fattori di accrescimento in siti

specifici, come ad esempio quelli per il trattamento del morbo di Parkinson e di Alzheimer.

Dai dati riportati da recenti studi è facile capire come l'ingegneria tissutale stia diventando un'alternativa sempre più concreta agli approcci tradizionali; il mercato globale di questa disciplina, valutato intorno ai 27 miliardi di dollari nel 2015, è in continua e forte crescita: nel 2018 è stato stimato intorno ai 32 miliardi di dollari, mentre è previsto raggiunga i 135 miliardi nel 2024 (Figura 1.2).

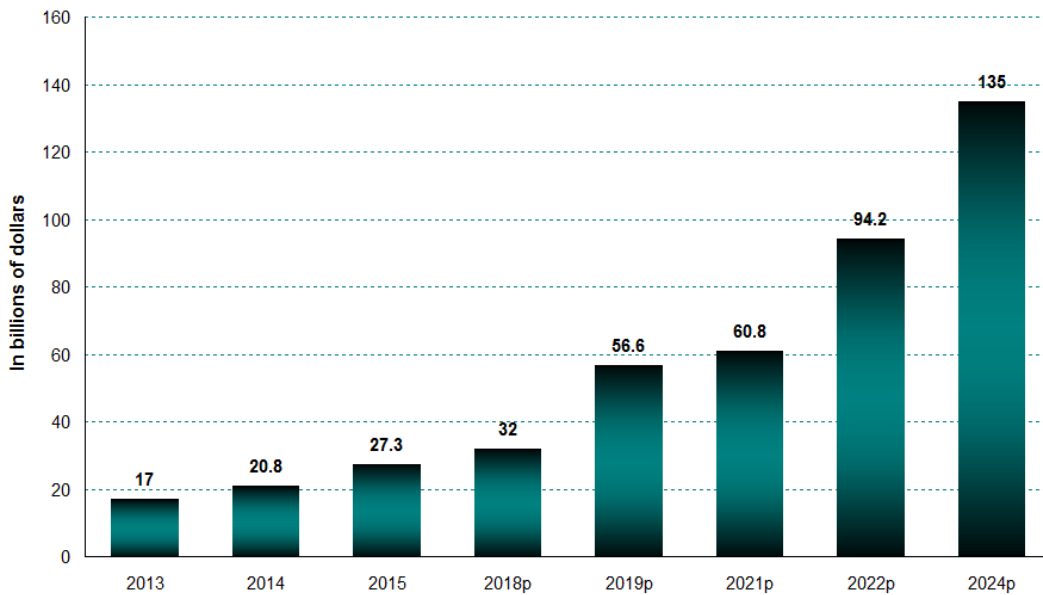


Figura 1.2. Mercato globale dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa nel periodo 2013-2024 (Fonte BCC Research, 2016).

1.1.1 Scaffold

Come già accennato, lo *scaffold* fornisce una piattaforma strutturale per il microambiente cellulare e supporta la formazione di nuovi tessuti, consentendo l'adesione, la migrazione, l'organizzazione ed il differenziamento cellulare.

I requisiti fondamentali che uno *scaffold* deve soddisfare nelle applicazioni nel campo dell'ingegneria tissutale sono:

- **Biocompatibilità:** di fondamentale importanza poiché le cellule devono poter aderire, migrare sulla superficie e proliferare attraverso la struttura dello *scaffold*. Quest'ultimo, inoltre, non deve innescare reazioni immunitarie o risposte infiammatorie avverse, per scongiurare, nei casi più gravi, il rigetto da parte dell'organismo ospite.

- Proprietà meccaniche compatibili con quelle del sito anatomico di impianto, per poter resistere ai carichi imposti dall'ambiente fisiologico per l'intero ciclo di vita del costrutto.
- Biodegradabilità: è necessario che la struttura impiantata sia realizzata con materiali che si degradino di pari passo con il processo di crescita cellulare, affinché le cellule possano produrre la propria matrice extracellulare e il tessuto rigenerarsi. Inoltre, i cataboliti, cioè i sottoprodotti della degradazione, devono essere atossici e devono poter essere smaltiti dall'organismo senza danneggiarlo.
- Elevata porosità ed interconnessione dei pori stessi (di diametro tipicamente compreso tra i 200 e 500 μm , che può variare a seconda del tipo di cellula utilizzato e del tessuto che si sta ingegnerizzando), per assicurare la penetrazione cellulare e la diffusione dei nutrienti all'interno del costrutto, permettendo allo stesso tempo la rimozione dei cataboliti.
- Adeguate proprietà superficiali che favoriscano l'interazione tra lo *scaffold* e le cellule: queste, infatti, aderiscono tramite gruppi chimici (ligandi) alla superficie del materiale; in particolare, materiali di origine naturale possiedono naturalmente questi ligandi, mentre quelli di origine sintetica possono richiederne l'incorporazione attraverso, ad esempio, l'adsorbimento di proteine.
- Riproducibilità del processo di produzione: affinché un particolare tipo di *scaffold* sia fruibile a livello clinico e commerciale, deve avere costi accessibili e deve essere possibile avviarne una produzione in serie.

1.1.1.1 Elettrofilatura

Nonostante siano diversi i metodi di fabbricazione di *scaffold* per le applicazioni in ingegneria tissutale, ad oggi soltanto pochi tra essi sono in grado di realizzare impalcature tridimensionali con caratteristiche compatibili con la matrice extracellulare. Un esempio è dato dall'elettrofilatura, attraverso cui è possibile ottenere fibre continue di dimensioni micro- e nanometriche interconnesse e dall'elevato rapporto superficie/volume. Inoltre, attraverso la regolazione della dimensione delle fibre, è possibile modulare la porosità e la dimensione dei pori stessi. Questo consente da una parte una buona adesione delle cellule allo *scaffold*,

dall'altra un efficace passaggio di nutrienti attraverso l'impianto. Tutte queste proprietà, che imitano strettamente le caratteristiche della matrice extracellulare, possono essere ottenute variando *ad hoc*, in base alle specifiche di progetto e alle caratteristiche del tessuto ospite, diversi parametri del processo [2].

La strumentazione impiegata è costituita da tre elementi principali, come illustrato in Figura 1.3: una siringa che contiene la soluzione di polimero disciolto in un solvente, un generatore di alta tensione (10-50 kV) che, mediante l'ago metallico della siringa, carica positivamente il polimero, ed un collettore metallico con messa a terra, da cui il polimero viene attratto.

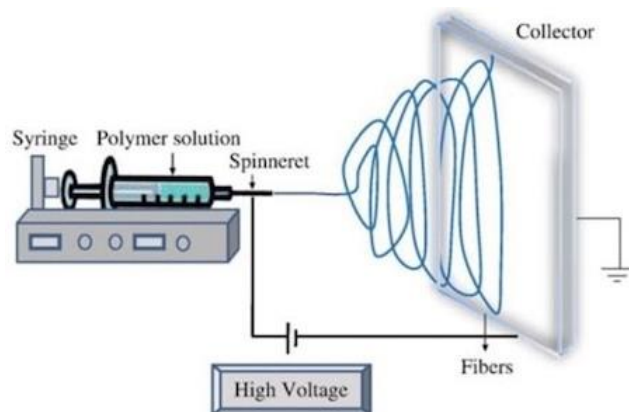


Figura 1.3. Schema del processo di elettrofilatura.

La soluzione costituisce un elemento chiave del processo, in quanto non solo ha la funzione di sciogliere il materiale e formare così la soluzione che verrà elettrificata, ma ha anche il compito di condurre il materiale stesso verso il collettore. In questa seconda fase è importante valutare le caratteristiche del solvente quali volatilità, tensione di vapore, tensione superficiale e punto di evaporazione, che influenzano notevolmente la morfologia della fibra.

Il fluido, sottoposto ad una differenza di potenziale, in corrispondenza della punta dell'ago subisce un aumento della sua carica superficiale e, una volta raggiunto un valore di tensione critica, l'accumulo di cariche uguali nella soluzione genera una forza auto-repulsiva maggiore della tensione superficiale della soluzione stessa. Questo provoca l'eruzione della soluzione, con la formazione di un getto polimerico nel verso del campo elettrico esterno, che termina sul collettore collegato a terra, in prossimità del quale la carica viene rilasciata e si ha la formazione di fibre polimeriche solide in seguito all'evaporazione del solvente.

Il percorso che il getto polimerico compie prima di giungere al collettore può essere suddiviso in quattro parti distinte: nella prima regione il getto di polimero esce dall'ago; la goccia inizia subito ad assottigliarsi, creando il cosiddetto “cono di Taylor” (Figura 1.4), orientato in direzione del collettore.

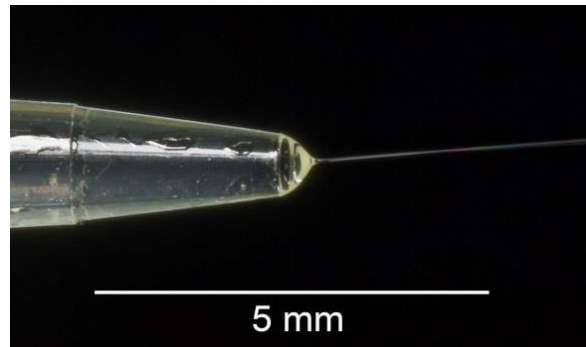


Figura 1.4. Cono di Taylor.

Nella seconda regione, che comprende gran parte della distanza tra la siringa e il collettore, il filo polimerico viene stirato e gran parte del solvente evapora, causando la diminuzione e la solidificazione del diametro della fibra. Nella terza regione, detta anche “*splay*”, il filamento polimerico si allarga, disegnando la forma di una spirale mentre si avvicina al collettore, che costituisce la quarta regione, dove il polimero perde la sua carica e si deposita in forma di sottili fibre polimeriche (Figura 1.5).

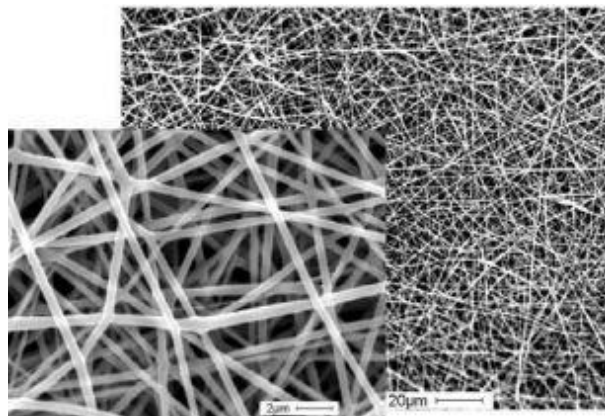


Figura 1.5. Nanofibre elettrofilate viste al SEM.

Come già detto, uno dei principali vantaggi offerti dal processo di elettrofilatura è l'ampio intervallo di parametri che possono essere variati in funzione delle applicazioni richieste; essi si suddividono in tre categorie:

1. Parametri di processo:

- tensione applicata: questo valore, variabile per diversi sistemi polimero/solvente ed influenzato anche dalla distanza tra ago e collettore, deve essere tale da permettere la formazione del cono di Taylor;
- distanza ago-collettore: deve essere sufficientemente grande per consentire l'evaporazione del solvente, ma nello stesso tempo non eccessiva, al fine di non compromettere il percorso del getto e la morfologia della fibra;
- velocità di flusso: generalmente si preferiscono velocità relativamente basse, in quanto l'aumento della portata genera pori di dimensioni maggiori, ma può causare anche una granulosità indesiderata delle fibre, dovuta all'incapacità del solvente di evaporare prima di raggiungere il collettore;
- tipo di collettore: i più comuni sono costituiti da piastre di alluminio; in alternativa vengono impiegati fogli di carta o tessuti conduttivi, oppure bagni liquidi di non solventi. Inoltre, è possibile scegliere un collettore fisso, se si desiderano fibre disposte in maniera casuale, oppure mobile (ad esempio cilindri rotanti), nel caso in cui si desiderino fibre orientate.

2. Parametri della soluzione:

- concentrazione: in generale, la concentrazione della soluzione polimerica è direttamente proporzionale al diametro della fibra. E' dunque necessario che questo parametro vari all'interno di un determinato range di valori, poiché se troppo basso il risultato del processo di elettrofilatura sarà un insieme di fibre e granelli, se troppo alto diventa invece impossibile mantenere un flusso costante a livello della punta dell'ago (Figura 1.6);

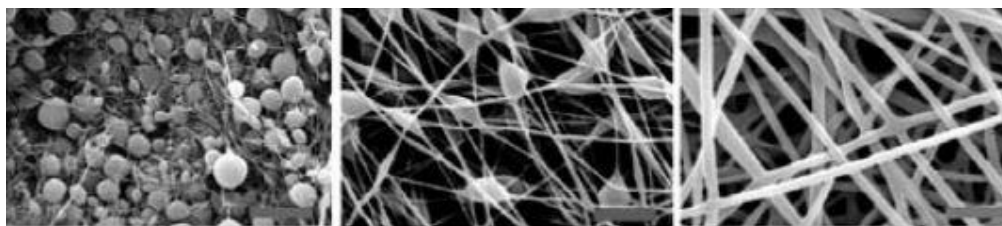


Figura 1.6. Effetto dell'aumento della concentrazione (da sinistra verso destra) di una soluzione di acido poli(lattico-co-glicolico) sulla morfologia delle fibre ottenute.

- peso molecolare: influisce sulle caratteristiche morfologiche della fibra, in quanto riflette il numero di legami tra le catene polimeriche in soluzione. Al crescere del peso molecolare si riduce la granulosità ed aumenta il diametro finale della fibra;
- viscosità: così come la concentrazione, anch'essa deve trovarsi all'interno di un certo range di valori. Infatti, nel caso sia troppo bassa non si riescono ad ottenere fibre continue, viceversa se troppo alta diventa impossibile processare agevolmente il materiale;
- tensione superficiale: ha diversi effetti sul diametro e sulla granulosità delle fibre e influisce anche sul valore della tensione critica in corrispondenza del quale ha inizio il processo di filatura. In generale, riducendo la tensione superficiale è possibile ottenere fibre prive di granuli ed operare con campi elettrici inferiori;
- conducibilità: gli ioni presenti nella soluzione polimerica incidono significativamente sulle dimensioni e l'uniformità delle fibre. Infatti, all'aumentare della conducibilità elettrica della soluzione si verifica un significativo aumento del diametro della fibra; al contrario, una conducibilità troppo bassa provoca una insufficiente forza elettrica, che non consente l'elongazione del getto e la formazione di una fibra uniforme, con la conseguente formazione di granuli.

3. Parametri ambientali

- temperatura: può influenzare il diametro della fibra modificando la viscosità del getto della soluzione polimerica. Generalmente, a

temperature più alte si registrano valori di viscosità più bassi e viceversa;

- umidità: influenza la morfologia delle fibre, in particolare nel caso di polimeri che sono disciolti in soluzione acquosa. Infatti, un'eccessiva umidità può impedire l'evaporazione del solvente, mentre con un tasso di umidità troppo basso la velocità di evaporazione aumenta, fino a superare la velocità di infusione dalla punta dell'ago, rendendo quindi impossibile il processo di elettrofilatura. L'umidità influisce inoltre sulla carica e sulla tensione superficiale della soluzione, promuovendo la scarica della fibra elettrofilata.

1.1.2 Fonti cellulari e cellule staminali

Da sempre, uno dei maggiori punti d'interesse nel campo dell'ingegneria tissutale è la comprensione dei meccanismi cellulari alla base della rigenerazione tissutale. Le prime fasi del processo di rigenerazione mediante questo tipo di approccio riguardano la raccolta di una porzione di tessuto ed il conseguente isolamento delle cellule, seguito dalla loro espansione in coltura [3]. Il tessuto donatore può avere diverse origini: può provenire dallo stesso paziente (autologo), oppure da un donatore (eterologo); naturalmente, l'utilizzo di cellule autologhe è preferibile per scongiurare il rischio di rigetto da parte dell'organismo. Tuttavia, anche l'approccio con cellule autologhe, seppure preferito, può avere aspetti negativi: se infatti da un lato permette di sfruttare cellule native, e quindi già differenziate, dall'altro può accadere, per esempio, che la capacità di proliferazione in vitro sia garantita soltanto per periodi di tempo relativamente brevi (si è notata infatti una progressiva perdita di funzionalità organo-specifica nel tempo), oppure che le cellule di alcuni distretti non siano in grado di espandersi (come nel caso del pancreas). Tali limitazioni hanno portato ad un sempre più vasto utilizzo di cellule staminali, dalle quali è possibile ottenere strutture tessuto-specifiche della maggior parte dei componenti dell'organismo.

Le cellule staminali vengono definite come cellule indifferenziate, in grado di dividersi in modo asimmetrico dando origine a due diverse cellule figlie, di cui una, identica alla cellula madre, mantiene le sue stesse caratteristiche di staminalità, mentre l'altra è precursore di una nuova linea cellulare destinata a differenziarsi in diversi fenotipi

cellulari. Le cellule staminali sono clonogeniche, ovvero capaci di produrre esatti duplicati di sé stesse, autorinnovanti, cioè presentano una capacità di auto-replicazione potenzialmente illimitata, e “potenti”, in quanto sono in grado di dare vita ad una o più linee cellulari altamente differenziate a seconda della loro potenzialità replicativa [4,5]. In base a tale caratteristica si possono distinguere (Figura 1.7):

- cellule staminali “totipotenti”: coinvolte negli stadi iniziali di sviluppo embrionico, possono generare tutti i tipi di cellule e tessuti presenti in un organismo, quali le cellule del trofoblasto e le cellule dei tre strati germinali (endoderma, mesoderma ed ectoderma), necessarie per il completo sviluppo dell’embrione. Dunque, da una staminale totipotente si può sviluppare un organismo vivente completo;
- cellule staminali “pluripotenti”: analogamente alle cellule staminali “totipotenti” possono generare i tre strati germinali (endoderma, mesoderma ed ectoderma), ma non il trofoblasto. Si trovano generalmente nel nodo embrionale della blastocisti, nell’embrione, nel feto, ma solo molto rare nell’individuo adulto;
- cellule staminali “multipotenti”: possono generare un numero limitato di cellule e tessuti, normalmente legati allo strato germinale da cui sono originate (cellule staminali mesenchimali). Esse si formano nel feto e nello stadio precoce di vita postnatale quando è già definita l’espressione genica delle singole cellule, e nell’organismo adulto si trovano in corrispondenza di midollo osseo, sangue, cervello, fegato, muscoli ed epidermide;
- cellule staminali “unipotenti”: possono dar vita ad un unico tipo di cellula. Dopo un numero molto limitato di divisioni cellulari, tali cellule iniziano a differenziarsi e a dare origine a cellule tessuto-specifiche, che hanno il compito di riparare e mantenere i tessuti.

Il tipo ed il numero di linee cellulari altamente differenziate che una cellula staminale è in grado di generare sono determinati geneticamente. Tuttavia, l’ambiente esterno gioca un ruolo fondamentale nei processi di attivazione genica mediante la modificazione del gradiente di citochine, le interazioni intercellulari e tra cellule e matrice extracellulare, guidando così il processo di differenziamento.

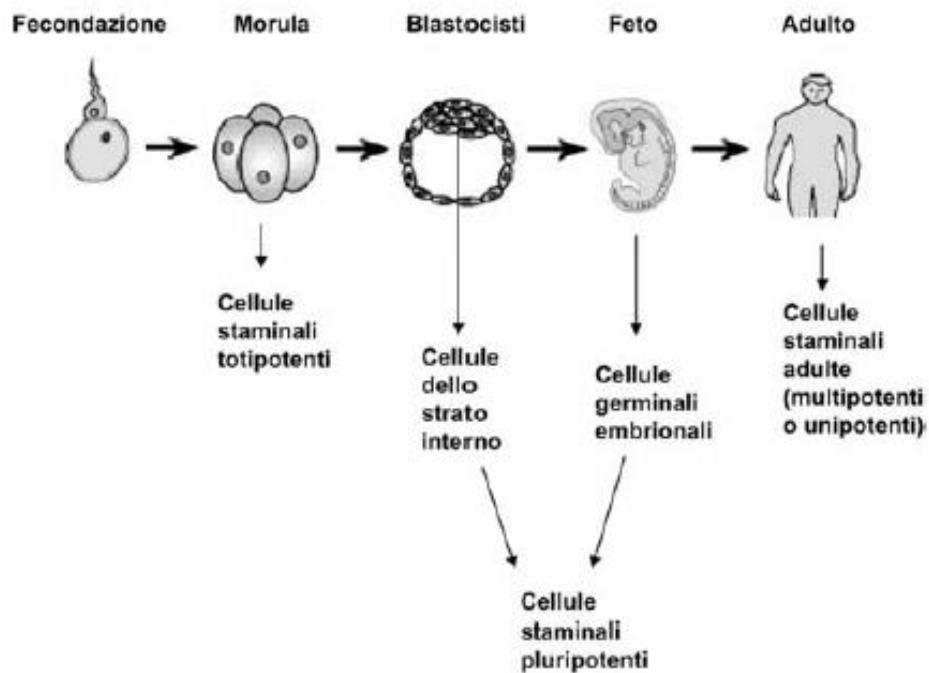


Figura 1.7. Origine delle cellule staminali totipotenti, pluripotenti, multipotenti e unipotenti.

1.1.3 Fattori di crescita

Le cellule in coltura, dopo un certo intervallo di tempo in cui proliferano, raggiungono una fase stazionaria, in cui il numero di cellule rimane costante; tuttavia, se viene aggiunto al sistema un fattore di crescita, si può ottenere una ripresa della proliferazione cellulare. Con il termine *growth factors* (GF) si indicano proteine capaci di stimolare la proliferazione ed il differenziamento cellulare. La fonte da cui, attualmente, sono ottenuti i fattori di crescita è il cosiddetto *platelet rich plasma* (PRP), ovvero una porzione di plasma ricca di piastrine ottenuta mediante centrifuga di una o più provette di sangue del paziente [6].

In generale, il rapporto tra i diversi tipi di cellule presenti nel sangue è così distribuito: 93% globuli rossi, 6% piastrine e 1% globuli bianchi. Nel PRP questo rapporto è invertito, in quanto si ha un decremento della percentuale di globuli rossi al 5% ed un incremento fino al 94% delle piastrine, che sono maggiormente coinvolte nei processi di guarigione e rigenerazione tissutale.

1.2 Biomateriali

Negli ultimi 50 anni, nei paesi maggiormente sviluppati, grazie ai progressi della medicina e al miglioramento delle condizioni igieniche generali, l'aspettativa di vita alla nascita è aumentata considerabilmente. La percentuale di popolazione ultrasessantacinquenne è in crescita ed è osservabile un aumento complessivo delle patologie croniche su quelle acute, cui fa riscontro un aumento della domanda di dispositivi medici per trattare o sostituire le funzioni di tessuti o di interi organi. Il loro impiego ha permesso una serie di innovazioni terapeutiche di notevole portata (Figura 1.8): basti pensare a come hanno migliorato la qualità della vita di migliaia di persone dispositivi medici quali protesi d'anca, pacemaker, cristallini artificiali per la cura della cataratta, protesi valvolari per la risoluzione di stenosi o insufficienze vascolari cardiache, impianti di *stent* per ripristinare la pervietà di un vaso, ecc... Lo sviluppo di tali dispositivi ha portato, di pari passo, ad un'estesa ricerca di biomateriali prestanti che potessero essere impiegati in questi ambiti specifici e che possedessero particolari caratteristiche e proprietà.

