

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**SCAFFOLD BIOCOMPATIBILE OTTENUTO DA COPOLIESTERE
MULTIBLOCCO DEL PBS PER APPLICAZIONI NELL'INGEGNERIA
TISSUTALE DEL MIOCARDIO**

Elaborato in:

FONDAMENTI DI CHIMICA

Relatore:

Prof.ssa Nadia Lotti

Presentata da:

Manal Ezzahiri

Correlatori:

Michelina Soccio

Silvia Quattrosoldi

Anno accademico 2018/19

Sessione III

Sommario

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE	1
1.1 Patologie cardiache e terapie tradizionali	1
1.2 Ingegneria tissutale	3
1.2.1 <i>Scaffold</i>	4
1.2.2 Cellule staminali	5
1.2.3 Elettrofilatura	8
1.3 Biomateriali	11
1.4 Polimeri	13
1.4.1 Struttura dei polimeri	14
1.4.2 Tecniche di polimerizzazione	15
1.4.3 Proprietà dei polimeri.....	17
1.4.3.1 Peso molecolare	17
1.4.3.2 Cristallinità.....	18
1.4.3.3 Proprietà termo-meccaniche	19
1.4.4 Poliesteri alifatici	21
1.4.4.1 Poliesteri alifatici per uso biomedicale	21
1.5 Copolimeri	25
1.5.1 Copolimeri statistici	26
1.5.2 Copolimeri a blocchi.....	27
1.6 Poli(butilene succinato) (PBS)	29
1.6.1 Copolimeri a base di PBS	30
1.6.2 Neopentilglicole	31
1.7 Biodegradazione	31
1.8 Degradazione idrolitica	32
CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI	34
CAPITOLO 3 – METODI E MATERIALI UTILIZZATI	36
3.1 Sintesi	36
3.1.1 Realizzazione di film	39
3.1.2 Realizzazione di <i>scaffold</i>	39
3.2 Caratterizzazione molecolare	40
3.2.1 Risonanza magnetica nucleare (NMR)	40
3.2.2 Cromatografia a permeazione su gel (GPC)	44
3.3 Caratterizzazione termica	46
3.3.1 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	46
3.3.2 Termogravimetria (TGA).....	48
3.3.3 Diffrattometria a raggi X.....	49
3.4 Caratterizzazione meccanica	51
3.4.1 Misure stress-strain a rottura e cicliche.....	51
3.5 Prove di degradazione idrolitica	54
3.6 Microscopico elettronico a scansione (SEM)	55

<i>CAPITOLO 4 – RISULTATI E DISCUSSIONE</i>	57
4.1 Caratterizzazione molecolare dei polimeri idrossil-terminati PBS-OH e P(BSNS)-OH e del copolimero multiblocco PBSP(BSNS)	57
4.2 Caratterizzazione morfologica degli <i>scaffold</i>	60
4.3 Analisi termogravimetrica (TGA)	61
4.4 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	62
4.5 Analisi diffrattometrica a raggi X	64
4.7 Degradazione idrolitica.....	68
<i>CAPITOLO 5 – CONCLUSIONE</i>	70
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	72

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE

1.1 Patologie cardiache e terapie tradizionali

Nell'ultimo secolo le morti causate da malattie cardiovascolari sono aumentate esponenzialmente, a causa di una serie di fattori legati allo stile di vita (fumo, dieta scorretta, ipertensione, diabete, consumo eccessivo di alcool), ma anche a cambiamenti economici, sociali e culturali che hanno interessato i Paesi più industrializzati. Questi hanno provocato un preoccupante incremento dei fattori di rischio che portano a tali patologie ⁽¹⁾. In particolare, le malattie più gravi sono l'infarto miocardico e l'ictus (Figura 1.1). L'American Heart Association riferisce che 635.000 americani vengono colpiti ogni anno da infarto miocardico e che il numero di decessi attribuibili allo scompenso cardiaco negli Stati Uniti nel 2009 è stato di 275.000. Inoltre, circa 61 milioni di americani (quasi un quarto della popolazione) convivono con malattie cardiovascolari, come cardiopatia coronarica, difetti cardiovascolari congeniti e insufficienza cardiaca congestizia ⁽²⁾.

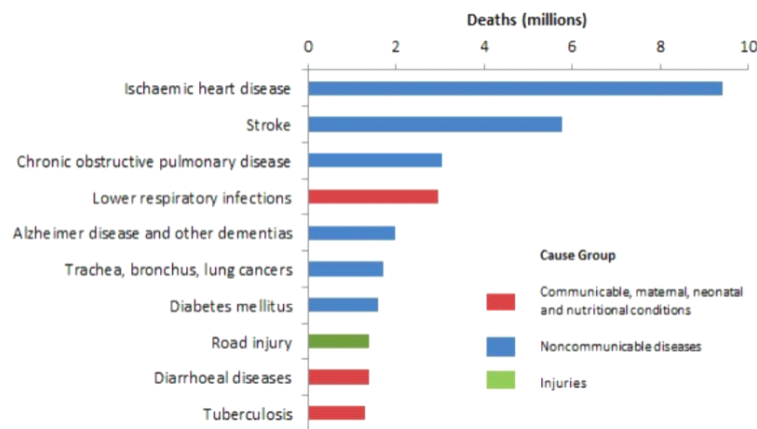


Figura 1.1. Le 10 principali cause di morte nel mondo nel 2000 (Fonte: World Health Organization).

L'infarto acuto può essere provocato dalla rottura di una placca aterosclerotica e dalla conseguente formazione di un trombo ricco di piastrine e di fibrina che porta all'immediata occlusione di un'arteria coronarica (Figura 1.2). Come conseguenza si ha la necrosi o morte del tessuto muscolare irrorato dall'arteria ostruita. Nei casi più gravi può complicarsi sino al collasso cardiocircolatorio e alla morte. L'ictus invece è una lesione cerebrovascolare causata dall'interruzione del flusso di sangue al cervello. Questo è causato da ischemia o da emorragia. Quando un'arteria che porta

sangue al cervello, o una sua diramazione in tale organo, si rompe o si ostruisce interrompendo il flusso di sangue, le cellule cerebrali private di ossigeno e dei nutrienti necessari, anche solo per pochi minuti, cominciano a morire. Si tratta della prima causa di invalidità negli adulti, può portare al coma o alla morte e si manifesta sovente come evento acuto, specie in soggetti affetti da ipertensione grave non adeguatamente trattata.

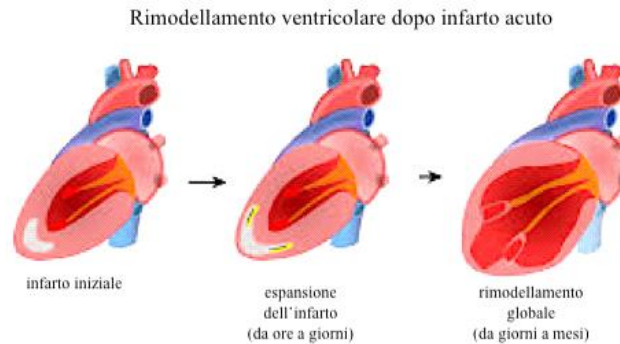


Figura 1.2 Rimodellamento ventricolare post-infartuale

1.1.2 Terapie e trattamenti maggiormente utilizzati

L'intervento per il trattamento dell'infarto miocardico più utilizzato ed efficace è la resezione ventricolare, ovvero un rimodellamento del ventricolo sinistro sovradimensionato, per ripristinare la forma e la dimensione originale del cuore. Nel caso di restrizione o occlusione delle arterie coronariche invece si procede con il bypass: si crea un ponte artificiale costituito da un tratto di vaso sanguigno sano, che aggira la parte non funzionante. Il sangue dunque riaffluisce al cuore attraverso questi nuovi segmenti vasali (Figura 1.3). Ci sono infine dispositivi di assistenza ventricolare sinistra, i pacemaker, che ripristinano la funzionalità cardiaca per limitare il progredire della malattia.

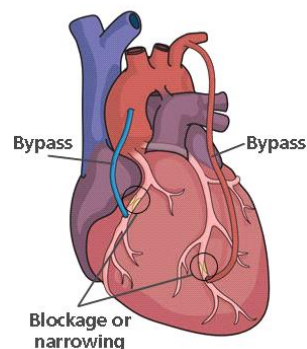


Figura 1.3 Esempio di *bypass*

1.2 Ingegneria tissutale

Il trattamento chirurgico delle malattie cardiovascolari spesso è ostacolato dalla mancanza di tessuto autologo, necessario per la realizzazione di bypass di vasi occlusi o malati e del muscolo cardiaco danneggiato. Il materiale d'innesto di origine sintetica, dunque, ricopre un ruolo fondamentale per sopperire a questa mancanza. Tuttavia, esso presenta una serie di problematiche legate al fatto che, a differenza del tessuto originale, presenta elevati rischi di trombosi, deposizione di calcio e impossibilità di crescere e rigenerarsi ⁽³⁾. Per questi motivi negli ultimi anni la disciplina dell'ingegneria dei tessuti si è sviluppata sempre più.

L'ingegneria tissutale rappresenta il primo settore terapeutico interdisciplinare che integra biologia cellulare/molecolare, scienza dei materiali, chimica, fisica, ingegneria industriale e medicina. Ha come scopo la riparazione e la sostituzione di tessuti e organi danneggiati da malattie, traumi o invecchiamento, restituendone l'integrità e la funzionalità ⁽⁴⁾.

La triade vincente dell'ingegneria tissutale è costituita da cellule staminali, regolatori di crescita e *scaffold*.

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate che, in determinate condizioni, si specializzano e si sviluppano in organi e tessuti. In particolare, l'accelerazione di questo processo di differenziamento è regolato dai fattori di crescita (molecole bioattive o proteine morfogeniche), specifici per ogni tipo di tessuto. Infine, ci sono gli *scaffold*, supporti meccanici e funzionali in 2D o 3D, in grado di ospitare e promuovere l'accrescimento e il differenziamento delle cellule staminali ⁽⁴⁾. Vengono progettati con materiali e geometrie che favoriscono sia la rigenerazione del tessuto danneggiato che il successivo riassorbimento e la sostituzione del nuovo tessuto. Lo *scaffold* infatti rappresenta una struttura temporanea che ospita le cellule e ne promuove la rigenerazione nella giusta direzione. È importante dunque che sia biocompatibile e citocompatibile, con idonee proprietà meccaniche e tempi di degradazione adeguati.

La procedura che porta alla realizzazione di tale struttura 3D si può suddividere in diversi step: isolamento delle cellule dall'ambiente biologico, espansione della coltura in vitro, semina delle cellule in coltura su *scaffold* all'interno di un bioreattore, ed infine impianto dello stesso *scaffold* nel corpo del paziente (Figura 1.4).



Figura 1.4. Procedura di realizzazione dello *scaffold*.

1.2.1 Scaffold

Nella progettazione degli *scaffold* bisogna tener conto di vari requisiti. Deve possedere proprietà meccaniche appropriate, in modo da poter fornire le giuste sollecitazioni meccaniche al tessuto in formazione, nonché una struttura superficiale adeguata a permetterne l'adesione cellulare. Vanno considerati fattori quali la porosità e la permeabilità, per permettere il rilascio di fattori di crescita e sostanze nutritive, quindi va studiato adeguatamente il materiale da utilizzare per produrlo ⁽³⁾. Le principali caratteristiche dei materiali impiegabili sono la biocompatibilità e la biodegradabilità e, nella categoria descritta, rientrano:

- metalli (acciai inossidabili, leghe di cobalto, leghe di titanio)
- ceramici (allumina, zirconia, fosfato di calcio, biovetri)
- polimeri naturali
- polimeri sintetici
- compositi
- idrogel

La struttura dello *scaffold* contribuisce significativamente allo sviluppo di specifiche funzioni biologiche nei tessuti, in quanto fornisce appropriate condizioni nutrizionali e organizzazioni spaziali per la crescita cellulare; più il materiale è poroso, più sarà facilitata la diffusione di nutrimenti verso le cellule. Tuttavia, anche se la porosità della matrice è alta, il trasporto dei materiali e la migrazione cellulare sarà infatti inibita se i pori non sono interconnessi ⁽³⁾. La continuità dei pori è dunque un fattore importante da considerare, insieme al fatto che la loro struttura può variare nel corso del tempo in vivo. Se le matrici sono biodegradabili, come nel caso di matrici PLA e PGA, la grandezza media dei pori aumenterà e si creeranno degli ostacoli

all'interno della struttura. Se la matrice non si degrada, si ridurrà l'effettiva ampiezza dei pori a causa dei fenomeni che possono realizzarsi in vivo come l'occupazione dei pori da parte di tessuti fibrosi.

Dal punto di vista meccanico, lo *scaffold* deve avere una resistenza tale per cui la sua struttura venga mantenuta anche dopo l'impianto, in particolare nel caso di ricostruzioni di tessuti che supportano un carico, come ossa e cartilagine; in applicazioni cardiovascolari, per interfacciarsi efficacemente con il tessuto cardiaco, gli *scaffold* devono presentare elevata contrattilità e flessibilità e, contemporaneamente, devono essere abbastanza robusti da resistere alle elevate pressioni che si generano all'interno dei vasi sanguigni durante le pulsazioni ⁽³⁾.

Deve inoltre avere buone proprietà di lavorabilità in modo tale da poter acquisire varie configurazioni ed essere progettato in modo da contenere additivi o agenti attivi per una crescita più rapida del tessuto o per una maggiore compatibilità.

Infine, a livello di produzione, esistono diversi metodi per creare uno *scaffold*. Dal punto di vista commerciale è importante che la produzione sia economicamente vantaggiosa e facilmente traslabile su larga scala ⁽³⁾.

1.2.2 Cellule staminali

Le cellule staminali rappresentano uno strumento estremamente efficace per il trattamento delle malattie cardiache, in particolare per lo sviluppo di terapie per l'insufficienza miocardica cronica e per il danno miocardico ischemico acuto. Entrambe le patologie sono altamente irreversibili, in quanto possiedono proprietà particolari associabili alla rigenerazione di tessuti.

Le cellule staminali sono per definizione cellule indifferenziate in grado di replicarsi per periodi indefiniti mantenendo lo stato indifferenziato e, in seguito a particolari stimoli, sono in grado di generare uno o più tipi cellulari diversi ⁽⁵⁾. Le cellule staminali presentano due tipi di replicazione diversa: simmetrica e asimmetrica. La prima replicazione prevede la generazione di due cellule figlie identiche che possono essere entrambe staminali o progenitrici, ovvero che vanno incontro a differenziamento. La seconda invece dà origine a due cellule figlie, di cui una conserva le caratteristiche di staminalità mentre l'altra sarà progenitrice.

In base alla loro capacità di differenziazione, le cellule staminali vengono classificate in:

- totipotenti: capaci di generare tutti i tessuti embrionali ed extraembrionali. Solo lo zigote possiede questa capacità ⁽⁶⁾.
- pluripotenti: sono in grado di generare i tre strati germinali che costituiscono la matrice embrionale di tutte le cellule del corpo, endoderma, mesoderma, ectoderma ⁽⁶⁾.
- multipotenti: sono in grado di specializzarsi unicamente in alcuni tipi di cellule. Hanno il compito di sostituire cellule differenziate che vengono perse attraverso fenomeni di deplezione o a causa di danneggiamenti cellulari ⁽⁶⁾.
- unipotenti: si differenziano in un unico tipo cellulare e hanno la peculiarità di auto-rinnovarsi, garantendo la riparazione il mantenimento dei tessuti sani ⁽⁶⁾.

Le cellule staminali possono essere anche classificate in base alla loro provenienza in:

- embrionali
- da cordone ombelicale o sangue placentare
- adulte

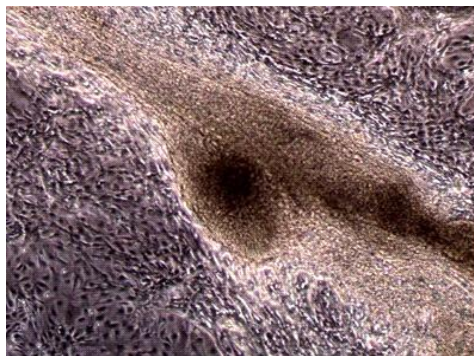


Figura 1.5 Esempio di differenziamento in vitro di cellule staminali verso cardiomiociti

La caratteristica principale delle cellule staminali embrionali è l'elevata potenzialità di differenziarsi in qualsiasi tipo cellulare. In vitro le cellule staminali embrionali sono capaci di differenziarsi in neuroni, muscolo liscio, muscolo scheletrico e cardiomiociti (Figura 1.5). Il differenziamento in cardiomiociti avviene attraverso tre stadi: il precoce, l'intermedio e il tardivo. Nello stadio precoce, sono prodotte cellule con attività contrattile (pacemaker like cells); nello stadio intermedio si sviluppano cellule atriali, ventricolari e cellule del sistema

di conduzione; durante lo stadio terminale, sono ben distinguibili miofibrille con bande A, I e Z e dischi intercalati che contengono desmosomi e gap junctions⁽⁷⁾.

Recentemente alcuni autori hanno dimostrato che i cardiomiociti, derivanti dalle cellule staminali embrionali, hanno proprietà elettrofisiologiche, strutturali e contrattili identiche a quelle dei cardiomiociti adulti. È stato dimostrato in vivo la differenziazione delle cellule embrionali in cardiomiociti e cellule endoteliali, capaci di integrarsi elettromeccanicamente nel tessuto miocardico ospite (Figura 1.6). Le problematiche legate all'utilizzo di queste cellule sono principalmente le potenziali reazioni di rigetto, insieme alla difficoltà di ottenere popolazioni cellulari pure. Oltre a ciò si devono anche considerare gli aspetti etici dell'impiego di embrioni umani e la tumorigenicità di questo tipo di cellule, capaci di formare teratomi cellulari a causa dell'elevata capacità proliferativa. Tuttavia, recenti ricerche hanno dimostrato in vivo l'elevata cardiomioplasticità delle cellule staminali embrionali senza reazioni di rigetto e di formazioni neoplastiche in condizioni di xenotrapianto. Tale fenomeno potrebbe essere legato al debole potenziale immunogenico delle cellule staminali embrionali e alla presenza di stimoli differenziativi cardiaco-specifici provenienti dal tessuto ospite⁽⁷⁾.

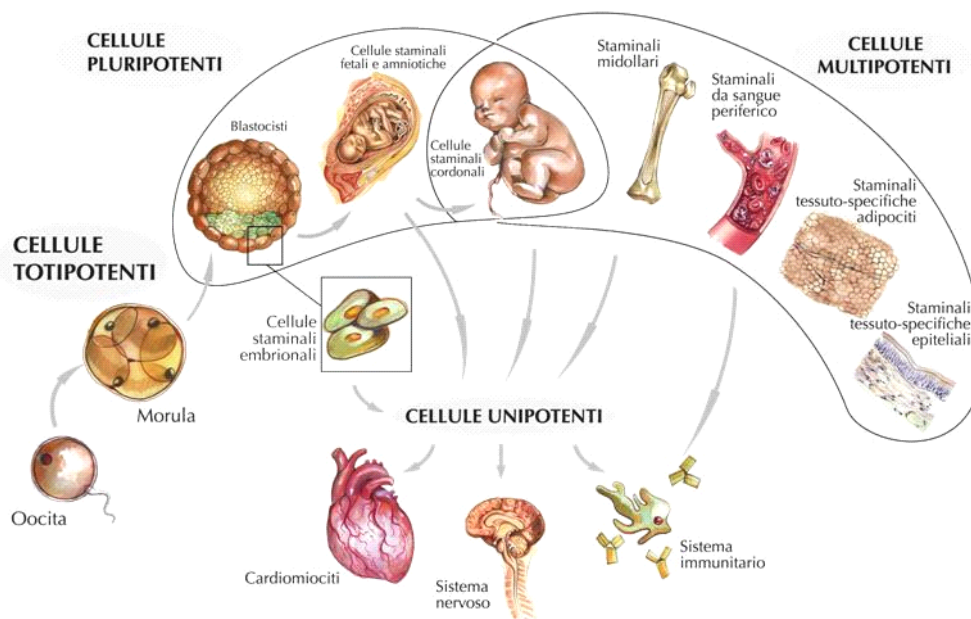


Figura 1.6 Differenziazione cellule staminali

(fonte: Smart Bank Scientific)

1.2.3 Elettrofilatura

L'elettrofilatura (*electrospinning*) è un processo mediante il quale un polimero in soluzione o fuso può essere filato in fibre di piccolo diametro, grazie ad un campo elettrico ad alto potenziale (Figura 1.7). Mentre con i metodi tradizionali (ad esempio filatura a secco e filatura ad umido) si possono ottenere al massimo fibre con diametro compreso tra 5 e 500 μm , le fibre prodotte con l'elettrospinning hanno diametri variabili tra 3 nm e 4 μm . Questi diametri conferiscono alle fibre eccezionali caratteristiche, quali una superficie molto grande in rapporto al volume, flessibilità nelle funzionalità di superficie, prestazioni meccaniche (durezza, resistenza a trazione, ecc.) superiori rispetto a qualsiasi altra, rendendole ottime candidate per varie applicazioni in ambito biomedico.

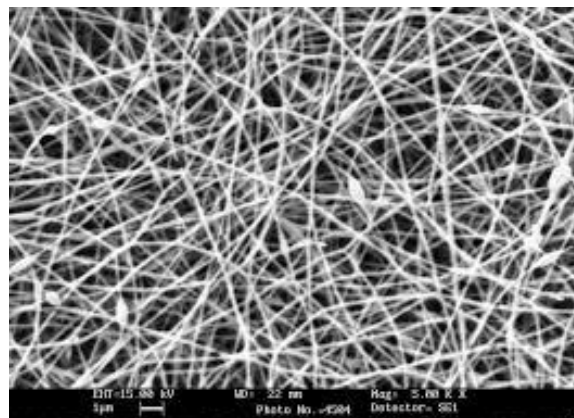


Figura 1.7 Immagine al microscopio elettronico a scansione (SEM) di nanofibre elettrofilate

L'elettrofilatura viene effettuata mediante uno strumento composto da una pompa, una siringa, una sorgente di alta tensione ed un collettore.

Il polimero, fuso o in soluzione, si trova in una siringa collegata alla filiera (spinneret), attraverso la quale viene fatto passare con un flusso costante e controllabile. Viene applicata un'alta differenza di potenziale tra il capillare della siringa e il collettore (generalmente tra 1kV e 30 kV), che porta alla formazione di una goccia di polimero in estrusione in punta alla filiera. Quando la tensione aumenta, la goccia risente di forze repulsive tra le sue cariche superficiali e della forza di Coulomb esercitata dal campo magnetico esterno, che fanno acquisire alla goccia una forma conica (cono di Taylor). Quando il campo magnetico supera un certo valore, le forze elettrostatiche prevalgono sulla tensione superficiale della goccia di polimero causando l'espulsione di un getto di liquido; il solvente, percorrendo la distanza

verso il collettore, evapora, incrementando la carica superficiale del getto, che induce un'instabilità di quest'ultimo, il quale subisce un processo di stiramento (whipping motion), portando alla formazione di un filo sottile. Attratta dal collettore a terra, la fibra carica vi si deposita sopra con orientazione casuale ⁽⁸⁾ (Figura 1.8).

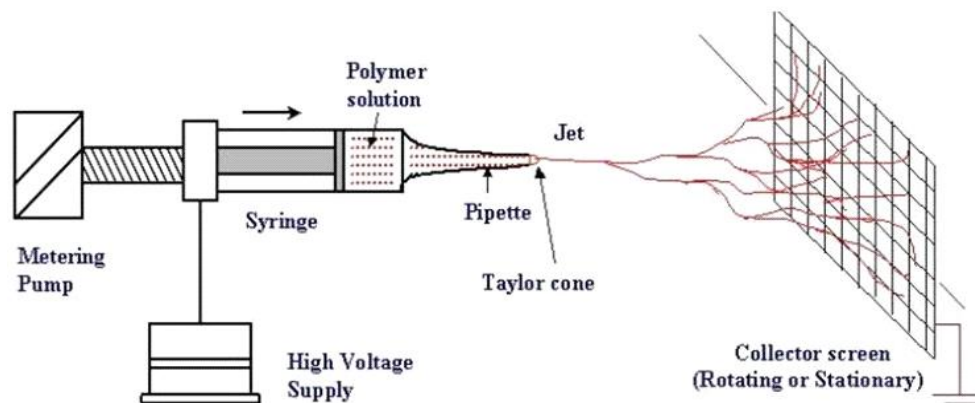


Figura 1.8 Elettrospinning set-up

La morfologia delle nanofibre, in termini di valore medio del diametro, distribuzione dei diametri e presenza o meno di difetti, dipende da tre parametri principali:

- **parametri di soluzione**

- concentrazione: la soluzione di partenza deve avere una concentrazione nè troppo alta, perchè si otterrebbe un insieme di fibre e granelli, nè troppo bassa, perchè diventerebbe impossibile mantenere un flusso costante a livello della punta dell'ago. In generale al crescere della concentrazione aumenta il diametro della fibra (Figura 1.9);
- peso molecolare: il peso molecolare è un indice delle caratteristiche morfologiche della fibra e si è osservato che più è grande, minore sarà la formazione dei granelli e maggiore sarà il diametro finale della fibra;
- viscosità: se la viscosità della soluzione è troppo bassa non si ottengono fibre continue, se è troppo alta viene ostacolata l'estrusione del materiale;
- tensione superficiale: minore è la tensione superficiale del solvente, maggiore è la probabilità di ottenere fibre prive di granuli, ed è possibile operare con campi elettrici inferiori;

- conduttività/densità superficiale di carica: all'aumentare della conducibilità elettrica della soluzione si verifica un aumento del diametro della fibra, mentre viceversa, una conducibilità troppo bassa implica una forza elettrica insufficiente, che non consente l'elongazione del getto e la formazione di una fibra uniforme;

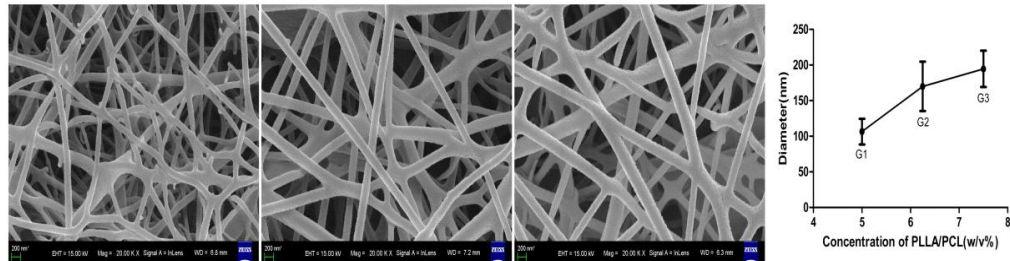


Figura 1.9 Aumento del diametro della fibra all'aumentare della concentrazione della soluzione.

- **Parametri del processo:**

- **voltaggio:** il processo di elettrofilatura inizia ad una certa tensione, detta di soglia, che dipende dalla distanza tra ago e collettore ed è in grado di indurre la polarizzazione della soluzione;
- **velocità di flusso:** la velocità di alimentazione della siringa influenza la velocità del getto e quindi il processo di evaporazione del solvente. Se i flussi sono troppo veloci si formano fibre granulose, perchè il solvente non riesce ad evaporare completamente prima che la soluzione raggiunga il collettore;
- **collettore:** è lo schermo metallico adibito al raccoglimento della fibra polimerica rimanente dopo l'evaporazione del solvente ed è generalmente costituito da alluminio. A seconda che il conduttore sia fisso o mobile, sarà possibile ottenere fibre distribuite in maniera random, oppure allineate;
- **distanza tra ago e collettore:** è necessario stabilire una distanza minima per consentire l'adeguata evaporazione del solvente, tuttavia non dev'essere troppo elevate perchè la fibra deve riuscire a raggiungere il collettore;

- **Parametri ambientali:**

- temperatura: la temperatura influenza la viscosità della soluzione; aumentandola, diminuisce la viscosità e questo provoca la diminuzione del diametro della fibra;
- umidità: influisce sulla volatilità del solvente; al diminuire dell'umidità aumenta la velocità di evaporazione del solvente, che può però superare la velocità di estrusione, rendendo impossibile l'elettrofilatura. L'umidità influisce anche sulla carica e sulla tensione superficiale;

I materiali che ad oggi vengono sottoposti a processi di elettrofilatura sono: i polimeri naturali, i polimeri sintetici, i compositi, i ceramici, i semiconduttori. Alla luce di queste considerazioni, risulta chiaro il ruolo di fondamentale importanza attribuito a questa tecnologia all'interno dell'ambito biomedicale.

1.3 Biomateriali

La definizione di biomateriale è stata cambiata spesso nel tempo, addirittura 19 volte. La definizione attualmente accettata e utilizzata è quella stabilita nel 1991 durante la *II International consensus conference on biomaterials*, tenutasi a Chester (Inghilterra): «Si definisce biomateriale un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici al fine di valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo»⁽⁹⁾.

La scelta del biomateriale è influenzata da molteplici fattori, quali la funzionalità, le proprietà tecnologiche (lavorabilità, costi di lavorazione...) e chimico-fisiche. Queste ultime si dividono in:

- 1) **proprietà chimico-strutturali**: tipo di legame interatomico, reticolo cristallino (ordine di reticolo, presenza relativa di difetti), composizione chimica e omogeneità, caratteristiche superficiali;
- 2) **proprietà fisico-meccaniche**: risposta a sollecitazioni semplici, statiche e dinamiche, viscoelasticità, durezza, attrito superficiale, resistenza all'usura;
- 3) **proprietà termiche**: temperatura di transizione, calore di fusione, conducibilità termica, espansione termica;
- 4) **proprietà elettriche**: conducibilità, resistività, costante dielettrica, piezoelettricità;
- 5) **proprietà elettrochimiche**: facilità di corrosione elettrochimica;
- 6) **altre proprietà**: ottiche, acustiche, capacità di assorbimento dei raggi X, densità, porosità, capacità diffusionali.

I biomateriali sono suddivisi in cinque macrocategorie:

- biomateriali metallici: caratterizzati da legame metallico che assicura ottime proprietà meccaniche quali resistenza all'usura. Tuttavia, sono soggetti a corrosione e poco biocompatibili, perciò sono generalmente utilizzati per applicazioni protesiche di carico ⁽⁹⁾;
- biomateriali polimerici: caratterizzati da una grande duttilità che rende facile la lavorabilità e sono molto versatili nelle applicazioni. Hanno però scarse capacità meccaniche ⁽⁹⁾;
- biomateriali ceramici: sono estremamente biocompatibili e resistono alla corrosione, ma sono materiali di tipo fragile, il che implica una bassa lavorabilità e scarsa resistenza a trazione (ma buona compressione). Sono generalmente utilizzati come rivestimento, soprattutto di parti che devono resistere ad attrito ⁽⁹⁾;
- biomateriali compositi: si tratta di strutture costituite da più materiali e dunque ottimizzate. Hanno una matrice generalmente polimerica e molto tenace (che costituisce più del 50% del corpo) e fibre che danno robustezza al materiale ⁽⁹⁾;
- biomateriali tessuti biologici: sono i materiali più biocompatibili in assoluto, ma sono difficili da mantenere in condizioni ottimali nel tempo ⁽⁹⁾;

Affinchè un biomateriale sia considerato tale deve essere biocompatibile e affidabile. Per biocompatibilità s'intende la capacità del materiale di interagire biologicamente e biochimicamente con il tessuto vivo che lo circonda e con gli altri organi del soggetto, senza che si degradi prima della che il tessuto si sia rigenerato. Inoltre, i prodotti di degradazione non devono essere tossici. La biocompatibilità è proprietà importantissima in quanto il sistema immunitario in presenza di corpi estranei reagisce in maniera negativa. L'affidabilità consiste invece nella capacità del dispositivo di mantenere le proprie funzioni nel tempo e/o con l'uso ripetuto.

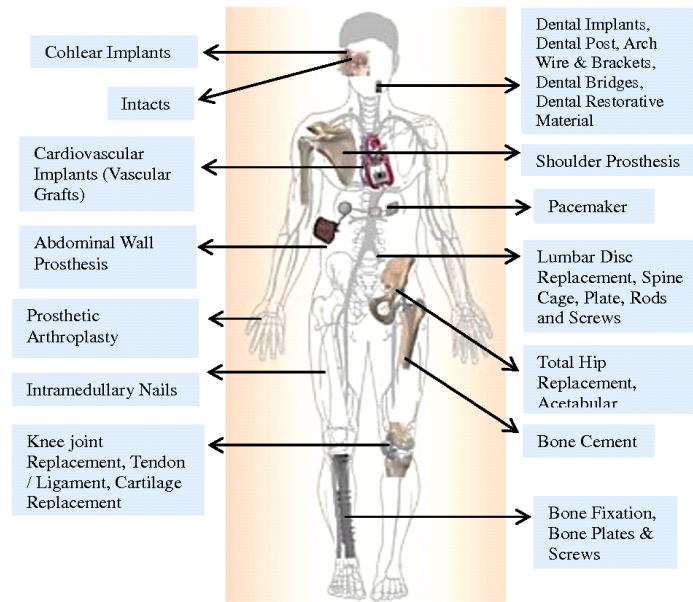


Figura 1.10 Principali applicazioni dei biomateriali in ambito biomedicale

1.4 Polimeri

I polimeri sono composti organici ottenuti dall'unione di due o più molecole semplici dette monomeri. Derivano in gran parte da idrocarburi, ossia composti carbonio-idrogeno, suddivisibili in tre categorie ⁽⁹⁾:

- idrocarburi saturi, costituiti da catene lineari aperte di atomi di carbonio legati da legami semplici;
- idrocarburi insaturi, presentano, oltre ai legami semplici, anche legami tra atomi di carbonio doppi;
- idrocarburi aromatici, derivano dal benzene e sono caratterizzati dalla presenza di uno o più anelli aromatici nella loro struttura;

I polimeri si distinguono in base al numero di monomeri da cui sono composti, si definiscono quindi dimeri se costituiti da due monomeri diversi, trimeri se sono presenti tre diversi monomeri a comporre la catena, e così via. Se i monomeri che si uniscono per formare la molecola sono tutti uguali, il composto prende il nome di omopolimero; se invece i monomeri sono diversi si parla di copolimero. Inoltre i polimeri possono essere classificati sulla base della loro provenienza; esistono i polimeri di origine naturale (ad esempio le proteine, i poliisopreni, polisaccaridi e acidi polinucleici) e quelli di origine sintetica, prodotti artificialmente (materie plastiche, elastomeri, fibre tessili). Un'altra importante classificazione si basa sul loro grado di polimerizzazione e sul peso

molecolare. Con grado di polimerizzazione s'intende il numero di molecole di monomero che costituiscono il polimero; in base ad esso, i polimeri si dividono in oligomeri (grado 1-10), polimeri a basso peso molecolare (10-100) e ad alto peso molecolare (>1000). Il peso molecolare si ottiene moltiplicando il peso della singola unità per il numero di molecole di monomero presenti nel polimero ⁽⁹⁾.

I principali vantaggi che i polimeri presentano rispetto alle altre classi di materiali sono una maggiore biocompatibilità, la possibilità di modificarne ampiamente composizione e proprietà fisico-meccaniche. Queste proprietà insieme a bassi coefficienti di attrito, facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture complesse, possibilità di modificarne chimicamente e/o fisicamente la superficie, possibilità di immobilizzare cellule o biomolecole al loro interno o sulla superficie, rendono questi materiali estremamente utili in campo biomedicale. Queste proprietà sono identificative della struttura molecolare del polimero, nonché dei processi chimico-fisici cui è stato sottoposto, e pertanto caratterizzano le proprietà del dispositivo creato.

1.4.1 Struttura dei polimeri

Le proprietà di un polimero sono legate non soltanto alla sua composizione chimica, ma anche alla lunghezza e all'architettura macromolecolare.

I polimeri possono presentarsi in tre differenti strutture (Figura 1.11):

- struttura lineare: nella molecola di polimero i monomeri si susseguono formando lunghe catene lineari tra loro aggrovigliate. Ogni macromolecola lineare filiforme è ben distinta dalle altre;
- struttura ramificata: la molecola di polimero è ramificata, cioè le unità monomeriche non si susseguono solo linearmente ma si diramano anche in catene laterali. Le macromolecole rimangono comunque distinte le une dalle altre;
- struttura a legami trasversali o intermolecolari: le macromolecole di polimero risultano tra loro unite da catene trasversali, generando una struttura tridimensionale;

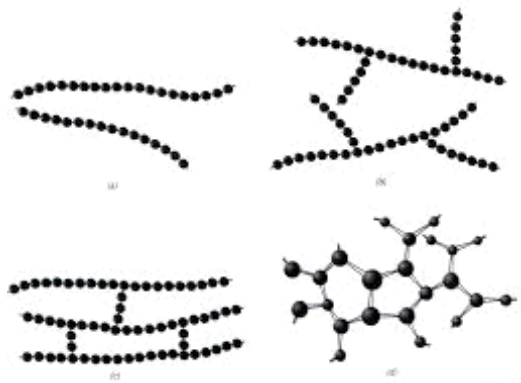


Figura 1.11 Strutture macromolecolari dei polimeri: a) lineare, b) ramificata, c) a legami incrociati e d) reticolata

I polimeri a catena lineare o ramificata sono legati fra loro da legami deboli (come Van der Waals e legami dipolo-dipolo) che consentono lo scorrimento delle catene l'una rispetto all'altra quando il polimero è sottoposto ad una sollecitazione. Tale scorrimento, di tipo viscoso, è responsabile del loro comportamento viscoelastico. Nei reticolati, invece, la massa del polimero è assimilabile ad una sola macromolecola che si estende tridimensionalmente, in cui le catene sono collegate mediante legami covalenti. Questo comporta una maggior rigidità del materiale e in generale proprietà meccaniche superiori rispetto alle altre strutture.

Un altro parametro di classificazione dei polimeri fa riferimento alle proprietà termomeccaniche. Si definiscono termoplastici i polimeri (lineari o ramificati) modellabili plasticamente un numero praticamente illimitato di volte, purché questo avvenga in un certo campo di temperature. I polimeri termoindurenti invece (catena reticolata) oltre un certo stadio del processo di ottenimento non sono più modellabili e anzi è proprio il calore a determinarne l'indurimento.

1.4.2 Tecniche di polimerizzazione

La polimerizzazione è il processo di preparazione dei polimeri che avviene mediante l'unione di più molecole di monomero. Esistono due diversi tipi di polimerizzazione:

- **policondensazione:** è una reazione che prevede l'eliminazione di piccole molecole come H_2O o $NaCl$ oppure CH_3OH e HCl , durante il processo di formazione della macromolecola. Per favorire lo spostamento dell'equilibrio verso i prodotti, dunque verso la formazione di polimero, è necessario distillare le molecole di condensazione ottenute. La policondensazione è un processo lento che tende ad interrompersi prima che si formino catene molto grandi, per questo non è utilizzata quando sono necessari polimeri ad altissimo peso o dove i prodotti di scarto costituirebbero un problema. Inoltre, coinvolge velocemente

tutta la massa dei reagenti, perciò i monomeri sono esauriti dopo poco tempo dall'inizio della reazione. Il processo di policondensazione è poi distinguibile in bifunzionale o polifunzionale a seconda del numero di gruppi funzionali coinvolti nella macromolecola. In funzione di ciò si ottengono polimeri lineari (policondensazione bifunzionale) o polimeri ramificati (policondensazione polifunzionale). Nella policondensazione, a causa delle sostanze secondarie liberate, le unità strutturali della molecola di polimero presentano una formula chimica diversa da quella dei monomeri costituenti (Figura 1.12).

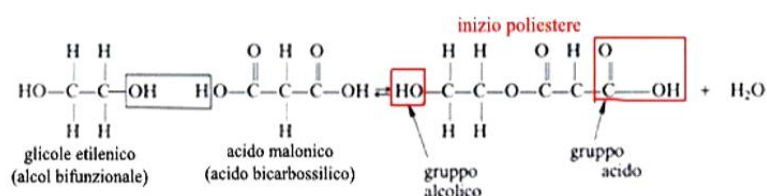


Figura 1.12 Esempio di reazione di policondensazione per la produzione di polietilen malonato.

- **poliaddizione:** le macromolecole in questo processo si generano per unione diretta dei monomeri senza sottoprodotti di reazione, perciò esse avranno la stessa formula chimica del monomero costituente, con unica differenza la disposizione dei legami chimici. In questi polimeri il peso molecolare raggiunge valori molto elevati.

Affinché il monomero polimerizzi, attivarlo, e ciò può aver luogo mediante calore, raggi ultravioletti o grazie alla presenza di un altro composto attivato. Questo permette l'inizio del processo che porta ad una semplice somma delle unità strutturali e alla generazione di catene che si estendono indefinitamente, fino a che la sostanza a disposizione lo permette.

La reazione di poliaddizione è rapida e altamente esotermica, il che potrebbe essere problematico nell'ambito di una polimerizzazione in situ, in quanto potrebbe portare ad aumenti di temperatura difficilmente controllabili.

1.4.3 Proprietà dei polimeri

1.4.3.1 Peso molecolare

Un parametro importante da considerare nell'analisi dei polimeri è il peso molecolare, in quanto da esso dipendono le proprietà del materiale. All'aumentare del peso aumentano linearmente anche le proprietà meccaniche, fino al raggiungimento di un valore di plateau in corrispondenza di alti pesi molecolari.

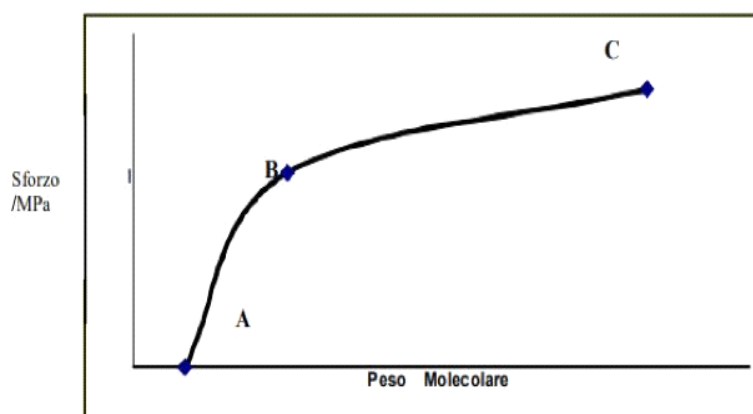


Figura 1.16: Andamento delle proprietà meccaniche in funzione del peso molecolare

Nelle macromolecole costituenti un polimero il numero di monomeri di ciascuna di esse può variare notevolmente (polidispersità), quindi in genere si definiscono il grado di polimerizzazione medio e il peso molecolare medio, ottenute rispettivamente dividendo il numero totale di monomeri per il numero di macromolecole e dividendo il peso totale del polimero per il numero di macromolecole. Il peso molecolare medio può essere espresso mediante tre diversi valori:

- peso molecolare medio numerico (M_n): è definito come il rapporto tra il peso di una certa quantità di polimero ed il numero di macromolecole in esso presenti; l' M_n esprime la media numerica dei pesi molecolari;
- peso molecolare medio ponderale (M_w): esprime la media pesata sulla massa delle macromolecole presenti;
- peso molecolare medio viscosimetrico (M_v): esprime la relazione tra il peso molecolare e la viscosità; infatti le molecole polimeriche più grandi rendono la soluzione più viscosa di quanto lo facciano le molecole piccole;

Nel caso reale di polimeri polidispersi risulta:

$$M_w > M_v > M_n,$$

in quanto M_w viene influenzato soprattutto dalle molecole di grandi dimensioni, mentre M_n da quelle più piccole. Le differenze tra i valori delle medie statistiche dipendono dall'ampiezza della distribuzione dei pesi molecolari, come mostrato in Figura 1.18.

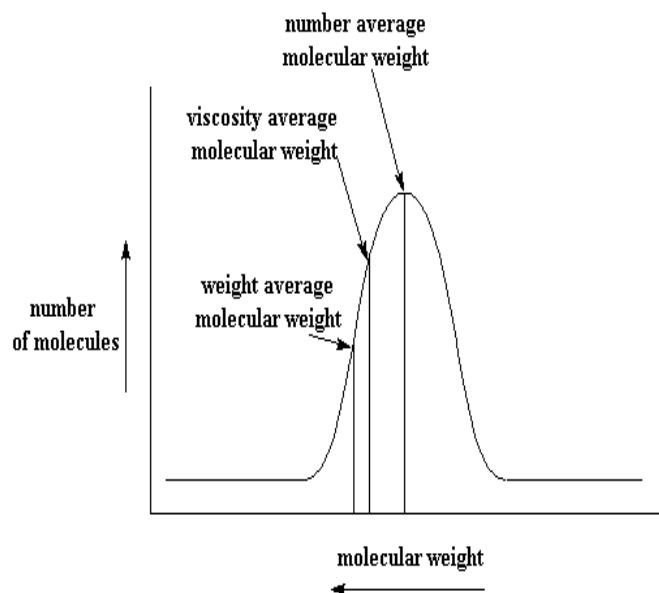


Figura 1.18 Distribuzione del peso molecolare.