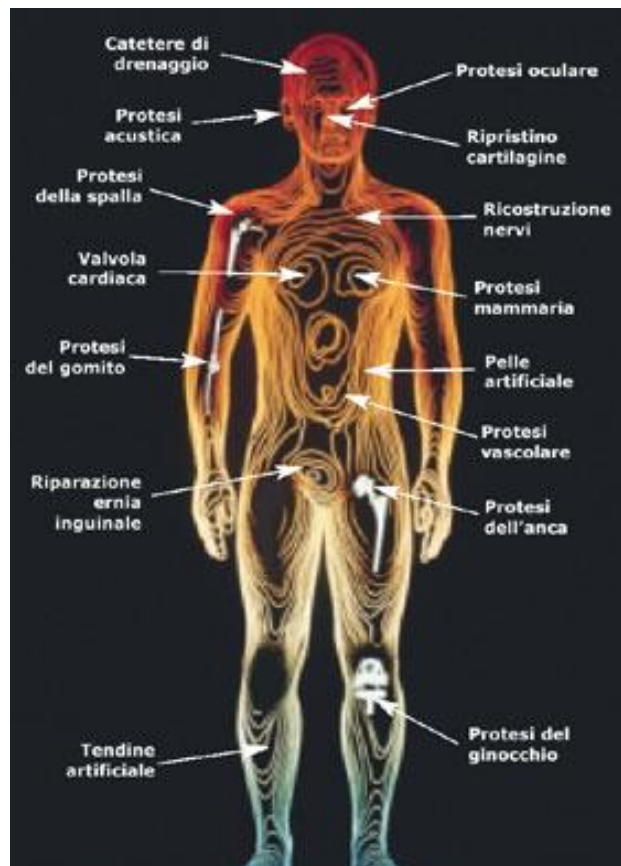


Figura 1.8. Esempi di dispositivi medici.

1.2.1 Definizione

In occasione della *Consensus Conference on Definitions in Biomaterials Science* del 1976, l'*European Society for Biomaterials* (ESB), diede per la prima volta una definizione al termine "biomateriale": venne identificato come biomateriale qualsiasi "materiale non vivente utilizzato in un dispositivo medico e finalizzato all'interazione con sistemi biologici". Tale definizione, nel corso degli anni, è stata più volte modificata ed aggiornata, fino a quella odierna: "materiale finalizzato all'interazione con un sistema biologico allo scopo di valutare, trattare, aumentare o sostituire qualsiasi tessuto, organo o funzione corporea". È possibile notare come i biomateriali siano passati dal semplice interagire con il corpo ad influenzare i processi biologici, fino a diventare veri e propri protagonisti nei processi di rigenerazione, andando a sostituire o integrare tessuti e organi danneggiati da malattie o da eventi traumatici. Le prestazioni dei materiali impiegati in campo medico sono valutate in base alla loro biofunzionalità e biocompatibilità [7]:

- la biofunzionalità si riferisce alle proprietà che un dispositivo deve possedere per riprodurre una determinata funzione dal punto di vista fisico e meccanico (durezza, modulo elastico, resistenza alla trazione, tenacità, ecc...). Di fondamentale importanza, in questo senso, è la resistenza alla fatica e all'usura: la prima, correlata alla risposta del materiale a carichi ciclici ripetuti, è ottimizzabile ad esempio mediante trattamenti superficiali, mentre per quanto riguarda la seconda, se accompagnata da un elevato coefficiente di attrito, si traduce in un allentamento dell'impianto ed un possibile rilascio di ioni nocivi all'interno dell'organismo;
- la biocompatibilità di un materiale, invece, consiste nella caratteristica di stabilire interazioni "non sfavorevoli" con i sistemi viventi con i quali esso viene in contatto. La biocompatibilità costituisce un requisito fondamentale, legato alla necessità di migliorare e/o ripristinare una determinata funzione biologica, senza interferire o interagire in modo dannoso con le attività fisiologiche dell'organismo. Il grado di biocompatibilità di un materiale è funzione non solo delle caratteristiche e delle proprietà del materiale stesso (proprietà chimiche, rugosità, energia e carica superficiale, stabilità chimica, proprietà dei prodotti di degradazione, ecc.) e dei dispositivi con essi realizzati (dimensioni, forma, rigidità, ecc.), ma anche delle condizioni dell'organismo ospite (tipo di tessuto, luogo di impianto, età, sesso, condizioni generali di salute, regime

farmaceutico, ecc.) e della tecnica chirurgica utilizzata in fase di impianto. La biocompatibilità di un materiale deve permanere durante l'intero ciclo produttivo, dalla fase di progettazione a quella di sterilizzazione, dall'approvvigionamento delle materie prime al confezionamento finale del prodotto. Se è vero, infatti, che l'impianto deve essere inerte per l'organismo, per non scatenare reazioni indesiderate, è altresì vero che deve essere in grado di tollerare le condizioni dell'ambiente in cui viene inserito, che in molti casi potrebbero danneggiarlo: emblematico è il caso della corrosione ad opera dei fluidi biologici, che causa il rilascio, da parte del materiale, di ioni che possono accumularsi nei tessuti provocando patologie acute o croniche e causando, contemporaneamente, un danneggiamento dell'impianto con conseguente detrimento delle sue prestazioni.

1.2.2 Classificazione

I biomateriali si possono classificare in base alla natura chimica del materiale stesso ed essere così suddivisi nelle seguenti categorie [8]:

- biomateriali metallici: sono caratterizzati da elevatissima resistenza meccanica ai carichi e alla fatica, garantita da valori di modulo elastico molto elevati, marcata duttilità e costi relativamente ridotti. Di contro, il loro limite principale è dato dalla bassa resistenza alla corrosione in ambiente fisiologico e dall'elevata densità, spesso maggiore di quella dei tessuti corporei. Ad eccezione del titanio "commercialmente puro", utilizzato principalmente negli impianti dentali, i materiali metallici vengono generalmente utilizzati come leghe, la cui composizione spazia dalle leghe auree per odontoiatria, agli acciai inossidabili, alle leghe a base di cobalto e titanio, che trovano il loro maggiore campo d'impiego nella realizzazione di protesi ortopediche (Figura 1.9) e di dispositivi di fissaggio quali viti, placche e perni.



Figura 1.9. Protesi d'anca in materiale metallico e radiografia post-impianto.

- biomateriali ceramici: sono caratterizzati da un'elevata resistenza alla corrosione e all'usura. A livello tecnologico, nascono in seguito ad un processo detto "sinterizzazione", cioè compressione di polveri ad altissime temperature e pressioni, fino ad ottenere un materiale indivisibile. Per questo motivo i materiali ceramici risultano particolarmente resistenti a sforzi di compressione, viceversa presentano un comportamento fragile se sottoposti a trazione. Trovano ampia applicazione nella realizzazione di teste sferiche per protesi articolari, di componenti nelle protesi di ginocchio, ma soprattutto nell'ortodonzia e odontoiatria come cementi per occlusioni e rivestimenti dentali (Figura 1.10).



Figura 1.10. Protesi dentale in materiale ceramico.

- biomateriali di origine naturale: di origine umana o animale, sia duri che molli, in passato, il loro impiego ha avuto come risultato diversi insuccessi, sia a causa della reazione fisiologica da corpo estraneo che essi inducevano sull'organismo, sia a causa dei processi degradativi che subivano. Per questo motivo i materiali naturali attualmente impiegati vengono sottoposti a devitalizzazione cellulare per attenuare o limitare tali reazioni. Sono maggiormente implicati come riempitivo in ambito ortopedico, a supporto di tessuti ossei, o in chirurgia cardiovascolare, nella

sostituzione di vasi o valvole (Figura 1.11), nonostante il loro impiego risulti piuttosto limitato a causa della ridotta disponibilità.



Figura 1.11. Protesi valvolare cardiaca di origine biologica.

- biomateriali polimerici: grazie alla grande versatilità delle loro caratteristiche fisiche e chimiche, le applicazioni dei polimeri sono innumerevoli: esse spaziano dalle protesi vascolari e valvolari (Figura 1.12) alle fibre cave per emodialisi, dalle superfici articolari per protesi ortopediche alle lenti intraoculari, dalle protesi mammarie ai cateteri, dai cementi per ossa ai materiali da sutura. Verranno approfonditi più accuratamente in seguito.

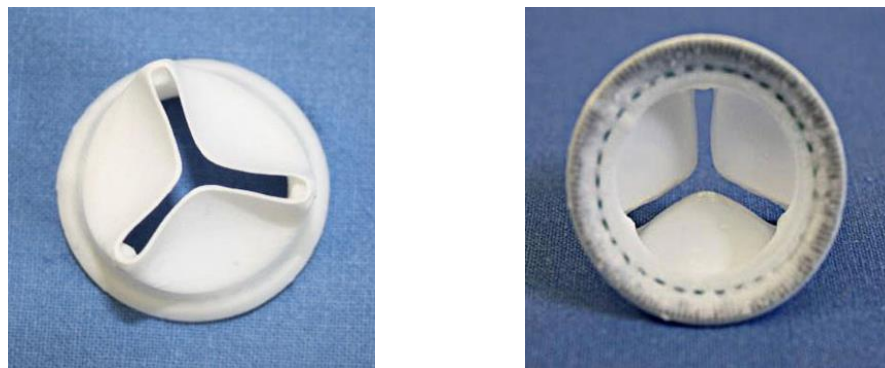


Figura 1.12. Protesi valvolare cardiaca in materiale polimerico.

- biomateriali compositi: sono materiali caratterizzati da proprietà modulabili in funzione della destinazione d'uso prevista, nei quali la distinzione di fase è visibile solo a livello microscopico. A seconda della funzione che ricoprono, tali costituenti prendono il nome di matrice (fase continua e omogenea che contiene il rinforzo) e rinforzo (fase dispersa che fornisce resistenza meccanica assumendo su di sé il carico esterno). Possono fornire prestazioni migliori rispetto a quelle dei materiali omogenei, dai

quali si differenziano in quanto offrono la possibilità di esercitare un notevole controllo sulle proprietà macroscopiche e quindi di pilotarle verso le caratteristiche desiderate, ad esempio variando la forma e la disposizione del rinforzo incluso nella matrice, la frazione di volume occupato dal rinforzo e le caratteristiche delle interfacce che si creano tra i due diversi componenti. Esempi di materiali compositi per applicazioni biomedicali sono il polietilene rinforzato con fibre di carbonio e i polimeri a base di acido lattico rinforzati, contenenti particelle di idrossiapatite, entrambi utilizzati per il trattamento di fratture ossee.

1.3 Biomateriali polimerici

Con il termine polimero si indica un composto organico dato dall'unione di unità a basso peso molecolare dello stesso tipo (omopolimero) o di tipo diverso (copolimero), dette monomeri. Tramite un processo di polimerizzazione, tali monomeri si combinano chimicamente tra loro per formare polimeri che possono avere un diverso grado di polimerizzazione: in particolare si parla di dimeri, trimeri, ecc. se il polimero è costituito rispettivamente da due, tre, ecc. monomeri. Se invece il peso molecolare raggiunto è sufficientemente elevato (ovvero maggiore di 5000 Dalton), si parla di macromolecola [9].

Come già accennato, i materiali polimerici trovano un vastissimo campo di applicazioni grazie alle loro proprietà, ampiamente modulabili in relazione alle specifiche richieste. Inoltre, mediante opportune procedure si possono ottenere polimeri di sintesi con strutture e proprietà molto simili a quelle dei tessuti biologici; in questo senso i materiali polimerici risultano essere biocompatibili, in quanto in grado di innescare reazioni positive all'interno dell'organismo ospite. Talvolta questa interazione può condurre anche ad una sorta di metabolizzazione di alcuni tipi di polimero che nel tempo vengono degradati e successivamente eliminati dall'organismo, peculiarità che ne consente l'impiego in quelle applicazioni per le quali è richiesto un uso temporaneo. Tali materiali risultano poi facilmente lavorabili e processabili, anche in strutture micro- e nanometriche, per la realizzazione ad esempio di capsule per il rilascio di farmaci e vettori di cellule e molecole bioattive. Altre applicazioni riguardano la realizzazione di suture, placche, viti e chiodi, protesi cardiache e vascolari, lenti a contatto e intraoculari.

Occorre però tenere presente che i materiali polimerici per uso biomedico differiscono dagli stessi materiali impiegati per applicazioni tradizionali in quanto devono contenere quantità molto limitate di additivi e di residui monometrici che possono essere rilasciati nei tessuti.

1.3.1 Struttura

In base alla configurazione molecolare assunta, i polimeri possono avere struttura (Figura 1.13):

- lineare: le diverse catene sono unite tra loro agli estremi, una di seguito all'altra, creando delle lunghe macromolecole filiformi. Hanno proprietà meccaniche inferiori rispetto ai polimeri reticolati. Infatti, le catene lineari sono legate fra loro da legami deboli del tipo Van der Waals, o interazioni dipolo-dipolo: quando il polimero è sottoposto a sollecitazione, tali legami consentono lo scorrimento viscoso delle catene l'una rispetto all'altra, che è responsabile del comportamento viscoelastico dei polimeri a catena lineare;
- ramificata: dalla catena principale, di tipo lineare, partono delle ramificazioni laterali, legate per mezzo di legami deboli alla struttura filiforme. Le ramificazioni limitano l'impaccamento delle catene, riducendo di conseguenza la densità del polimero. Presentano proprietà intermedie rispetto ai polimeri a catena lineare e reticolata in quanto i fenomeni di scorrimento viscoso, per quanto possibili, sono limitati dagli impedimenti fisici dati dalle ramificazioni;
- reticolata: hanno una massa assimilabile ad una sola macromolecola reticolata che si estende tridimensionalmente, e di conseguenza possiede proprietà di rigidità e resistenza meccanica superiori. Infatti, tra le catene lineari adiacenti si generano dei veri e propri ponti covalenti, che ne impediscono completamente lo scorrimento viscoso.

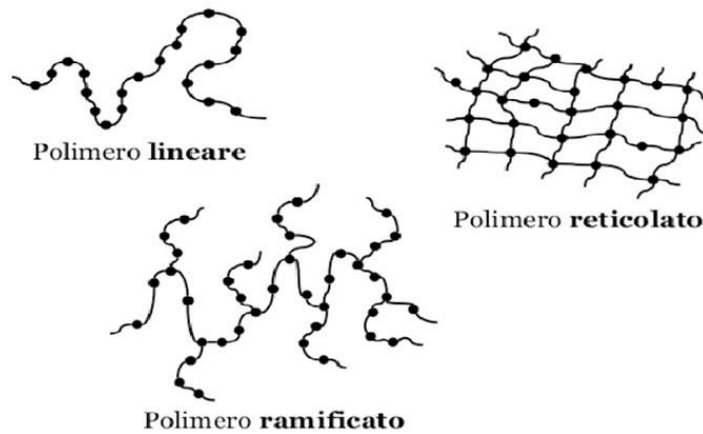


Figura 1.13. Tipi di strutture dei materiali polimerici.

1.3.2 Cristallinità

Generalmente, le macromolecole contengono al loro interno due fasi distinte, una cristallina, in cui le catene sono disposte ordinatamente nelle tre dimensioni, ed una amorfa, in cui al contrario le catene sono orientate in modo casuale e formano una struttura a “gomitolo”. Per la classe dei materiali polimerici il grado di cristallinità, ovvero il rapporto percentuale tra il peso di sostanza in forma cristallina ed il peso totale, varia tra il 5 ed il 95%. Non esistono dunque polimeri completamente cristallini, ma al più semicristallini (Figura 1.14), in quanto la componente amorfa è sempre presente, in percentuali più o meno elevate.

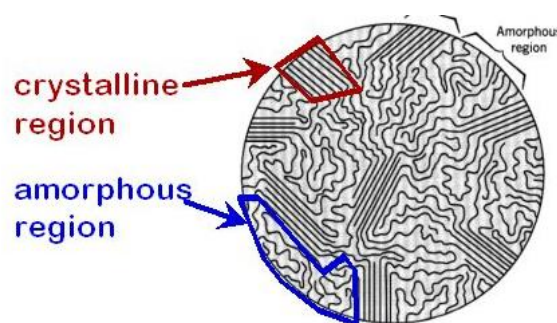


Figura 1.14. Rappresentazione di struttura semi-cristallina.

Il grado di cristallinità di un polimero può dipendere da diversi fattori, primo fra tutti la sua struttura chimica, ma anche l’eventuale presenza di ramificazioni o il trattamento termico a cui possono essere sottoposti, come ad esempio la velocità di raffreddamento da fuso. Durante il raffreddamento, infatti, le catene fortemente

disperse in seguito alla fusione, possono assumere una configurazione ordinata, e dunque cristallizzare, se dispongono di un tempo sufficiente, ovvero se la velocità di raffreddamento è minore di quella di cristallizzazione. Inoltre, indici di cristallinità più elevati si osservano per polimeri a catena lineare, rispetto a quelli a catena ramificata o reticolati.

Infine, a parità di peso molecolare, la densità di un polimero cristallino è maggiore rispetto a quella di un polimero amorfo, in quanto in una struttura cristallina le catene sono raggruppate insieme in maniera più compatta. Questo conferisce ai polimeri cristallini una maggiore rigidità (modulo elastico più elevato) e durezza, che comporta una maggiore resistenza meccanica, all'usura, e a fenomeni viscoelastici quali rilassamento e *creep*.

1.3.3 Peso molecolare

Nel caso dei polimeri, il peso molecolare di una molecola (M) è costituito dal peso molecolare del monomero moltiplicato per il grado di polimerizzazione (n). 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 polimerica contiene macromolecole di diversa lunghezza, il cui grado di polimerizzazione, e quindi il peso molecolare, non è uguale per tutte. In genere, il peso molecolare di una massa di polimero è rappresentabile con la curva a campana in Figura 1.15.

Risulta pertanto indispensabile analizzare statisticamente la determinazione del peso molecolare, individuando valori medi e funzioni che lo caratterizzino e ne descrivano adeguatamente la distribuzione: il grado di polimerizzazione medio, ad esempio, viene ottenuto dividendo il numero totale di molecole di un monomero per il numero totale di macromolecole.

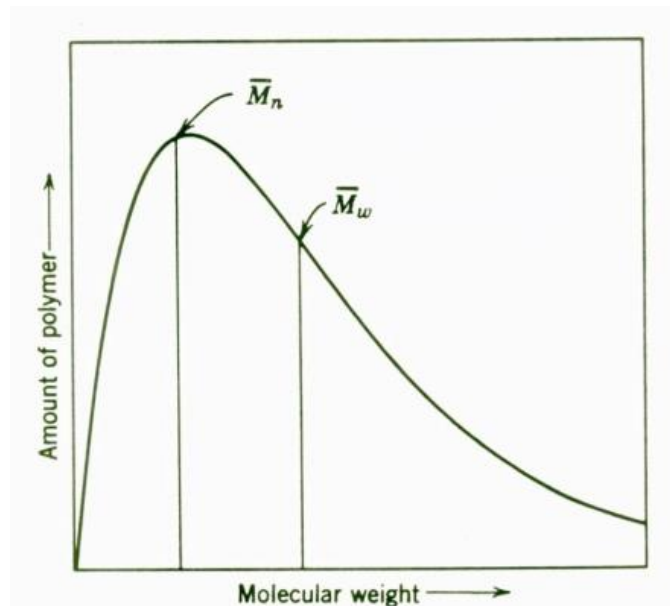


Figura 1.15. Distribuzione dei pesi molecolari all'interno di un polimero.

Vengono inoltre definiti due pesi molecolari medi:

- il peso molecolare medio numerale, M_n , che esprime la media numerica dei pesi molecolari, e viene definito come il rapporto tra il peso di una quantità nota di polimero ed il numero di macromolecole contenute in esso:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^n N_i M_i}{\sum_{i=1}^n N_i},$$

dove N_i rappresenta il numero di molecole di peso molecolare M_i ;

- il peso molecolare medio ponderale, M_w , che indica la media pesata sulla massa delle macromolecole:

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^n W_i M_i}{\sum_{i=1}^n W_i} = \frac{\sum_{i=1}^n N_i M_i^2}{\sum_{i=1}^n N_i M_i},$$

dove W_i indica il peso delle molecole di peso molecolare M_i . In tutti i casi, si ha che $M_n < M_w$.

Il rapporto:

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

è chiamato indice di polidispersità, ed è legato alla larghezza della distribuzione dei pesi molecolari. Nel caso in cui il polimero sia costituito esclusivamente da molecole

di ugual peso molecolare, allora $M_n = M_w$, e si dice che il polimero è monodisperso ($D=1$). Nella pratica, per i polimeri sintetici il limite inferiore della polidispersità difficilmente arriva ad 1, ma solitamente è compreso tra 1 e 3.

Il peso molecolare influenza alcune proprietà fisiche e meccaniche del polimero: in generale, infatti, le proprietà meccaniche aumentano linearmente all'aumentare del peso molecolare e raggiungono un valore di plateau in corrispondenza di alti pesi molecolari.

Nelle applicazioni biomediche sono richiesti sia un alto peso molecolare sia una relativamente stretta distribuzione (valori di D relativamente bassi).

1.3.4 Proprietà termiche

I polimeri possono essere classificati sulla base delle loro proprietà termomeccaniche in:

- termoplastici: se riscaldati rammolliscono senza andare incontro a trasformazioni chimiche, permettendo il modellamento plastico, e si induriscono in seguito ad un successivo raffreddamento. Tale processo è reversibile all'interno di un certo range di temperature. Il comportamento termoplastico è tipico dei polimeri a catena lineare e ramificata, perché i legami che li caratterizzano sono legami a bassa resistenza termica;
- termoindurenti: oltre un certo stadio del loro processamento non sono più modellabili, e anzi è proprio il calore che ne determina un indurimento irreversibile. Ciò avviene perché durante la lavorazione avviene una reticolazione della massa polimerica a causa del calore applicato. Sono generalmente termoindurenti i polimeri a catena reticolata.

Analizzando l'andamento delle proprietà meccaniche, ed in particolare del modulo elastico, in funzione della temperatura, è possibile notare transizioni e comportamenti diversi a seconda che il polimero sia amorfo, semicristallino o reticolato, in corrispondenza di alcune temperature caratteristiche (Figura 1.16).

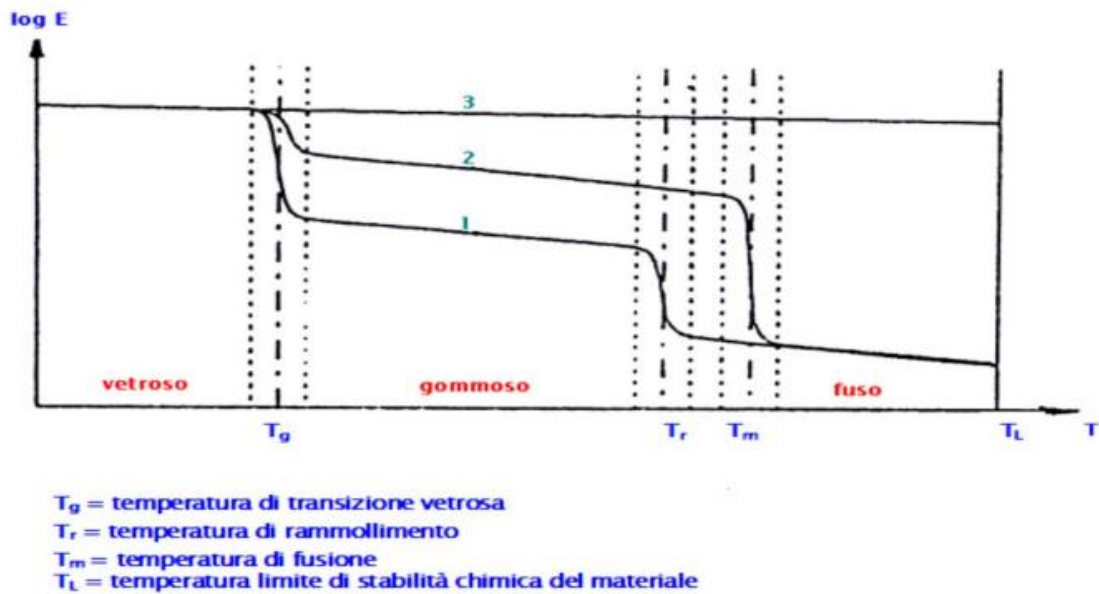


Figura 1.16. Andamento del modulo elastico in funzione della temperatura per un polimero lineare amorfo (1) , parzialmente cristallino (2) e reticolato (3).

Nel caso in cui il materiale sia amorfo, si osservano tratti orizzontali alternati a brusche cadute delle proprietà meccaniche in corrispondenza della temperatura di transizione vetrosa (T_g), che segna il passaggio attraverso cui il materiale da vetroso (fragile e difficilmente deformabile) diventa gommoso (minore rigidità ed elevate deformabilità e tenacità), e della temperatura di rammollimento (T_r), la quale divide il campo di proprietà di un polimero gommoso da quello di un polimero fuso liquido. Al superamento di queste due temperature si verificano rispettivamente una prima rottura dei legami amorfi, ed in seguito una seconda completa rottura dei legami deboli della struttura. Infine, oltre la temperatura limite di stabilità chimica (T_L), il polimero si degrada in seguito alla rottura dei legami chimici.

Nel caso di un materiale polimerico parzialmente cristallino la transizione vetrosa modifica in misura minore il valore di modulo elastico, che invece diminuisce sensibilmente nel momento in cui il reticolo cristallino inizia a fondere, cioè in corrispondenza della temperatura di fusione (T_m), analoga alla T_r per i polimeri cristallini. Nel caso infine di un polimero reticolato non si verificano significative variazioni di proprietà con la temperatura, fino al raggiungimento del limite di stabilità chimica (T_L). In questo ultimo caso non è possibile definire né una T_g né una T_m .

La temperatura di transizione vetrosa è un dato di grande interesse tecnologico e applicativo: come indicato in Figura 1.16, infatti, il suo valore incide notevolmente sul

comportamento meccanico e, quindi, sul campo di applicazione finale di un polimero. In particolare, polimeri con T_g inferiore a temperatura ambiente sono caratterizzati da una maggiore mobilità delle catene macromolecolari, che macroscopicamente si traduce in una modesta rigidità, risultando così tenaci e capaci di sopportare elevate deformazioni. Polimeri con T_g superiore a temperatura ambiente saranno invece vetrosi, cioè caratterizzati da una scarsa mobilità delle catene, quindi più rigidi, fragili e difficilmente deformabili. In genere, dunque, a seconda delle proprietà meccaniche richieste, occorrerà conoscere lo stato del materiale alla temperatura di esercizio. In particolare, nel caso di materiali polimerici da impiantare nel corpo umano, è indispensabile verificare preventivamente se a 37°C avvengono transizioni termiche quali la transizione vetrosa o addirittura la fusione.

1.3.5 Strategie sintetiche

I principali meccanismi di polimerizzazione sono essenzialmente due:

- poliaddizione: si tratta di una reazione a catena in cui le macromolecole si generano per unione diretta dei monomeri di partenza, caratterizzati da bifunzionalità interdipendente, tipica dei composti insaturi, senza la liberazione di molecole secondarie. Di conseguenza, la formula chimica del monomero e quella delle unità strutturali del polimero ottenuto risultano essere identiche. Nei polimeri di addizione il peso medio molecolare può raggiungere valori anche molto elevati.

Il processo di poliaddizione può essere suddiviso in quattro fasi distinte:

- fase di inizio, che avviene per mezzo del calore, della luce o di una sostanza chimica appositamente aggiunta al monomero, chiamata iniziatore, che può essere un radicale libero (polimerizzazione radicalica), un carbocatione (polimerizzazione cationica), oppure un carboanione (polimerizzazione anionica). Le molecole di iniziatore diventano attive ed iniziano a loro volta ad attivare le molecole di monomero;
- fase di propagazione, in cui si verifica l'accrescimento delle macromolecole;

- fase di terminazione, in cui termina la crescita delle macromolecole, per accoppiamento fra catene in accrescimento, o fra una catena e un radicale libero, oppure per disproporzionamento, cioè quando due catene attive e in accrescimento si incontrano e si inattivano reciprocamente, per esempio grazie allo scambio di un idrogeno;
 - trasferimento di catena, in cui una molecola in crescita può disattivare o arrestare il suo accrescimento attivando una molecola di monomero o di una catena che già si era chiusa.
- policondensazione: attraverso questo processo di polimerizzazione, a differenza di quanto avviene nella poliaddizione, si ottengono dei prodotti secondari, ovvero molecole di piccole dimensioni quali acqua, metanolo, cloruro di sodio o acido cloridrico (Figura 1.17). Le unità strutturali del polimero finale presentano perciò una formula chimica diversa da quella dei monomeri di partenza. Solitamente questo processo è piuttosto lento e tende ad interrompersi prima che le catene abbiano raggiunto dimensioni particolarmente elevate; per questo motivo i pesi molecolari dei policondensati sono solitamente minori rispetto a quelli dei polimeri ottenuti per poliaddizione. I monomeri di partenza impiegati presentano una simile reattività, per cui non esistono componenti attivate che agiscono preferenzialmente sulle altre. Quando le molecole di monomero che reagiscono tra loro presentano due soli gruppi funzionali, la reazione prende il nome di policondensazione bifunzionale e le macromolecole si accrescono linearmente. Quando almeno uno dei monomeri presenta più di due gruppi funzionali la reazione prende il nome di policondensazione polifunzionale e si può quindi avere la formazione di polimeri reticolati.

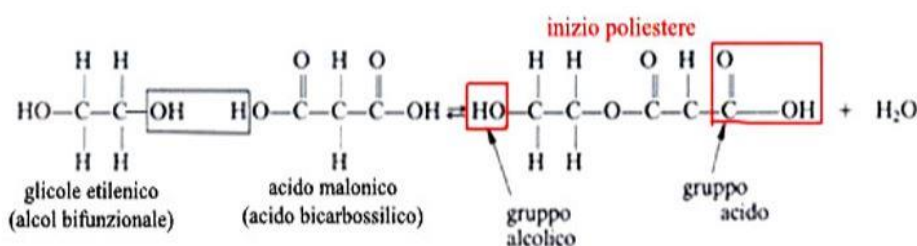


Figura 1.17. Esempio di reazione di policondensazione.

1.3.6 Processi di degradazione

La degradazione di un materiale polimerico consiste nell'alterazione chimica della sua struttura, dovuta alla rottura dei legami chimici sia della catena principale sia dei gruppi laterali, che incide anche sulle caratteristiche fisiche. Nel caso di impianti in materiale polimerico, tale processo può essere artificialmente indotto ad un tempo specifico dopo l'inserimento dell'impianto, oppure può innescarsi fin da subito, non appena il materiale entra in contatto con i fluidi corporei. Una delle principali conseguenze del processo di degradazione è la diminuzione del peso molecolare, con conseguente peggioramento delle proprietà meccaniche del materiale. In generale, i principali effetti responsabili della degradazione possono essere suddivisi in:

- effetti chimici: possono verificarsi rotture casuali delle catene che provocano depolimerizzazione tramite un processo praticamente inverso rispetto a quello di polimerizzazione. Si generano prodotti secondari che potrebbero, in alcuni casi, essere dannosi per l'organismo;
- effetti della sterilizzazione: la sterilizzazione è un processo indispensabile per inattivare i microrganismi e dunque evitare eventuali infezioni in seguito all'impianto di un dispositivo. A seconda del tipo di procedura si possono raggiungere temperature anche molto elevate (160 – 190 °C nel caso di sterilizzazione a secco, 120 – 135 °C nel caso di sterilizzazione umida in autoclave) a volte superiori alle temperature di rammollimento dei polimeri. La sterilizzazione a secco è perciò possibile solo per materiali resistenti alle alte temperature come il politetrafluoroetilene o le gomme siliconiche. Per polimeri più bassofondenti, è invece previsto l'uso di agenti chimici quali gas o soluzioni a bassa temperatura: questo metodo richiede tempi maggiori ed è più costoso, ma abbassa notevolmente i rischi di degradazione. Per quanto riguarda la sterilizzazione mediante radiazioni gamma, essa può degradare i polimeri, in quanto la radiazione può provocare la rottura delle catene e la loro successiva ricombinazione casuale;
- effetti meccanochimici: i polimeri possono deteriorarsi o degradarsi se sottoposti a carichi, sia statici che ciclici, con il conseguente rilascio di residui

ad elevato rapporto superficie/volume, che innescano a loro volta ulteriori processi degradativi;

- effetti dell'ambiente biologico: l'ambiente biologico è estremamente aggressivo nei confronti di ogni tipo di corpo estraneo, tanto che alcuni dispositivi, tra cui anche i polimeri, iniziano a deteriorarsi non appena impiantati. La più probabile causa di deterioramento è l'attacco ionico (in particolare dello ione OH^-) e dell'ossigeno disciolto. Oltre alla biodegradazione ossidativa, è possibile che avvengano processi di degradazione idrolitica ed enzimatica.

Per quanto riguarda invece i meccanismi attraverso cui ha luogo la degradazione, essi variano in base alla posizione dell'impianto all'interno dell'organismo, alla risposta immunitaria, alle condizioni dell'organismo ospite (età, livello di salute, eventuali farmaci assunti), e alle caratteristiche fisico-chimiche del materiale stesso. Le modalità di degradazione sono essenzialmente due: erosione in *bulk* (idrolitica) ed erosione superficiale (enzimatica) (figura 1.18). Esse differiscono in relazione alla porzione di campione interessata dal fenomeno: nel primo la perdita di massa riguarda l'intero volume, poiché la velocità di penetrazione dell'acqua è più rapida di quella del processo erosivo, mentre nel secondo solo le porzioni più superficiali, in quanto la velocità di penetrazione dell'acqua è simile a quella di erosione. I processi di erosione superficiale sono preferibili a quelli in *bulk*, poiché più facilmente controllabili, anche se non sempre possibili da ottenere in quanto molti polimeri non sono sufficientemente idrofobi da evitare che l'acqua penetri all'interno e degradi il materiale più velocemente di quanto vengano erosi gli strati superficiali.

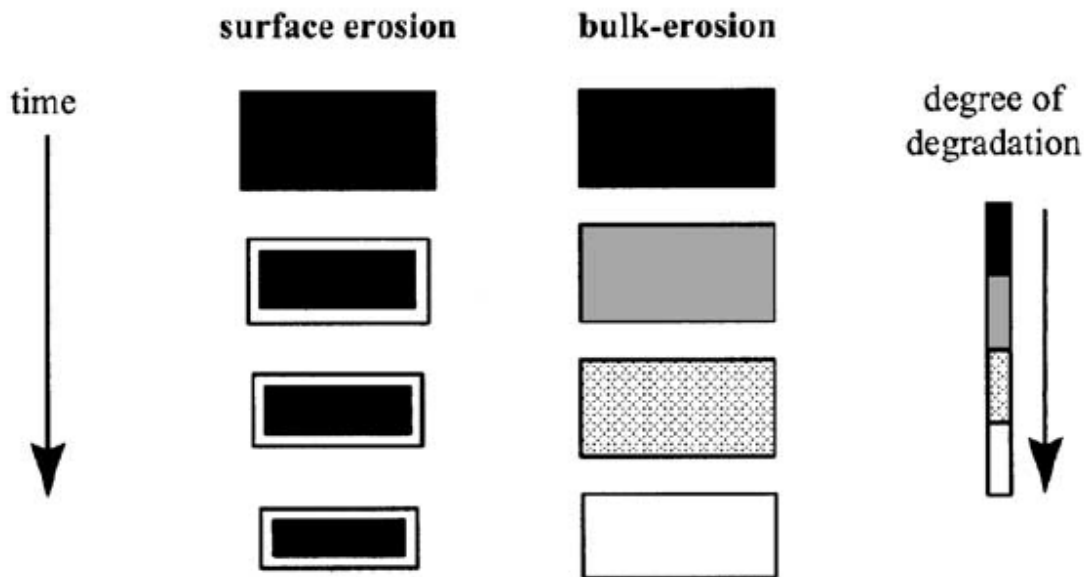


Figura 1.18. Meccanismi di degradazione superficiale e di bulk.

Un altro fattore che è opportuno tenere in considerazione è la velocità a cui la biodegradazione avviene: essa dipende, oltre che dal tipo di unità ripetitiva, composizione e lunghezza della sequenza, geometria, peso molecolare e area superficiale esposta, da quattro fattori fondamentali che incidono nel caso di degradazione sia idrolitica che enzimatica:

- T_m : ad elevate differenze tra la temperatura di esercizio e quella di fusione del materiale, corrisponde una minore biodegradabilità. Questa relazione è dovuta al fatto che in prossimità della T_m le catene polimeriche risultano più mobili e quindi più facilmente attaccabili. Analogamente, operando al di sopra della T_g la velocità di biodegradazione aumenta a causa della maggiore mobilità delle catene;
- Grado di cristallinità: polimeri più cristallini sono caratterizzati da minore velocità di biodegradazione, in quanto la porzione cristallina, dato l'elevato grado di ordine ed impacchettamento delle catene, risulta meno accessibile all'acqua;
- Grado di perfezione dei cristalli: a parità di grado di cristallinità, cristalliti piccoli, e contenenti difetti, vengono degradati più facilmente rispetto a strutture maggiormente impacchettate e pure;
- Idrofilicità: in presenza di superfici polimeriche più idrofiliche, e quindi più facilmente bagnabili, si verifica una più alta velocità di degradazione.

1.4 Poliesteri

I poliesteri sono polimeri contenente gruppi esterei nella catena principale, generalmente ottenuti per policondensazione di uno o più acidi organici polifunzionali con uno o più alcoli polifunzionali. In alternativa si possono ottenere tramite una reazione di transesterificazione: in questo caso i monomeri di partenza sono alcoli e gli esteri dei corrispondenti acidi.

In base alla presenza o meno di anelli aromatici nella catena, i poliesteri si distinguono in alifatici ed aromatici.

1.4.1 Poliesteri alifatici

I poliesteri alifatici, caratterizzati dalla presenza di legami esterei all'interno della loro catena macromolecolare e la cui struttura chimica è riportata in Figura 1.19, sono una delle classi di polimeri sintetici di maggior successo, importanza e diffusione commerciale. Sono facilmente biodegradabili e presentano buone proprietà di biocompatibilità, caratteristiche che li rendono particolarmente interessanti sia in campo ambientale che biomedico.

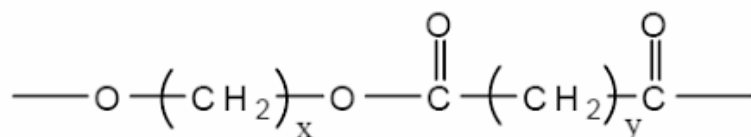


Figura 1.19. Struttura chimica di un generico poliestere alifatico.

I primi poliesteri alifatici sintetizzati erano caratterizzati da un basso peso molecolare e quindi da scarse proprietà meccaniche, per questo inizialmente vennero usati principalmente come plastificanti. Più recentemente, però, l'interesse verso i poliesteri è decisamente aumentato, grazie alla loro versatilità e modulabilità delle proprietà finali in relazione alle specifiche applicazioni. Nonostante, ad oggi, siano ancora presenti diverse problematiche, legate alla loro processabilità, stabilità, sia durante la lavorazione sia al momento dell'utilizzo, e prevedibilità in termini di velocità di degradazione, i poliesteri alifatici si sono rivelati ottimi candidati in ambito biomedicale, ad esempio per la realizzazione di suture biorassorbibili, di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci, protesi e *stent* vascolari e protesi per legamenti e tendini, grazie alle peculiari proprietà chimiche, fisiche, meccaniche, morfologiche e

biologiche che li caratterizzano e per la loro capacità di degradarsi in ambiente biologico senza causare reazioni dannose all'organismo ospite.

Esempi di questo tipo di materiali sono certamente l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA), il poli (ϵ - caprolattone) (PCL) ed i loro copolimeri [10], ed il poli(butilene succinato) (PBS), che verrà approfondito maggiormente in seguito, tutti approvati dalla *Food and Drug Administration*.

1.4.1.1 Poliesteri alifatici per uso biomedicale

- **Acido poliglicolico (PGA):** è un poliestere alifatico lineare ottenuto principalmente per policondensazione dell'acido glicolico oppure mediante apertura dell'anello del glicolide (Figura 1.20). L'acido poliglicolico è caratterizzato da un elevato grado di cristallinità (con densità dei cristalli pari a $1,69 \text{ g/cm}^3$), temperatura di transizione vetrosa compresa tra 35 e $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e punto di fusione tra 220 e 227°C ; la sua solubilità in solventi organici è piuttosto bassa mentre dal punto di vista meccanico è piuttosto rigido (modulo elastico uguale a 12.5 GPa). Il PGA è stato commercializzato fin dal 1970 ed applicato nel campo dell'ingegneria biomedica come materiale da sutura, vista la sua già allora nota biocompatibilità, ma anche per la preparazione di *scaffold* per la rigenerazione di ossa, cartilagini, tendini, denti, tratti intestinali, tessuto spinale e linfatico e, in accoppiamento ad altri materiali biodegradabili, come riempitivo. Tuttavia, il PGA mostra nel tempo una perdita di resistenza meccanica, se impiegato per applicazioni *in vivo*, a causa della sua elevata idrofilicità che velocizza il processo di bioerosione, ed il rilascio in grandi quantità di acido glicolico il quale, nonostante venga assorbito dalle cellule ed escreto per via urinaria, a lungo termine provoca gravi risposte infiammatorie nell'organismo ospite.

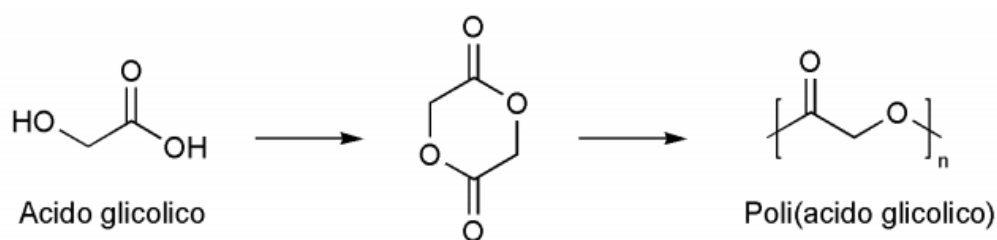


Figura 1.20. Schema di sintesi dell'acido poliglicolico.

- Acido polilattico (PLA):** è un poliesteri alifatico biodegradabile che può essere preparato sia mediante condensazione dell'acido lattico sia mediante l'apertura dell'anello del dimero dell'acido lattico, il lattide, che viene purificato e polimerizzato ad acido polilattico senza bisogno di solventi (Figura 1.21). Il gruppo laterale metilico presente nella struttura del PLA lo rende più idrofobico e più resistente all'idrolisi rispetto al PGA. L'acido polilattico è una molecola che presenta una struttura chirale e si presenta sotto forma di due isomeri L e D, per cui con "acido polilattico" si indicano quattro diversi polimeri: acido poli-L-lattico (PLLA), acido poli-D-lattico (PDLA), acido poli-D,L-lattico (PDLLA, copolimero dei primi due) e acido meso-polilattico. Di questi, solo il PLLA e il PDLLA trovano applicazione in ambito biomedico. Le proprietà variano a seconda dell'isomeria: il PDLLA 50:50, caratterizzato da una distribuzione random di unità L e D, è amorfo, con basso carico a rottura, elevata deformabilità e tempi di degradazione relativamente brevi, mentre il PLLA, semicristallino (le cui T_m e T_g sono comprese rispettivamente tra 175 e 178° C e tra 60 e 65° C), è caratterizzato da buona resistenza a trazione e compressione, bassa deformazione a rottura e modulo elastico tale da renderlo adatto per applicazioni che richiedono resistenza ai carichi. Venne studiato per la prima volta come possibile materiale per il rilascio controllato di farmaci nel 1971, anche grazie alle sue eccellenti proprietà di biodegradabilità e biocompatibilità. Tali proprietà ne hanno sancito un più ampio utilizzo in sistemi in ingegneria tissutale, come materiale per suture, fissaggio ortopedico e fabbricazione di *scaffold* per la rigenerazione di ossa, cartilagini e tendini.

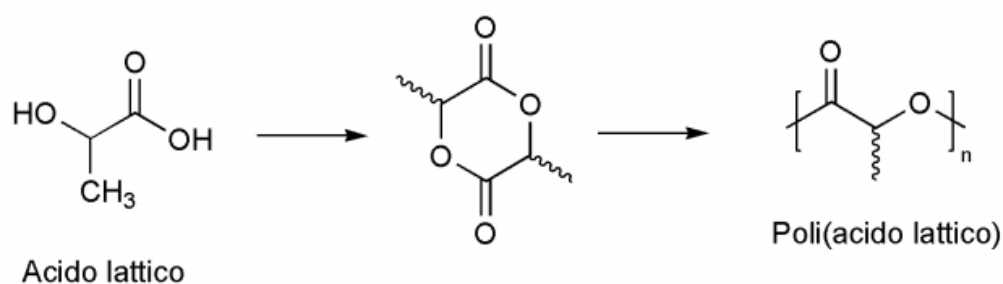


Figura 1.21. Schema di sintesi dell'acido polilattico.

- Poli (ϵ - caprolattone) (PCL):** è un polimero semicristallino, ottenuto tramite la rottura dell'anello del monomero ciclico ϵ -caprolattone (Figura 1.22), la cui lunga

catena principale alifatica impartisce al materiale alcune proprietà non comuni ad altri poliesteri alifatici, come una temperatura di transizione vetrosa estremamente bassa (circa $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$), una bassa temperatura di fusione (tra 59 e $64\text{ }^{\circ}\text{C}$), un'alta solubilità in solventi organici, una notevole stabilità termica e la capacità di formare miscele monofasiche con diversi materiali polimerici. Dal punto di vista meccanico, con un modulo elastico di circa 23 MPa ed un allungamento a rottura del 4700% , il PCL risulta particolarmente adatto per la realizzazione di *scaffold* impiegati per la rigenerazione di ossa, legamenti, cartilagini, pelle, tessuto vascolare e nervoso. Viene inoltre ampiamente utilizzato per lo sviluppo di sistemi di somministrazione di farmaci a lungo termine (a tale scopo risulta estremamente idoneo per via dei suoi lunghi tempi di degradazione, in genere di due anni).

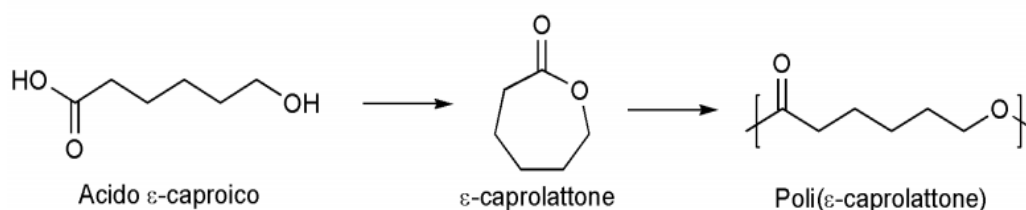


Figura 1.22. Schema di sintesi del poli(ϵ – caprolattone).

- **Acido polilattico-co-glicolico (PLGA):** l'acido poli(lattico-co-glicolico) è un copolimero statistico ottenuto dalla copolimerizzazione tra le unità strutturali dell'acido lattico e dell'acido glicolico (Figura 1.23). È un materiale biocompatibile e biodegradabile, con proprietà modulabili in funzione del rapporto tra i due tipi di monomeri costituenti, molto diversi tra loro: tendenzialmente, aumentando la quantità di acido lattico si ottengono migliori proprietà meccaniche a fronte di un rallentamento della velocità di degradazione. Per questo motivo, e grazie alla sua biocompatibilità il PLGA viene largamente utilizzato sia per la fabbricazione di suture, aggraffaggi e impianti, sia per la realizzazione di *scaffold* per la rigenerazione tissutale e di particelle biodegradabili per il *drug delivery* [11].

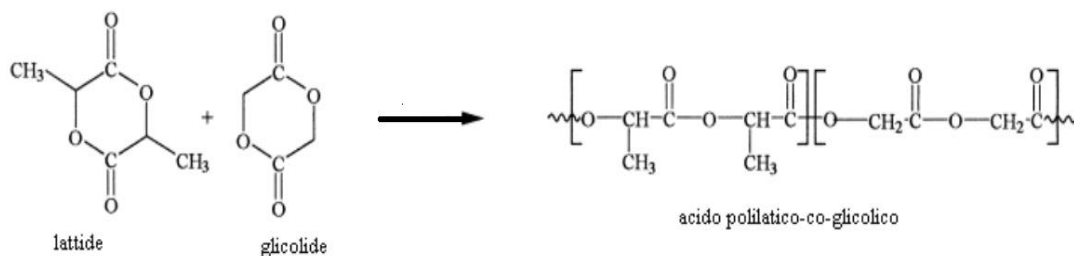


Figura 1.23. Schema di sintesi dell'acido polilattico-co-glicolico.