Si definisce infine indice di polidispersità PD il rapporto:

$$PD = M_w / M_n$$

Se $PD=1$ si parla di polimero monodisperso, ovvero costituito da molecole aventi tutte lo stesso peso molecolare. Per i polimeri sintetici il valore di polidispersità è solitamente compreso tra 1,5 e 2,5. In campo biomedicale si richiedono polimeri ad alto peso molecolare e con un indice PD relativamente basso, fattori che assicurano buone proprietà meccaniche.

1.4.3.2 Cristallinità

I polimeri in generale presentano una struttura amorfa, ovvero conservano allo stato solido la struttura disordinata caratteristica della sostanza allo stato fuso. In particolare, questo vale per le strutture ramificate e reticolate, mentre per quelle lineari è possibile la formazione di regioni ordinate che costituiscono le zone cristalline. Più specificamente, con il termine cristallizzazione s'intende la formazione di zone ordinate nelle tre direzioni dello spazio. Tuttavia, nel caso di sostanze ad alto peso molecolare solo piccole parti della struttura riescono ad ordinarsi e cristallizzare. Questo significa che un polimero non potrà mai essere cristallino al 100%. Al

contrario, i polimeri sono semicristallini, ovvero sono caratterizzati dalla presenza di due fasi, una amorfa e una cristallina (Figura 1.14).

Con il termine cristallinità si definisce la percentuale in peso di sostanza che si trova allo stato cristallino, e questo valore si trova principalmente mediante misure di diffrazione ai raggi X. Un maggior grado di cristallinità determina un aumento di densità, con conseguente incremento della rigidità del materiale (soprattutto ad alte temperature), un minor coefficiente d'attrito e quindi migliore resistenza all'usura, una maggior durezza, maggior resistenza all'aggressione ambientale e maggior resistenza al creep.

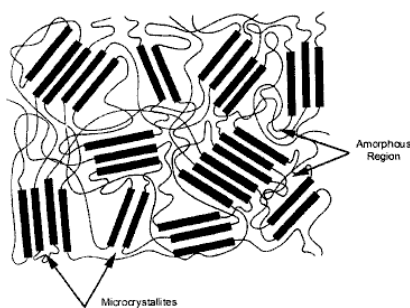


Figura 1.14 Fase amorfa e semicristallina di un polimero

1.4.3.3 Proprietà termo-meccaniche

Dal punto di vista termomeccanico i polimeri si distinguono in termoplastici e termoindurenti. I primi sono a catena lineare o ramificata e sono modellabili plasticamente un numero praticamente illimitato di volte senza che le loro proprietà meccaniche vengano intaccate, purché ciò avvenga in un certo campo di temperature. I secondi invece, a catena reticolata, si modificano se sottoposti a riscaldamento, con un conseguente modifica delle loro proprietà meccaniche, in particolare un indurimento irreversibile.

Tenendo conto del comportamento meccanico del materiale alla temperatura d'esercizio, è possibile riportare in grafico l'andamento del modulo elastico in funzione della temperatura: si possono così individuare tre curve distinte, una riferita ai polimeri reticolati, le altre due a polimeri lineari o ramificati in condizione rispettivamente di amorfismo o di parziale cristallinità (Figura 1.16). A partire da tali andamenti è possibile individuare alcune temperature caratteristiche:

- temperatura di transizione vetrosa (T_g), in corrispondenza della quale si verifica il passaggio dallo stato vetroso fragile, a quello gommoso, caratterizzato da deformabilità e tenacità;

- temperatura di rammollimento (T_r): per i polimeri amorfi segna il passaggio dallo stato gommoso, comunque solido, a quello liquido;
- temperatura di fusione (T_m), che rappresenta il punto di fusione termodinamico della fase cristallina, in corrispondenza del quale si verifica la rottura del reticolo;
- temperatura limite di stabilità chimica (T_l), oltre la quale il materiale inizia a degradare a causa della rottura dei legami chimici;

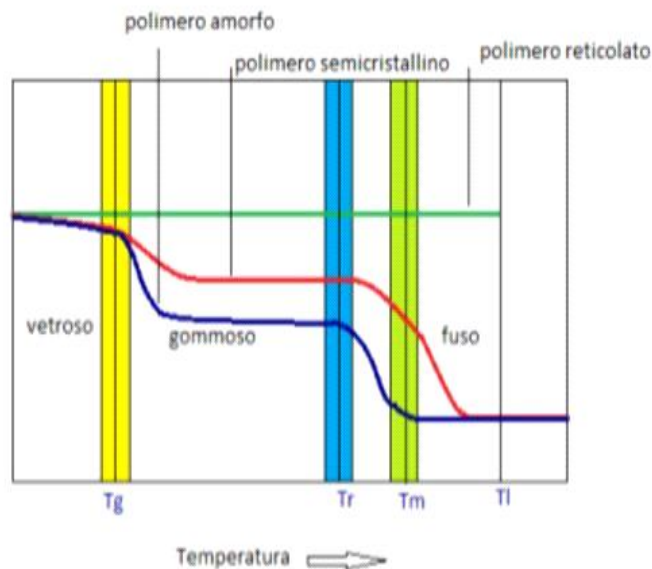


Figura 1.15 Andamento del modulo elastico in funzione della temperatura per polimeri a differente struttura

Il grafico in Figura 1.15 mostra il comportamento di tre diverse classi di polimero al variare della temperatura.

La linea rappresentante il comportamento del polimero reticolato è quasi orizzontale, a dimostrazione del fatto che le sue proprietà meccaniche non variano al variare della temperatura, una volta avvenuta la reticolazione. Nel caso del polimero lineare parzialmente cristallino, il modulo elastico cala sensibilmente, a partire dalla temperatura di transizione vetrosa. Infatti, i polimeri non reticolati, se si trovano sotto questa temperatura (variabile da polimero a polimero), sono rigidi e duri, ma se la oltrepassano assumono una forma gommosa, fino alla temperatura di fusione dopo la quale passano allo stato liquido. Infine, viene analizzato il comportamento di un polimero lineare amorfo, che subisce cali di rigidità simili a quelli visti per il lineare parzialmente cristallino in corrispondenza della temperatura di transizione vetrosa e quella di rammollimento (temperatura variabile minore di quella di fusione, che dunque non porta il materiale allo stato liquido). Si può osservare dal grafico che ad alte temperature comunque il comportamento dei termoplastici risulta essere indipendente dalla loro cristallinità. Esiste poi un altro valore di

temperatura, definito come limite di stabilità chimica (superiore alla temperatura di fusione), oltre alla quale i polimeri cominciano a degradarsi irreversibilmente, che perciò viene considerato come il limite del campo di lavorazione del polimero.

1.4.4 Poliesteri alifatici

Con il termine generale di poliestere, si intendono tutti i polimeri ottenuti per condensazione di un acido bifunzionale con un alcol bifunzionale (Figura 1.18).

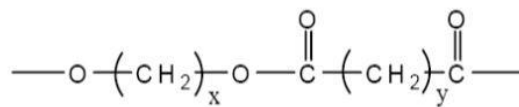


Figura 1.18 Struttura generale di un poliestere alifatico

I poliesteri si distinguono in alifatici ed aromatici. La differenza principale tra i due è la presenza di anelli aromatici nell'unità monomerica dei poliesteri aromatici.

Grazie a particolari caratteristiche quali un'alta biocompatibilità, biodegradazione e resistenza, sono particolarmente diffusi e ricercati nelle applicazioni in campo biomedico. Tuttavia, il loro utilizzo è limitato da problematiche legate alla loro processabilità, stabilità e scarsa velocità di degradazione.

I poliesteri più utilizzati in campo biomedico sono l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA) e il poli(butilene succinato) (PBS), nelle cui catene generalmente vengono inserite differenti subunità aromatiche o alifatiche per migliorarne le proprietà fisiche, meccaniche e termiche. Le più importanti applicazioni dei poliesteri alifatici riguardano la realizzazione di strutture biorassorbibili, per dispositivi a rilascio controllato di farmaci, *stent* vascolari e protesi per legamenti e tendini.

1.4.4.1 Poliesteri alifatici per uso biomedicale

I principali poliesteri alifatici utilizzati in campo biomedicale sono l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA), l'acido polilattico-co-glicolico (PLGA), il policaprolattone (PCL) ed il poli(butilene succinato) (PBS).

- Acido poliglicolico (PGA): è un polimero termoplastico e biodegradabile. Può essere sintetizzato tramite policondensazione o polimerizzazione ad apertura d'anello dell'acido glicolico. E' caratterizzato da una temperatura di transizione vetrosa compresa fra i 35-40 °C ed una temperatura di fusione individuabile fra i 225-230 °C. Inoltre, presenta un alto grado di cristallinità, che lo rende insolubile in qualsiasi solvente organico ⁽¹⁰⁾. Trova ampio utilizzo in campo biomedico, sebbene le sue applicazioni siano limitate dalla sua instabilità idrolitica, dovuta alla presenza di una elevata densità di gruppi esterei che facilitano il fenomeno di degradazione del materiale; questa provoca una progressiva perdita delle proprietà meccaniche, nonché il rilascio di acido glicolico che provoca risposte infiammatorie nell'organismo ospitante. Il PGA è principalmente utilizzato per la realizzazione di fili di sutura biodegradabili. E' stato anche impiegato per la generazione di tessuti a rilascio controllato di farmaci e *scaffold* per la rigenerazione di ossa, cartilagini, tendini, denti, tratti intestinali, tessuto spinale e linfatico ⁽¹¹⁾ (Figura 1.19).

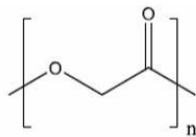


Figura 1.19: struttura chimica del PGA

- Acido polilattico (PLA): si tratta di un poliestere alifatico biodegradabile. Questo viene ottenuto dalla polimerizzazione di acido lattico, mediante due diverse strategie sintetiche (Figura 1.20):
 - condensazione dell'acido lattico;
 - apertura dell'anello del dimero dell'acido lattico, il lattide, che viene purificato e polimerizzato ad acido polilattico senza utilizzo di solventi.

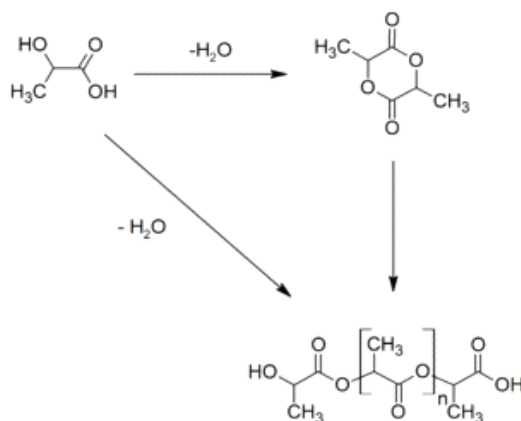


Figura 1.20 Strategie sintetiche per la sintesi di PLA

L'acido lattico è una molecola chirale che esiste sotto forma di due isomeri L e D. Si possono quindi individuare quattro diverse forme polimeriche: acido poli-L-lattico (PLLA), acido poli-D-lattico (PDLA) e poli-D,L-lattico (PDLLA, copolimero dei primi due) e l'acido meso-polilattico (Figura 1.22). Quelli che vengono maggiormente studiati in ambito biomedico sono il PLLA e il PDLLA (Figura 1.21). In particolare, il PLLA ha riscontrato un notevole successo grazie alle sue caratteristiche meccaniche e di biocompatibilità: caratterizzato da una cristallinità del 37% con un punto di fusione di circa 173-178°C e una temperatura di transizione vetrosa di circa 60-65°C, possiede un'elevata resistenza a trazione ed un elevato modulo elastico, che lo rendono un materiale adatto a reggere carichi importanti. Il PDLLA è un polimero amorfo (disposizione casuale dei suoi due monomeri isomerici) con T_g intorno ai 55-60°C e che possiede, rispetto al PLLA, una resistenza a trazione minore, un allungamento a rottura maggiore e tempi di degradazione più rapidi. Le proprietà che caratterizzano questo poliesterne ne hanno favorito l'utilizzo in sistemi a rilascio controllato di farmaci, in ingegneria tissutale, come materiale per suture, fissaggio ortopedico e fabbricazione di *scaffold* (per la rigenerazione di ossa, cartilagini, tendini, nervi e vasi sanguigni) ⁽¹¹⁾.

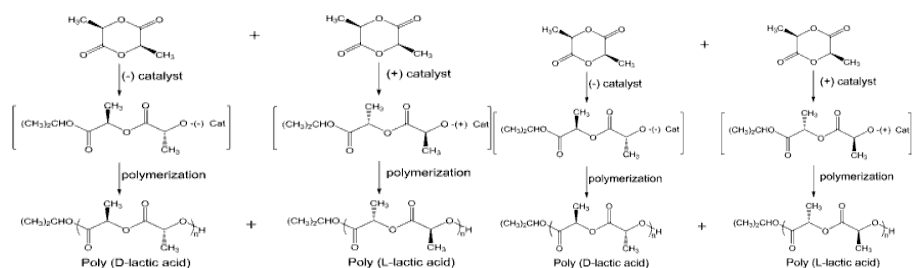


Figura 1.21 Strutture chimiche del PLLA PDLA

- Acido polilattico-co-glicolico (PLGA): si tratta di un copolimero ampiamente utilizzato grazie alla sua biodegradabilità e biocompatibilità. Viene ottenuto mediante copolimerizzazione per apertura d'anello dei dimeri ciclici dell'acido glicolico (glicolide) e dell'acido lattico (lattide) (Figura 1.22). A seconda del rapporto molare di lattide e glicolide si ottengono diverse forme di PLGA, caratterizzate da diverse cristallinità. Generalmente la temperatura di transizione vetrosa del polimero varia tra 40°C e 60°C. I polimeri con maggior lattide sono solubili in solventi clorurati, mentre quelli con più glicolide vengono sciolti in solventi fluorurati. In presenza di acqua il PLGA degrada per idrolisi e anche il tempo della sua degradazione dipende dal rapporto molare: maggiore è il contenuto di unità glicolidiche, minore è il tempo necessario per la degradazione rispetto ai materiali prevalentemente lattidei. Questo materiale ha avuto successo come polimero biodegradabile perché i prodotti di idrolisi (i monomeri di partenza) non hanno la minima tossicità. Viene infatti utilizzato sia per la fabbricazione di suture e impianti, sia per la realizzazione di nano e microparticelle biodegradabili per il rilascio controllato di sostanze. Il PLGA trova impiego anche come supporto per la rigenerazione di tessuto osseo, cartilagineo, tendineo, pelle, fegato e tessuto nervoso.

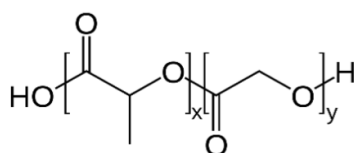


Figura 1.22 Struttura dell'acido polilattico-co-glicolico

- Policaprolattone (PCL): si tratta di un poliesteri alifatico semicristallino che si ottiene tramite la rottura dell'anello del monomero ciclico ϵ -caprolattone (Figura 1.23). Presenta una temperatura di transizione vetrosa di circa -60°C e un punto di fusione di 55-69°C. Il PCL è un biomateriale altamente elastico: presenta un modulo elastico di circa 23 MPa e un allungamento a rottura del

4700%. Queste caratteristiche lo rendono adatto per la realizzazione di *scaffold* per la rigenerazione di ossa, legamenti, cartilagine, pelle, tessuto nervoso e vascolare ⁽¹²⁾.

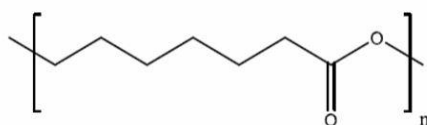


Figura 1.23 Struttura del policaprolattone

1.5 Copolimeri

I copolimeri sono le macromolecole costituite da due o più unità di ripetizione.

A seconda di come si susseguono le unità comonomeriche all'interno della catena del polimero, i copolimeri si classificano in:

- copolimeri statistici (o random): le unità monomeriche assumono collocazioni casuali nella catena principale;

ABAABABBBABBA

- copolimeri alternati: i monomeri sono regolarmente alternati nella catena;

ABABABABABA

- copolimeri a segmenti (o blocchi): è evidenziabile una distribuzione regolarmente alternata dei comonomeri;

AAAABBBBAABBA

- copolimeri ad innesto: un solo tipo di monomero costituisce la catena principale dalla quale si dipartono ramificazioni formate da altre unità;

B

B

AAAAAAAAAAAAA

B

B

1.5.1 Copolimeri statistici

Le unità comonomeriche sono disposte in maniera casuale e indipendente dalla natura delle unità adiacenti. I copolimeri sono ottenuti sia mediante processi di polimerizzazione a stadi o a catena. Nota la composizione iniziale dei monomeri utilizzati, risulta problematico determinare la composizione del copolimero a causa del fatto che la reattività dei monomeri varia durante la reazione e quindi la composizione del copolimero evolve nel tempo rispetto a quella del mezzo di reazione. In relazione ad una certa miscela di alimentazione, la composizione è dunque istantanea e definibile come l'esito di conversioni infinitesime di monomeri ⁽¹³⁾.

Anche per i copolimeri, la fusione della fase cristallina e la transizione vetrosa della componente amorfa (T_m e T_g rispettivamente) sono transizioni termiche cruciali.

Differentemente da quanto affermato per gli omopolimeri, la possibile presenza di molteplici fasi cristalline determina l'individuazione di altrettanti processi, quindi temperature, di fusione. La transizione vetrosa, caratteristica della fase amorfa e variabile in maniera monotona con la composizione, si palesa ad una temperatura intermedia a quelle dei due omopolimeri, T_{gA} e T_{gB} . L'andamento di T_g in funzione della composizione polimerica può essere descritto analiticamente ricorrendo all'equazione di Fox:

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

in cui w_A e w_B rappresentano le frazioni in peso dei rispettivi monomeri. È stata sviluppata anche un'equazione più recente, equazione di Couchman, adottata anche nel caso di andamenti regolari di T_g :

$$\ln T_g = \frac{\ln T_{gA} + (k \cdot w_B/w_A) \cdot \ln T_{gB}}{1 + (k \cdot w_B/w_A)}$$

in cui k rappresenta il rapporto tra gli incrementi di calore specifico alla transizione vetrosa degli omopolimeri. Queste equazioni sono valide per descrivere andamenti della temperatura di transizione vetrosa monotoni rispetto alla composizione. Ma per alcuni copolimeri si osserva invece un minimo o un massimo di T_g a composizioni intermedie. Per tenere conto di queste deviazioni, si è corretta l'equazione di Fox:

$$\frac{1}{T_g} = \frac{w_{AA}}{T_{gAA}} + \frac{w_{BB}}{T_{gBB}} + \frac{w_{AB}}{T_{gAB}}$$

ove T_{gAB} rappresenta la T_g del copolimero ad unità A e B alternate, T_{gAA} e T_{gBB} le T_g degli omopolimeri e w_{AA} , w_{AB} e w_{BB} le frazioni in peso delle rispettive diadi. In questo modo è stato possibile ottenere un andamento teorico in linea con gli andamenti sperimentali.

Un altro elemento da considerare è la presenza di più fasi cristalline. Infatti un copolimero statistico, composto ad esempio da due unità comonomeriche distinte, A e B, può cristallizzare in due situazioni differenti: può formarsi un sistema a due fasi in cui la fase cristallina è composta interamente da A ed è in equilibrio con una fase amorfa di A e B non cristallizzabili (esclusione di comonomero), oppure le unità del comonomero B possono entrare a far parte del reticolo cristallino, sia in forma di difetti, sia in condizioni di equilibrio (inclusione di comonomero)⁽¹³⁾ (Figura 1.24). Anche per descrivere queste situazioni sono state introdotte delle equazioni che permettono di predire con sufficiente precisione la temperatura di fusione del copolimero.

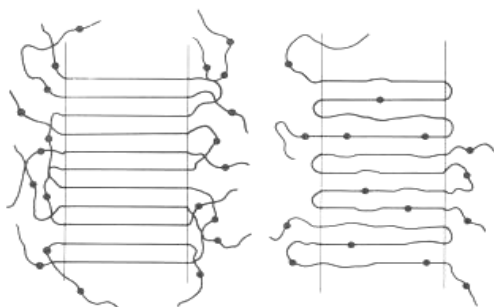


Figura 1.24: Rappresentazioni del modello di esclusione (a sinistra) e del modello di inclusione (destra).

1.5.2 Copolimeri a blocchi

I copolimeri a blocchi possiedono la capacità di auto-organizzarsi in strutture aventi periodicità anche su scala nanometrica. I blocchi costituiti dalle due diverse unità comonomeriche possono formare macromolecole con architettura lineare (copolimeri di-, tri- e multiblocco) o non lineare (multirami, a stella e graffati)⁽¹³⁾ (Figura 1.25).

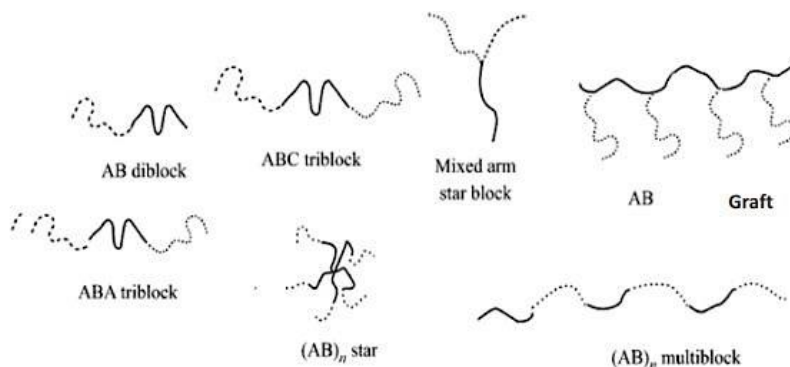


Figura 1.25: architettura lineare e non lineare dei copolimeri a blocchi

Le principali strutture copolimeriche a blocchi sono:

- Di-blocco (Am-Bn): i blocchi possono contenere gruppi terminali (-OH), gruppi di giunzione (-COO-), oppure, il secondo blocco può includere un terzo monomero C (Am-B-C), distribuito in maniera casuale, alternato, o in sequenze decrescenti, ecc.
- Tri-blocchi (Am-Bn-Am, Am-Bn-Aq, Am-Bn-Cq): sequenze che rappresentano copolimeri contenenti tre blocchi.
- Multi-blocco (Am-Bn-Am-Bq-Am-Bq): copolimeri segmentati.
- Copolimeri di-blocco ripetuti ((Am-Bn)_x).
- Copolimeri a stella: presentano multi-braccia collegate da un'unità di giunzione (caso particolare di copolimeri ad innesto).