1.4.1.2 Poli(butilene succinato)

Il poli(butilene succinato) (PBS) è un poliesteri alifatico ottenuto a partire da acido succinico (SA), oppure dal suo estere dimetilico, il dimetilsuccinato (DMS) e da 1,4-butandiolo (BD), mediante policondensazione in massa a due stadi (Figura 1.24): durante il primo stadio hanno luogo le reazioni di esterificazione (o transesterificazione nel caso si utilizzi DMS) con formazione di oligomeri a basso peso molecolare e rimozione di acqua (o metanolo), mentre il secondo, condotto a temperatura più elevata e in condizioni di pressione ridotta, ha lo scopo di rimuovere il BD in eccesso (generalmente si usa un eccesso di glicole del 10-20% circa) e di favorire ulteriormente le reazioni di transesterificazione, così da ottenere PBS ad alto peso molecolare. La reazione viene condotta in presenza di un catalizzatore, solitamente a base di titanio, come ad esempio il titanio (IV) butossido (TBT) [12].

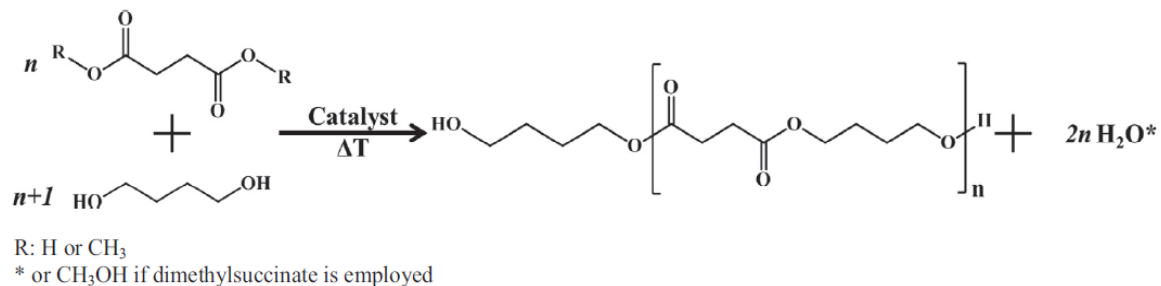


Figura 1.24. Schema di reazione della sintesi del PBS.

Il successo di questo polimero è strettamente legato ad alcune sue caratteristiche, quali il moderato costo di produzione, la semplice procedura di sintesi, già impiegata a livello industriale, la possibilità di ottenerlo a partire da fonti 100% rinnovabili, oltre che alle sue ottime proprietà. Infatti, il PBS è un polimero semicristallino (grado di cristallinità intorno al 35-45%), ad alta capacità di cristallizzazione, con una temperatura di fusione fra le più alte tra i poliesteri alifatici. La temperatura di transizione vetrosa è ben al di sotto della temperatura ambiente, pertanto il PBS possiede un'ampia finestra di lavorabilità che ne consente la lavorazione mediante estrusione, stampaggio a iniezione e termoformatura. Per quanto riguarda le proprietà meccaniche, il PBS è caratterizzato da elevata rigidità (modulo elastico intorno ai 300-500 MPa) e fragilità (allungamenti a rottura inferiori al 5%), le quali possono essere notevolmente migliorate inserendo in fase di sintesi piccole quantità di diisocianati, tipicamente esametilene diisocianato, usate come estensori di catena. Infine, il poli(butilene succinato) è caratterizzato da una comprovata biodegradabilità e biocompatibilità, caratteristiche di fondamentale importanza per applicazioni in ambito biomedicale. Per quanto riguarda l'aspetto della biocompatibilità, sono state condotte numerose ricerche, sia in vitro, mediante prove di citotossicità diretta e indiretta utilizzando linee cellulari umane (cellule staminali, fibroblasti, osteoblasti, condrociti, splenociti, cardiomiociti), sia in vivo, attraverso l'impianto in piccoli roditori, le quali hanno dato esiti positivi.

Tra i principali svantaggi del PBS è opportuno menzionare una velocità di idrolisi piuttosto bassa e una bassa flessibilità, che potrebbero ostacolare l'utilizzo in determinate applicazioni, quali ad esempio l'ingegneria tissutale dei tessuti molli. Per migliorare questi aspetti, si può procedere con tecniche di miscelazione fisica o copolimerizzazione, attraverso cui è possibile modulare e migliorare proprietà come la bagnabilità, il grado di cristallinità, le proprietà meccaniche e la velocità

biodegradazione, agendo sull'architettura molecolare e sulla natura della co-unità o dell'altro materiale componente la blend. L'applicazione biomedica più studiata dei copolimeri [13, 14] e delle blend a base di PBS è l'ingegneria tessutale, in cui questi materiali sono impiegati sia sotto forma di film sia come *scaffold*, ottenuti mediante elettrofilatura o estrusione. Un'altra applicazione è nell'ambito del rilascio controllato di farmaci, come materiali per la realizzazione di micro e nanosfere.

1.5 Polimeri di origine naturale

I polimeri di origine naturale sono, a differenza dei polimeri prodotti per via sintetica, macromolecole prodotte da organismi viventi, animali o vegetali, a partire da materie prime biologiche. Essi possono essere suddivisi in tre classi distinte sulla base delle unità monomeriche costituenti:

- polinucleotidi: lunghe macromolecole costituite da monomeri nucleotidici;
- polipeptidi e proteine: polimeri costituiti da unità amminoacidiche;
- polisaccaridi: strutture formate da sequenze di carboidrati legate tra loro per formare catene prevalentemente lineari.

Come già accennato, il vantaggio principale nell'uso di polimeri naturali rispetto a quelli di origine sintetica è senza dubbio la loro biocompatibilità, legata alla presenza di opportune sequenze che favoriscono il riconoscimento e l'adesione cellulare. Inoltre, i prodotti della loro degradazione non sono tossici per l'organismo. Mediante opportuni processi di reticolazione è anche possibile modularne la velocità di degradazione in relazione all'applicazione desiderata. Infine, se utilizzati a contatto con molecole bioattive, non ne alterano la loro bioattività. Tuttavia, i polimeri di origine animale sono facilmente soggetti a contaminazione batterica e richiedono diversi processi di purificazione e decellularizzazione prima del loro impiego, al fine di eliminare eventuali agenti patogeni e cellule che potrebbero innescare risposte immunitarie avverse all'interno dell'organismo ospite. Tali processi, particolarmente aggressivi, potrebbero alterare e persino denaturare le caratteristiche del materiale stesso. Un altro svantaggio che è opportuno tenere presente è la disomogeneità delle loro proprietà fisiche e meccaniche, legate al tipo di organismo da cui vengono estratte e, nel caso di polimeri di origine animale, anche dal tipo di tessuto di provenienza.

Per quanto riguarda i principali impieghi nel settore biomedicale, questi materiali vengono utilizzati nel rilascio controllato di farmaci, come materiali per la realizzazione di biosensori, di fibre per la cura delle ferite, di *scaffold* per l'ingegneria tissutale, agenti gelificanti, emulsionanti.

Tra i principali esempi di polimeri naturali figurano la cellulosa, il più abbondante polimero di origine naturale presente in natura, seguita dalla chitina, il principale componente strutturale dell'esoscheletro degli invertebrati, il DNA e l'RNA, fondamentali nella genetica e nei processi vitali, e le proteine, essenziali per il controllo delle cellule viventi. Queste ultime, in particolare, si sono rivelate ottime candidate per le suddette applicazioni, in quanto, fungendo da matrice extracellulare, favoriscono i processi di adesione tra cellule e di interazione tra cellule e matrice. La loro struttura tridimensionale, inoltre, costituisce un substrato ideale per la proliferazione e la rigenerazione tissutale. Esempi di questa classe di polimeri sono il collagene, l'elastina, l'albumina, la gelatina, la fibroina e la cheratina, quest'ultima oggetto del presente lavoro di Tesi.

1.5.1 Cheratina

La cheratina è una proteina strutturale insolubile, che costituisce la componente principale di capelli (Figura 1.25), lana, piume, corna e unghie di mammiferi, rettili e uccelli, e può essere estratta da materie facilmente reperibili e a basso costo, come ad esempio la lana non adatta alla filatura e i suoi sottoprodotti dell'industria tessile, oppure le piume provenienti da scarti di macelleria.

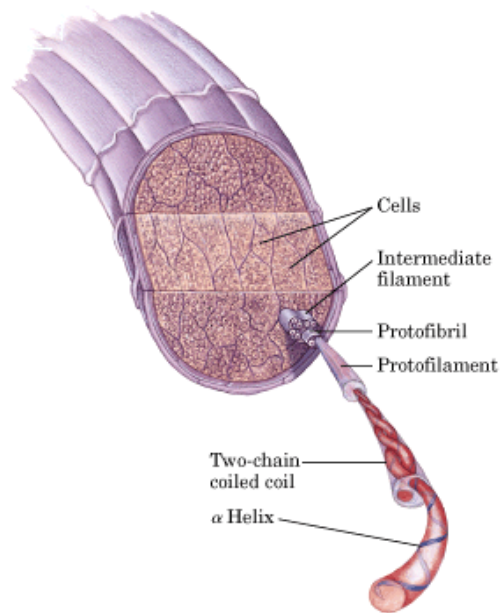


Figura 1.25. Sezione trasversale del capello.

A livello molecolare la cheratina presenta una struttura primaria data da una catena polipeptidica elicoidale, costituita dalla ripetizione di 18 tipi di amminoacidi diversi (tra cui cistina e cisteina, serina, glutammina, glicina, arginina, asparagina, prolina, valina, leucina e isoleucina), di lunghezza intorno ai 450Å, mentre a livello di struttura secondaria si possono avere tre diverse configurazioni:

- **α-cheratina:** costituita da α-eliche intrecciate fra loro e ricca di amminoacidi solforati tra cui la cisteina (Figura 1.26). Risulta neutra o lievemente basica. Le α-eliche si assemblano tra loro per formare strutture complesse dette protofilamenti. I protofilamenti si associano a loro volta per formare la protofibrilla. Le catene polipeptidiche sono legate tra loro prevalentemente attraverso ponti disolfuro, che stabilizzano la struttura quaternaria.

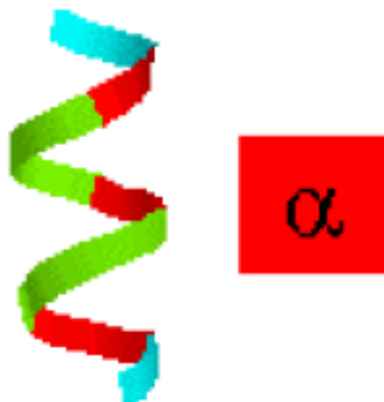


Figura 1.26. Struttura ad α-elica della cheratina.

- **β -cheratina:** lievemente acida, presenta una struttura a foglietto β (Figura 1.27) piatto e leggermente pieghettato; anche in questo caso è presente una struttura quaternaria con diverse sub-unità che si associano e sono stabilizzate dalla formazione dei ponti disolfuro.

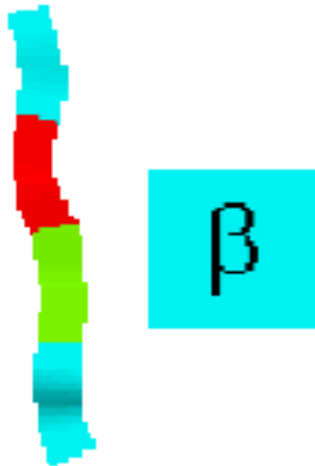


Figura 1.27. Struttura a β -foglietto della cheratina.

- **Random coil:** struttura disordinata.

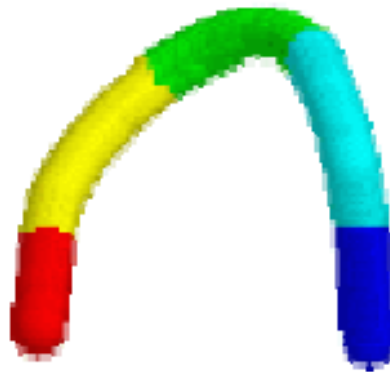


Figura 1.28. Struttura random coil della cheratina.

Un'ulteriore classificazione può essere effettuata in base alla consistenza: si parla di cheratina molle o dura, sempre in relazione alla sequenza amminoacidica costituente, che ne determina diverse proprietà, soprattutto per quanto riguarda la resistenza all'acqua e al calore.

I primi utilizzi della cheratina in ambito medico risalgono al XVI secolo, quando in Cina, una cenere ottenuta da capelli pirolizzati venne utilizzata per accelerare il processo di guarigione di ferite e per la coagulazione del sangue [15]. Il crescente interesse nei confronti di questa proteina portò nei secoli successivi a notevoli sviluppi nei processi di estrazione (da corna di animali, lana e capelli), sia di tipo ossidativo che riduttivo, fino a quando, nei primi anni del '900, la cheratina trovò impiego come polvere per la realizzazione di cosmetici, materiali compositi e rivestimenti di farmaci. Ulteriori sviluppi nei processi di estrazione, separazione e caratterizzazione portarono, per tutta la durata del '900, ad una crescita esponenziale dell'utilizzo di questa proteina e dei suoi derivati, in forma di polveri, gel, film, *coating*, fibre e schiume anche per applicazioni biomedicali grazie, come già detto, alla loro capacità di autoassemblarsi in strutture tridimensionali porose e fibrose, ed alle ottime proprietà emostatiche e di supporto alla proliferazione cellulare: in particolare, la cheratina proveniente dalla lana e dai capelli possiede delle sequenze di leucina-acido aspartico-valina (LDV) e acido glutammico-acido aspartico-serina (EDS) in grado di favorire l'adesione cellulare [16, 17]. Inoltre, si ritiene che la cheratina possa prendere parte a funzioni regolatorie che mediano il comportamento cellulare; pertanto, è possibile preservare l'attività biologica all'interno del tessuto rigenerato su biomateriali cheratinici.

Tuttavia, a causa della sua eccessiva fragilità, che ne limita fortemente la lavorabilità, e della troppo rapida degradazione *in vivo* (la cheratina degrada in ambiente fisiologico in meno di una settimana, tempo insufficiente per il processo di rigenerazione tissutale) la cheratina è stata mescolata con altri polimeri, sia di origine naturale che sintetica, al fine di ottimizzarne e modularne le proprietà, mantenendone allo stesso tempo l'eccellente biocompatibilità [18, 19]. Ad esempio, mediante la combinazione con glicerolo, è stato possibile ottenere film flessibili, biocompatibili e biodegradabili. L'aggiunta di chitosano, invece, ha permesso di ottenere film resistenti dalle elevate proprietà antibatteriche. Per quanto riguarda la combinazione con polimeri di origine sintetica, sono stati realizzati film a base di una blend tra cheratina e poli(etilen ossido) (PEO): la presenza di PEO ha permesso di stabilizzare la struttura β della cheratina, rendendo così possibile la realizzazione di scaffold per la crescita cellulare ed il trattamento di ferite, oltre che membrane a rilascio controllato di farmaci [20]. La cheratina è stata inoltre studiata con successo in combinazione con il PLA al fine di migliorare l'adesione cellulare su quest'ultimo [21];

altre blend a base di cheratina, acido polilattico e chitosano sono state invece proposte in forma di membrane dalle migliorate proprietà meccaniche per il supporto e la proliferazione cellulare [22]. Un altro poliestere alifatico utilizzato per realizzare blend a base di cheratina è il poli(ϵ -caprolattone), per la realizzazione di scaffold elettrofilati per la rigenerazione tissutale [23].

Alla luce di queste promettenti ricerche, nel presente lavoro di Tesi verrà studiata una blend di cheratina ed un altro poliestere alifatico biocompatibile, il poli(butilene succinato).

CAPITOLO 2: SCOPO

L'ingegneria tissutale rappresenta a tutt'oggi una delle sfide di ricerca più importanti in ambito medico-ingegneristico. Questa disciplina si pone come obiettivo di far fronte alla mancanza, sostituzione o riparazione di tessuto attraverso lo sviluppo di scaffolds opportunamente ottimizzati. Come trattato nel capitolo introduttivo, i polimeri naturali rappresentano una classe di materiali particolarmente indicata per soddisfare i requisiti richiesti soprattutto per la biocompatibilità che spesso li caratterizza. La cheratina è uno dei materiali che si presta alla realizzazione di scaffolds innovativi ad altissima biocompatibilità nonostante le scarse proprietà meccaniche, in particolare elevata fragilità, e la eccessiva velocità di degradazione. La preparazione di *blend* di cheratina con altri polimeri di tipo sintetico rappresenta una strategia vincente per migliorarne le prestazioni non soddisfacenti, senza andare a detrimento di quelle buone.

Tra i nuovi materiali di sintesi proposti per uso biomedico, quelli di natura polimerica si stanno imponendo in modo significativo 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.

Lo scopo di questo lavoro di Tesi, svolto presso i laboratori del Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali dell'Università di Bologna e

presso il laboratorio di *Electrospinning Gene-Assembler* del CNR di Bologna, è la progettazione, lo sviluppo e la caratterizzazione di un scaffold polimerico poroso a base di cheratina e poli(butilene succinato) per applicazioni nell'ambito dell'ingegneria tissutale.

Il progetto ha previsto una prima fase di ricerca bibliografica che ha permesso di conoscere lo stato dell'arte sull'argomento trattato. A valle, si è proceduto alla sintesi mediante l'usuale procedura di policondensazione in massa a due stadi del poli(butilene succinato) (PBS), che previo utilizzo è stato caratterizzato dal punto di vista molecolare, termico e meccanico. E' stata quindi preparato un blend 50% in peso di cheratina e PBS. Si è potuto così procedere alla realizzazione degli scaffolds della miscela e del PBS puro, quest'ultimo fabbricato per necessità di confronto, e a una prima loro caratterizzazione di carattere chimico-fisico e morfologico. A questo punto, sono state effettuate le caratterizzazioni meccaniche, gli studi di degradazione enzimatica e le prove di adesione e proliferazione cellulare. In ultimo, sono stati analizzati e rielaborati tutti i risultati.

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

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 e presso il laboratorio di *Electrospinning Gene-Assembler* del CNR di Bologna.

3.1 Sintesi di poli(butilene succinato) (PBS) ad alto peso molecolare

Il poli(butilene succinato) è stato realizzato a partire da due reagenti: 1,4-butandiolo (BD), e il DBE, estere dell'acido succinico (Figura 3.1).

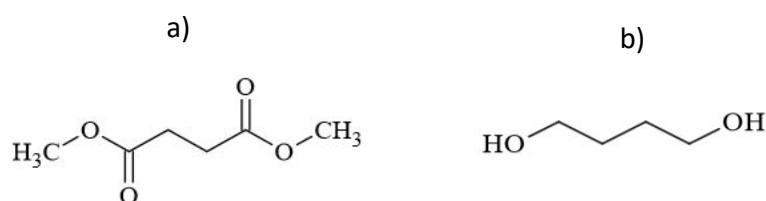


Figura 3.1. Struttura del dimetil succinato (a) e dell'1,4-butandiolo (b).

Si è proceduto lavorando con un leggero eccesso molare di glicole, circa il 20%. Inoltre, per accelerare la reazione, è stato utilizzato un catalizzatore, il titanio(IV)tetrabutossido ($\text{Ti}(\text{OBu})_4$ o TBT), in quantità pari a 400 ppm/grammo di polimero teoricamente ottenibile.

Per svolgere la sintesi è stata utilizzata un'apparecchiatura costituita da un reattore in vetro a tre colli, immerso in un bagno di sali inorganici, il quale ha la funzione di mantenere costante ed uniforme la temperatura del sistema (Figura 3.2). Tramite un albero motore collegato ad una pala, i reagenti vengono agitati a velocità costante. Sulla pala sono posti degli estensimetri per la misura del momento torcente della pala, il quale aumenta all'aumentare della viscosità del fluido, che a sua volta è direttamente proporzionale al peso molecolare del polimero.

La sintesi, condotta in fuso, consta di due fasi: durante la prima, condotta a 190 °C, con flusso controllato di azoto e agitazione di 100 giri al minuto (rpm), avvengono le reazioni di transesterificazione diretta, con eliminazione di specie a basso peso

molecolare, in questo caso metanolo, quest'ultimo raccolto in un'apposta trappola collegata al sistema. La produzione di metanolo (CH_3OH) è dovuta all'unione di due unità ripetitive in corrispondenza delle loro estremità: una catena perde un gruppo -OH, mentre l'altra perde un gruppo CH_3 .

Durante la seconda fase, che ha inizio quando almeno il 90% del metanolo teorico viene distillato, avvengono le reazioni di transesterificazione tra gli oligomeri ottenuti precedentemente per ottenere un polimero dall'elevato peso molecolare. All'inizio di questo step la temperatura viene aumentata gradualmente ogni 30 minuti di 10°C , fino ad un massimo di 230°C , mentre la pressione del reattore viene ridotta tramite una pompa da vuoto fino ad un massimo di 0,09 mbar, allo scopo di eliminare l'eccesso di glicole e spostare dunque l'equilibrio di reazione verso i prodotti. Per impedire che le sostanze volatili prodotte entrino nella pompa, danneggiandola, si inserisce una seconda trappola immersa in azoto liquido, contenuto in un apposito dewar.

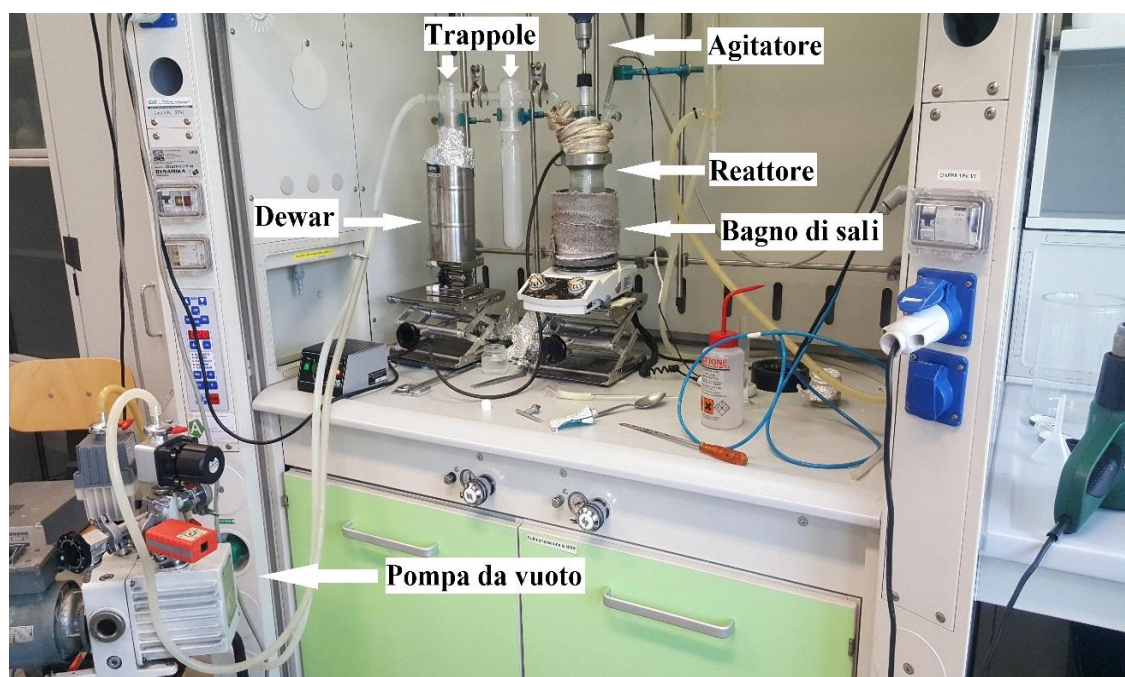


Figura 3.2. Strumentazione utilizzata per la sintesi.

3.1.1 Purificazione del PBS

Al fine di eliminare eventuali residui e prodotti di reazione indesiderati, il PBS ottenuto ha subito un processo di purificazione: il polimero è stato sciolto in una piccola quantità di cloroformio, fino a ottenerne la completa solubilizzazione. La soluzione è stata poi fatta sgocciolare in un becher contenente metanolo in largo

eccesso, un comune non solvente del polimero. A contatto con il metanolo, il PBS solidifica istantaneamente, precipitando sul fondo, mentre le componenti a basso peso (catalizzatore, oligomeri, ...) rimangono sospese in metanolo, che diventa visibilmente più opaco col procedere della purificazione (Figura 3.3).



Figura 3.3. Strumentazione utilizzata per la purificazione.

Successivamente, il polimero precipitato, di colore bianco (Figura 3.4), è stato filtrato e lasciato a riposo sottovuoto, al fine di permettere l'evaporazione di metanolo e cloroformio eventualmente presenti.



Figura 3.4. PBS purificato.

3.2 Caratterizzazione molecolare

3.2.1 Risonanza magnetica nucleare (NMR)

La spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) è una tecnica attraverso cui è possibile analizzare la struttura chimica delle molecole. La strumentazione si compone di un elettromagnete che genera un campo magnetico stabile ed omogeneo, un emettitore di onde radio, un ricevitore, ed un'apparecchiatura che ha lo scopo di variare la frequenza della radiazione.

Il principio di funzionamento alla base dell'NMR sfrutta la capacità che hanno i nuclei di alcuni atomi di generare un campo magnetico in seguito alla rotazione intorno al proprio asse, se sottoposti a un campo magnetico esterno. Tale rotazione, o spin, è legata ad un momento di spin \vec{I} rispetto al centro del proprio nucleo, definito come segue:

$$\vec{I} = \frac{n}{2} \cdot \frac{h}{2\pi}$$

In cui n è il numero quantico principale ed h la costante di Planck.

È possibile notare che, una volta fissato il numero quantico principale, e quindi la specie chimica in esame, il momento di spin è costante. A tale momento di spin viene associato un momento magnetico elementare μ , dipendente da esso:

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{I}$$

in cui γ è il rapporto giromagnetico

Inoltre, il momento magnetico nucleare μ , in seguito all'allineamento del nucleo, non rimane fermo, ma continua ad oscillare attorno alla direzione di B , compiendo un moto di precessione simile a quello di una trottola (Figura 3.5).

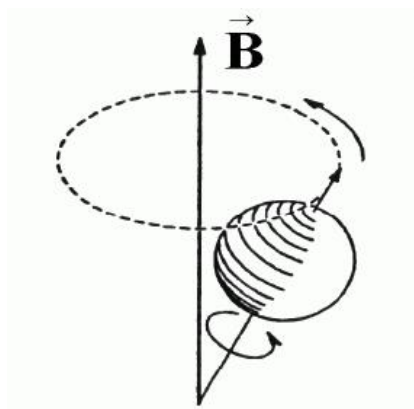


Figura 3.5. Moto di precessione dei momenti magnetici.

Quando i nuclei di alcuni particolari atomi, per i quali il numero quantico di spin (m_s), pari alla metà del numero quantico principale (n), risulta non intero (^1H , ^{13}C , ^{17}O e ^{31}P), vengono sottoposti ad un campo magnetico esterno B , la loro rotazione si sincronizza, e gli assi di rotazione si dispongono lungo le linee di flusso del campo magnetico (Figura 3.6).

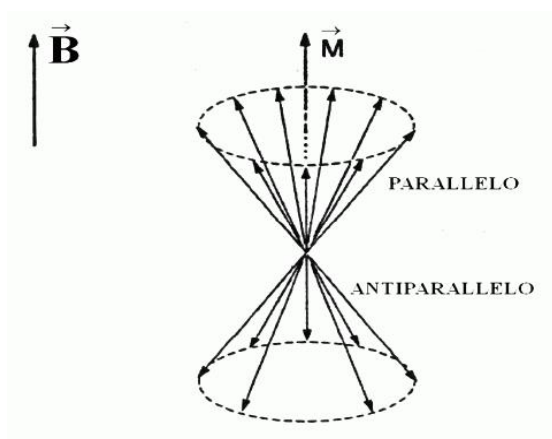


Figura 3.6. Disposizione degli assi di rotazione in prossimità di un campo magnetico B .

L'allineamento è possibile in verso parallelo ($m = +\frac{1}{2}$) o antiparallelo ($m = -\frac{1}{2}$) rispetto al campo. In base a queste due possibili disposizioni, i nuclei si troveranno anche su due livelli energetici differenti: quelli orientati in verso parallelo avranno minor energia, viceversa quelli orientati in verso antiparallelo (Figura 3.7).

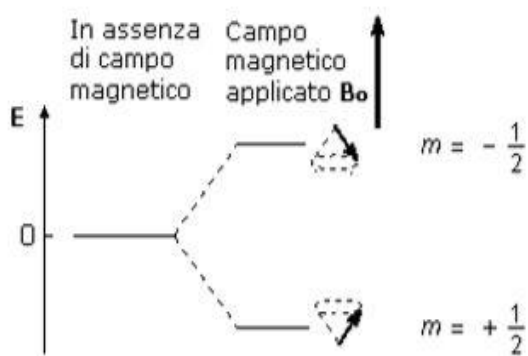


Figura 3.7. Energia ed orientamento dei nuclei con e senza campo magnetico esterno.

La differenza di energia tra i due livelli è direttamente proporzionale all'intensità del campo magnetico applicato, ed è pari a

$$\Delta E = 2 \cdot \vec{\mu} \cdot \vec{B} \xrightarrow{\text{legge di Planck}} h \cdot \nu$$

dove $\nu = \frac{2 \cdot \vec{\mu} \cdot \vec{B}}{h}$ è la frequenza di risonanza.

In questa situazione, la distribuzione dei nuclei atomici sui 2 livelli energetici è regolata dalla statistica di Boltzmann:

$$\frac{N_2}{N_1} = e^{-\frac{2 \cdot \vec{\mu} \cdot \vec{B}}{K \cdot T}}$$

In cui N_1 ed N_2 corrispondono rispettivamente alla densità dei nuclei a spin parallelo e antiparallelo, K è costante di Boltzmann e T la temperatura assoluta.

Tuttavia, la differenza di energia ΔE risulta essere molto piccola, quindi la popolazione di nuclei sui due livelli energetici è molto simile, se non fosse per una leggera prevalenza per lo stato a minor energia; grazie a questa piccola differenza è possibile ricavare il segnale NMR.

A questo punto, se viene applicato un secondo campo magnetico B_1 orientato perpendicolarmente a quello già presente, il vettore campo magnetico complessivo ed il vettore magnetizzazione si defletteranno dall'asse del campo B di un certo angolo, detto angolo di nutazione o di precessione, pari a:

$$\theta = \gamma \cdot |\vec{B}_1| \cdot t_p$$

In cui \vec{B}_1 corrisponde al secondo campo magnetico e t_p è il tempo di applicazione del campo \vec{B}_1 .

Questo fenomeno avviene se \vec{B}_1 possiede una frequenza specifica, detta frequenza di Larmor, che dipende dalla specie atomica in esame e dal campo B , pari a:

$$f = \frac{|\gamma \cdot B|}{2 \cdot \pi}$$

Una volta che il campo magnetico \vec{B}_1 cessa di essere applicato, il vettore magnetizzazione ritorna in allineamento con il campo B , entro un certo tempo, rilasciando energia.

Il segnale viene generato secondo il metodo ad impulso, in cui gli impulsi sono generati e ricevuti da un sistema di bobine magnetiche secondo una sequenza ben precisa, detta FID (*Free Induction Decay*). Tale sequenza consiste nell'inviare un impulso, detto "impulso di ribaltamento", che porta il sistema di spin ad inclinare il

proprio vettore magnetizzazione di 90° rispetto alla verticale. Questa inclinazione è energeticamente “scomoda” per la rotazione dei nuclei, quindi essi iniziano a cedere rapidamente energia per ritornare alla posizione iniziale, una volta cessato l’impulso, generando così un segnale che si smorza velocemente nel tempo (Figura 3.8).

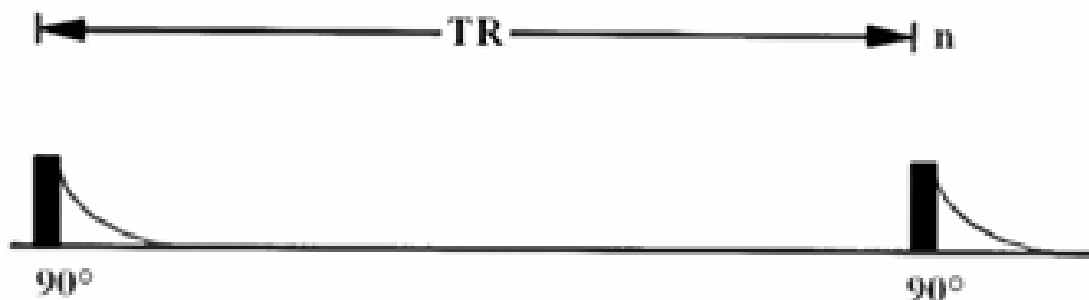


Figura 3.8. Impulso di ribaltamento in una sequenza FID (TR = tempo di ripetizione delle sequenze di impulsi).

Se questo segnale viene espresso in funzione della frequenza, invece che del tempo, si ottiene lo spettro NMR relativo alla sostanza in esame (Figura 3.9), costituito da un insieme di picchi collocati a specifiche frequenze.

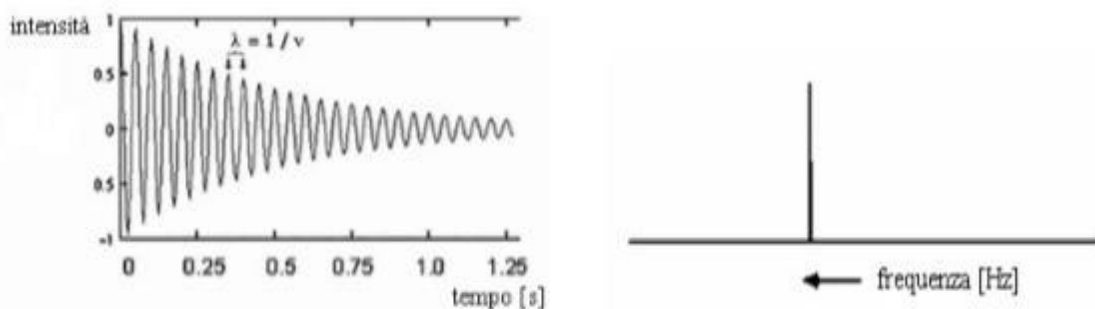


Figura 3.9. Esempio di grafico FID e relativo spettro NMR per nuclei di idrogeno.

Per quanto riguarda i picchi, essi si trovano in corrispondenza di frequenze più o meno elevate a seconda dell’intorno chimico che circonda l’atomo in esame, considerando che gli elettroni provocano un effetto di schermatura: tanto più grande sarà la densità elettronica, tanto maggiore sarà l’entità della schermatura, quindi i nuclei che presentano un intorno ricco di elettroni sono influenzati da un campo magnetico meno intenso, e subiranno una transizione ad una frequenza più bassa rispetto ad atomi che presentano, al contrario, un intorno povero di elettroni.

Inoltre, considerando che lo spostamento chimico assoluto dipende dall'intensità del campo magnetico applicato, è preferibile utilizzare lo spostamento chimico relativo δ , misurato in parti per milione (ppm):

$$\delta = \frac{\nu_r - \nu}{\nu_r} \cdot 10^6$$

dove ν è la frequenza di risonanza del campione, e ν_r è la frequenza di risonanza del tetrametilsilano (TMS), un nucleo di riferimento. Tipicamente per il nucleo dell'atomo ^1H e per gran parte delle molecole organiche, δ è compreso nell'intervallo tra 0 e 10 ppm.

Tramite il rapporto fra le aree sottese ad ogni picco, è possibile determinare il rapporto tra le varie tipologie di ^1H presenti. L'area di un picco è infatti indipendente dalla struttura a cui è legato l'atomo di idrogeno, in quanto dipende unicamente dalla frequenza con cui tale atomo è ripetuto all'interno della molecola. Dividendo poi l'area di ogni picco per il numero di idrogeni a cui corrisponde, si ottengono valori perfettamente confrontabili con quelli dati dalla formula chimica del polimero analizzato.

Gli spettri oggetto della presente Tesi 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%) (i cui atomi di idrogeno vengono sostituiti da atomi dell'isotopo deuterio), al fine di escludere la presenza di qualsiasi fonte di protoni, ad eccezione di quelli relativi alla molecola da analizzare. Gli spettri sono stati acquisiti a temperatura ambiente con concentrazione dei polimeri pari al 0.5 wt%, tempo di rilassamento pari a 0 secondi e tempo di acquisizione di 1 secondo per 100 ripetizioni.

3.2.2 Cromatografia a permeazione su gel (GPC)

La cromatografia a permeazione su gel (GPC) è un'analisi che consente di determinare la distribuzione del peso molecolare di un polimero.

Lo strumento è composto da una pompa volumetrica, una colonna cromatografica contenente particelle porose (polistirene reticolato con divinilbenzene) ed un rivelatore, che per i poliesteri alifatici è generalmente ad indice di rifrazione (Figura 3.10).

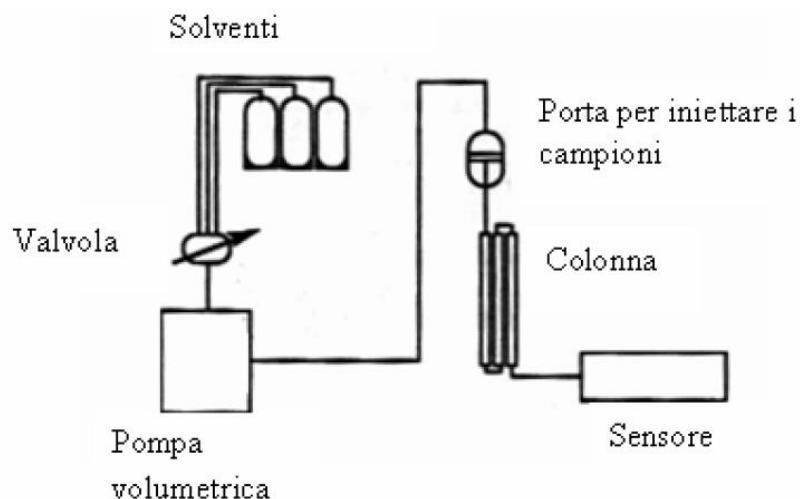


Figura 3.10 Schema della strumentazione GPC.

Si tratta di una tecnica di separazione fisica delle catene polimeriche, possibile grazie alla porosità della colonna (Figura 3.11): le molecole caratterizzate da un maggior volume idrodinamico non riescono a penetrare nei pori, aggirandoli, mentre le molecole di più piccole dimensioni riescono ad entrare in questi corpi di riempimento, dove il liquido scorre più lentamente. Per questo motivo le molecole ad alto peso molecolare usciranno dalla colonna in tempi brevi, mentre quelle a peso molecolare più basso impiegheranno più tempo.

Durante la scansione in colonna viene fatto circolare un solvente con portata volumetrica costante. Prima di essere introdotto in colonna, il campione viene sciolto nello stesso solvente che scorre in colonna, filtrato (al fine di eliminare eventuali particelle non solubili che potrebbero ostruire i pori), e dunque iniettato.

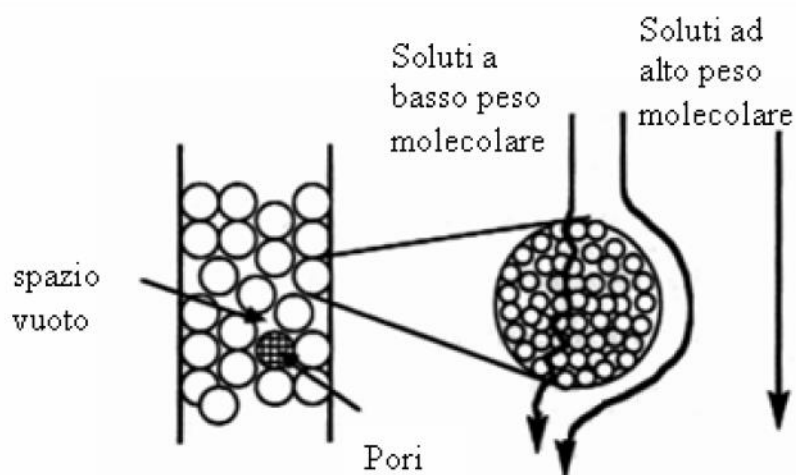


Figura 3.11. Esempio di colonna porosa utilizzata per analisi GPC.

All'uscita della colonna la soluzione viene analizzata dal rilevatore, che fornisce in tempo reale un segnale di intensità proporzionale alla concentrazione della soluzione, il cromatogramma. Per associare i tempi di eluizione ai pesi molecolari delle catene si fa riferimento a delle curve di taratura, ottenute iniettando in colonna 10 standard di polistirene monodisperso e a peso molecolare noto.

Il cromatografo utilizzato per le analisi è costituito da due colonne disposte in serie: la prima è una PLgel MiniMIX-A (20 μm con dimensioni di 250x4,6 mm) seguita da una seconda colonna TOSOH TSKgel SuperMultipore HZ-M (4 μm con dimensioni di 150x4,6 mm). I cromatogrammi sono stati registrati ed elaborati con il software Agilent GPC/SEC versione A.02.01. L'eluente utilizzato è il cloroformio, con flusso in colonna pari a 0,2ml/min, al quale è stato aggiunto toluene (2-2,5 μl /20 ml) come riferimento.

3.3 Realizzazione di *scaffold*

Per la realizzazione degli *scaffold* oggetto del presente lavoro di Tesi, è stato applicato il procedimento illustrato nel paragrafo 1.1.1.1: lo strumento, illustrato in Figura 3.12, è costituito da un generatore di tensione ad alto voltaggio ($\pm 30\text{KV}$, 5mA) SVH150, Alintel Power Electronics (Italia), una siringa dotata di ago di diametro variabile tra 0.2 e 1.5 mm, contenente la soluzione polimerica da elettrofilare, una pompa per infusione KDS200, KD Scientific Inc. (USA) che ha la funzione di spingere lo stantuffo della siringa ad una velocità costante, ed un collettore metallico in acciaio inossidabile, ad un potenziale più basso rispetto a quello applicato alla soluzione polimerica (di solito è collegato a terra), su cui vengono depositate le nanofibre che costituiscono il tappetino elettrofilato.

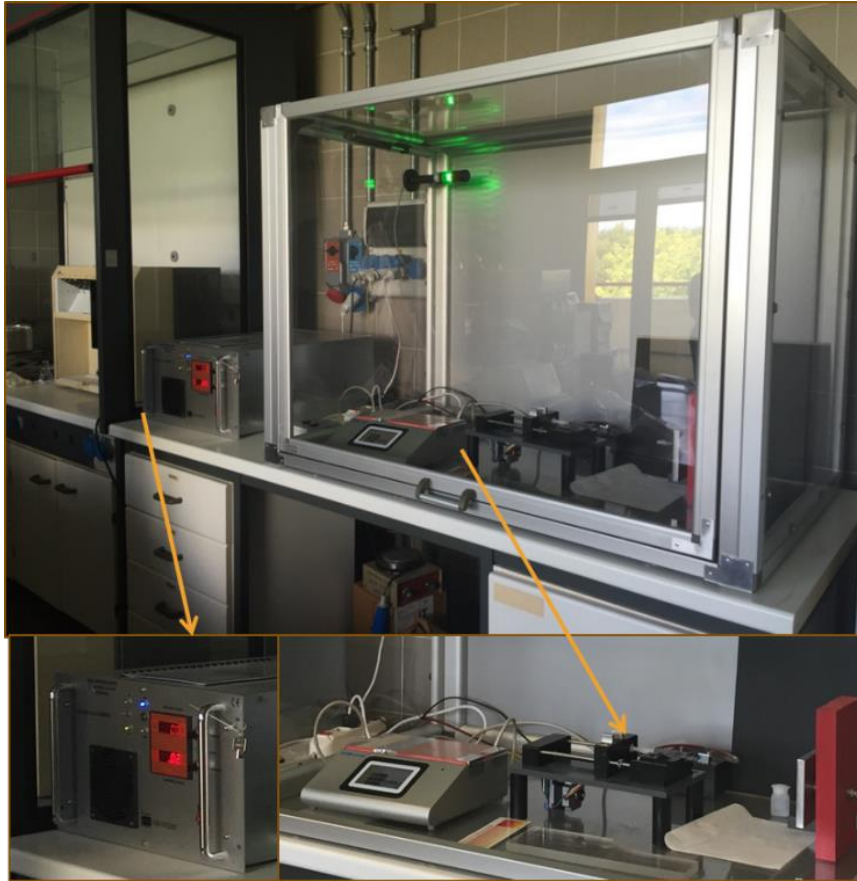


Figura 3.12. Strumentazione per elettrofilatura.

Più in dettaglio, 600 mg di PBS purificato, sono stati disciolti in 4 ml di esafluoro-isopropanolo, così da avere una soluzione al 15% peso/volume; una volta che il polimero è risultato completamente disciolto, la soluzione è stata caricata all'interno di una siringa con ago dal diametro di 0.8 mm, posta poi sul portacampione a una distanza di 15 cm dal collettore. È stata poi messa in funzione la pompa per infusione, impostando il flusso a 0.03 ml/min ed applicato un campo magnetico di 20 kV. Lo stesso procedimento è stato ripetuto per la blend a base di PBS e cheratina: in questo caso 300 mg di PBS e 300 mg di cheratina sono stati disciolti separatamente, ciascuno in 2 ml di esafluoro-isopropanolo; le due soluzioni così ottenute sono state unite ed agitate insieme al fine di ottenere una soluzione omogenea, la quale poi è stata elettrofilata nelle medesime condizioni sopra descritte. Tali procedure, della durata complessiva di circa 40 minuti ciascuna, hanno permesso di ottenere tappetini di dimensione 15x15 cm.

3.4 Caratterizzazione morfologica

3.4.1 *Microscopia elettronica a scansione (SEM)*

Tramite microscopia elettronica a scansione (SEM), è possibile analizzare e studiare la morfologia superficiale di un campione. La peculiarità dei microscopi elettronici rispetto a quelli ottici è l'utilizzo di radiazioni provenienti non da fotoni luminosi, bensì da elettroni, i quali sono caratterizzati da una lunghezza d'onda minore; in questo modo si possono ottenere immagini con risoluzione molto più alta e dettagli dalle dimensioni anche inferiori al nanometro.

La struttura del sistema SEM è illustrata in Figura 3.13: è presente innanzitutto un generatore di elettroni, detto cannone elettronico, nel quale un filamento in tungsteno, portato ad un elevato potenziale, si riscalda per effetto Joule liberando elettroni, che vengono a loro volta accelerati verso il basso. Al fine di focalizzare gli elettroni verso il basso, evitando che si disperdano in diverse direzioni, vengono poste delle lenti collimatrici che assicurano la convergenza sul campione, e un sistema di quattro bobine di scansione, il quale fa scorrere il fascio su tutta la superficie del campione, inviando contemporaneamente al sistema esterno di elaborazione il segnale corrispondente al fascio incidente su ogni porzione di superficie del campione. Altre quattro bobine di correzione servono per omogeneizzare il campo magnetico e mantenerne, con un sistema di controllo in retroazione, la simmetria cilindrica. Prima e dopo tali bobine, il fascio incontra una serie di lenti collimatrici, che servono a focalizzare il fascio stesso e ad aumentare la luminosità finale dell'immagine. L'interno del tubo elettronico appena descritto, è posto, tramite apposite pompe da vuoto, a pressioni molto basse (10^{-4} mmHg). Il fascio di elettroni investe il campione, posto su un supporto mobile, per poi colpire una serie di lenti che lo proiettano su un primo schermo fluorescente che converte il segnale elettronico in luce visibile, generando così la cosiddetta immagine intermedia, e in seguito su un secondo schermo, dal quale si ottiene l'immagine finale all'ingrandimento desiderato, visualizzabile su uno schermo digitale. Tali immagini forniscono informazioni sulla chimica superficiale, sulla struttura e sulla composizione chimica del materiale irradiato.