Se i copolimeri a blocchi sono amorfi e se le sequenze costituenti risultano compatibili, allora il copolimero consiste di un'unica fase con un'unica temperatura di transizione vetrosa. Se, invece, i diversi blocchi polimerici sono chimicamente incompatibili, si ha separazione di fase con segregazione spontanea delle differenti macromolecole in diversi microdomini amorfi. Se uno o entrambi i blocchi sono cristallizzabili, si ha segregazione di fase con formazione di domini cristallini (*self-assembly*). La periodicità, le dimensioni di tali domini regolari e le transizioni termiche di questi sistemi dipendono dalla morfologia, che dipende a sua volta dal metodo di preparazione del campione e dalle caratteristiche molecolari del copolimero.

Si distinguono, quindi, due tipologie di copolimeri a blocchi:

- Blocchi non cristallizzabili: ad ogni fase amorfa presente corrisponde una transizione vetrosa che, nell'ipotesi di una separazione di fase, porta a microdomini distinti, facilmente correlabili alla T_g dell'omopolimero corrispondente. Nella realtà questo avviene solo quando il peso molecolare dei blocchi è elevato e l'incompatibilità tra i blocchi molto marcata.
- Blocchi cristallizzabili: se nel copolimero uno o entrambi i blocchi risultano cristallizzabili, la segregazione di fase comporta anche la formazione di domini cristallini. Questi possono dare luogo a strutture organizzate con un arrangiamento periodico, come avviene nel caso di copolimeri a due o tre blocchi, oppure a strutture prive di organizzazione, come nel caso di polimeri multi-blocchi. Quando entrambi i blocchi sono cristallizzabili, la morfologia è dettata dal blocco che cristallizza per primo e il secondo componente cristallizza in presenza delle restrizioni steriche imposte dai domini cristallini già formati.

1.6 Poli(butilene succinato) (PBS)

Il poli(butilene succinato) è un poliestere alifatico semicristallino ad alta capacità di cristallizzazione ($X_c = 35-45\%$). La sua temperatura di transizione vetrosa è al di sotto di temperatura ambiente (circa -30°C), mentre la temperatura di fusione è di $110-115^\circ$. Le proprietà termiche del polimero ne permettono la lavorabilità in un ampio range di temperature; si può lavorare mediante estrusione, stampaggio ad iniezione e termoformatura. Dal punto di vista meccanico il polimero ha comportamento fragile, con allungamenti a rottura estremamente ridotti. Altre caratteristiche interessanti di questo poliestere sono il moderato costo di produzione, il processo di sintesi semplice, la possibilità di ottenerlo partendo da fonti rinnovabili ma soprattutto la comprovata biodegradabilità e biocompatibilità. In particolare, per quanto riguarda l'ultimo punto, sono stati effettuati vari studi, in vitro e in vivo. Nel primo caso, cellule animali e umane sono state poste in contatto diretto ed indiretto con la base polimerica e, dagli studi di citotossicità e immunoistochimica è stata confermata la biocompatibilità da contatto indiretto. È poi stata confermata anche la biocompatibilità in vivo, mediante l'impianto di strutture omo- o copolimeriche a base di PBS in piccole cavie, che, dopo una breve iniziale risposta infiammatoria, si stabilizzano nell'organismo ospite ⁽¹⁴⁾.

Tuttavia, i suoi principali impieghi riguardano applicazioni ambientali, come pellicole per pacciamatura, sacchetti compostabili, fogli in tessuto non tessuto, prodotti per la ristorazione, schiume, componenti a basso peso nell'industria automobilistica. Attualmente, in ambito biomedicale, sono commercializzati da Bionolle® *stents*, involucri compatibili con la sterilizzazione a vapore, e componenti per la diagnostica a immagini.

I monomeri impiegati nella sintesi di PBS sono acido succinico (SA) o dimetil succinato (DMS) e 1,4-butandiolo (BD), comunemente ottenuti da risorse fossili. Sia l'acido succinico che l'1,4-butandiolo possono essere ottenuti, come già accennato, anche da fonti rinnovabili, ad esempio attraverso la fermentazione di zuccheri, rendendo il PBS un copolimero completamente *bio-based* ⁽¹⁵⁾.

Il PBS viene sintetizzato per policondensazione in massa a due stadi: nel primo si verifica una reazione di esterificazione (o transesterificazione se il monomero di partenza è il DMS) con rimozione di acqua (o metanolo), mentre nel secondo, condotto a temperatura più elevata e a pressione ridotta, viene rimosso il glicole prodotto dalla successiva transesterificazione tra i diesteri

formati nello stadio precedente ⁽¹⁴⁾. La reazione viene condotta in presenza di un catalizzatore, solitamente il titanio (IV) butossido (TBT) (Figura 1.26).

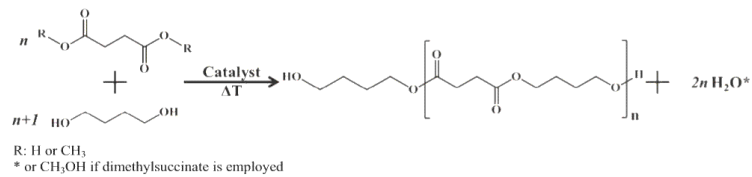
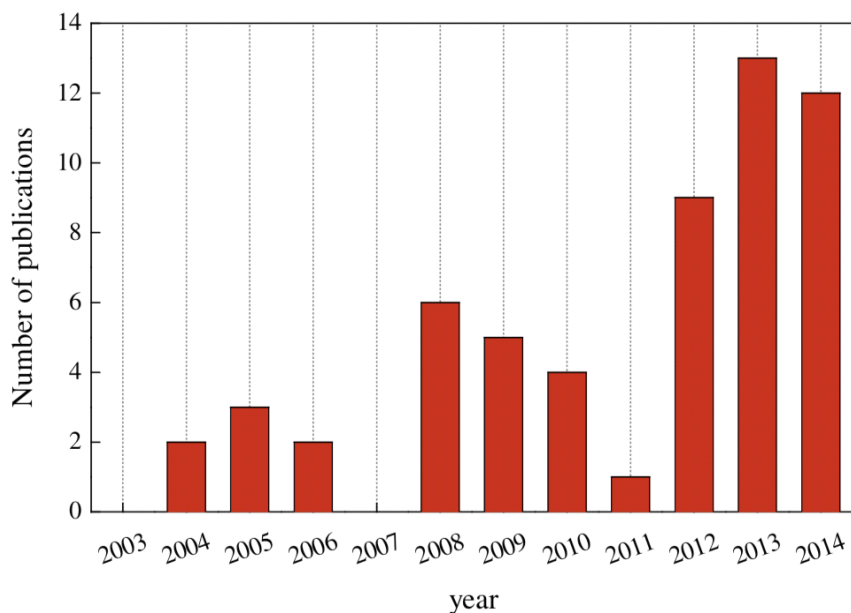


Figura 1.26 Schema di reazione della polimerizzazione del PBS.

1.6.1 Copolimeri a base di PBS

I copolimeri a base di PBS in campo biomedicale sono impiegati sottoforma di film e *scaffold*; vengono realizzati per migliorare le proprietà meccaniche del PBS in termini di flessibilità, per aumentarne la biodegradabilità, mantenendone la biocompatibilità e la buona stabilità termica e diminuirne la cristallinità. Le tecniche di copolimerizzazione più utilizzate sono la copolicondensazione, la miscelazione reattiva e la *chain extension*, tramite cui si sono ottenuti copolimeri statistici a diversa composizione, copolimeri multiblocco con blocchi a diversa lunghezza e copoliesteri-uretani multiblocco ad alto peso molecolare ⁽¹⁴⁾. Il PBS è stato modificato chimicamente introducendo lungo la catena macromolecolare diversi comonomeri, allo scopo di raggiungere le caratteristiche più idonee una specifica applicazione; è stato copolimerizzato con poliesteri alifatici contenenti legami eterei e tio-etere, con subunità derivanti dal glucosio, quali mannitolo e sorbitolo. Sono stati realizzati e caratterizzati ionomeri contenenti PBS. Inoltre, si sono sviluppati diversi compositi ottenuti miscelando il PBS con materiali organici, come chitosano (estremamente biodegradabile e biocompatibile) e collagene, o inorganici, come fosfato di calcio, idrossiapatite e fluoroapatite. L'idrossiapatite è molto utilizzata in quanto è un materiale ceramico bioattivo, principale componente di ossa e denti, che mostra un'eccellente biocompatibilità con i tessuti duri ⁽¹⁵⁻¹⁹⁾.



Numero di ricerche pubblicate sul PBS e suoi copolimeri nell'ambito delle applicazioni biomediche

1.6.2 Neopentilglicole

Il neopentilglicole è un glicole, che può reagire con acidi dicarbossilici formando gruppi esterei. Si presenta sotto forma di solido bianco cristallino, inodore, igroscopico. Viene impiegato principalmente per la produzione di resine poliestere insature, vernici in polvere, plastificanti elastomeri, tensioattivi, materiali isolanti. Nell'ambito biomedicale viene utilizzato per la sintesi di polimeri con lo scopo di migliorarne le proprietà meccaniche, termiche e fisiche in funzione dell'applicazione desiderata⁽²⁰⁾.



Figura 1.28 Struttura del neopentilglicole

1.7 Biodegradazione

La biodegradazione consiste nell'alterazione chimica e fisica che un materiale subisce in ambiente biologico e interessa tutti i materiali impiantati nell'organismo, quindi anche i biomateriali di natura

polimerica. Può essere voluta, come nel caso dei polimeri utilizzati per il rilascio controllato dei farmaci e per le protesi riassorbibili, oppure può essere del tutto indesiderata, come nel caso di protesi programmate per durare per molti anni o, addirittura, per tutta la vita del paziente.

Il processo può essere artificialmente indotto o può avvenire spontaneamente e indesideratamente. Infatti, nel tempo i materiali possono solubilizzare, sbriciolarsi o deformarsi. Inoltre, i prodotti di degradazione rilasciati nell'organismo possono risultare tossici e dannosi, oppure essere studiati per svolgere un'attività farmacologica (quindi benefica) specifica. In applicazioni recenti, la degradazione di membrane polimeriche viene telecomandata e controllata da sistemi computerizzati esterni all'organismo, permettendo il rilascio di reagenti o di molecole bioattive nella successione e nella quantità richiesta. Un esempio di questa tecnologia è dato dai sistemi che permettono la determinazione quantitativa della glicemia ed il rilascio controllato di insulina in sito.

La biodegradazione è influenzata dalle cosiddette "condizioni fisiologiche", quali valori di pH vicino alla neutralità, temperature blande e basse concentrazioni saline, che inducono una degradazione più o meno rapida.

I principali fenomeni che possono portare al deterioramento di protesi impiantabili, costruite in tutto o in parte con materiali polimerici, possono essere di natura chimica, come l'ossidazione, oppure possono essere ricondotti a modificazioni chimiche innescate da processi di termolisi, fotolisi e radiolisi.

Dal punto di vista fisico si hanno fenomeni quali assorbimento, rigonfiamento, rammollimento, solubilizzazione, mineralizzazione e cristallizzazione. Infine, la degradazione è fortemente influenzata anche da fattori meccanici quali rotture causate da sollecitazioni meccaniche (stress cracking), fratture riconducibili a fatica del materiale o causate da impatti, tensioni dovute a carichi costanti o ciclici.

Generalmente la degradazione del biomateriale è dovuta alla combinazione di più meccanismi che operano simultaneamente sul materiale.

1.8 Degradazione idrolitica

Il processo di idrolisi determina la scissione delle molecole in due o più parti per effetto dell'acqua. La predisposizione più o meno marcata di un polimero all'idrolisi è dovuta alla sua natura chimica, alla struttura, alle dimensioni e all'ambiente in cui si trova. I fattori che tendono a favorire il

processo di idrolisi sono: elevata mobilità di catena (T_g bassa), basso grado di cristallinità, elevato numero di legami idrolizzabili, sollecitazione meccanica e presenza di porosità. Al contrario, la presenza nel polimero di zone idrofobiche, la reticolazione, una elevata cristallinità, bassi valori di sollecitazione meccanica e forme compatte, sono fattori che tendono a ridurre l'idrolisi.

In condizioni fisiologiche, il corpo umano tende a mantenere un equilibrio controllato attraverso l'omeostasi, dunque i parametri ambientali saranno mantenuti isotermi (37°C), neutri (pH 7.4) ed asettici. Tuttavia, la situazione *in vivo*, nonostante sia considerata blanda rispetto ai normali standard utilizzati *in vitro*, è complicata e resa drastica dalle complesse interazioni con attivatori, recettori, inibitori e con altre sostanze contenute nei fluidi biologici o presenti come componenti cellulari. Tutto ciò provoca risposte aggressive che si manifestano attraverso processi di adesione, liberazione e trasporto di biomolecole particolarmente attive. La degradazione può essere monitorata attraverso misurazione delle variazioni di peso molecolare, derivanti dalla scissione dei legami, e di perdita di peso gravimetrico, imputabile al passaggio in soluzione di molecole a basso peso molecolare. Questo fenomeno si concretizza in modifiche morfologiche e topologiche, formazione di prodotti di degradazione ed alterazione delle proprietà meccaniche.

Fattori	Metodi di controllo
Struttura chimica della catena principale e dei gruppi laterali	Selezione di legami chimici e gruppi funzionali
Stato di aggregazione	Trattamento, copolimerizzazione
Stato cristallino	Miscela polimerica
Bilancio idrofilico-idrofobico	Copolimerizzazione, introduzione di gruppi funzionali
Area superficiale	Micropori
Forma e morfologia	Fibre, film e compositi

Figura 1.28 Fattori strutturali e metodi di controllo della degradazione

CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI

L'ingegneria tissutale è un campo di ricerca in continua espansione, che ha come obiettivo quello di comprendere come i tessuti umani svolgono i propri compiti, per poterne riprodurre le funzioni in sostituti tissutali ingegnerizzati a scopo terapeutico. L'innovazione di questo settore sta nella sua interdisciplinarietà, in quanto in esso convergono i contributi della bioingegneria, della biologia cellulare, delle biotecnologie e della medicina rigenerativa.

Negli ultimi anni, la ricerca si sta focalizzando con particolare interesse sullo studio di nuovi materiali biocompatibili e biodegradabili per applicazioni miocardiche. Infatti, secondo numerose statistiche, le patologie cardiovascolari, in particolare quelle legate alle arterie coronariche come l'infarto miocardico e l'insufficienza cardiaca congestizia, costituiscono ad oggi la malattia cronica dominante in molte parti del mondo, rappresentando la principale causa di invalidità e morte. Attualmente l'unico trattamento efficace per la cura di queste patologie è il trapianto di cuore. La scarsa disponibilità di organi da trapiantare, il fallimento dell'innesto primario, le complicanze infettive e il rigetto, sono solo alcune delle problematiche legate a questo trattamento

L'ingegneria tissutale rappresenta un valido approccio per la sostituzione del miocardio danneggiato o per la ricostruzione di malformazioni congenite, tramite la realizzazione di strutture porose tridimensionali in grado di supportare la crescita e l'adesione cellulare. Per queste applicazioni i materiali più vantaggiosi da utilizzare sono i polimeri, che rispetto ad altre classi di biomateriali presentano caratteristiche fondamentali quali: biocompatibilità, la possibilità di modificarne ampiamente composizione e proprietà fisicomeccaniche, bassi coefficienti di attrito, facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture complesse, possibilità di modificarne chimicamente e/o fisicamente la superficie, possibilità di immobilizzare cellule o biomolecole al loro intorno o sulla superficie.

La classe di polimeri più promettente ad oggi risulta essere quella dei poliesteri alifatici, e tra questi il poli(butilene succinato) (PBS), già da tempo presente in commercio ed utilizzato nel campo degli imballaggi, sta riscuotendo un forte successo anche nell'ambito biomedicale. Esso presenta infatti buone proprietà di biocompatibilità, stabilità termica ed elevata temperatura di fusione (115°C); tuttavia la sua alta cristallinità è responsabile di una rigidità eccessiva per alcune applicazioni. La copolimerizzazione rappresenta uno strumento efficace per modificare le proprietà non idonee alle applicazioni d'interesse di un omopolimero, preservando quelle soddisfacenti.

In tale contesto si inserisce il presente lavoro di Tesi, che ha come scopo la sintesi e la caratterizzazione di un nuovo copolimero multiblocco a base di poli(butilene succinato), con proprietà meccaniche tipiche degli elastomeri termoplastici, per la fabbricazione di *scaffold* adatti ad applicazioni nell'ingegneria tissutale del miocardio. A tal fine, un poli(butilene succinato) (PBS-OH) idrossil-terminato è stato chain esteso con un suo copolimero, il poli(butilene/neopentil succinato), anch'esso idrossil-terminato (P(BSNS)-OH), ottenendo un copolimero ad elevato peso molecolare multiblocco, denominato PBSP(BSNS).

Il lavoro di Tesi è stato strutturato nelle seguenti fasi:

- preliminare ricerca bibliografica per conoscere gli sviluppi recenti sull'argomento trattato e ricostruire lo stato dell'arte;
- Sintesi tramite policondensazione in massa degli oligomeri PBS-OH, e P(BSNS)-OH e loro purificazione;
- sintesi del copolimero multiblocco PBSP(BSNS) tramite estensione di catena in presenza di esametilene diisocianato (HDI);
- caratterizzazione molecolare dei campioni mediante risonanza magnetica nucleare (NMR) e cromatografia a permeazione su gel (GPC);
- stampaggio in film sottili dei polimeri sintetizzati mediante pressofusione;
- realizzazione di *scaffold* mediante elettrofilatura;
- caratterizzazione termica mediante analisi termogravimetrica (TGA) e calorimetria differenziale a scansione (DSC) dei film e degli *scaffold*;
- analisi diffrattometrica a Raggi X dei film e degli *scaffold*;
- caratterizzazione meccanica dei campioni mediante prove a trazione a rottura e cicliche dei film e degli *scaffold*;
- studi di degradazione idrolitica sui film e sugli *scaffold*;
- analisi dei risultati ottenuti ed estrapolazione di correlazioni proprietà struttura.

CAPITOLO 3 – METODI E MATERIALI UTILIZZATI

3.1 Sintesi

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

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

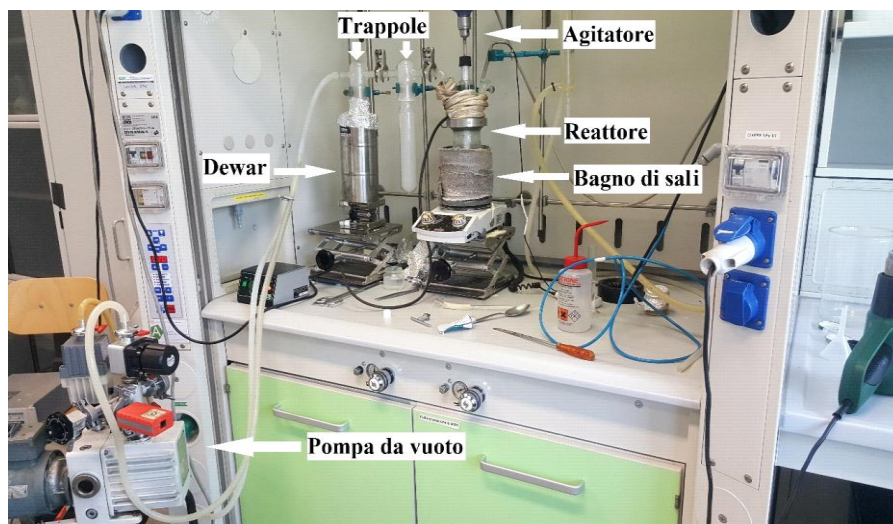


Figura 3.1 Schema dell'apparecchiatura per la polimerizzazione.

Il PBS-OH, l'omopolimero idrossil-terminato a basso peso molecolare, è stato sintetizzato tramite policondensazione in massa a due stadi, utilizzando come monomeri di partenza dimetil succinato (DMS) e 1,4-butandiolo (BD), quest'ultimo impiegato in eccesso del 70% per assicurare la formazione preferenziale dei terminali idrossilici. In aggiunta ai reagenti è stato inserito il catalizzatore titanio(IV)tetrabutossido ($\text{Ti}(\text{OBU})_4$, TBT), in quantità pari a 400 ppm/grammo di

polimero teoricamente ottenibile. Tutti i reagenti e il catalizzatore sono stati caricati nel reattore di polimerizzazione simultaneamente all'inizio del processo di sintesi. Il primo stadio della reazione è stato condotto alla temperatura di 190°C, sotto flusso controllato di azoto e con un'agitazione di 100 giri al minuto. In questa prima fase hanno avuto luogo le reazioni di transesterificazione diretta con successiva eliminazione di molecole di metanolo. Il secondo stadio ha avuto inizio quando almeno il 90% del metanolo teorico è stato raccolto nella trappola di condensazione mediante distillazione. In questa fase avvengono ulteriori reazioni di transesterificazione tra gli oligomeri ottenuti precedentemente che portano alla formazione di polimeri a basso peso molecolare. Durante questo stadio la temperatura viene aumentata di 10°C ogni 30 minuti, fino al raggiungimento di 230°C. Contemporaneamente, la pressione all'interno del reattore viene ridotta fino a 0,09 mbar con una pompa da vuoto, al fine di rimuovere, tramite distillazione, l'eccesso di diolo e spostare l'equilibrio di reazione verso i prodotti. Raggiunti i valori desiderati di temperatura e pressione, questi vengono mantenuti costanti fino al termine della reazione. Il processo ha avuto una durata totale di circa 5 ore. Il polimero ottenuto (Figura 3.2) è risultato di colore bianco e dalla consistenza piuttosto densa. Il campione è stato purificato, per eliminare eventuali residui monomericici e prodotti indesiderati, sciogliendolo nella minima quantità di cloroformio. La soluzione è stata poi fatta sgocciolare in un becher contenente un largo eccesso di metanolo: il polimero, a contatto con il metanolo, precipita sul fondo del becher, mentre le impurità rimangono in soluzione. Al termine di tale procedura, il precipitato è stato filtrato, al fine di eliminare la miscela di solventi, e mantenuto sotto cappa per qualche giorno, per permettere la completa evaporazione di eventuali metanolo e cloroformio residui.