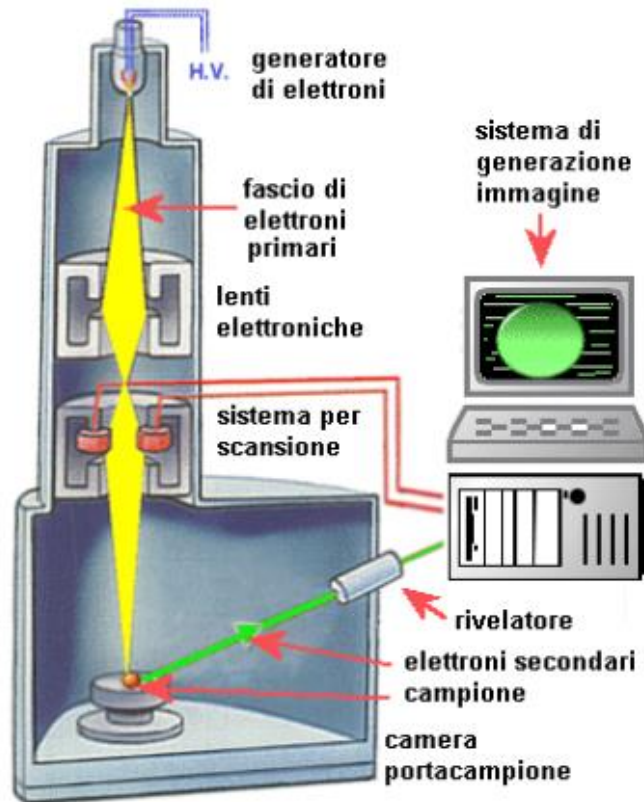


Figura 3.13. Struttura del SEM.

Per quanto riguarda la preparazione dei campioni, la procedura generale è la seguente: il campione viene montato su un apposito supporto (*stub*) di materiale conduttore (in genere alluminio) e incollato con un materiale adesivo (pasta di argento o nastro biadesivo di grafite). Nel caso di materiali non conduttori, essi vengono sottoposti ad un processo di ricoprimento con un sottile strato di materiale conduttore (metallizzazione dei campioni).

Lo strumento utilizzato per l'analisi è un microscopio EVO LS LaB6. Le immagini SEM sono state acquisite utilizzando un voltaggio di 5 kV ed una distanza di lavoro di 5 mm, su campioni metallizzati con oro collegato a massa, allo scopo di scaricare l'eventuale deposito superficiale di elettroni sul campione, che lo renderebbe invisibile al microscopio. L'analisi d'immagine è stata effettuata con GIMP 2.8 con un software di acquisizione e analisi di immagine (EDAX Genesis), e la distribuzione dei diametri delle fibre elettrofilate è stata calcolata misurando il diametro di 150 fibre.

3.5 Caratterizzazione termica

3.5.1 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

La calorimetria a scansione differenziale o DSC (*differential scanning calorimetry*) è una delle indagini termiche maggiormente utilizzata per ottenere informazioni legate alle proprietà termodinamiche di un materiale.

Il principio di base consiste nel riscaldare o raffreddare in maniera controllata il materiale di interesse, 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, l'altra il riferimento, costituito da una capsula vuota (Figura 3.14).

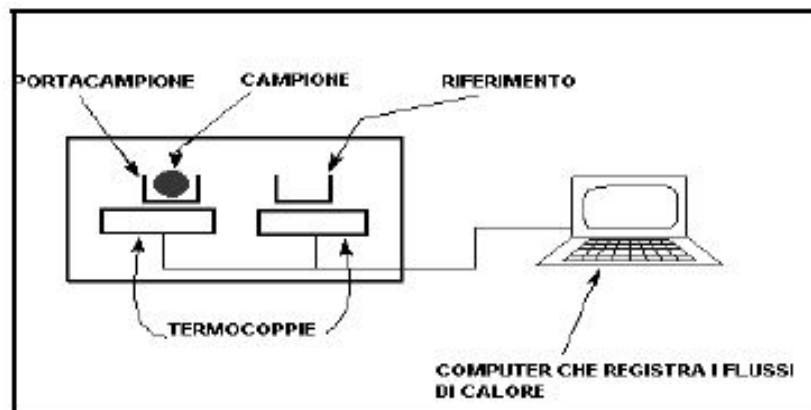


Figura 3.14. Schema degli alloggiamenti della DSC.

Gli alloggiamenti costituiscono dei microcalorimetri, mantenuti in atmosfera inerte con un flusso continuo ed uniforme di azoto. Il flusso di calore viene regolato e controllato tramite un computer, in modo tale che le due celle siano sottoposte in ogni istante al medesimo programma termico. Quando avvengono delle transizioni nel materiale, e quindi il crogiuolo contenente il campione si trova ad una temperatura diversa rispetto al riferimento, viene immediatamente fornita energia al microcalorimetro, in modo da riportare il campione e il riferimento alla stessa temperatura. Tramite lo stesso software che regola le temperature, è possibile anche elaborare i dati.

Con questo tipo di analisi si possono misurare le temperature di transizione vetrosa, di fusione, di cristallizzazione ed i calori associati a tali transizioni. Più in dettaglio, la temperatura di transizione vetrosa (T_g) si manifesta come una variazione

endotermica della linea di base ed il suo valore è determinato in corrispondenza della metà della variazione di calore specifico associata alla transizione (Figura 3.15).

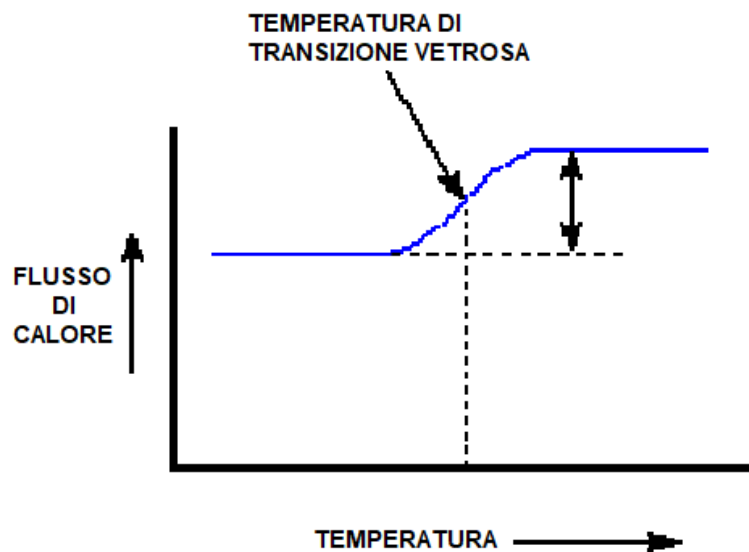


Figura 3.15. Calcolo della T_g .

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

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

dove dT/dt è la velocità di scansione.

Per quanto riguarda invece fusione, essa si presenta nel tracciato come un picco endotermico; la temperatura di fusione T_m corrisponde all'ascissa di tale picco, mentre l'area sottesa rappresenta il calore di fusione ΔH_m (J/g), che sarà tanto più grande quanto più alto è il grado di cristallinità del materiale (Figura 3.16). Il rapporto tra quest'ultima grandezza e il calore di fusione del polimero completamente cristallino costituisce il grado di cristallinità del materiale.

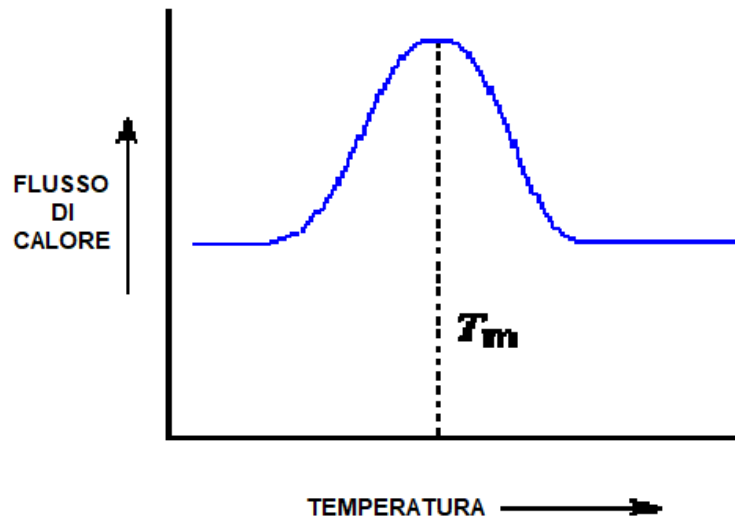


Figura 3.16. Calcolo della T_m .

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 al seguente programma termico:

- prima scansione: riscaldamento da -70°C a 370 °C a velocità di 20 °C/min, mantenimento a 200 °C per 4 minuti
- raffreddamento rapido (velocità di 100 °C/min) fino a -70°C e mantenimento a -70 °C per 15 minuti;
- seconda scansione: riscaldamento in condizioni di temperatura e velocità analoghe alla prima scansione.

Un esempio di curve DSC è riportato in Figura 3.17.

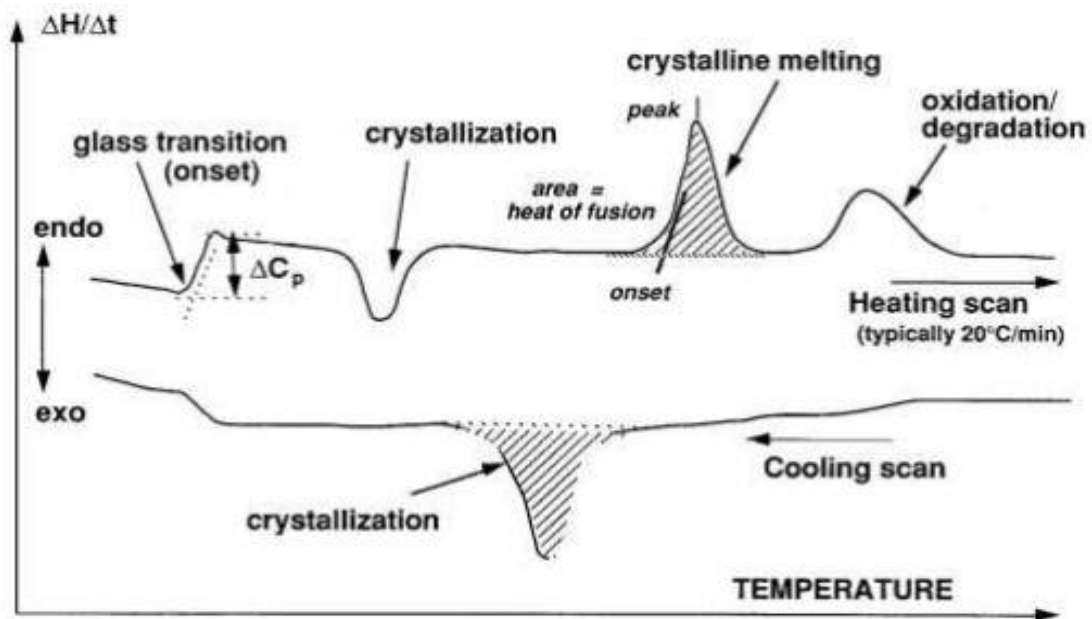


Figura 3.17. Esempio di curve DSC.

3.5.2 Analisi termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica è una tecnica da cui è possibile ricavare informazioni sulla stabilità termica del campione, sulla cinetica di decomposizione e sul suo comportamento nei confronti di determinati processi termici. Tali informazioni sono di fondamentale importanza per definire il valore di temperatura che non deve essere oltrepassato durante il trattamento del polimero, per non incorrere nella sua degradazione. Il campione subisce un riscaldamento controllato in presenza di gas di diverso tipo (aria, O₂, N₂), e ne viene registrata la perdita di peso in funzione dell'aumento della temperatura. I cambiamenti di peso sono dovuti a perdite di sostanze volatili in seguito a processi fisici o chimici che modificano la natura del composto: nel caso dei polimeri i prodotti di decomposizione saranno CO₂ e acqua.

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 3.18).

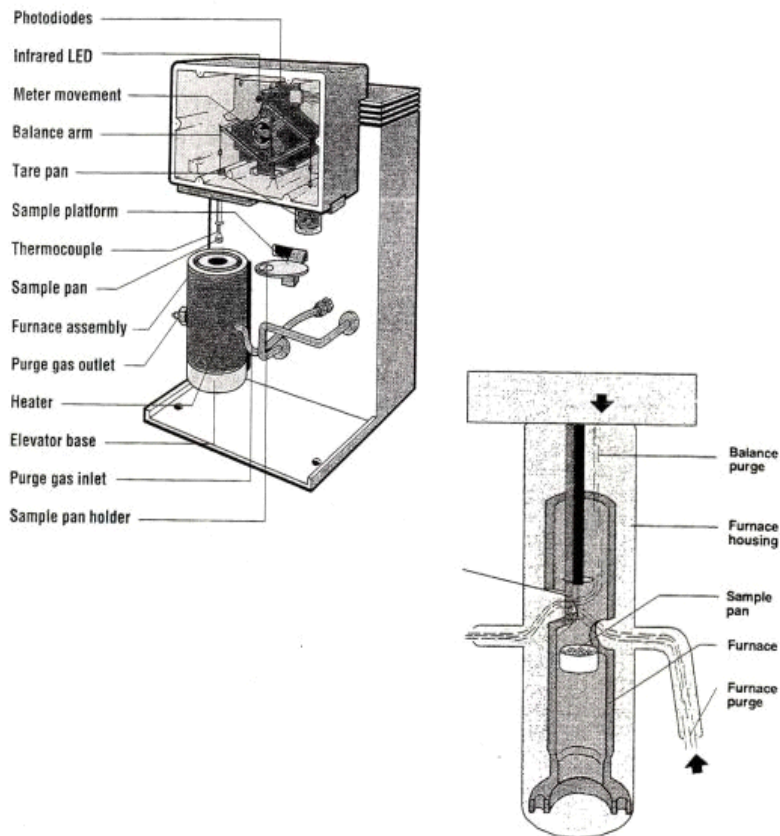


Figura 3.18. Strumentazione per TGA.

A partire da un termogramma è possibile ricavare:

- T_{onset} : temperatura in corrispondenza della quale inizia il processo di degradazione;
- T_{max} : temperatura alla quale si rileva la massima velocità di perdita di peso.

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 è di $+10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e la temperatura varia nell'intervallo $[40-800^{\circ}\text{C}]$.

Esempi di termogrammi di materiali polimerici sono riportati in Figura 3.19.

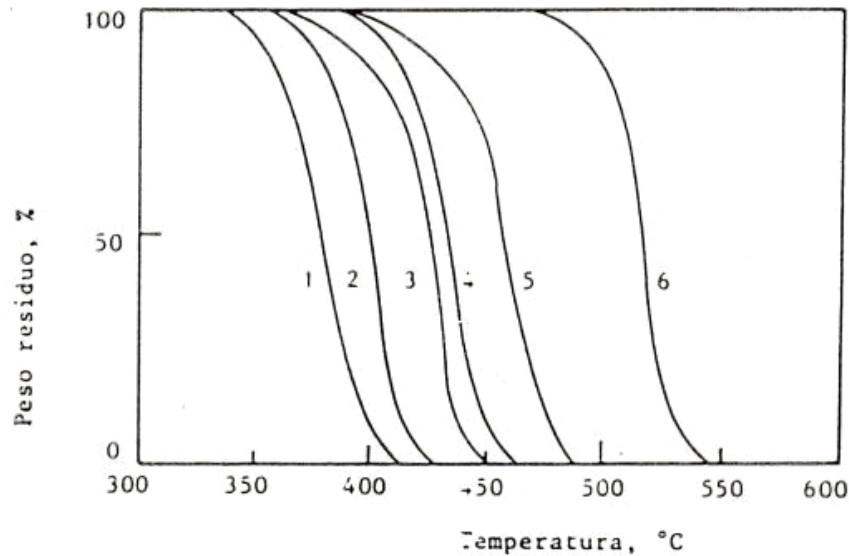


Figura 3.19. Curve termogravimetriche di: 1) poliisobutilene, 2) polistirene, 3) poli-5-fenilpentene, 4) polipropilene, 5) polietilene, 6) politetrafluoroetilene (velocità di riscaldamento: 100°C/h).

3.6 Caratterizzazione meccanica

Le misure di resistenza meccanica permettono di studiare il comportamento dei materiali in presenza di sollecitazioni meccaniche di diverso tipo. In particolar modo, quando si vuole indagare la resistenza di un materiale alla trazione, vengono eseguite prove tensili.

Le proprietà meccaniche di un materiale si deducono dal grafico tensione-deformazione (o grafico σ - ϵ), in cui viene registrata la tensione esercitata sul materiale in funzione della deformazione subita. Più precisamente, si definisce la tensione σ come il rapporto tra il carico applicato in direzione normale (N) e l'area della sezione del provino resistente a riposo (A):

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

La deformazione, ϵ , indica l'allungamento subito dal provino, indicato con Δl , rapportato alla lunghezza iniziale l_0 :

$$\epsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$$

La strumentazione con cui si effettuano queste prove è costituita da un dinamometro schematizzabile in alcuni sottocomponenti (Figura 3.20):

- 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 3.20. Strumentazione per prove meccaniche a trazione.

Un tipico andamento, nel caso di materiali polimerici, è riportato in Figura 3.21.

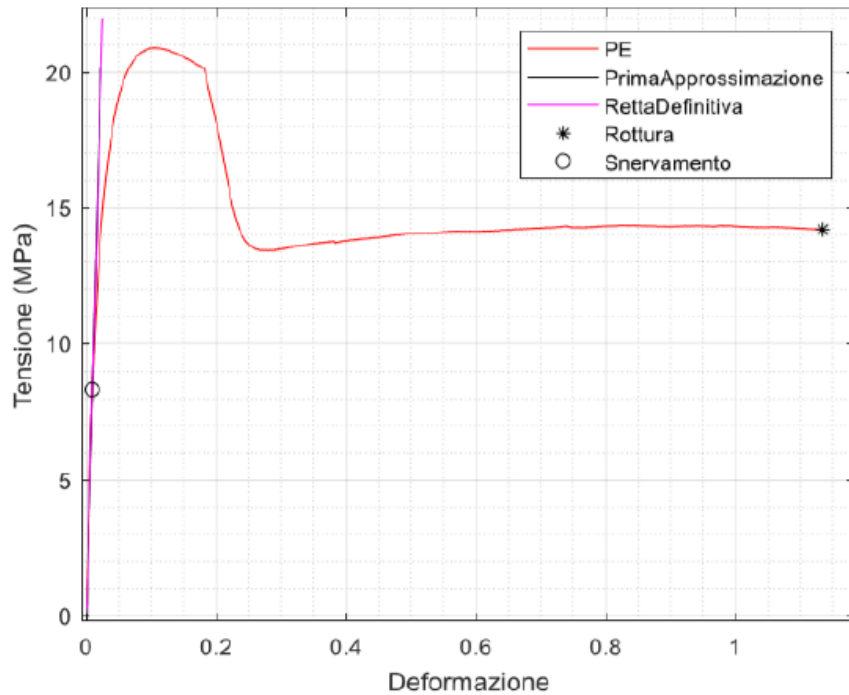


Figura 3.21. Esempio di diagramma σ - ε per un polimero duttile (polietilene).

È possibile individuare, su tale grafico, tre regioni distinte: regione elastica, snervamento o *yielding* e strizione o *necking*. La fine della curva coincide con il momento in cui il materiale si rompe.

Il campo elastico è contraddistinto da un tratto lineare, approssimabile ad una retta. Tensione e deformazione sono direttamente proporzionali ed il fattore di proporzionalità che li lega è il modulo elastico o modulo di Young, in accordo con la legge di Hooke:

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

Se il materiale viene posto in tensione all'interno della zona lineare, non presenterà nessun tipo di deformazione irreversibile al termine dell'applicazione del carico; questo si verifica se il valore di tensione applicata rimane al di sotto di un determinato valore limite, chiamato tensione di snervamento. Oltre tale punto, il materiale manifesta una deformazione plastica irreversibile che cresce all'aumentare del carico applicato, causata dallo scorrimento dei piani reticolari all'interno del materiale. Se si scarica il provino una volta che è stato snervato, il grafico percorrerà a ritroso una retta parallela al tratto lineare, che parte dal punto di rilascio del carico; l'intersezione tra tale retta e l'asse ascisse è la deformazione residua, che ci dà informazioni su quanto il materiale si è snervato.

Oltre il punto di snervamento, si entra nella regione di strizione, caratterizzata da una grande deformazione per piccoli incrementi di tensione. In questa zona, il provino manifesta un restringimento della sua sezione in concomitanza all'allungamento (Figura 3.22). Con l'aumentare del carico, si giungerà infine a rottura.

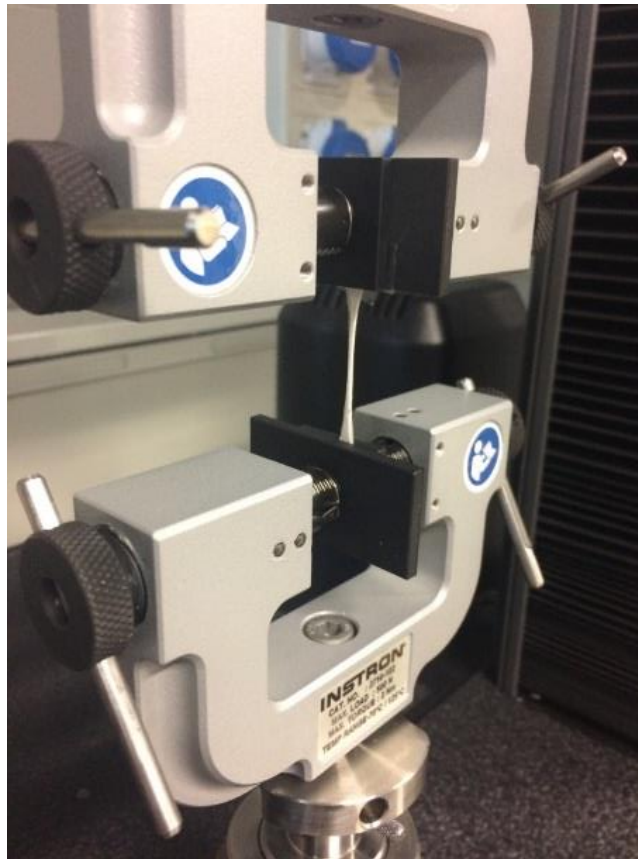


Figura 3.22. Restringimento della sezione trasversale in un campione sottoposto a trazione.

Naturalmente questa descrizione è applicabile ai soli materiali duttili, poiché i materiali fragili sono caratterizzati da un unico tratto rettilineo, che termina nel punto di rottura.

Studiando l'area sottesa all'intero grafico, è possibile ricavare il valore della tenacità, che coincide con l'energia necessaria per portare a rottura il materiale o, in altre parole, l'energia che il campione assorbe prima di rompersi.

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 dimensione dei provini.

Le prove meccaniche sono state condotte utilizzando un dinamometro Instron 4465 con cella di carico di 10 KN. Lo strumento è costituito da una struttura rigida di base e una traversa mobile posta nella parte superiore. A partire dagli *scaffold* polimerici, sono state ottenute striscioline rettangolari dalle dimensioni di 5x50 mm, il cui spessore, di circa 100 μ m è stato misurato in tre punti diversi per mezzo di un micrometro (Mitutoyo): 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 (Figura 3.23); il valore della tensione applicata viene misurato direttamente 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.



Figura 3.23. Prova a trazione su un campione di PBS elettrofilato.

3.7 Studi di degradazione enzimatica

Per poter conoscere il comportamento dei polimeri oggetto della presente Tesi in condizioni fisiologiche, ed in particolare la loro velocità di degradazione, sono state condotte delle prove di degradazione enzimatica, che hanno lo scopo di simulare l'attacco che il materiale potrebbe ricevere in ambiente corporeo.

Gli esperimenti di degradazione enzimatica sono stati condotti in condizioni di temperatura e pH fisiologici, su porzioni di *scaffold* di circa 10 mg dei due campioni PBS e PBS50KER50 in presenza di tripsina. L'enzima è stato aggiunto ad una soluzione tampone (pH 7.4) in concentrazione pari a 500µg/ml. I campioni sono stati inizialmente pesati e inseriti in provette contenenti una quantità di soluzione acquosa tamponata tale che all'interno di ogni provetta fosse presente una quantità di tripsina pari a 2.5 µg/mg di campione. Sono stati poi mantenuti ad una temperatura costante di 37 °C per periodi di tempo variabili, fino ad un massimo di tre settimane, provvedendo a cambiare la soluzione enzimatica quotidianamente, per garantire la piena attività dell'enzima.

Periodicamente i campioni sono stati rimossi in triplicato dalla soluzione, lavati con acqua distillata, centrifugati e lasciati ad asciugare fino a raggiungere un peso costante. I campioni sono stati poi pesati per misurare la perdita di peso.

3.8 Studi di biocompatibilità

La biocompatibilità, intesa come capacità di un materiale di indurre, da parte di un sistema vivente, una reazione favorevole alla sua presenza in una specifica applicazione, è una grandezza non misurabile, spesso stabilita mediante verifica di una soddisfacente prestazione clinica. Tenendo presente che la biocompatibilità è strettamente legata all'interazione tra materiali e sistema vivente, è necessario definire procedure, incentrate sulla risposta del materiale e dell'ospite, che possano essere di supporto nella scelta e nella progettazione di un dispositivo destinato ad una data applicazione clinica. Le procedure normalmente seguite prevedono prove da effettuarsi sia in laboratorio (*test in-vitro*) che successivamente su cavie animali (*test in-vivo*), antecedenti il *trial* clinico.

Per quanto riguarda lo studio di biocompatibilità effettuato nel presente lavoro di Tesi, gli esperimenti di vitalità cellulare sono stati condotti su fibroblasti provenienti da

embrione di topo (NIH-3T3/GFP). Le cellule NIH-3T3/GFP sono state coltivate in condizioni standard in un terreno composto da DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) a cui è stato aggiunto siero fetale bovino (FBS) in quantità pari al 10% v/v, 2mM di L-glutammina, 0.1 mM di amminoacidi non essenziali (NEAA) MEM, 100 U/mL di penicillina e 100 U/mL di streptomina, all'interno di un incubatore impostato a 37 °C e con una percentuale di CO₂ pari al 5%.

Le cellule sono state seminate su pezzetti di *scaffold* di PBS e PBS50KER50 all'interno di multi-well contenenti 24 pozzetti ciascuna, con una densità pari a 105 cellule/cm². Per determinare il numero di cellule vitali adese ad ogni tipo di materiale, si è utilizzata resazurina, aggiunto direttamente al medium di coltura in quantità pari al 10% del terreno totale presente in ciascun pozzetto. Alla fine di ogni periodo di incubazione, effettuato per 3 ore a 37 °C in presenza del 5% di CO₂, aliquote di ciascun campione sono state prelevate e trasferite in piastre da 96 pozzetti per le misure in fluorescenza ($\lambda = 560 - 590 \text{ nm}$) (Thermo Scientific Varioskan Flash Multimode Reader). Nelle analisi sono stati inclusi anche un controllo negativo, costituito da solo terreno di coltura senza cellule, in modo da determinare il segnale di background, ed un controllo positivo dato da resazurina completamente ridotta in assenza di cellule.

CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 Sintesi e caratterizzazione molecolare

A temperatura ambiente il poli(butilene succinato) PBS si presenta come solido semicristallino di colore giallo chiaro (Figura 4.1), mentre dopo la procedura di purificazione, lo stesso materiale assume una forma a “fiocchi” di colore bianco. Lo *scaffold* ottenuto dai “fiocchi” di PBS per elettrofilatura risulta un solido poroso bianco e piuttosto flessibile, così come il tappetino ottenuto miscelando PBS e cheratina in percentuale 50:50 in peso (PBS50KER50). Per quanto riguarda la cheratina (KER), essa si presenta come un solido bianco molto cristallino, di cui non è stato possibile ottenere un tappetino mediante elettrofilatura, a causa della difficile processabilità, dovuta alla sua estrema rigidità.



Figura 4.1. PBS appena scaricato dal reattore.

Tutti i materiali oggetto della presente Tesi risultano caratterizzati da una buona solubilità in esafluoro-isopropanolo, solvente utilizzato per preparare la soluzione da elettrofilare; il PBS risulta inoltre solubile in cloroformio.

La struttura chimica del PBS è stata determinata tramite spettroscopia $^1\text{H-NMR}$. Lo spettro ottenuto, riportato in Figura 4.2, è risultato coerente con la struttura prevista,

permettendo di escludere la presenza di reazioni secondarie durante la polimerizzazione.

Lo spettro mostra, oltre ai segnali del solvente a δ 7.25 ppm e del riferimento a δ 0 ppm, i segnali caratteristici del PBS: a δ 4.19 ppm e a δ 1.70 ppm sono registrati i segnali dei protoni metilenici della subunità glicolica, rispettivamente *b* e *c*, mentre a δ 2.61 ppm si trova il singoletto ascrivibile agli idrogeni della subunità acida, *a*.

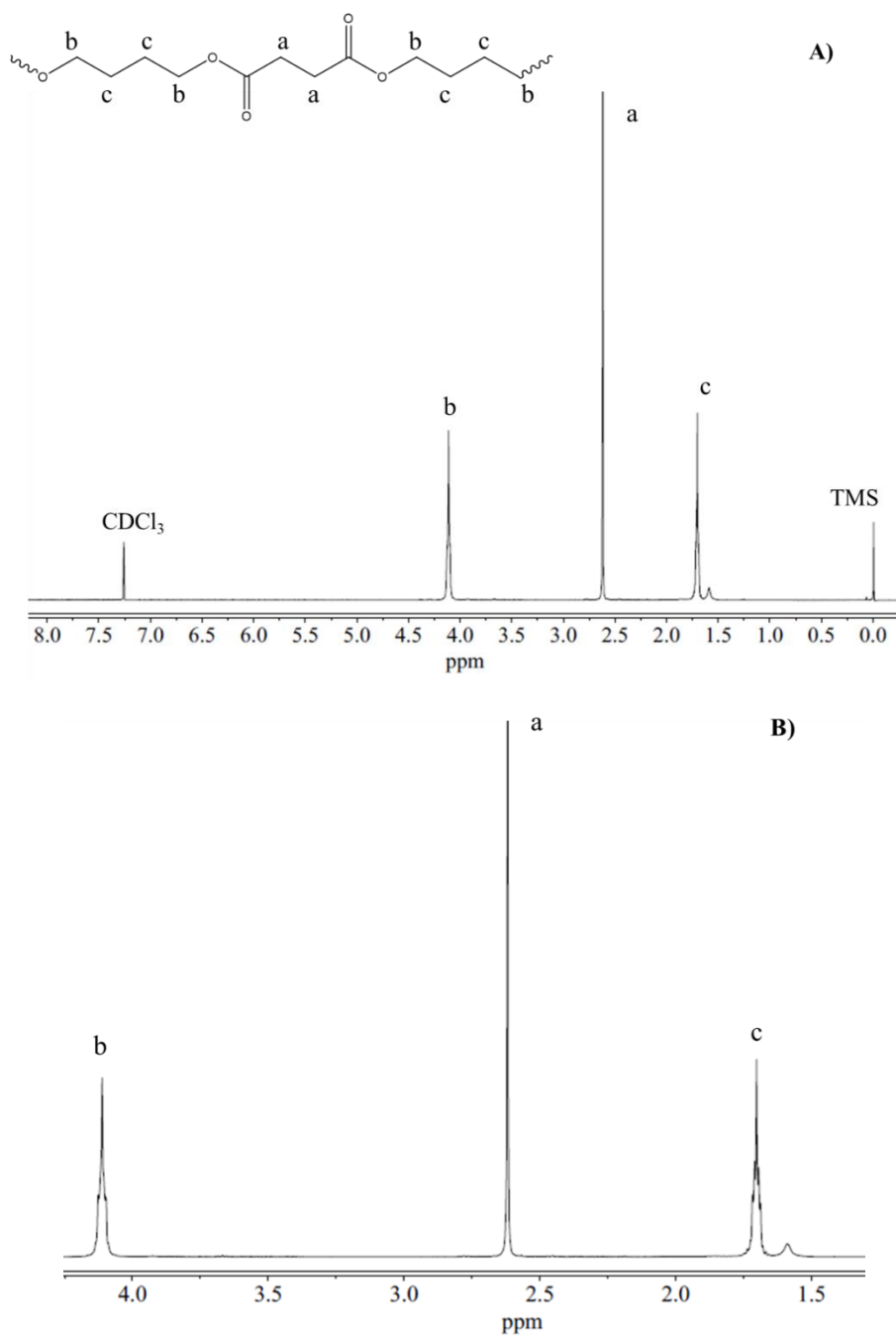


Figura 4.2. **A)** Spettro ¹H-NMR del PBS con attribuzione dei picchi; **B)** Ingrandimento della regione compresa tra 1 e 4.5 ppm.

Dalla misura del peso molecolare sul campione PBS, effettuata mediante cromatografia a permeazione su gel (GPC) è emerso come il materiale sintetizzato sia caratterizzato da un peso molecolare elevato ($M_n = 50000 \text{ g/mol}$) ed un indice di polidispersità D piuttosto ridotto ($D = 2,1$) ad indicare un buon controllo del processo di sintesi.

4.2 Caratterizzazione morfologica degli *scaffold*

La Figura 4.3 riporta, a titolo di esempio, l'immagine SEM, con ingrandimento 10.00K X, dei due tappetini elettrofilati dell'omopolimero PBS e della blend PBS50KER50, ottenuti tramite elettrofilatura (come riportato nella parte sperimentale).

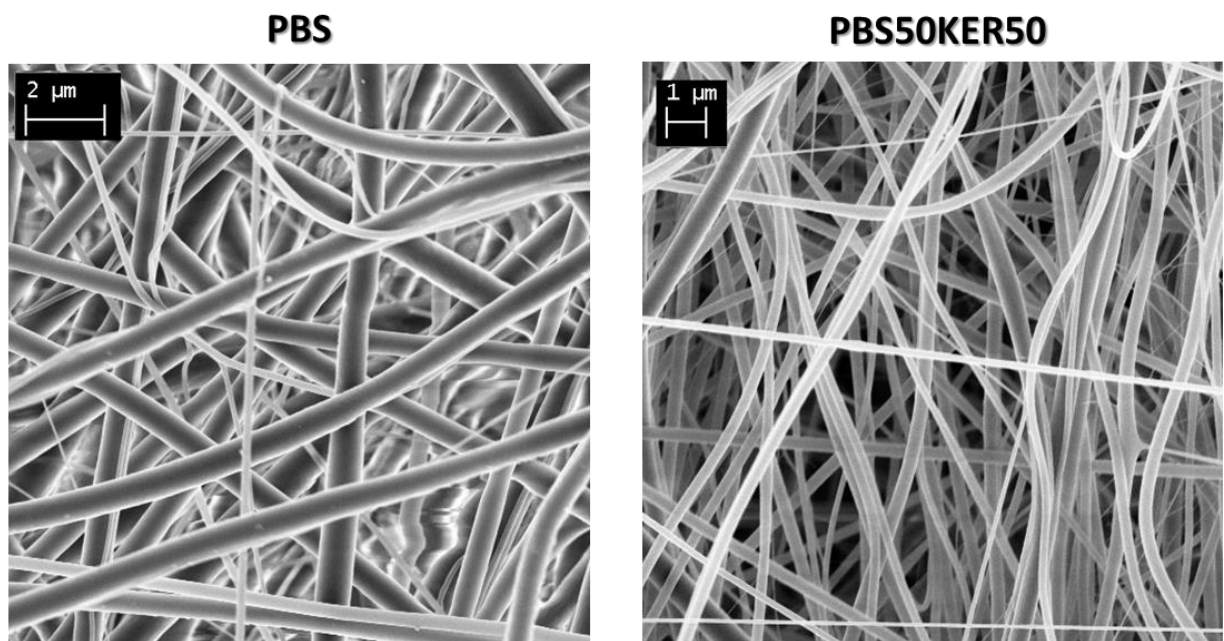


Figura 4.3. Immagine SEM delle fibre di PBS e PBS50KER50.

L'assenza di *beads* e difetti indica la buona messa a punto del processo: lo sviluppo della fase cristallina durante l'evaporazione del solvente permette di evitare la formazione di agglomerati conferendo alle fibre solidità strutturale. Nel caso del PBS, la membrana è un intreccio di filamenti di dimensioni piuttosto diverse e questo è probabilmente dovuto a fenomeni di *jet-splitting*, che partono dal getto primario e causano getti secondari di dimensioni inferiori. Per quanto riguarda le fibre ottenute

dalla blend PBS50KER50, esse sono caratterizzate da diametri di dimensioni minori rispetto a quelle ottenute dal solo PBS, e con una distribuzione più stretta, in accordo con le differenze a livello reologico tra le due soluzioni. La dimensione delle nanofibre è compresa tra 150 e 900 nm nel caso del PBS, mentre per quanto riguarda la blend PBS50KER50, essa varia nel range 40-450 nm (Figura 4.4).

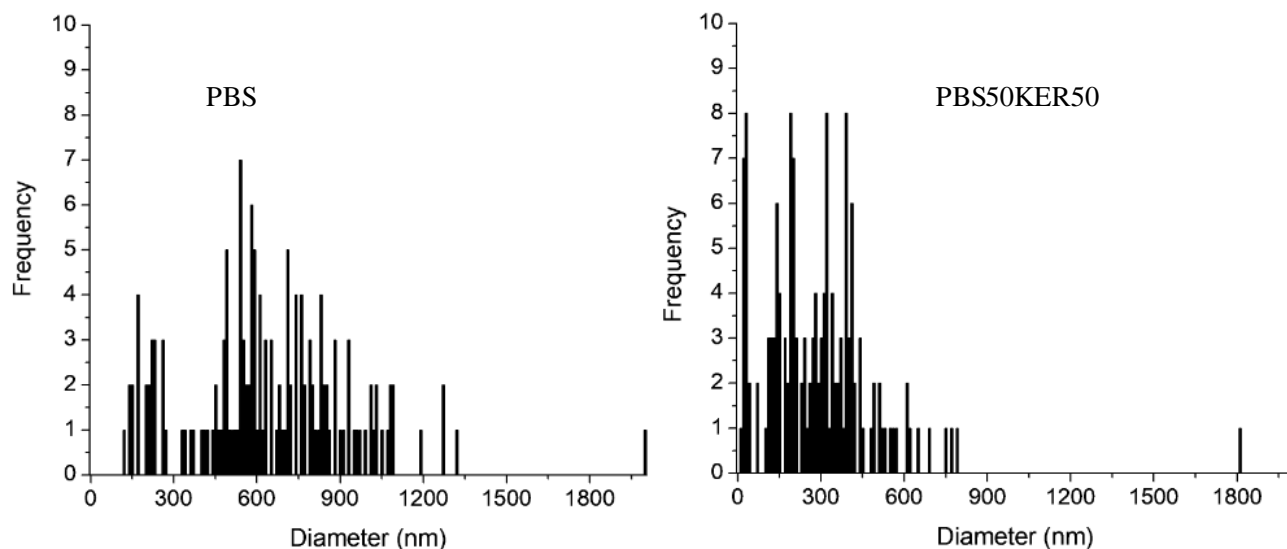


Figura 4.4. Distribuzione delle dimensioni delle fibre di PBS e PBS50KER50.

4.3 Caratterizzazione termica

La caratterizzazione dei materiali elettrofilati è proseguita sottoponendoli alle seguenti analisi:

- analisi termogravimetrica (TGA);
- analisi calorimetrica (DSC).

Le curve TGA dei materiali studiati, PBS, KER e PBS50KER50, sono riportate in Figura 4.5, mentre le temperature corrispondenti all'inizio della degradazione e alla velocità di massima perdita di peso sono raccolte in Tabella 4.1. Il PBS risulta il materiale termicamente più stabile, la cheratina il meno stabile. La miscela PBS50KER50 presenta una stabilità intermedia, coerentemente con la sua composizione (50:50). Più in dettaglio, la curva TGA della cheratina presenta tre step, il primo che parte già a 40°C, il secondo a 113 °C, l'ultimo a 278 °C. Le prime due perdite di peso sono legate all'acqua legata alla cheratina mediante rispettivamente interazioni fisiche ($T_{id} \approx 40^\circ\text{C}$) e legami a idrogeno ($T_{id} \approx 113^\circ\text{C}$).

L'ultimo step è invece ascrivibile al processo di degradazione della proteina. Nel caso del PBS e di PBS50KER50, invece, la perdita di peso avviene in un unico stadio, e si verifica a temperature più elevate (rispettivamente 363 e 326°C), ad indicare come il PBS sia il responsabile della migliorata stabilità termica della blend. Per quanto riguarda il peso residuo, esso è praticamente nullo nel caso del PBS, mentre per la cheratina si attesta intorno al 20%: tale residuo è attribuibile a residui carboniosi di urea e sodio dodecil solfato (SDS) utilizzati in fase di estrazione. Anche in questo caso il campione PBS50KER50 si colloca in una posizione intermedia, con un peso residuo del 15% circa, nelle condizioni sperimentali adottate.

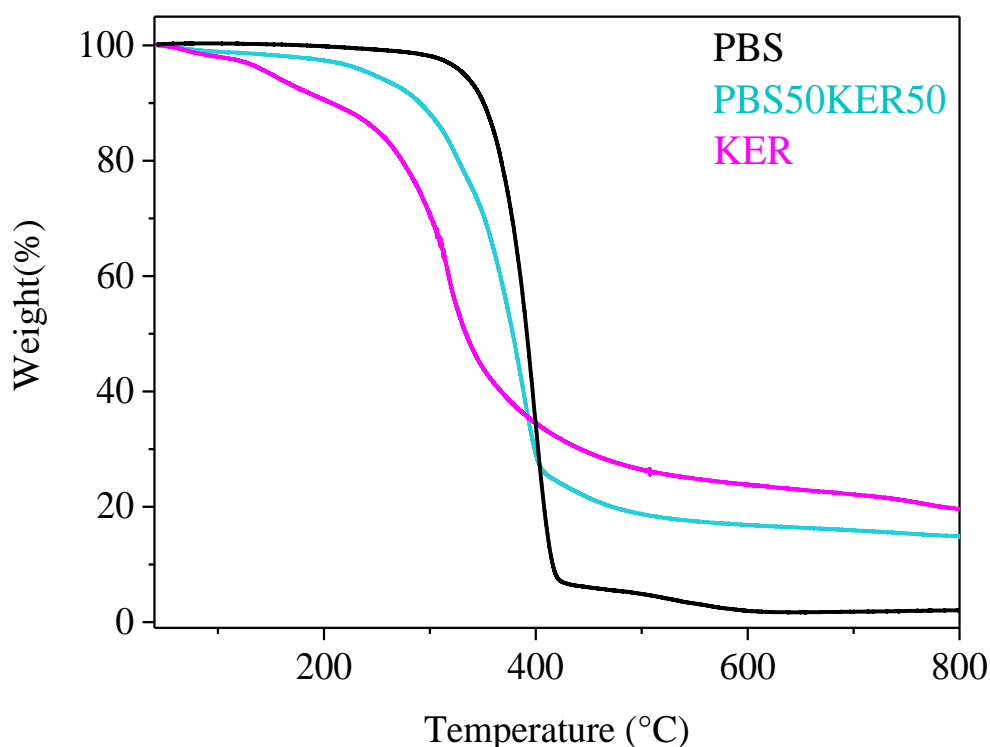


Figura 4.5. Curve TGA in atmosfera di N₂ di PBS, KER e PBS50KER50.

Successivamente, i campioni elettrofilati sono stati sottoposti ad analisi calorimetrica. I dati relativi alle curve calorimetriche di prima e seconda scansione sono riportati in Tabella 4.1, mentre i tracciati DSC di prima e seconda scansione sono mostrati in Figura 4.6.

Polimeri	T _{id} °C	T _{max} °C	I scan						II scan			
			T _g °C	Δc _p J/g°C	T _d °C	T _m °C	ΔH _d J/g	ΔH _m J/g	T _g °C	Δc _p J/g°C	T _m °C	ΔH _m J/g
PBS	363	398	-32	0.193	-	114	-	64	-32	0.251	114	53
PBS50KER50	326	388	-32	0.124	63 183 280	111	36 2 111	36	-32	0.164	109	30
KER	40 113 278	315	-	-	87 248 318	-	134 4 109	-	-	-	-	-

Tabella 4.1. Dati di caratterizzazione termica (TGA e DSC) dei materiali sintetizzati.

In prima scansione il campione PBS risulta semicristallino: la corrispondente curva calorimetrica è infatti caratterizzata da una variazione endotermica della linea di base associata alla transizione vetrosa, caratteristica della porzione amorfa del materiale, sotto temperatura ambiente ($T_g \approx -32^\circ\text{C}$), seguita da un picco endotermico a più alta temperatura, relativo alla fusione della porzione cristallina presente nel materiale (Figura 4.6).

La curva DSC della cheratina presenta invece tre picchi endotermici di diversa intensità e forma: il primo, molto allargato e centrato intorno a 87°C , è legato all'evaporazione dell'acqua legata alla proteina, il secondo, di minore intensità a 248°C , è dovuto alla denaturazione delle strutture secondarie (principalmente α -eliche) mentre il terzo, a più alta temperatura ($T = 318^\circ\text{C}$) è imputabile al processo di degradazione, in accordo con i dati ottenuti dalle analisi TGA (Tabella 4.1). Per quanto concerne la miscela PBS50KER50, il corrispondente tracciato DSC mostra sia i fenomeni endotermici caratteristici della cheratina che le transizioni tipiche del PBS (T_g e T_m). Per quanto riguarda le temperature a cui si manifestano le transizioni della cheratina nella miscela, esse risultano inferiori rispetto a quanto osservato nella sola cheratina; ciò potrebbe essere ascritto ad un minore sviluppo della struttura secondaria ad α -elica, a causa dall'effetto sinergico dovuto alla rapida evaporazione del solvente e all'elevata orientazione conseguente il processo di elettrofilatura [20]. Per quanto riguarda invece le transizioni caratteristiche del PBS, il calore di fusione è risultato dimezzato rispetto a quello del PBS (36 J/g vs. 64 J/g), in accordo con la

quantità di PBS presente all'interno della blend. Per quanto riguarda invece i valori di T_g e T_m , non sono state osservate differenze significative.

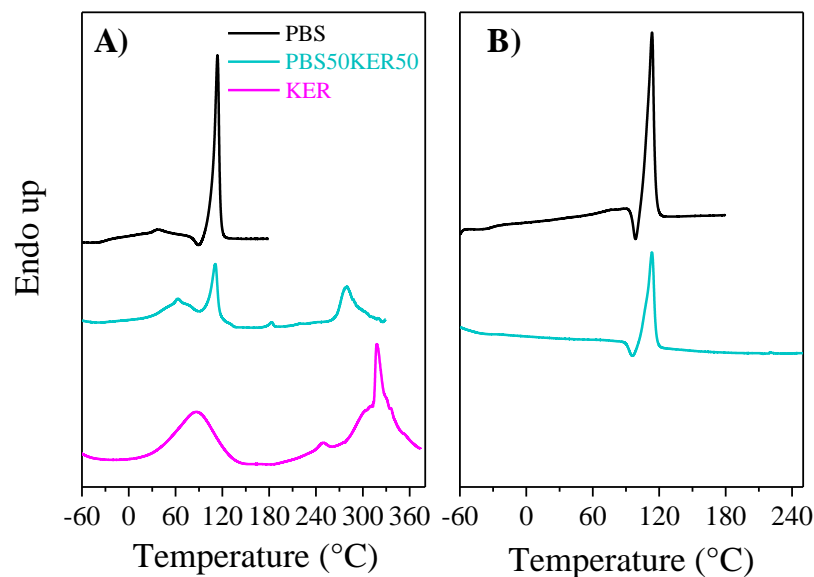


Figura 4.6. Curve DSC dei campioni PBS, KER e PBS50KER50: **A)** I scan (20 °C/min); **B)** Il scan (20 °C/min) dopo rapido raffreddamento dal fuso.