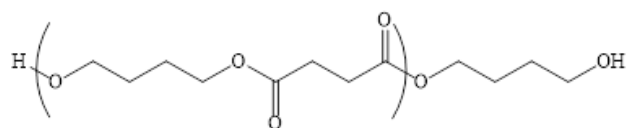


Figura 3.2 Struttura del PBS-OH

Il copolimero idrossil-terminato P(BSNS)-OH è stato sintetizzato impiegando la procedura precedentemente riportata per l'omopolimero PBS-OH, utilizzando come reagenti di partenza dimetil succinato (DMS), 1,4-butandiolo (BD) e il neopentil glicole (NG) (Figura 3.3). BD e NG sono stati aggiunti al sistema di reazione in quantità tale da avere una composizione equimolare di BD e NG.

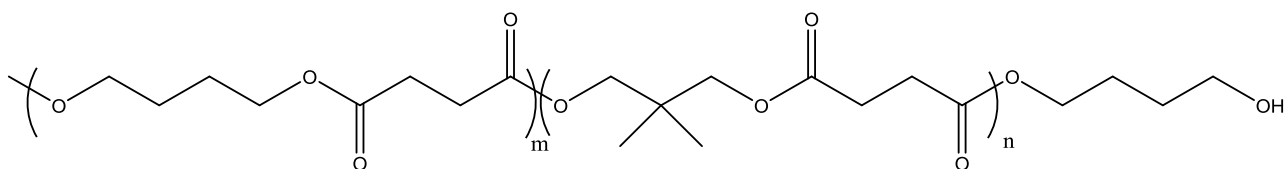


Figura 3.3 Struttura chimica del P(BSNS)-OH.

Anche in questo caso si è lavorato con un eccesso del 70% miscela BD/NG per assicurare la formazione preferenziale di terminali idrossilici, utilizzando il TBT come catalizzatore. Il materiale è risultato essere più scuro dell'omopolimero e rigido. Al termine della sintesi, il copolimero è stato purificato con la medesima procedura precedentemente illustrata.

Infine per ottenere il copolimero multiblocco PBSP(BSNS) oggetto di studio della presente Tesi è stata effettuata una reazione di estensione di catena dei polimeri idrossil-terminati precedentemente sintetizzati e purificati, PBS-OH e P(BSNS)-OH, in un rapporto 30:70 in peso, usando l'esametilendiisocianato (HDI) come estensore di catena (Figura 3.4).

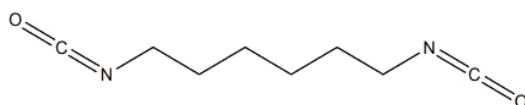


Figura 3.4 Struttura dell'esametilendiisocianato (HDI).

La reazione per ottenere il PBSP(BSNS) è stata eseguita in un reattore in vetro da 250 mL, all'interno del quale sono stati caricati 2,33 g di PBS-OH e 5,45 g di P(BSNS)-OH. La temperatura è stata portata a 160°C per favorire la fusione dei prepolimeri; contemporaneamente, la pressione è stata ridotta fino a 0,1 mbar e mantenuta per 10 min per favorire l'eliminazione delle molecole residue dei solventi usati per la purificazione. Successivamente, ristabilita la pressione atmosferica, è stata aggiunta una quantità equimolare, rispetto ai gruppi ossidrilici dei prepolimeri PBS-OH e P(BSNS)-OH, di HDI (180 µL).

La reazione tra i gruppi -OH dei prepolimeri e l'esametilendiisocianato, con conseguente formazione di legami uretanici, ha portato ad un aumento istantaneo della viscosità della massa polimerica all'interno del reattore. Il processo di estensione di catena è durato circa 10 minuti. Al

termine della sintesi, il polimero viene purificato secondo la procedura precedentemente descritta per i due blocchetti idrossil terminati.

3.1.1 Realizzazione di film

I film sottili sono stati realizzati tramite pressofusione, utilizzando una pressa con piastre di alluminio (Figura 3.5). Per avere un film di dimensioni 10x10 cm sono stati utilizzati circa 2 grammi di materiale, inserito tra due strati di teflon per garantire film dallo spessore uniforme (0,1-0,2 mm). Al fine di permettere la completa fusione del polimero, la temperatura della pressa è stata impostata ad un valore di circa 40°C superiore rispetto alla temperatura di fusione del materiale. Successivamente è stata applicata una pressione costante del valore di $20 \cdot 10^3$ N per due minuti. Infine, le piastre sono state raffreddate in pressione, in modo da garantire la solidificazione del campione nella nuova forma.

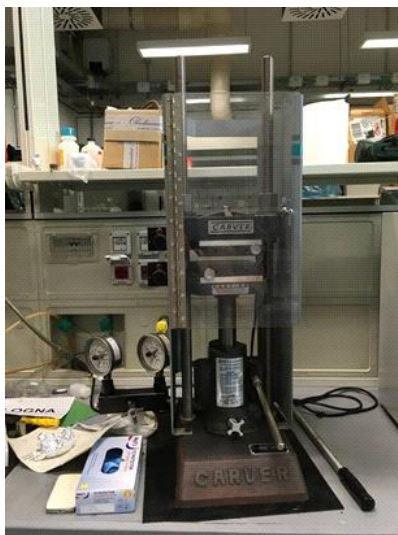


Figura 3.5 Pressa utilizzata per la preparazione di film sottili.

3.1.2 Realizzazione di *scaffold*

La preparazione di *scaffold* tridimensionali costituiti da fibre nanometriche è stata effettuata mediante elettrofilatura. Lo strumento è costituito da un generatore di tensione ad alto voltaggio (± 30 kV, 5 mA) (SVH150, Alintel Power Electronics, Italia), una siringa, dotata di ago di diametro ristretto (0,2-1,5 mm), contenente la soluzione polimerica, una pompa per infusione (KDS200, KD Scientific Inc., USA) che spinge lo stantuffo della siringa ad una velocità costante, ed un collettore metallico in acciaio inossidabile, collegato a terra (Figura 3.6).



Figura 3.6 Strumentazione per elettrofilatura.

La preparazione di ciascun tappetino elettrofilato è avvenuta secondo la seguente procedura:

- 600 mg di polimero sono stati disciolti in 4 mL di esafluoro-isopropanolo, al fine di ottenere una soluzione al 15% w/v; la soluzione viene solitamente mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per una notte, per permettere il completo scioglimento del polimero;
- la soluzione è stata caricata all'interno di una siringa in vetro, alla cui estremità è stato inserito un ago del diametro di 0,8 mm. La siringa è stata poi posta sul portacampione;
- si aziona la pompa, in maniera tale da avere un flusso costante di 0,05 mL/min e contemporaneamente si applica un campo elettrico di intensità pari a 20 kV. La distanza tra ago e collettore è stata fissata a 15 cm;
- al termine dell'infusione, che ha una durata di circa 45 minuti, sono stati ottenuti tappetini fibrosi dalle dimensioni di circa 7x7 cm.

3.2 Caratterizzazione molecolare

3.2.1 Risonanza magnetica nucleare (NMR)

Si tratta di un fenomeno fisico a cui sono soggetti alcuni nuclei atomici, in particolare quelli per cui il numero quantico di spin (m_s) è pari al numero quantico principale (n). Gli isotopi principali soggetti a questo fenomeno sono ^1H e ^{13}C . Lo spin è la proprietà fisica di questi nuclei di ruotare naturalmente intorno al proprio asse, mossi da un momento di spin (I) rispetto al centro del proprio

nucleo, a cui è associato un momento magnetico elementare μ . In presenza di un campo magnetico esterno, gli assi di rotazione di questi nuclei si dispongono lungo le linee di flusso del campo magnetico in versi opposti: in verso parallelo, verso il polo S del magnete e in verso antiparallelo, verso il polo N (Figura 3.7).

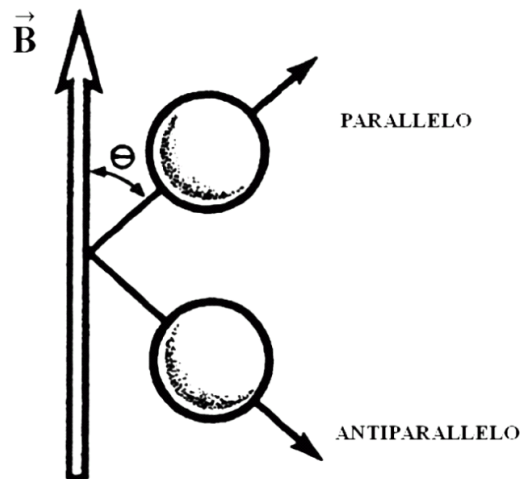
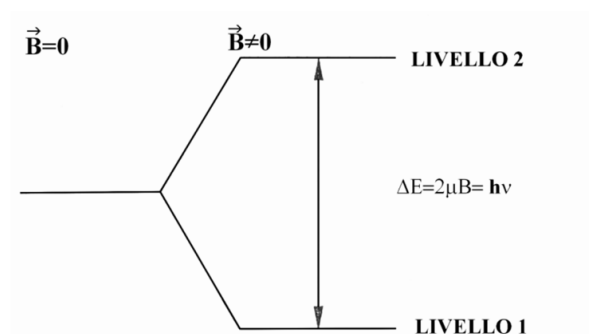


Figura 3.7 In presenza di un campo magnetico esterno B , gli spin adottano una delle due possibili orientazioni, denominate parallela e antiparallela

I nuclei a questo punto si trovano anche su due livelli energetici diversi: sul più alto ci sono quelli orientati in verso antiparallelo, sul più basso quelli in verso parallelo. Il divario tra i due livelli energetici dipende esclusivamente dal nucleo scelto e dal campo magnetico esterno, come pure la frequenza di risonanza.



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. Il moto di precessione dei momenti magnetici nucleari avviene con una frequenza

proporzionale alla differenza di energia tra i due livelli, detta frequenza di Larmor, data dalla formula:

$$\nu = \frac{\gamma B}{2\pi}$$

dove γ è il rapporto giromagnetico.

Se il campione viene irradiato con una radiazione elettromagnetica di frequenza uguale alla frequenza di Larmor dei nuclei in esame, l'energia della radiazione può essere trasferita a tali nuclei. Di conseguenza, ogni assorbimento di radiazione comporta un cambiamento di orientazione dello spin nucleare, da allineato con il campo ad opposto al campo. Quando si verifica questa transizione di spin, si dice che i nuclei sono in risonanza con la radiazione applicata: da qui il nome di risonanza magnetica nucleare. Il passaggio, da parte di un nucleo, da un'orientazione all'altra, è possibile tramite l'assorbimento di una quantità di energia pari a:

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

dove h è la costante di Planck e ν è la frequenza della radiazione elettromagnetica assorbita (Figura 3.8).

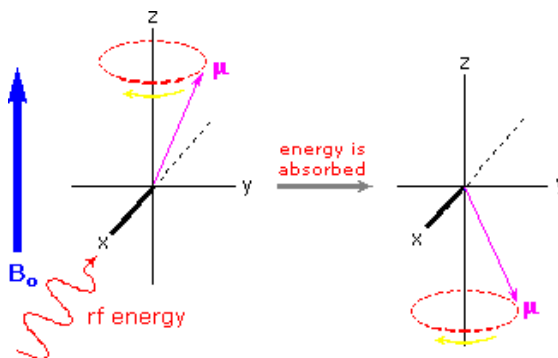


Figura 3.8 Transizione tra due stati di uno spin nucleare

Nei moderni strumenti, i nuclei di una specie vengono stimolati contemporaneamente da un impulso che comprende tutto l'intervallo di frequenze necessario ad eccitarli. I dati ottenuti vengono elaborati con la tecnica della trasformata di Fourier e il segnale risultante, che prende il nome di FID (*Free Induction Decay*), è oscillante con frequenza ν (la frequenza di Larmor) e si smorza nel tempo, in quanto i nuclei eccitati, anche quando si interrompe l'impulso di radiofrequenza, continuano ad emettere per qualche istante un debole segnale, che infine si annulla (Figura 3.9). Il segnale registrato rappresenta una misura dell'intensità dell'energia trasmessa in funzione del tempo. Per ottenere lo spettro NMR, costituito da diversi picchi più o meno elevati in base alla

maggiore o minore presenza del corrispondente costituente, è necessario riportare il segnale in funzione della frequenza.

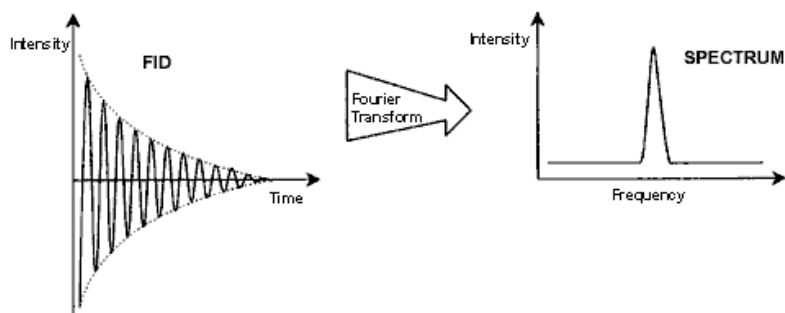


Figura 3.9 La sequenza FID e il relativo spettro NMR

I diversi picchi si ritrovano ad occupare posizioni a frequenze più o meno elevate proprio a seconda dell'intorno chimico che circonda l'atomo tracciante, in base ad un fenomeno di schermatura dovuto alla carica negativa delle particelle elettroniche. Ciò accade perché gli elettroni, essendo particelle cariche, se immersi in un campo magnetico B_0 si muovono generando, in opposizione ad esso, un piccolo campo magnetico opposto e secondario. Tale campo scherma il nucleo dal campo B_0 ; in particolare, quanto più grande è la densità elettronica, tanto maggiore sarà la schermatura: i nuclei che si trovano in un intorno ricco di elettroni sentiranno un campo magnetico più basso, e quindi subiranno la transizione ad una frequenza applicata più bassa rispetto ai nuclei situati in intorni poveri di elettroni. Lo spostamento risultante nel segnale NMR per un dato nucleo viene detto spostamento chimico; in generale, protoni o carboni adiacenti ad atomi elettronegativi risultano deschermati, di conseguenza avvertono un campo magnetico applicato più intenso, subiscono transizione a frequenze maggiori e, nello spettro, vengono individuati in corrispondenza di uno spostamento chimico più alto. Dal momento che lo spostamento chimico assoluto risulta direttamente proporzionale al campo applicato, strumenti diversi fornirebbero spostamenti chimici assoluti diversi; al fine di superare tale limitazione, si utilizza lo spostamento chimico relativo, misurato in ppm [Hz/MHz], e definito dall'equazione:

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

dove ν_r è la frequenza di risonanza del tetrametilestano (TMS), il nucleo di riferimento, e $\Delta\nu$ è la frequenza di risonanza del campione considerato. Tipicamente, per il nucleo dell'atomo ^1H e per molte molecole organiche, δ è compreso nell'intervallo tra 0 e 10 ppm. In uno spettro ^1H -NMR, ad atomi di idrogeno con intorni chimici diversi corrispondono picchi diversi; considerando l'area

sottesa da ogni picco, valutata in termini relativi (le misure in termini assoluti risultano prive di valore, in quanto variabili a seconda della concentrazione della soluzione), è possibile determinare il rapporto tra i vari tipi di atomi di idrogeno presenti. Dividendo poi l'area di ogni picco per il numero di idrogeni a cui corrisponde, si ottengono valori perfettamente confrontabili con quelli dati dalla formula chimica del polimero analizzato.

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

3.2.2 Cromatografia a permeazione su gel (GPC)

La cromatografia di permeazione su gel (GPC) è una tecnica che permette di determinare la distribuzione di peso molecolare in un polimero. Il metodo di analisi dei campioni si basa sulla creazione di curve di taratura attraverso standard di polimeri a peso molecolare noto e ad una successiva analisi per il confronto. Lo strumento è costituito da una pompa volumetrica, una colonna costituita da una resina porosa (polistirene reticolato con divinilbenzene) ed un rivelatore (Figura 3.10).

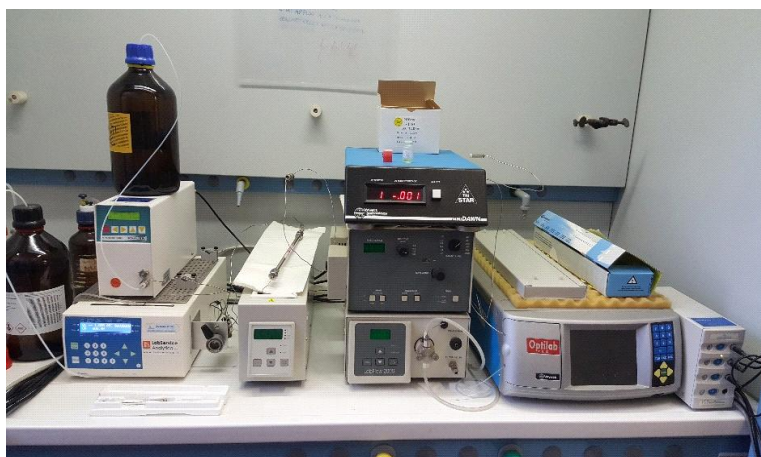


Figura 3.10 Strumentazione GPC

La separazione dei diversi pesi molecolari è dovuta al fatto che le molecole più grandi non penetrano nella maggior parte dei pori disponibili a causa delle loro dimensioni. Differentemente, le molecole più piccole riescono ad entrare nei suddetti pori, dove il liquido scorre più lentamente; di conseguenza le molecole ad alto peso molecolare usciranno in tempi brevi, quelle a basso peso

molecolare impiegheranno invece un tempo maggiore. Durante la scansione in colonna viene fatto circolare un solvente con portata volumetrica costante. I campioni da analizzare vengono sciolti nello stesso solvente circolante in colonna, filtrati attraverso l'utilizzo di un'apposita siringa munita di setto poroso, al fine di eliminare eventuali particelle non solubili che potrebbero ostruire i pori (Figura 3.11). L'analita così preparato viene iniettato tramite un sistema loop in colonna.



Figura 3.11 Filtrazione dei campioni disciolti nel solvente

La soluzione in uscita dalla colonna viene analizzata da un sensore che fornisce, istante per istante, un segnale, la cui intensità è proporzionale alla concentrazione del soluto. Il risultato dell'analisi è un grafico che riporta l'andamento dell'intensità del segnale in funzione del tempo. Per convertire i tempi in pesi molecolari è necessario fare riferimento alle curve di taratura, ottenute analizzando campioni standard di polistirene (PS) a peso molecolare noto.

Le misure di GPC sono state ottenute a 30 °C con un cromatografo HP Series 1100 HPLC per mezzo di una colonna PL gel 5 μ m MiniMIX-C (rapporto lunghezza/diametro in mm interno 250/4.6). I cromatogrammi sono stati registrati con HP Chemstation versione A.05.04 ed elaborati con GPC Calculator 7.6 software sviluppato dalla General Electric Company. Come eluente è stato utilizzato cloroformio, con flusso in colonna pari a 0.3 mL/min, precedentemente filtrato e fatto fluire attraverso un degasatore, al fine di rimuovere le particelle gassose che, analogamente a quelle non solubili, potrebbero ostruire i pori del gel. Tutte le soluzioni utilizzate contenevano una concentrazione di polimero pari a 2 mg/ml. Per costruire la curva di taratura sono stati impiegati vari standard di polistirene con peso molecolare variabile tra 2000 e 100000, per mezzo di una curva del terzo ordine. Il software associato al cromatografo calcola automaticamente, in base alla distribuzione ottenuta, il peso molecolare medio numerico (M_n) e l'indice di polidispersità del campione (PD).

3.3 Caratterizzazione termica

3.3.1 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

La calorimetria differenziale a scansione (DSC) è una tecnica di analisi termica utilizzabile per misurare la temperatura e il flusso di calore associato alle transizioni che avvengono nel campione, le entalpie di fusione, le cinetiche di cristallizzazione e le transizioni vetrose. Questa tecnica è basata sulla misura della differenza di flusso termico tra il campione in esame e il riferimento, mentre i due sono vincolati ad una temperatura definita da un programma prestabilito (Figura 3.12).

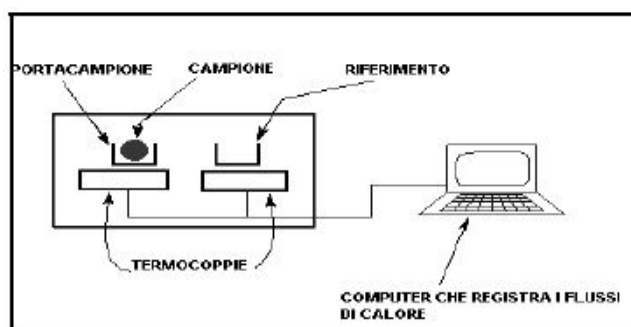


Figura 3.12 Schema di funzionamento della DSC

Il sistema è costituito da due camere che operano come microcalorimetri: in una camera viene messo il polimero incapsulato in un crogiolo di alluminio; nella seconda camera viene invece posto il riferimento, costituito da un crogiolo vuoto. Il computer collegato al sistema regola l'accensione e lo spegnimento delle termocoppie e stabilisce un flusso di calore specifico a cui saranno sottoposti entrambe le camere. In assenza di transizioni di fase, campione e riferimento si mantengono alla stessa temperatura; al contrario, in caso di variazioni di fase, che avvengono nel materiale al variare della temperatura, il crogiolo contenente il campione si troverà ad una temperatura diversa rispetto al riferimento, perciò al microcalorimetro contenente il riferimento viene fornita energia sufficiente per riportare campione e riferimento alla stessa temperatura. Con l'ausilio di un grafico rappresentante il flusso di calore in funzione della temperatura, è possibile studiare il comportamento del materiale in funzione della temperatura.

La temperatura di transizione vetrosa (T_g) indica il passaggio da uno stato solido vetroso ad uno gommoso, nel quale sono possibili movimenti conformazionali che interessano lunghi spezzoni di catena. Questa transizione termica si manifesta come una variazione endoterma della linea di base. 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 :

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

dove dT/dt è la velocità di scansione.

Al di sopra della transizione vetrosa, i polimeri sono molto mobili. Se le catene, oltre alla sufficiente mobilità, dispongono di sufficiente energia, possono riorganizzarsi in un assetto ordinato tridimensionalmente, i cosiddetti cristalli. Nel tracciato DSC si noterà dunque un picco esotermico, la cui area rappresenta l'entalpia di cristallizzazione, ΔH_c .

La temperatura di fusione (T_m) rappresenta il passaggio dallo stato solido a quello fuso, durante il quale le strutture cristalline vengono meno. Nel tracciato DSC essa si presenta come un picco endotermico. L'area sottesa al picco corrisponde al calore di fusione ΔH_m (J/g), proporzionale alla cristallinità del polimero; il rapporto tra quest'ultima grandezza e il calore di fusione del polimero completamente cristallino costituisce il grado di cristallinità del materiale (Figura 3.13).

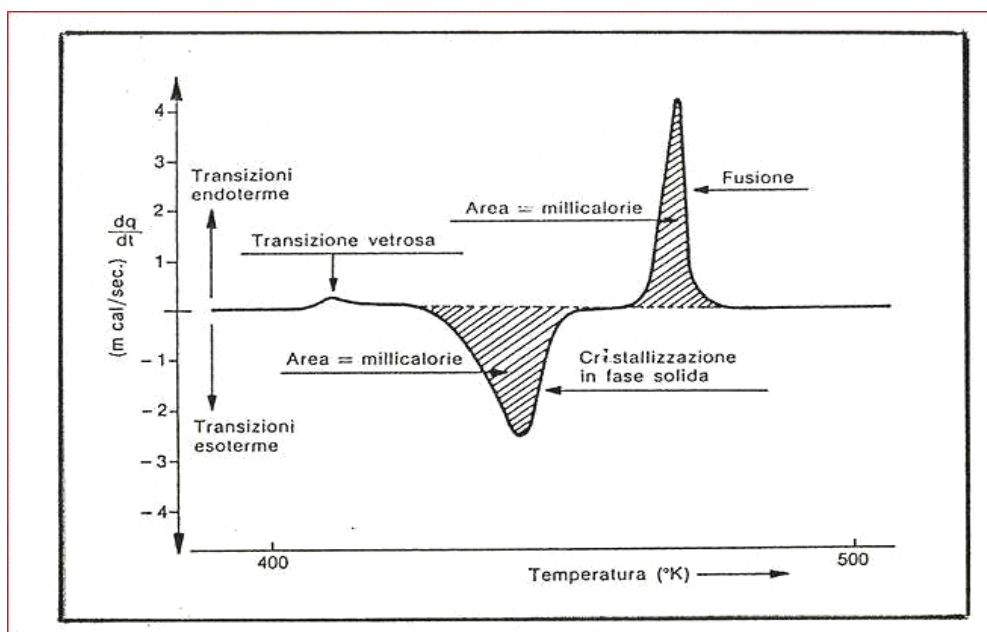


Figura 3.13 Esempio di curva DSC

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

in alluminio contenente il campione è stata riempita con circa 6-8 mg di materiale e, insieme alla capsula di riferimento lasciata vuota, è stata sottoposta ad un programma termico ben definito:

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

3.3.2 Termogravimetria (TGA)

La termogravimetria è una tecnica utilizzata per misurare la variazione di peso di una sostanza soggetta ad un riscaldamento controllato in atmosfera di gas diversi (aria, O_2 , N_2). In questo modo si ottengono informazioni sulla cinetica di decomposizione del materiale e sulla sua stabilità termica; in particolare si analizzano e definiscono i limiti di temperatura entro i quali il polimero può essere lavorato per evitare di incorrere nella sua degradazione.

Lo strumento utilizzato è la termobilancia PerkinElmer TGA 4000: all'interno di una fornace termostata sotto atmosfera controllata, vi è un piattello su cui viene posta una quantità di campione compresa tra 5-10 mg. Lo strumento è collegato ad un calcolatore sul quale vengono impostate l'intervallo di temperature di lavoro e la velocità di scansione. Il termogramma in uscita riporta la variazione percentuale di peso in funzione della temperatura (Figura 3.14). La procedura utilizzata per l'analisi dei polimeri sintetizzati, prevede una scansione da 40°C a 800°C ad una velocità di $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ in flusso di azoto.

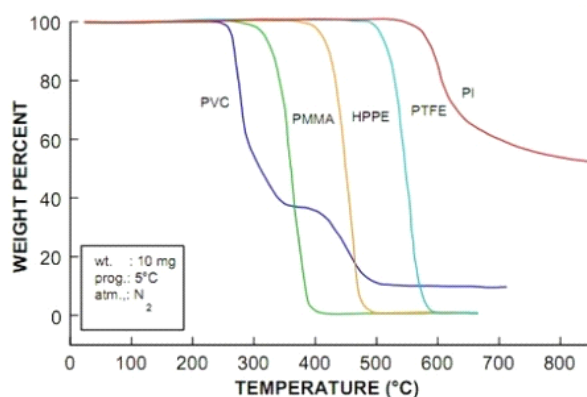


Figura 3.14 Curve termogravimetriche di polimeri

Nel presente lavoro di tesi sono state prese in considerazione la temperatura di inizio decomposizione (T_{onset}) e la temperatura corrispondente alla massima velocità di perdita di peso (T_{max}).

3.3.3 Diffrazione a raggi X

La diffrattometria è una tecnica che consente di ottenere informazioni chimico-strutturali sul campione. Il principio fisico su cui è basata è la legge di Bragg: si proietta sul campione un fascio di raggi X e se ne rileva la diffrazione. Agendo sull'angolo di incidenza del fascio si ricavano informazioni sulla struttura reticolare del campione (a partire dalla distanza interplanare ricavata con la legge di Bragg), agendo sulla lunghezza d'onda si indagano i diversi tipi di legame, giungendo anche a conclusioni sulla composizione chimica del materiale (Figura 3.15).

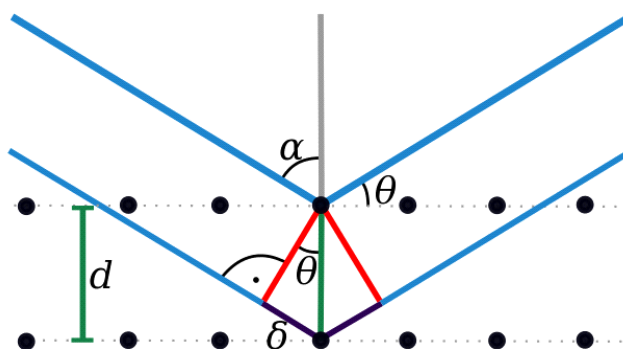


Figura 3.15 Diffrazione di raggi paralleli secondo Bragg

Il diffrattometro è costituito da:

- 1) **sorgente di raggi X**: è un tubo radiogeno che emette raggi X a lunghezza d'onda nota, costituito da una ampolla di vetro contenente, sottovuoto, un filamento in tungsteno collegato ad un'alimentazione elettrica, e da una base metallica contenente un circuito di raffreddamento idraulico. La base metallica contiene anche una lamina, detta **anticatodo** perché posta di fronte al filamento catodo, costituita da un unico elemento, attraverso la cui ionizzazione si otterranno i raggi X.
- 2) **collimatore e sistema di focalizzazione**: servono a far convergere i raggi verso il campione, poiché essi escono dalla sorgente con la tendenza a divergere;
- 3) **sample holder metallico**: è aperto superiormente e contiene il campione;

- 4) **sistema di focalizzazione e collimatore riceventi**: identici a quelli presenti prima del campione, ma posizionati specularmente, servono a far convergere meglio il fascio diffratto verso il rivelatore o un eventuale monocromatore;
- 5) **specchio monocromatore**: serve a filtrare il fascio di raggi X diffratto, eliminando in frequenza la componente di radiazione X derivante dalla ionizzazione delle molecole del campione (ossia la componente di fluorescenza, distinta da quella di diffrazione utile in XRD), più o meno presente a seconda del materiale che si analizza;
- 6) **rilevatore** riceve le radiazioni diffratte e conta quante provengono dalla medesima angolazione.

I pattern di diffrazione a Raggi X dei film polimerici sono stati ottenuti per mezzo di un diffrattometro X'PertPro PANalytical che utilizza la lunghezza d'onda del rame ($\lambda = 0.15418$ nm), equipaggiato con un rivelatore allo stato solido X'Celerator. I dati sono stati acquisiti nell'intervallo 2θ da 5 a 60° con passo di 1° , e tempo di conteggio pari a 100 secondi per punto. Gli indici di cristallinità χ_c sono stati calcolati in base ai diagrammi di diffrazione (Figura 3.16), effettuando il rapporto tra l'area di diffrazione cristallina, ovvero l'area data dalla frazione di materiale cristallino (A_C), e l'area totale del profilo di diffrazione (A_T), tenendo conto della radiazione diffusa e secondo l'equazione:

$$\chi_c = A_C/A_T$$

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

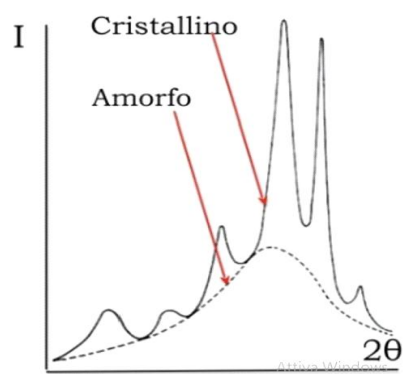


Figura 3.16 Esempio di diffrattogramma di un polimero semicristallino

3.4 Caratterizzazione meccanica

3.4.1 Misure stress-strain a rottura e cicliche

Per studiare il comportamento dei materiali polimerici sottoposti a sollecitazioni meccaniche vengono fatte misure della resistenza meccanica. In particolare, durante le prove tensili il provino è sottoposto a trazione e risente di uno sforzo σ (*stress*) e di una deformazione ε (*strain*).

Lo *stress* viene definito come rapporto tra il carico applicato in direzione normale N e l'area della sezione del provino resistente a riposo, A :

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

Lo *strain* indica l'allungamento del provino Δl rapportato alla lunghezza iniziale l :

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

La strumentazione con cui si effettuano queste prove è costituita da un dinamometro schematizzabile in alcuni sottocomponenti (Figura 3.17):

- 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.

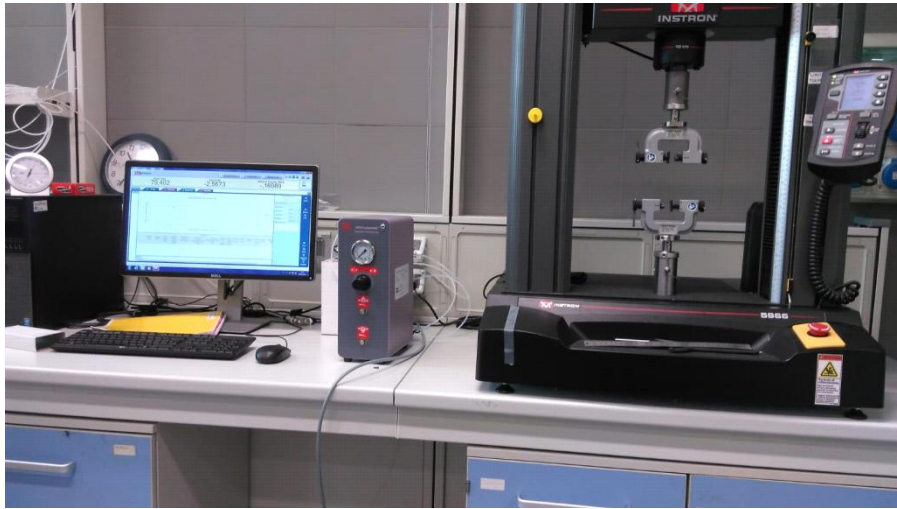


Figura 3.17 Strumentazione per prove meccaniche

Durante la prova si misura il valore del carico al variare della lunghezza del provino e in tal modo si ottengono dei diagrammi sforzo-deformazione, in cui ϵ è posto in ascissa e σ in ordinata (Figura 3.18).

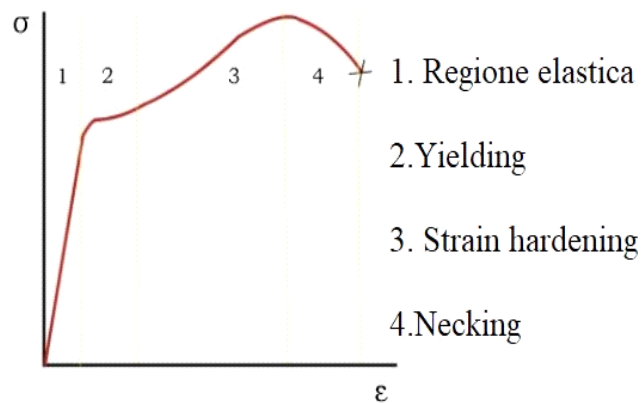


Figura 3.18 Esempio di curva sforzo-deformazione per materiali duttili

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

$$\sigma = E \cdot \epsilon$$

La costante di proporzionalità E indica il modulo elastico di Young, il cui valore corrisponde, per definizione, alla pendenza del tratto iniziale rettilineo della curva sforzo-deformazione. All'aumentare della deformazione si arriva ad un punto, detto di snervamento o *yielding*, in cui la

deformazione permane seppure in piccola parte quando il carico viene eliminato. Il materiale ha, quindi, subito una deformazione permanente e si è entrati nel campo plastico. Si entra poi nella zona di *strain hardening* in cui sia l'allungamento che la tensione crescono, fino a raggiungere un massimo in corrispondenza della tensione di rottura. Il campo plastico viene completato dall'ultimo tratto, il *necking*, in cui tipicamente la tensione diminuisce ma la deformazione continua e si rende più marcata in un punto particolare del provino. L'ultimo punto della curva è detto punto di rottura. Dall'area sottesa alla curva è possibile inoltre valutare la tenacità, che è una misura dell'energia necessaria per rompere il materiale.

I dati ottenuti dalle prove meccaniche non dipendono solamente dal tipo di polimero (struttura chimica, cristallinità, peso molecolare), ma risentono, della temperatura, e delle condizioni di prova, quali la velocità di allungamento, la forma e le dimensioni del provino. È quindi necessario operare in condizioni sperimentali strettamente controllate per poter confrontare il comportamento meccanico dei diversi materiali e porlo in relazione con le caratteristiche strutturali.

Le prove meccaniche sono state condotte utilizzando un dinamometro Instron 5966 con cella di carico di 100 N. Lo strumento è costituito da una struttura rigida di base e una traversa mobile posta nella parte superiore. Dai film polimerici e dagli *scaffold* sono state ottenute striscioline rettangolari dalle dimensioni di 5x40 mm, il cui spessore è stato misurato in tre punti diversi per mezzo di un micrometro: lo spessore utilizzato per l'analisi è stato ottenuto calcolando una media sulle tre misure. I provini sono stati fissati per mezzo di agganci (Figura 3.19), in maniera tale da avere un tratto utile di 20 mm e l'applicazione del carico è avvenuta tramite il movimento verso l'alto della traversa superiore. Il valore della forza impressa è stato misurato dalla cella di carico, mentre l'allungamento è stato determinato sulla base della distanza percorsa dalla traversa mobile. Le prove a rottura sono state condotte a temperatura ambiente, su 6 provini diversi, con velocità pari a 10 mm/min. Il modulo elastico riportato è stato calcolato come valore medio \pm deviazione standard delle 6 prove.

Per quanto riguarda le prove cicliche, condotte anch'esse su 6 provini, per ciascuno dei 20 cicli effettuati, ogni campione è stato prima portato ad una deformazione del 50%, e poi riportato alla condizione iniziale (0,001 MPa) ad una velocità di 50 mm/min.



Figura 3.19 *Scaffold* sottoposto a trazione

3.5 Prove di degradazione idrolitica

Si tratta di un test effettuato per verificare la velocità di degradazione di un materiale in condizione che simulano l'ambiente del corpo. Gli esperimenti sono stati condotti su campioni di film e *scaffold* di circa 40 mg che sono stati posti in condizioni fisiologiche di temperatura e pH (37°C e pH 7,4), con l'ausilio di una soluzione di tampone fosfato, in modo da mantenere il pH al valore desiderato.

I campioni sono stati posti in *vial* in vetro contenenti 5 mL di soluzione acquosa tamponata. Questi sono stati mantenuti in agitazione ad una temperatura costante di 37°C per periodi di tempo variabili, all'interno di un bagno termostatico con scuotitore azionato alla frequenza di 60 giri/minuto.

La soluzione tampone è stata preparata nel seguente modo: in 800 mL di acqua distillata sono stati disciolti 8 g di NaCl, 0,2 g di KCl, 1,44 g di Na₂HPO₄ e 0,24 g di KH₂PO₄; il pH della soluzione è stato aggiustato al valore di 7,4 per aggiunta di HCl e il volume finale portato ad 1 litro.

Nel presente lavoro di Tesi sono stati preparati e mantenuti in incubazione 14 provini del copolimero. Sono stati effettuati 7 prelievi, uno ogni 21 giorni, in duplicato, al fine di studiare il processo degradativo. Al momento del prelievo, i campioni sono stati rimossi dalla soluzione, lavati con acqua distillata per eliminare i sali della soluzione tampone, asciugati con carta assorbente. Essi vengono poi essiccati a temperatura ambiente, fino alla completa eliminazione dell'acqua residua e

al raggiungimento di un peso costante. Al termine di tale procedura, i campioni parzialmente degradati sono stati pesati e analizzati mediante cromatografia a permeazione su gel (GPC), per poter valutare, oltre alla perdita di peso gravimetrica, anche variazioni relative al peso molecolare. Inoltre, sono state condotte analisi $^1\text{H-NMR}$, DSC e diffrattometrica a raggi X.

3.6 Microscopico elettronico a scansione (SEM)

La microscopia elettronica a scansione (SEM) è una tecnica analitica che permette di esaminare la morfologia superficiale di un campione. Questa tecnica ha una risoluzione spaziale medio-alta (circa 1 micron, anche mille volte più della microscopia ottica) e la sua innovazione consiste nell'utilizzo dell'elettrone al posto del fotone, che possiede una lunghezza d'onda molto minore (frequenza più alta) ed è quindi capace di provocare risposte in corpi molto più piccoli. Con il SEM si è capaci di fare sia *imaging* sia spettroscopia grazie alle diverse risposte fisiche che si hanno quando il campione è investito dagli elettroni primari (gli elettroni scaturiti dal cannone elettronico all'apice del microscopio) lanciati contro di lui. Da essi si generano tre risposte:

- elettroni secondari: quando un elettrone primario si scontra con la nube elettronica di un atomo sulla superficie del campione viene rifratto indietro perdendo molta energia e viene identificato da un detector apposito;
- elettroni retrodiffusi: quando un elettrone primario si scontra con il nucleo di atomo del campione viene rifratto indietro con un urto quasi elastico, che non influisce di molto con l'energia cinetica dell'elettrone. Un detector parallelo al primo capta questi elettroni dall'energia cinetica maggiore come retrodiffusi. A seconda del numero atomico dell'atomo colpito avrà una densità maggiore di retrodiffusi dove ci sono numeri atomici maggiori;
- raggi X: un elettrone primario potrebbe anche urtare con gli elettroni interni (non quelli di valenza) e in alcuni casi anche strapparli via. L'atomo in questione si ionizza ed emette un raggio X per tornare stabile. I segnali associati ai raggi X vengono analizzati in frequenza e forniscono informazioni sulla composizione chimica del campione, poiché la loro analisi si basa sull'energia di ogni singola radiazione X, corrispondente ad un salto quantico atomico. Sapendo che ogni elemento chimico ha uno schema caratteristico di salti quantici si può perciò risalire alla chimica superficiale del campione.

La struttura del SEM (Figura 3.19) comprende due sistemi elettronici: il microscopio e un tubo a raggi catodici. Entrambi hanno un apparato per il lancio elettronico, lenti per l'indirizzamento del raggio di elettroni, placchette comandate in tensione da un segnale a dente di sega per la modulazione in x e y e camere sottovuoto, per la propagazione libera degli elettroni. Il campione è

posto sul fondo della camera apposita nel microscopio, sotto al quale vi è solo una pompa che assicura il vuoto dopo ogni estrazione o inserimento. Subito accanto al campione vi sono i tre detector, che acquisiscono le tre informazioni utili e le mandano al display. Il segnale in uscita dai detector viene manipolato per modulare l'intensità di ogni elemento della matrice visualizzata: a seconda della quota calcolata, viene assegnato un valore in toni di grigio.

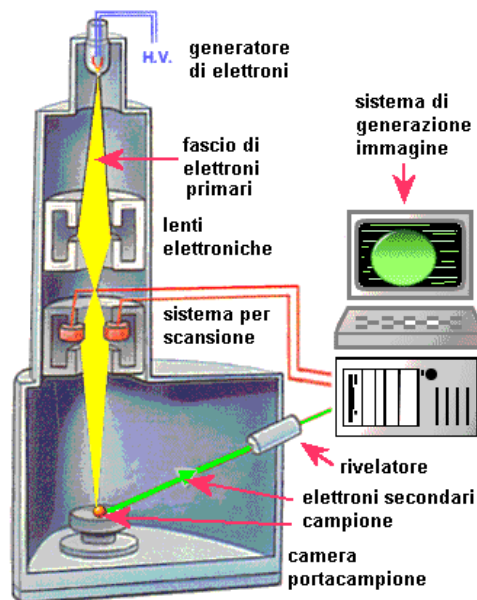


Figura 3.19 Struttura del SEM

La procedura generale per la preparazione dei campioni è la seguente: il campione viene montato su un apposito supporto (*stub*) di materiale conduttore (alluminio) e incollato con un materiale adesivo (pasta di argento o nastro biadesivo di grafite) che sia un buon conduttore di elettroni dallo *stub* al campione. Nel caso di materiali non conduttori, essi vengono sottoposti ad un processo di metallizzazione, che consiste nella stesura di un sottile strato di materiale conduttore direttamente sul campione.

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. L'analisi d'immagine è stata effettuata con GIMP 2.8, un software di acquisizione e analisi di immagine (EDAX Genesis); la distribuzione dei diametri delle fibre elettrofilate è stata calcolata come valor medio delle misure dei diametri di 150 fibre.

CAPITOLO 4 – RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Caratterizzazione molecolare dei polimeri idrossil-terminati PBS-OH e P(BSNS)-OH e del copolimero multiblocco PBSP(BSNS)

La caratterizzazione molecolare dei materiali sintetizzati è stata effettuata mediante analisi $^1\text{H-NMR}$. I valori ottenuti per i prepolimeri idrossil-terminati PBS-OH, P(BSNS)-OH sono riportati in Tabella 4.1, mentre il copolimero multiblocco derivante, PBSP(BSNS), è caratterizzato in Tabella 4.2.