I campioni PBS e PBS50KER50 sono stati anche sottoposti a una seconda scansione calorimetrica dopo rapido raffreddamento “*quenching*” dal fuso. Dalle curve DSC corrispondenti si evidenzia, in entrambi i casi, un comportamento simile alla prima scansione: dopo la variazione endotermica della linea di base, associata alla transizione vetrosa, è possibile notare un intenso picco, legato alla fusione dei cristalli di PBS. Tale evidenza indica che in entrambi i casi, nelle condizioni sperimentali adottate, la velocità di raffreddamento dello strumento è risultata inferiore alla velocità di cristallizzazione dei segmenti BS.

4.4 Caratterizzazione meccanica

Le misure meccaniche *stress-strain* sono state eseguite su striscioline di *scaffold* di forma 50 x 5 x 0.1 mm, mediante misure di trazione, allungando un provino di forma rettangolare a velocità costante, e misurando la variazione dello sforzo in funzione della deformazione. Sono stati sottoposti a trazione solo i campioni PBS e PBS50KER50 perché, come già detto, la cheratina è risultata troppo rigida e fragile per poter elettrofilare un tappetino in grado di autosostenersi. Per ogni campione le

misure sono state effettuate su cinque provini diversi, riportando il risultato come valore medio delle 5 prove \pm deviazione standard. In Figura 4.7 sono rappresentate le curve sforzo-deformazione, mentre in Tabella 4.2 sono raccolti i valori di modulo elastico (E), di sforzo (σ_b) e deformazione (ϵ_b) a rottura, registrati durante le prove meccaniche a trazione.

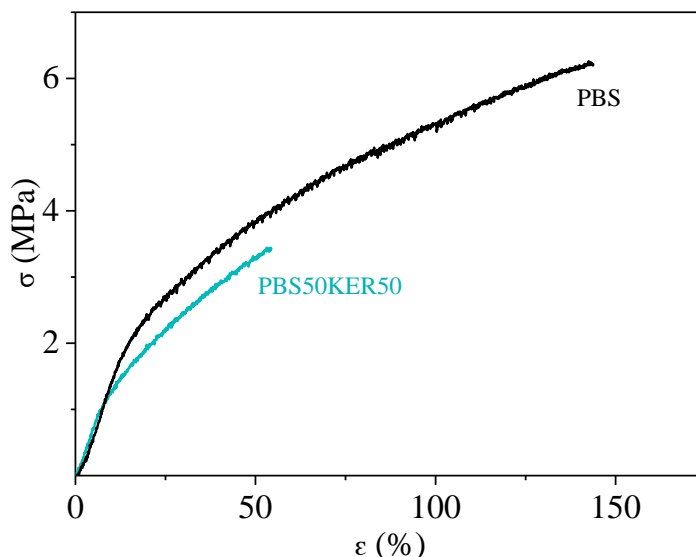


Figura 4.7. Grafico sforzo-deformazione dei campioni PBS e PBS50KER50.

Polimero	E (MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)
PBS	19.8 \pm 3.3	6.2 \pm 0.7	151 \pm 7
PBS50KER50	17.3 \pm 1.9	3.6 \pm 0.4	54 \pm 10

Tabella 4.2. Dati di caratterizzazione meccanica dei campioni PBS e PBS50KER50.

Si può notare (Figura 4.7 e Tabella 4.2) come i due campioni PBS e PBS50KER50 mostrino valori di modulo elastico (E) e tensione a rottura (σ_b) comparabili, a conferma del fatto che è stato possibile ottenere un nuovo materiale a base di cheratina processabile, con rigidità molto simile a quella dell'omopolimero PBS e decisamente inferiore a quella della cheratina. Per quanto riguarda l'allungamento a rottura, invece, esso risulta maggiore nel caso dello *scaffold* realizzato in solo PBS (151 vs. 54%, ovvero circa tre volte maggiore). Nello *scaffold* ottenuto miscelando PBS e cheratina il minore allungamento a rottura è ascrivibile alla presenza di due fasi difficilmente miscibili, che tendono a segregare se sottoposte a sforzi di tipo

meccanico. Occorre inoltre tenere presente che la cheratina è caratterizzata da deformazione a rottura praticamente nulla.

4.5 Studi di degradazione enzimatica

L'omopolimero di riferimento PBS e la blend PBS50KER50 sono stati sottoposti a esperimenti di degradazione enzimatica in condizioni fisiologiche di temperatura (37 °C) e di pH (7.4), in presenza di tripsina. Tali esperimenti sono stati condotti al fine di valutare la tempistica di degradazione di questi materiali nell'ottica di utilizzarli come biomateriali all'interno dell'organismo.

Lo studio del processo di degradazione ha previsto di sottoporre ogni campione incubato a misure di perdita di peso gravimetrico ad intervalli predeterminati, per un tempo complessivo di 17 giorni. I test sono stati condotti in triplicato. Il peso residuo percentuale è stato calcolato attraverso la seguente equazione:

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

dove m è il peso del campione registrato dopo il processo di degradazione mentre m_{in} è il peso iniziale. In Figura 4.8 sono riportati i pesi residui percentuali dei due campioni in funzione dei giorni di permanenza in soluzione tampone contenente l'enzima.

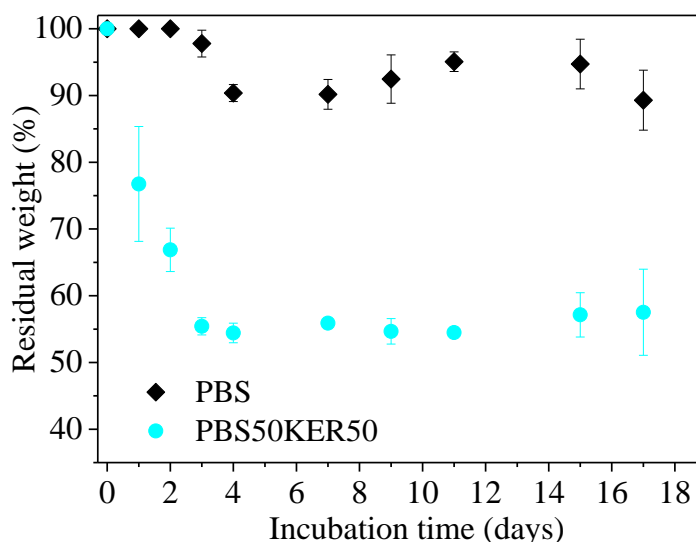


Figura 4.8. Peso residuo percentuale dei campioni PBS e PBS50KER50 in funzione del tempo di incubazione in tampone fosfato contenente l'enzima.

Come si può notare dalla Figura 4.8, per il PBS la perdita di peso gravimetrico è molto limitata all'interno della finestra temporale esplorata ($\approx 8\%$): tale evidenza è imputabile all'elevato grado di cristallinità e di perfezione dei cristalli, all'elevata temperatura di fusione, decisamente superiore a quella a cui sono stati condotti i test, ed infine all'idrofobicità del PBS.

Al contrario, il campione PBS50KER50 presenta un andamento molto diverso da quello dell'omopolimero PBS: dalla Figura 4.8 si può notare come già dopo soli tre giorni di incubazione, si osservi una graduale diminuzione del peso gravimetrico, che raggiunge un valore pari a $\approx 55\%$; dopo questa prima fase, la velocità di perdita di peso sembra raggiungere un valore di plateau, dal momento che per i restanti giorni il peso residuo è rimasto praticamente costante. Tale risultato è coerente con la degradazione della cheratina presente all'interno del campione, la quale in effetti degrada completamente entro tre giorni nelle medesime condizioni sperimentali (dati precedentemente ottenuti e non mostrati). Il peso gravimetrico residuo è in effetti in accordo con la quantità di poli(butilene succinato) presente nella blend.

4.6 Studi di biocompatibilità

L'omopolimero PBS e la blend PBS50KER50 sono stati sottoposti a test di vitalità cellulare utilizzando come linea cellulare una popolazione di fibroblasti provenienti da embrione di topo (NIH-3T3/GFP), secondo la procedura descritta nel Paragrafo 3.8.

In Figura 4.9 è riportato l'andamento della crescita cellulare sui materiali oggetto della presente Tesi, opportunamente sterilizzati, espresso come vitalità cellulare %. I dati sono rappresentati come percentuale di sopravvivenza rispetto alle stesse cellule cresciute su plastica per coltura cellulare a due diversi tempi di incubazione: 24 e 48 ore.

Dopo 24 ore di incubazione, è possibile osservare una buona adesione cellulare sia per il PBS che per la miscela PBS50KER50, benchè per quest'ultima la percentuale di adesione sia più elevata. I dati di proliferazione ottenuti a 48 ore presentano il medesimo trend, con valori di vitalità compresi tra il 67 e l'87% (rispetto al controllo: 120%). Occorre sottolineare che la presenza di cheratina favorisce la proliferazione.

Da questi dati preliminari si evince come entrambi i materiali oggetto della presente Tesi, siano in grado di supportare la crescita cellulare, risultando ottimi candidati per applicazioni in ambito di ingegneria tissutale.

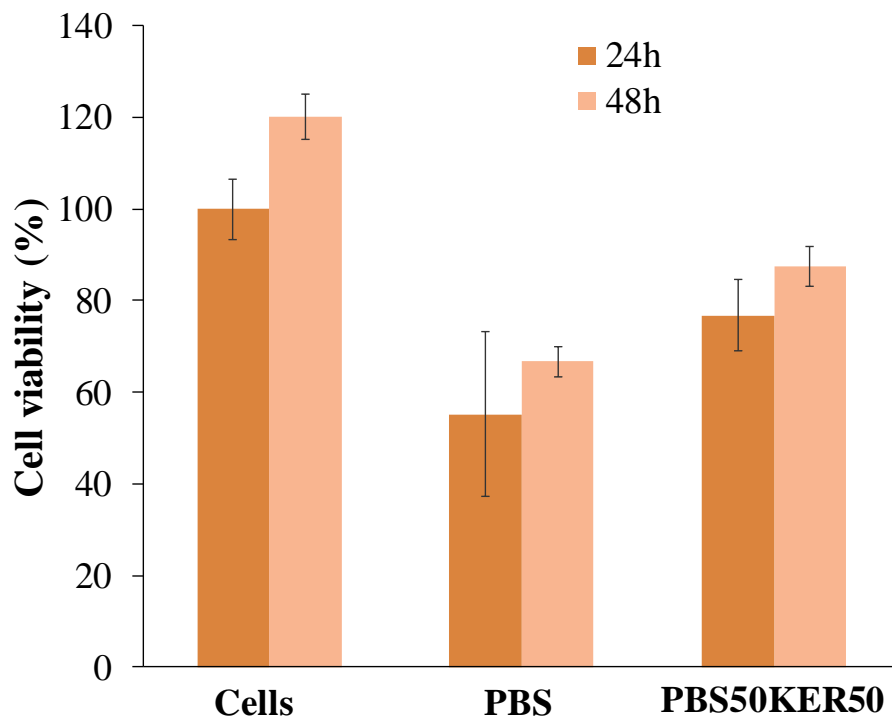


Figura 4.9. Vitalità cellulare sui campioni PBS e PBS50KER50 valutata dopo 24 e 48 ore di incubazione. Cellule coltivate su plastica per coltura cellulare (Cells) costituiscono il riferimento.

CAPITOLO 5: CONCLUSIONI

Le nuove tecnologie basate sull'impiego dell'ingegneria tissutale e di "impalcature" che consentano il corretto differenziamento delle cellule staminali sedimentate su di esse appare di grande interesse nel campo della medicina rigenerativa, e potrebbe garantire ottime prospettive a lungo termine nell'approccio e nel trattamento non solo di patologie di natura cronica, ma anche nell'intervento in seguito a danni d'organo acuti.

In particolare, la capacità di bioingegnerizzare cellule staminali in strutture funzionali molto complesse potrebbe far superare quelli che sono i due principali problemi nella medicina del trapianto: il rigetto immunitario e la carenza di organi disponibili. Lo *scaffold*, oltre a fornire un ambiente tridimensionale di sostegno, mette in contatto le cellule permettendo loro di "auto-assemblarsi". Questo dipende dalla cito-compatibilità, dalla biocompatibilità (tra i materiali dell'impianto e il corpo ospitante) e dall'adeguata vascolarizzazione, tale per cui le cellule all'interno della struttura 3-D vengano raggiunte dai nutrienti necessari per una sopravvivenza a lungo termine.

Con lo scopo di rispondere a queste richieste, abbiamo sviluppato biomateriali "smart" contraddistinti da architetture a livello nano-metrico e fibre disposte in modo random, capaci di stimolare la desiderata risposta cellulare (compatibilità citologica) nell'interfaccia con il biomateriale stesso, e capace di promuovere la biocompatibilità con il corpo ospitante. Usando la tecnica dell'*electrospinning*, abbiamo quindi progettato e realizzato strutture 3-D originali (*scaffolds*) che incorporano tale architettura "smart" e il sistema micro-fluidico che garantisce l'apporto del flusso dei nutrienti al suo interno.

In quest'ambito, i biomateriali rivestono un ruolo di grande importanza: all'interno di questa ampia famiglia, troviamo i biopolimeri e i polimeri di sintesi, ed in particolare i poliesteri alifatici. Tra i biopolimeri, la cheratina estratta dalla lana trova interessanti applicazioni nel settore biomedicale poiché, secondo quanto riportato in letteratura, membrane di cheratina rigenerata risultano facilmente biodegradabili in vivo e in vitro e potrebbero quindi essere utilizzate come *scaffolds* per le colture cellulari (nello specifico, per la proliferazione dei fibroblasti). La cheratina rigenerata ha tuttavia scarse proprietà meccaniche a causa del ridotto peso molecolare che ne determina

un limitata processabilità. Miscelando la proteina con un polimero biocompatibile è possibile migliorare la processabilità e le prestazioni meccaniche. Il poli(butilene succinato) (PBS) si è rivelato un ottimo candidato per tale scopo, essendo biocompatibile, biodegradabile e facilmente processabile.

Grazie al lavoro di ricerca qui descritto è stato infatti possibile realizzare un blend con performance meccaniche decisamente migliorate rispetto a quelle della cheratina, buona stabilità termica, biodegradabile e biocompatibile.

Gli obiettivi della ricerca sono stati dunque raggiunti: le proprietà meccaniche della cheratina risultano significativamente migliorate, senza detrimento di quelle già soddisfacenti.

In conclusione, le proprietà del materiale in oggetto si sono rivelate estremamente interessanti in vista di possibili applicazioni nel campo dell'ingegneria tissutale, nonostante i risultati ottenuti siano preliminari e rappresentino un punto di partenza. Il mescolamento dei due omopolimeri è avvenuto in soluzione, ovvero in presenza di solvente. L'ottenimento di cheratina termoplastica, ovvero lavorabile in fuso, rappresenterebbe un enorme passo in avanti ai fini di una industrializzazione del processo. Inoltre, le prove di biocompatibilità condotte nel presente studio sul nuovo materiale sono del tutto preliminari e condotte *in vitro*. Occorrono prove *in vivo* e *trials* clinici per valutare il reale utilizzo in medicina rigenerativa di questo nuovo biomateriale.

BIBLIOGRAFIA

- [1] F. J. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials today*, 2011, 14(3), 88-95.
- [2] M. R. Ladd, T. K. Hill, J. J. Yoo, S. Jin Lee, Electrospun Nanofibers in Tissue Engineering, in: *Nanofibers - Production, Properties and Functional Applications*, 2011, 347-372.
- [3] B. Grigolo, L. Roseti, M. Fiorini, L. De Franceschi, A. Facchini, Applicazioni dell'ingegneria tissutale: riparazione di lesioni cartilaginee con condrociti autologhi, *Reumatismo*, 2002, 54(4), 364-371.
- [4] F. Carini, M. Ciaravino, M. Baldoni, G. Tredici, Ingegneria tissutale e cellule staminali mesenchimali: protocollo sperimentale di rigenerazione parodontale, 2008, 19 (3), 203-209 <https://boa.unimib.it/retrieve/handle/10281/14385/55313/2008-03.pdf>.
- [5] M. Centola, K. H. Schuleri, A. C. Lardo, J. M. Hare, Stem cell therapy for myocardial regeneration: Mechanisms and current clinical applications, *Giornale Italiano di Cardiologia*, 2008, 9(4), 234-250.
- [6] E. Castellacci P. Lunati E. Orsoni, Tissue engineering: use of growth factors and stem cells in sports traumatology, *Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia* 2009, 35, 163-169.
- [7] C. Piconi, Biomateriali e dispositivi medici, *Studi & Ricerche*, 2014, 48-65.
- [8] R. Pietrabassa, Biomateriali per protesi e organi artificiali, Patròn editore, 141-143, 137-138.
- [9] M. Soccio, Sintesi, caratterizzazione e correlazioni proprietà-struttura di poliesteri innovativi per usi speciali, Dottorato di Ricerca in Chimica Industriale, 2008.

- [10] P. A. Gunatillake, R. Adhikari, Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *European Cells and Materials*, 2003, 5, 1-16.
- [11] Lü J. M., Wang X., Marin-Muller C., Wang H., Lin P. H., Yao Q., Chen C., Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2009, 9(4), 325-341.
- [12] 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*, 2016, 75, 431–460.
- [13] M. Fabbri, G. Guidotti, M. Soccio, N. Lotti, M. Govoni, E. Giordano, M. Gazzano, R. Gamberini, B. Rimini, A. Munari, Novel biocompatible PBS-based random copolymers containing PEG-like sequences for biomedical applications: From drug delivery to tissue engineering, *Polymer Degradation and Stability*, 2018, 153, 53 – 62.
- [14] M. Fabbri, M. Soccio, M. Gigli, G. Guidotti, R. Gamberini, M. Gazzano, V. Siracusa, B. Rimini, N. Lotti, A. Munari, Design of fully aliphatic multiblock poly(ester urethane)s displaying thermoplastic elastomeric properties, *Polymer*, 2016, 83, 154 – 161.
- [15] J. G. Rouse, M. E. Van Dyke, A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications, *Materials*, 2010, 3, 999–1014.
- [16] K. G. De Frates, R. Moore, J. Borgesi, G. Lin, T. Mulderig, V. Beachley, X. Hu, Protein-based fiber materials in medicine: a review, *Nanomaterials*, 2018, 8, 457.
- [17] B. Srinivasan, R. Kumar, K. Shanmugam, U. Tiruchiarapalli Sivagnam, N. Puiy Reddy, P. Kumar Sehgal, Porous Keratin scaffold-promising biomaterial for tissue engineering and drug delivery, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2009, 92, 5-12.

- [18] X. Mia, H. Xub, Y. Yang, Submicron amino acid particles reinforced 100% keratin biomedical films with enhanced wet properties via interfacial strengthening, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019, 177, 33–40.
- [19] T. Posati, D. Giuri, M. Nocchetti, A. Sagnella, M. Gariboldi, C. Ferroni, G. Sotgiu, G. Varchi, R. Zamboni, A. Aluigi, Keratin-hydroxylapatite hybrid films for drug delivery applications, *European Polymer Journal*, 2018, 105, 177–185.
- [20] A. Aluigi, C. Vineis, A. Varesano, G. Mazzucchetti, F. Ferrero, C. Tonin, Structure and properties of keratin/PEO blend nanofibers, *European Polymer Journal*, 2008, 44, 2465-2475.
- [21] J. Li, Y. Li, L. Li, A. F. T. Mak, F. Ko, L. Oin, Preparation and biodegradation of electrospun PLLA/keratin nonwoven fibrous membrane, *Polymer Degradation and Stability*, 2009, 94(10), 1800-1807.
- [22] C. E. Tanase, I. Spiridon, PLA/chitosan/keratin composites for biomedical applications, *Materials Science and Engineering: C*, 2014, 40, 242-247.
- [23] A. Edwards, D. Jarvis, T. Hopkins, S. Pixley, N. Bhattarai, Poly(ϵ -caprolactone)/keratin-based composite nanofibers for biomedical applications, *Journal of Biomedical Materials Research, part B: Applied Biomaterials*, 2015, 103, 1-30.

RINGRAZIAMENTI

Questo bellissimo percorso che è stato il mio studio di Tesi non sarebbe stato possibile grazie alla carissima professoressa Nadia Lotti, che vorrei ringraziare non solo per avermi dato l'opportunità di lavorare così vicino al mondo della Chimica, ma soprattutto per ogni singola lezione in cui mi ha dimostrato quanto può essere bello studiare, se lo si fa con passione e curiosità. Grazie di cuore all'ingegnere Giulia Guidotti, che ha saputo guidarmi con gentilezza e affetto, mostrandosi fin da subito più un'amica che un semplice allaccio con un docente universitario. Grazie alla dottoressa Annalisa Aluigi, che ha contribuito a rendere possibile questo studio, accompagnandomi con professionalità e passione nelle bellissime ore trascorse in laboratorio.

Grazie mamma, perché nonostante tutte le liti e gli scontri, sei diventata la mia migliore amica e più intima confidente, una complice meravigliosa e un modello di riferimento.

Grazie papà per il tuo costante supporto; sono orgogliosa di essere come te e avere la tua determinazione. Spero mi possano portare lontano almeno quanto hanno portato lontano te.

Grazie Antonio, perché sei stato in grado di tirare fuori da me la forza di resistere ogni volta che mi lasciavo prendere dalla malinconia, e hai creduto in me più di quanto sarei mai stata in grado di fare io stessa. Grazie per essere stato ed essere il mio porto sicuro.

Grazie Andrea, perché sei stato il mio primo compagno di giochi, il primo rivale e migliore amico, e la tua costante presenza nella mia vita è una sicurezza di cui mai riuscirei a fare a meno.

Grazie Nonna Rina, Nonna Teresa, Nonno Peppe e Nonno Antonio per avermi sempre coccolata e viziata, per essere stati ed essere dei nonni dolcissimi e dei

modelli di riferimento, ma soprattutto per avermi trasmesso più di chiunque altro solidi valori, come il rispetto, il sacrificio, l'amore per il prossimo e per la famiglia.

Grazie ai miei fantastici zii Alberto, Grazia, Paolo, Ida, Daniela, Francesca, Gianni e Fiorenza per quell'affetto che mi avete sempre riservato, e che col passare degli anni non è mai cambiato.

Un grazie doveroso va ai miei adorati figli a quattro zampe: Ettore e Simba. L'amore che solo un cane è in grado di donarti è un qualcosa che non capisci finché non lo provi sulla tua pelle, e che voi due mi ricordate ogni singola volta in cui vi guardo in quegli occhietti languidi, vogliosi di affetto e di cibo.

Grazie alla mia meravigliosa squadra di nuoto, per le risate e le vittorie, per gli scontri e le sconfitte che abbiamo condiviso insieme; grazie al mio fantastico allenatore, cui mi sono affezionata più di quanto potessi immaginare.

Grazie, infine, ai miei due amici di sempre, Giusy e Giampy: non importa quanto tempo possa passare senza sentirci, ogni volta che parlo con voi è come se quel tempo non sia mai passato.

Il mio percorso universitario non è che al giro di boa, ma sono sicura che la consapevolezza di me stessa che ho acquistato in questi anni mi aiuterà ancora di più ad affrontare di petto i prossimi ostacoli senza lasciarmi abbattere, specialmente se sarò accompagnata e supportata ancora da tutte le persone speciali che sono state elencate fino ad adesso. Qualcosa mi dice che sarà così.

Ad maiora.