Polimeri	M_n (g/mol)	DP	BS (mol%)	BS (wt%)
PBS-OH	9700	55,6	100	100
P(BSNS)-OH	8000	44,0	45	43

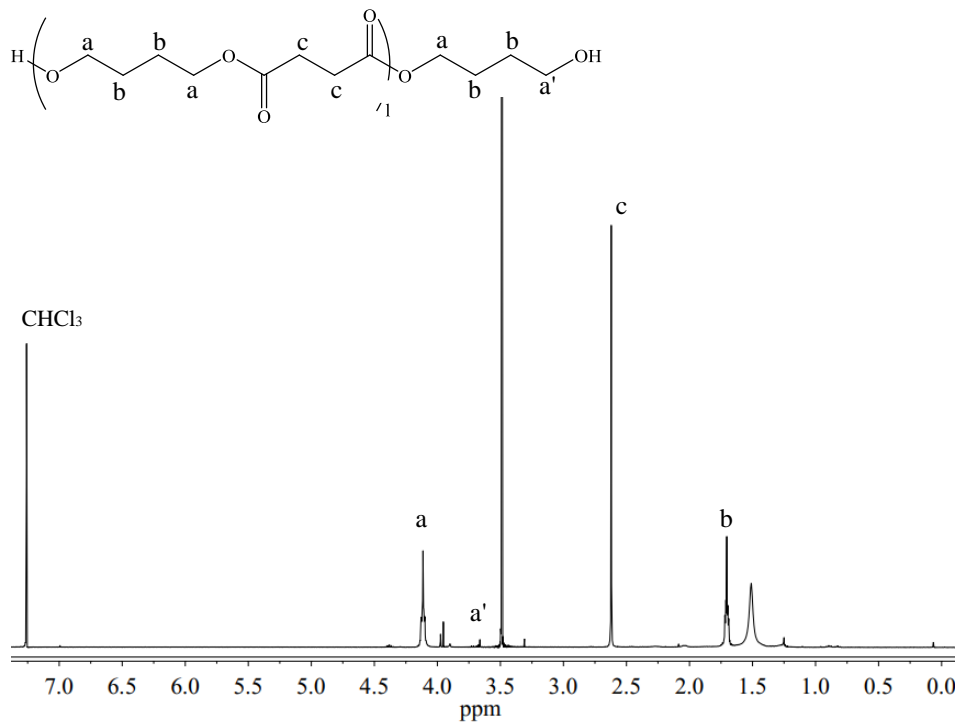
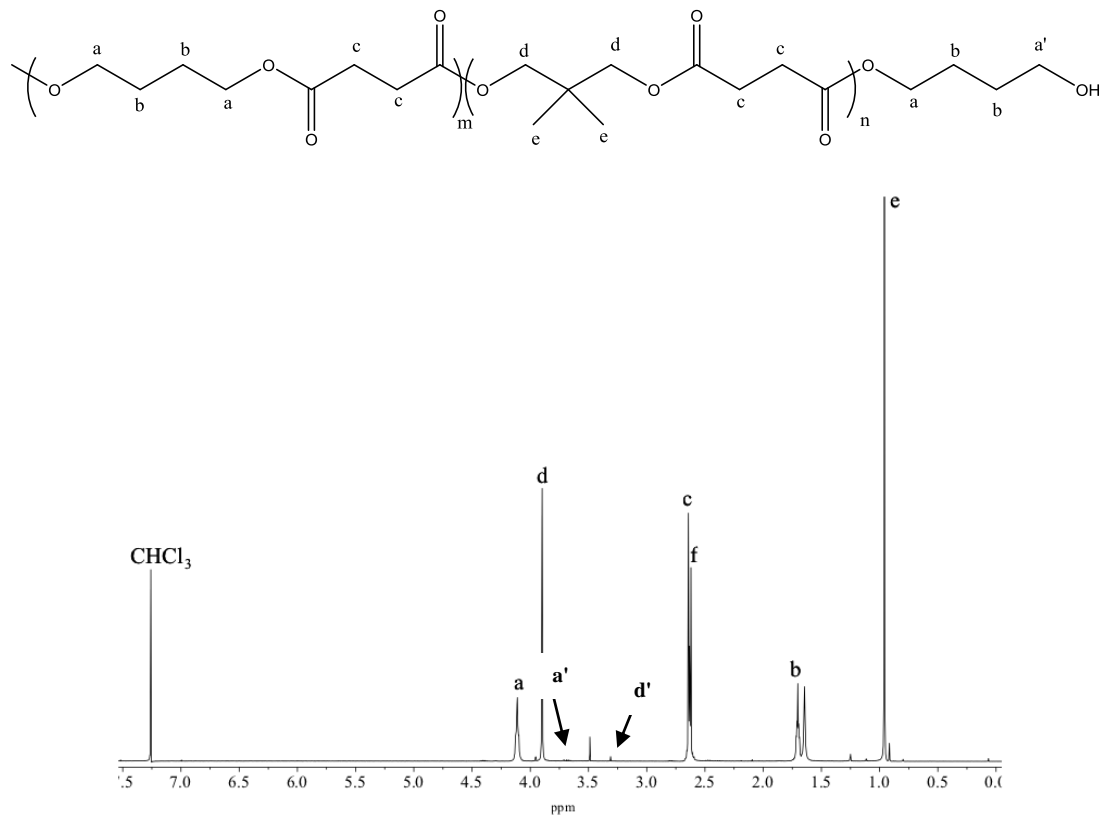
Tabella 4.1. Caratterizzazione molecolare di PBS-OH, P(BSNS)-OH

Polimero	M_n (g/mol)	PD	PBS_{blocco}(mol%)	PBS_{blocco}(wt%)
PBSP(BSNS)	36000	2,5	29	28

Tabella 4.2. Caratterizzazione molecolare di PBSP(BSNS)

Gli spettri in Figura 4.1 (a, b e c) mostrano i segnali caratteristici degli omopolimeri PBS-OH, P(BSNS)-OH e del copolimero multiblocco PBSP(BSNS).

Lo spettro del PBS-OH (Figura 4.1 a) mostra a δ 4,2 ppm e a δ 1,7 ppm i segnali dei protoni metilenici della subunità glicolica, rispettivamente *a* e *b*, mentre a δ 2,6 ppm si trova il singoletto ascrivibile agli idrogeni della subunità acida, *c*. Oltre ai segnali sopracitati, relativi alle unità ripetitive interne, nello spettro è anche possibile distinguere la presenza di un altro picco, *a'*, dovuto ai protoni metilenici delle subunità glicoliche esterne.

A**B**

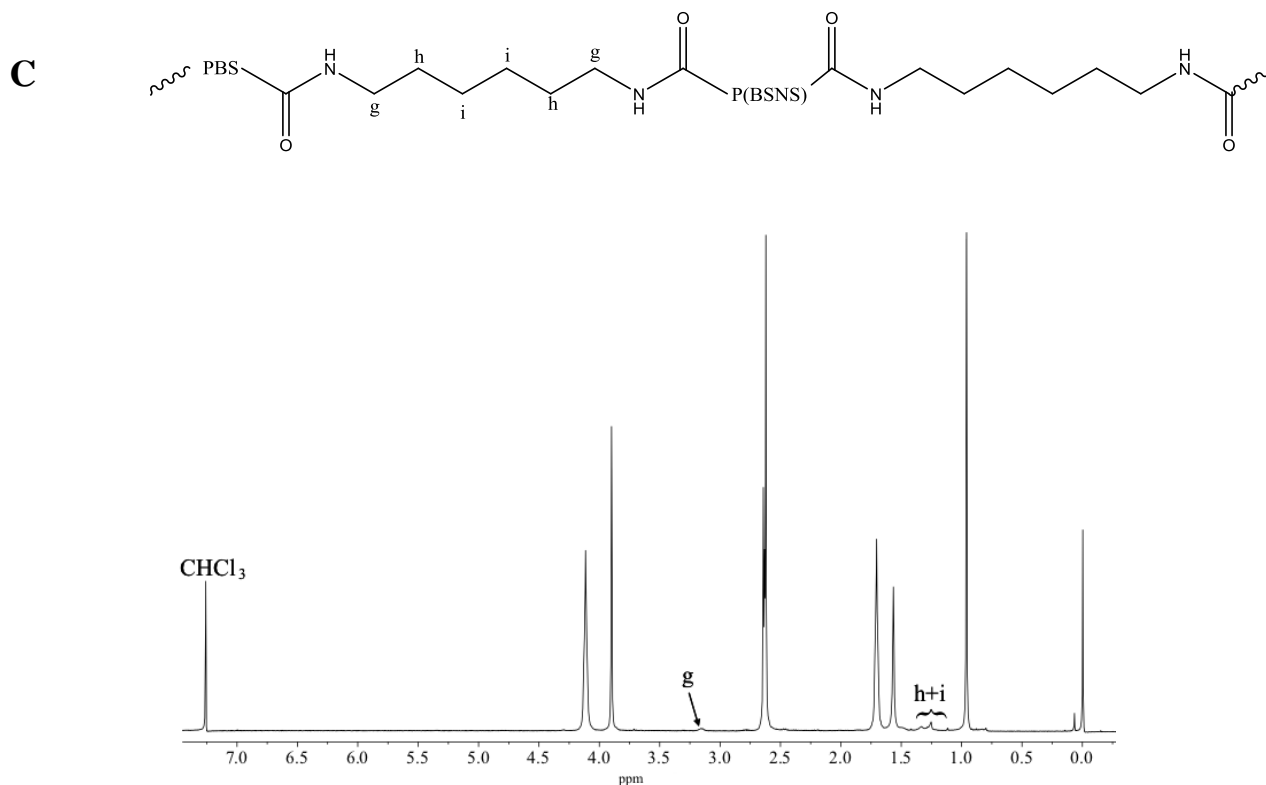


Figura 4.1 Spettri $^1\text{H-NMR}$ del PBS-OH(a), P(BSNS)-OH (b) e PBSP(BSNS) (c), con attribuzione dei picchi.

Dall'analisi $^1\text{H-NMR}$ è stato possibile calcolare il peso molecolare medio delle catene polimeriche (M_n), utilizzando la formula:

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

dove W_{ur} e $W_{glicole}$ sono rispettivamente il peso molecolare dell'unità ripetitiva e del glicole, mentre DP indica il grado di polimerizzazione. DP viene definito come:

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

in cui $I_{a'}$ è l'area sottesa dai segnali dei protoni delle unità glicoliche esterne a' , mentre I_a è l'area dei segnali metilenici delle stesse unità interne a . Il grado di polimerizzazione (quindi il numero di unità ripetitive per catena) e il peso molecolare medio per il PBS-OH, determinati tramite $^1\text{H-NMR}$, sono risultati rispettivamente pari a 55,6 e a 9700 g/mol (Tabella 4.1).

Nello spettro del P(BSNS)-OH (Figura 4.1 b), oltre ai picchi delle unità ripetitive BS già identificati nell'analisi del PBS-OH, si osservano i segnali dovuti al segmento NS: a δ 3,9 ppm e a δ 0,95 ppm troviamo i picchi dei protoni metilenici della subunità glicolica, rispettivamente d ed e ; a δ 2,6 ppm si trova il singoletto ascrivibile agli idrogeni della subunità acida, f ; a δ 3,70 ppm si trova il terminale a' che si presenta come un tripletto e a δ 3,30 ppm troviamo il terminale d' che si presenta

come singoletto. Sono stati quindi calcolati DP e M_n del P(BSNS)-OH, rispettivamente 44,0 e 8000 g/mol (Tabella 4.1). Analizzando lo spettro $^1\text{H-NMR}$, dall'area dei picchi dei protoni *a* della subunità glicolica BD a δ 4,1 ppm e dall'area del segnale dei metileni *d* della subunità NS a δ 3,9 ppm, è stata determinata la composizione del copolimero P(BSNS)-OH. La percentuale delle due unità ripetitive è risultata essere: BS 45 mol% e NS 55 mol% (Tabella 4.1).

I due polimeri idrossil-terminati PBS-OH e P(BSNS)-OH sono stati copolimerizzati per la realizzazione del copolimero multiblocco PBSP(BSNS), tramite reazione di estensione di catena con HDI. Nello spettro $^1\text{H-NMR}$ del copolimero multiblocco PBSP(BSNS) (Figura 4.1 c), oltre ai segnali dovuti ai picchi dei segmenti BS e NS, si osservano anche i segnali ascrivibili all'estensore di catena esametilendiisocianato: *g*, *h* e *i* che cadono rispettivamente a δ 3,15 e δ 1,25 ppm. La percentuale di HDI (3 mol%) è stata calcolata dall'intensità relativa del picco *g* ascrivibile all'estensore di catena e al picco *c* relativo alle unità sia BS che NS. L'analisi $^1\text{H-NMR}$ ha permesso di determinare la composizione del copolimero multiblocco dall'area del segnale dei metileni *d* della subunità NS a δ 3,9 ppm e dall'area dei picchi dei protoni *a* della subunità glicolica BD a δ 4,1 ppm. A quest'ultima è stato sottratto il contributo delle subunità glicolica BD all'interno del blocco P(BSNS), calcolato precedentemente. La percentuale dei due blocchi all'interno del copolimero PBSP(BSNS), riportata in Tabella 4.2, è risultata essere: PBS 29 mol% (corrispondente al 28% in peso) e P(BSNS) 71 mol% (corrispondente al 72% in peso). Mediante cromatografia a permeazione di gel (GPC) è stato determinato il peso molecolare medio numerico (M_n) del copolimero, che è risultato pari a 36000, mentre la polidispersità è risultata pari a 2,5 (Tabella 4.2).

4.2 Caratterizzazione morfologica degli *scaffold*

Nella Figura 4.2 sono state riportate le immagini SEM dello *scaffold* di PBSP(BSNS) elettrofilato. L'elettrofilatura, come descritto nella parte introduttiva di questo lavoro di Tesi, è una tecnica che permette di produrre fibre di dimensioni micrometriche o nanometriche, a partire da una soluzione polimerica.

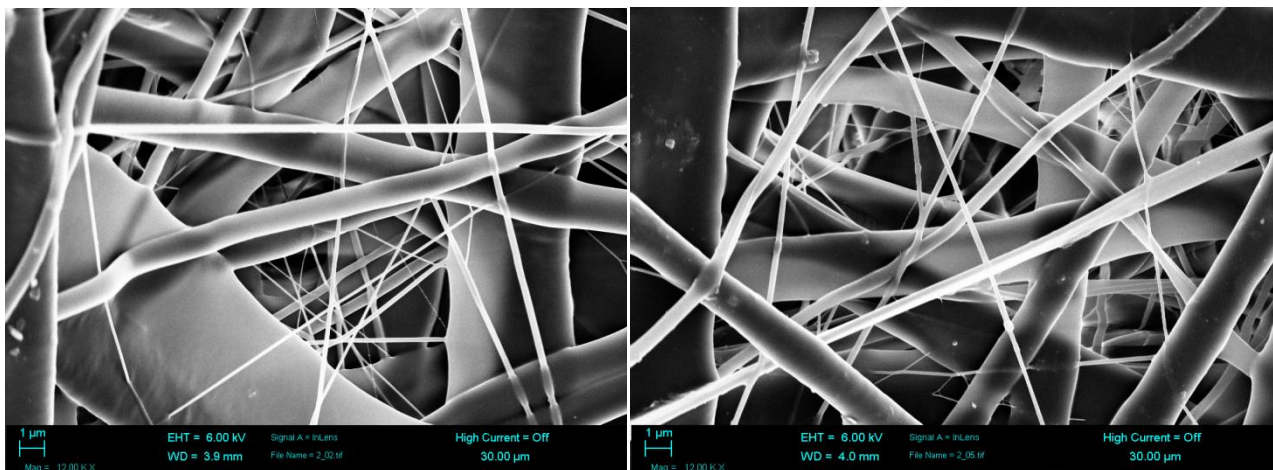


Figura 4.2 Immagini SEM delle fibre del copolimero multiblocco PBSP(BSNS)

L'assenza di *beads* 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. 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. La dimensione delle nanofibre è dell'ordine dei 1000 nm, mentre le microfibre hanno un diametro che varia da 1 a 10 μm.

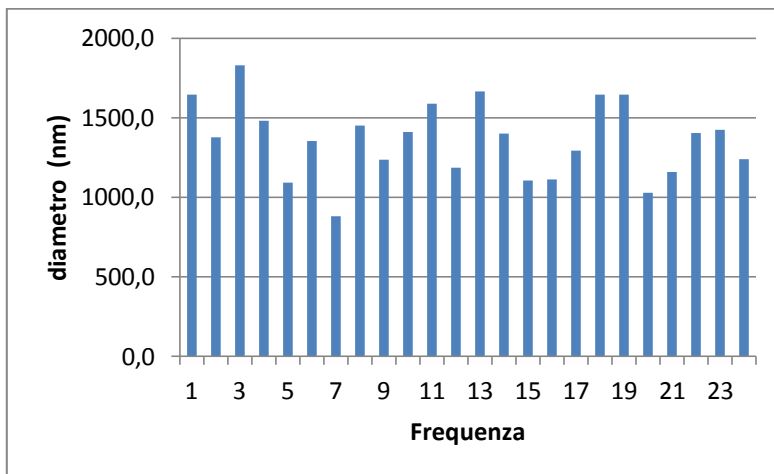


Figura 4.3 Distribuzione dimensionale del diametro delle fibre del PBSP(BSNS)

4.3 Analisi termogravimetrica (TGA)

Attraverso questa analisi è stato possibile valutare la stabilità termica dei campioni in esame. Dal punto di vista tecnologico è fondamentale individuare la temperatura di inizio decomposizione, poiché permette di processare il materiale senza incorrere in problemi legati a processi di

degradazione termica. I dati ottenuti dall'analisi termogravimetrica sui polimeri idrossil-terminati PBS-OH e P(BSNS)-OH e sul copolimero PBSP(BSNS) sono riassunti in Tabella 4.3

Campioni	T_{onset} (°C)	T_{max} (°C)
PBS-OH	376	409
P(BSNS)-OH	380	412
PBSP(BSNS)	378	415

Tabella 4.3 Dati termogravimetrici dei polimeri PBS-OH, P(BSNS)-OH e PBSP(BSNS).

L'analisi termogravimetrica indica un'ottima stabilità termica di tutti i campioni esaminati; si nota che l'introduzione lungo la catena di PBS di segmenti neopentile impartisce una maggiore stabilità termica, probabilmente legata alla presenza dei due gruppi metilici sul C₂ dell'unità glicolica, che limita le reazioni di β -scission⁽²¹⁾.

Il processo di elettrofilatura non compromette la stabilità termica del relativo *scaffold*, che risulta avere un comportamento in linea con il medesimo materiale non elettrofilato (dati non mostrati).

4.4 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

Nel caso dei prepolimeri PBS-OH e P(BSNS)-OH, l'analisi calorimetrica è stata effettuata subito dopo purificazione (Tabella 4.5). Per quanto riguarda invece PBSP(BSNS), in forma di film e di *scaffold*, l'analisi è stata eseguita dopo tre settimane di permanenza a temperatura ambiente in modo da dare al materiale il tempo necessario per raggiungere la cristallinità di equilibrio (Tabella 4.5).

	T _g (°C)	ΔC_p (J/g · °C)	T _m (°C)	ΔH_m (J/g)
PBS-OH	-29	0,155	119	67
P(BSNS)-OH	-26	0,459	43	16
PBSP(BSNS) Film	-27	0,303	43 104	41
PBSP(BSNS) Scaffold	-26	0,365	45 102	42

Tabella 4.5 Dati di caratterizzazione termica dei polimeri idrossil-terminati PBS-OH, P(BSNS)-OH e del copolimero multiblocco sia in forma di film che di *scaffold*.

In Figura 4.5 sono riportate le curve calorimetriche di prima scansione del PBS, P(BSNS)-OH e PBSP(BSNS) sotto forma di film e di *scaffold*.

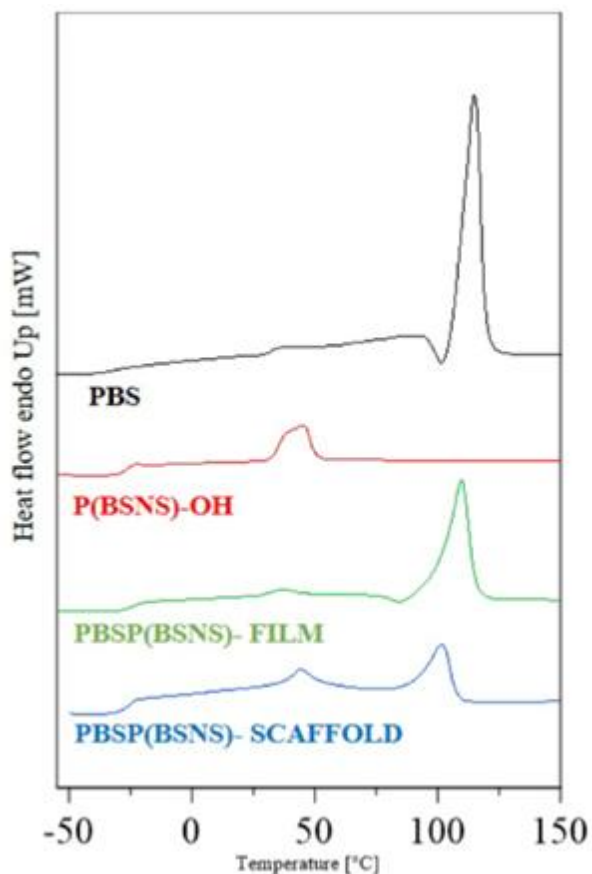


Figura 4.5 Curve DSC del PBS, P(BSNS)-OH e PBSP(BSNS) sotto forma di film e di *scaffold*.

Nel tracciato DSC del copolimero P(BSNS)-OH si evidenziano delle sostanziali differenze rispetto a quello del PBS: la co-unità NS induce un leggero aumento della T_g e del ΔC_p . Tale effetto è dovuto ai due $-CH_3$ sul C_2 glicolico che determinano una diminuzione della mobilità di catena e al tempo stesso ostacolano il processo di cristallizzazione. Il picco di fusione, infatti, si trova a una temperatura minore ed è meno intenso rispetto a quello del PBS (ΔH_m minore). Inoltre, la forma più allargata del picco di fusione di P(BSNS)-OH, suggerisce la presenza di cristalli meno perfetti. Per quanto riguarda il copolimero multiblocco PBSP(BSNS) sotto forma di film, il corrispondente tracciato DSC mostra una variazione endoterma della linea di base associata alla transizione vetrosa con T_g che si assesta intorno a $-27^\circ C$, seguita da due picchi di fusione si trovano rispettivamente a $43^\circ C$ e $104^\circ C$. Il primo picco corrisponde alla fusione dei cristalli del blocco P(BSNS) mentre quello a $104^\circ C$ è imputabile alla fusione dei cristalli del blocco PBS. Dai risultati ottenuti si evince che tramite questa strategia sintetica si riesce ad ottenere un copolimero caratterizzato da due

blocchi cristallizzabili, che fondono ad una temperatura non significativamente abbassata per effetto della copolimerizzazione.

La curva DSC del copolimero PBSP(BSNS) sotto forma di *scaffold*, risulta simile quella del film. I valori di ΔH_m sono confrontabili, a riprova del fatto che il processo di realizzazione dello *scaffold* favorisce la cristallizzazione sia dei segmenti BS lunghi del blocco PBS che quelli più corti del blocco P(BSNS).

4.5 Analisi diffrattometrica a raggi X

Il copolimero PBSP(BSNS) è stato sottoposto ad analisi diffrattometrica, sia sottoforma di film che di *scaffold* (Figura 4.6), allo scopo di determinare il tipo e la quantità di fase cristallina presente.

Come si può notare, sia il film che lo *scaffold* sono materiali semicristallini: i diffrattogrammi, infatti, presentano alcuni riflessi dovuti alla componente cristallina del materiale, sovrapposti ad una linea di base a campana dovuta alla porzione amorfa. In entrambi i casi, i picchi di diffrazione osservati sono caratteristici della fase α del PBS⁽²²⁾. Dunque, nel copolimero i segmenti di PBS sono in grado di cristallizzare, seppure in minore quantità. Il risultato non è così sorprendente se si tiene conto della similarità nella struttura chimica dei due glicoli. Inoltre, le ramificazioni del neopentilglicole sono corte quindi è plausibile che non disturbino eccessivamente la cristallizzazione del PBS. Analizzando più nello specifico i riflessi, si nota come la loro posizione non vari rispetto a quella che hanno nello spettro dell'omopolimero PBS. Questo porta ad ipotizzare la completa esclusione della co-unità nella fase amorfa.

Si nota inoltre che i riflessi per il PBSP(BSNS), film e *scaffold*, sono allargati rispetto a quelli del PBS, a causa della formazione di cristalli con un diverso grado di perfezione conseguente al rigetto nella fase amorfa presenza della co-unità non cristallizzabile.

I valori di cristallinità determinati tramite analisi diffrattometrica a Raggi X (Tabella 4.8) sono in linea con i risultati calorimetrici.

Polimeri	χ_c film (%)	χ_c scaffold (%)
PBS ⁽²²⁾	46	-
PBSP(BSNS)	35	38

Tabella 4.8 Indici di cristallinità del PBS sotto forma di film e del copolimero PBSP(BSNS) sotto forma di film e di *scaffold*.

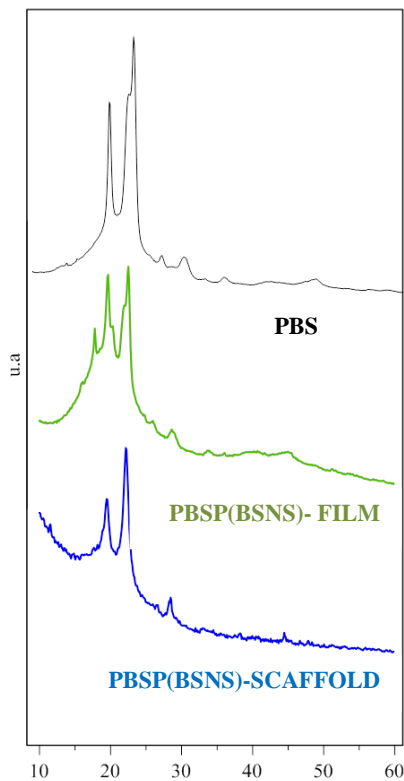


Figura 4.6 Curve diffrattometriche del PBS in forma di film e del copolimero PBSP(BSNS) in forma di film e di *scaffold*.

4.6 Caratterizzazione meccanica

Le misure meccaniche *stress-strain*, a rottura e cicliche, sono state eseguite su campioni di forma rettangolare (film 50 x 5 x 0,3 mm e *scaffold* 50 x 5 x 0,05 mm). Nelle misure di trazione, il provino è stato allungato a velocità costante e si è registrata la variazione dello sforzo, che viene poi riportata in grafico in funzione della deformazione. Nelle prove cicliche il campione è stato sottoposto ad un allungamento pari al 50% e, sottoposto a 20 cicli. Si registra lo sforzo applicato

durante la deformazione. Per ogni campione le misure sono state effettuate su 6 provini diversi, riportando il risultato come valore medio \pm deviazione standard.

In Figura 4.8 e 4.9 sono rappresentate le curve sforzo-deformazione a rottura e cicliche per il PBSP(BSNS), sotto forma di film e di *scaffold*. In Tabella 4.9 sono raccolti i valori di sforzo massimo (σ_{max}), deformazione a rottura (ϵ_{max}) e modulo elastico (E) dei campioni (film e *scaffold*), registrati durante le prove meccaniche a trazione.

Si può notare come il copolimero multiblocco PBSP(BSNS) sotto forma di film sia caratterizzato da un modulo elastico inferiore rispetto all'omopolimero di riferimento PBS (≈ 4 volte). L'allungamento a rottura del copolimero è al contrario di un ordine di grandezza maggiore rispetto a quello dell'omopolimero, mentre lo sforzo a rottura è analogo.

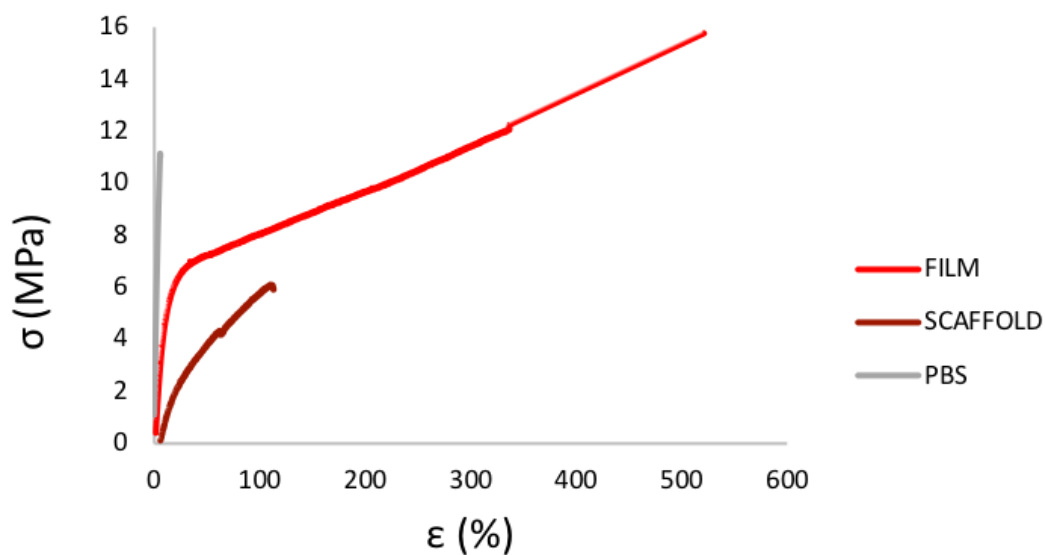


Figura 4.8 Grafico sforzo-deformazione del PBS in forma di film e del PBSP(BSNS) sotto forma di film e di *scaffold*

Polimeri	E (MPa)	σ_{max} (MPa)	ϵ_{max} (%)
PBS ⁽²²⁾	301 \pm 25	16 \pm 2	5 \pm 1
PBSP(BSNS) _{film}	78 \pm 10	15 \pm 2	520 \pm 27
PBSP(BSNS) _{scaffold}	5 \pm 1	2,2 \pm 0,8	120 \pm 18

Tabella 4.9 Dati di caratterizzazione meccanica del PBS e del copolimero PBSP(BSNS) sotto forma di film e *scaffold*

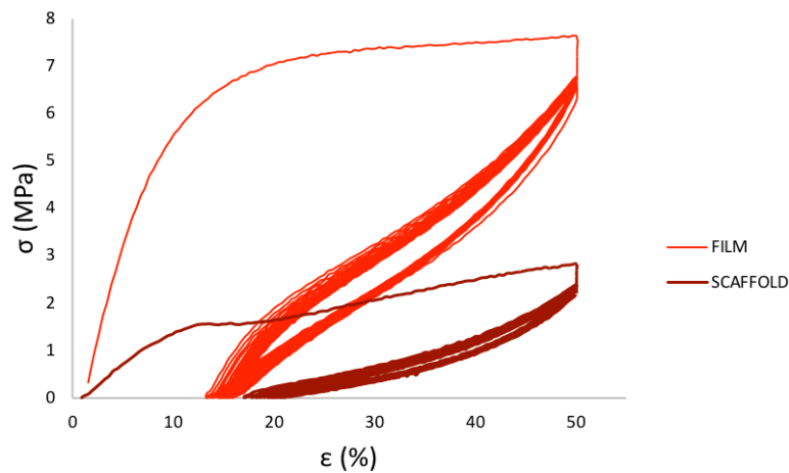


Figura 4.9 Prove cicliche sforzo-deformazione del PBSP(BSNS) sotto forma di film e di *scaffold*

Il risultato è da imputare alla minore cristallinità del copolimero. E' altresì interessante notare come la curva stress-strain del copolimero sia priva di snervamento. Questo risultato è da attribuire all'architettura molecolare, ottenuta con il processo di sintesi adottato, che alterna segmenti *hard* (PBS) a segmenti *soft* (P(BSNS)) e conferisce al materiale finale le caratteristiche di un elastomero termoplastico. Oltre che sul film, la risposta meccanica del copolimero multiblocco è stata testata anche sullo scaffold. Dai dati raccolti in Tabella 4.9, è possibile notare un ulteriore abbassamento del modulo elastico nel campione elettrofilato, che risulta di circa 15 volte più basso del valore misurato per il film. Non si osserva tuttavia un miglioramento dell'allungamento a rottura, che addirittura diminuisce di circa 4 volte, così come lo sforzo a rottura (≈ 7 volte). Possiamo ipotizzare che la stessa microstruttura porosa dello scaffold porti a una minore densità del materiale con conseguente diminuzione del modulo ma che, allo stesso tempo, produca delle discontinuità nel campione che favoriscano la rottura sotto sforzo per deformazioni più basse che nel film ottenuto per pressofusione.

(Tabella 4.9).

Per valutarne le proprietà elastomeriche e la resistenza alle sollecitazioni di carico-scarico, il PBSP(BSNS), sia in forma di film che elettrofilato, è stato sottoposto a prove cicliche condotte secondo le condizioni riportate nella parte sperimentale. In Figura 4.9 è riportato l'andamento dello sforzo (σ) in funzione della deformazione (ϵ %) per allungamenti del 50%. I cicli di carico-scarico evidenziano un'elevata elasticità del materiale, sia in forma di film che scaffold, avendo in entrambi i casi, un recupero di circa il 65% anche dopo 20 cicli. La differenza tra il primo e il secondo ciclo può essere spiegata sulla base del riorientamento delle macromolecole con conseguente cristallizzazione durante l'allungamento. Dal secondo ciclo, la curva carico-scarico segue un percorso molto simile caratterizzato da una isteresi, che risulta particolarmente bassa nel caso dello

scaffold.

Il PBSP(BSNS), sia in forma di film che di *scaffold*, presenta proprietà e caratteristiche che permettono di identificarlo come elastomero termoplastico. In particolare, il polimero sotto forma di *scaffold* ha un modulo elastico che si avvicina a quello del tessuto miocardico (valore compreso tra 0,02 e 0,5 MPa).

4.7 Degradazione idrolitica

Le prove di degradazione idrolitica hanno permesso di testare il comportamento del copolimero in esame, in particolare la sua velocità di degradazione, in condizioni che simulano l'ambiente corporeo. A tempi stabiliti, il campione parzialmente degradato è stato pesato e analizzato mediante cromatografia a permeazione su gel (GPC), per poter valutare la perdita di peso gravimetrica e le variazioni relative di peso molecolare. Inoltre, sono state condotte analisi DSC e diffrattometrica a Raggi X, per valutare eventuali variazioni del rapporto fase cristallina/fase amorfa.

L'idrolisi è un fenomeno che avviene in *bulk*: le catene macromolecolari in ambiente acquoso, infatti, vengono idrolizzate, ovvero tagliate, motivo per cui il valore del peso molecolare diminuisce. La perdita di peso gravimetrico può non essere rilevata nei primi stadi, poiché le catene idrolizzate non necessariamente passano subito in soluzione acquosa.

Polimeri	Perdita di peso gravimetrico (%)	Perdita di peso molecolare M_n (%)	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)
PBS ⁽²²⁾	2,0	35	-32	115	62
PBSP(BSNS) _{film}	1,3	23	-26	104	41
PBSP(BSNS) _{scaffold}	3,0	71	-26	102	42

Tabella 4.11. Dati di perdita di peso e variazione peso molecolare del PBS e del copolimero PBSP(BSNS) sotto forma di film e scaffold sottoposti a degradazione idrolitica in condizioni fisiologiche.

I parametri che influenzano la velocità di degradazione idrolitica sono molteplici: la densità di gruppi esterei, la flessibilità di catena e il grado di cristallinità rappresentano i fattori più importanti. In particolare, la velocità di degradazione è direttamente proporzionale alla quantità di gruppi -COOR- e alla mobilità di catena, mentre è inversamente proporzionale alla percentuale di fase cristallina presente.

Rispetto al PBS, il PBSP(BSNS) film ha un valore di T_g leggermente maggiore, mentre la porzione cristallina e la T_m corrispondente diminuiscono, mantenendosi comunque alte (Tabella 4.11). Inoltre, essendo le due co-unità glicoliche (BD e NS) di lunghezza simile, la quantità di gruppi -COOR- non varia sensibilmente rispetto all'omopolimero di riferimento. In quest'ottica, il rallentamento della velocità di degradazione di tale copolimero in forma di film, rispetto al PBS può essere spiegato sulla base del maggior valore di temperatura di transizione vetrosa, che indica una minore mobilità della catena macromolecolare, che risulta meno accessibile all'acqua. Inoltre, la maggiore diminuzione di M_n rispetto alla perdita di peso gravimetrico che si evidenzia nel campione analizzato, non stupisce se si considera che il fenomeno di degradazione idrolitica è un processo che avviene in *bulk*: per brevi tempi di incubazione, la variazione di peso molecolare non è accompagnata da una perdita di peso gravimetrico. Infine, nel copolimero non sono stati riscontrati, tramite analisi $^1\text{H-NMR}$, sbilanciamenti nella composizione, e le analisi DSC e diffrattometrica a Raggi X non hanno evidenziato variazioni del grado di cristallinità e della fase cristallina presente; si può affermare, dunque, che la degradazione coinvolge allo stesso modo le fasi amorfe e cristalline dei materiali analizzati.

È interessante soffermarsi sul confronto fra film e *scaffold* nel copolimero multiblocco. I risultati ottenuti evidenziano per lo *scaffold* una maggiore perdita di peso sia molecolare che gravimetrico dopo 21 settimane di incubazione in condizioni fisiologiche. Tale fenomeno è dovuto alla maggiore area superficiale esposta alle molecole d'acqua.

CAPITOLO 5 – CONCLUSIONE

La ricerca nel campo dell'ingegneria tissutale applicata alla patologia cardiaca ha compiuto notevoli progressi negli ultimi anni e numerosi studi ne attestano le notevoli potenzialità terapeutiche. Un ruolo di grande importanza in questo settore emergente è rivestito dai materiali polimerici, grazie alle loro proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità, facile lavorabilità e compatibilità meccanica con il sito di applicazione. In particolare, la classe di polimeri che si è rivelata più idonea è quella dei poliesteri alifatici. Tuttavia, ad oggi, solo pochi poliesteri sono stati approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) per la realizzazione di dispositivi medici impiantabili nel corpo umano, tra cui l'acido polilattico, l'acido poliglicolico e il policaprolattone e il polibutilene succinato. In particolare, quest'ultimo rappresenta un ottimo candidato, per la sua comprovata biocompatibilità e biodegradabilità, sebbene si dimostri essere troppo rigido per applicazioni nell'ingegneria tissutale del miocardio. In questo contesto si inserisce il presente lavoro di Tesi finalizzato alla sintesi e caratterizzazione di un nuovo copoliestere alifatico biodegradabile a base di poli (butilene succinato) con promettenti proprietà meccaniche per applicazioni nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti molli.

Grazie al lavoro di ricerca qui descritto è stato infatti possibile realizzare un materiale con spiccate caratteristiche di elastomero termoplastico (basso modulo elastico, relativamente elevato allungamento a rottura, ottimo recupero elastico e bassa isteresi) e al contempo tenace, con elevata temperatura di fusione e buona stabilità termica, addirittura più alta dell'omopolimero di riferimento. Il design del nuovo materiale ha permesso la realizzazione di una architettura molecolare in cui segmenti *hard* (PBS) coesistono con segmenti *soft* (P(BSNS)), che conferisce al materiale finale le caratteristiche di un elastomero termoplastico. L'elettrofilatura ha permesso di ridurre ulteriormente la rigidità del materiale, che ha un modulo elastico molto simile a quello del tessuto cardiaco.

Gli obiettivi della ricerca siano stati dunque raggiunti: le proprietà meccaniche sono state significativamente migliorate rispetto a quelle dell'omopolimero di riferimento (PBS) e a quelle dei materiali “*FDA approved*” disponibili in commercio.

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

soddisfacenti dell'omopolimero di riferimento, il PBS, senza andare a detrimento di quelle già buone.

Occorre poi sottolineare che il processo di sintesi è molto semplice e non prevede l'uso di solventi o di condizioni operative spinte; le enormi potenzialità di tale strategia sono comprovate dall'utilizzo su scala industriale.

A tale scopo, presso i laboratori di Translational Cardiology, Department of Development and Regeneration (Katholieke Universiteit di Leuven KUL), sono stati condotti studi di biocompatibilità e differenziamento cellulare nel fenotipo cardiaco. Gli esperimenti sono stati eseguiti su cellule staminali umane pluripotenti (*induced Pluripotent Stem Cells*, iPSCs). Dai risultati ottenuti, è possibile affermare che le cellule proliferano e mantengono il loro stato di pluripotenza nell'intervallo di tempo esplorato. Questi sono dati di particolare rilievo, in quanto per la prima volta nel gruppo di ricerca presso cui sono state svolte queste prove, è stato possibile far proliferare e differenziare cellule staminali umane su *scaffold* polimerici. Alla luce degli ottimi risultati finora ottenuti, ulteriori prove verranno condotte al fine di migliorare il processo di differenziamento fino ai cardiomiociti.

BIBLIOGRAFIA

1. James W. Levenson MD, Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease: The Role of Risk Factors, Wiley Online Library, (2007)
2. M. Radisić, G. Vunjak-Novaković, *Cardiac tissue engineering*, J. Serb. Chem. Soc. 70, (2005), 541-556.
3. F. J. O'Brien, *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*, Materialstoday 14, (2011), 88-95.
4. F.Felline, *Tissue Engineering. Materiali innovativi per la medicina rigenerativa*, CNI Scintille, (2015)
5. M. T Alrefai¹, D. Murali, A. Paul, K. M. Ridwan, J. M Connell, D. Shum-Tim, *Cardiac tissue engineering and regeneration using cell-based therapy*, Stem Cells and Cloning: Advances and Applications 8, (2015), 81-101.
6. M. Centola, K. Schuleri, A. Lardo, J. Hare, Stem cell therapy for myocardial regeneration: mechanisms and current clinical applications, G Ital Cardiol 9, (2008), 234-50. - 91 –
7. M.Sampaolesi, *Cellule Staminali, XXI Secolo, Treccani (2010)*
8. M. L. Focarete, M. Scandola, *Elettrofilatura: una tecnologia antica per applicazioni innovative su scala 'nano'*, CNES 2007 I Congresso Nazionale di Electrospinning, Milano, 4-5 Giugno 2007, 34-41.
9. C.Di Bello, A.Bagno, *Biomateriali. Dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*, Collana di Ingegneria Biomedica, Patron Editore, (2016).
10. Vineet Singh, Meena Tiwari, *Structure-Processing-Property Relationship of Poly(Glycolic Acid) for Drug Delivery Systems 1: Synthesis and Catalysis*, International Journal of Polymer Science, 2010, Article ID 652719, 1-23
11. A. Kramschuster, L. S. Turng, *Fabrication of Tissue Engineering Scaffolds*, Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics, (2013).
12. L. S. Nair, C. T. Laurencin, *Biodegradable Polymers as Biomaterials*, Progress in Polymer Science, (2007), 762-798.
13. L. Li, K. Raghupathi, C. Song, P. Prasad, S. Thayumanavan, Self-assembly of Random Copolymers, Chem Commun (Camb) 77A, (2014), 13417–13432.
14. M. Gigli, M. Fabbri, N. Lotti, R. Gamberini, B. Rimini, A.Munari , *Poly(butylene succinate)- based polyesters for biomedical applications: A review*, European Polymer Journal 75, (2016), 431-460.

15. M. Gigli, N. Lotti, M. Gazzano, L. Finelli, A. Munari, *Novel eco-friendly random copolyesters of poly(butylene succinate) containing ether-linkages*, *React. Funct. Polym.* 72, (2012), 303–310.
16. M. Gigli, M. Fabbri, N. Lotti, R. Gamberini, B. Rimini, A. Munari, *Poly(butylene succinate)- based polyesters for biomedical applications: A review*, *European Polymer Journal* 75, (2016), 431-460.
17. M. Gigli, N. Lotti, M. Gazzano, L. Finelli, A. Munari, *Novel eco-friendly random copolyesters of poly(butylene succinate) containing ether-linkages*, *React. Funct. Polym.* 72, (2012), 303–310.
18. M. Soccio, N. Lotti, L. Finelli, M. Gazzano, A. Munari, *Influence of transesterification reactions on the miscibility and thermal properties of poly (butylene/diethylene succinate) copolymers*, *Eur. Polym. J.* 44, (2008), 1722–1732.
19. C. Gualandi, M. Soccio, M. Govoni, S. Valente, N. Lotti, A. Munari, E. Giordano, G. Pasquinelli, M.L. Focarete, *Poly(butylene/diethylene glycol succinate) multiblock copolyester as a candidate biomaterial for soft tissue engineering: solid-state properties, degradability, and biocompatibility*, *J. Bioact. Compat. Polym.* 27, (2012), 244–264.
20. [Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Neopentyl_glycol](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Neopentyl_glycol).
21. M. Soccio, N. Lotti, L. Finelli, M. Gazzano, A. Munari, *Neopentyl glycol containing poly(propylene azelate)s: Synthesis and thermal properties*, *European Polymer Journal* 43, (2007), 3301-3313.
22. G. Guidotti, M. Soccio, V. Siracusa, M. Gazzano, E. Salatelli, A. Munari, N. Lotti, *Novel Random PBS-Based Copolymers Containing Aliphatic Side Chains for Sustainable Flexible Food Packaging*, *Polymers* 9, (2017), 724-740.