
ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E
DELL'INFORMAZIONE "GUGLIELMO MARCONI"

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

Titolo dell'elaborato

**APPLICAZIONI BIOMEDICALI DEL
POLI(BUTILENE SUCCINATO) E DEI SUOI COPOLIMERI**

Elaborato in

FONDAMENTI DI CHIMICA

Relatore

Prof.ssa Nadia Lotti

Correlatore

Ing. Giulia Guidotti

Presentata da

Giulia Di Ciano

Anno Accademico 2019/2020

INDICE

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	1
1.1 Biomateriali	1
1.1.1 Definizione.....	1
1.1.2 Caratteristiche	1
1.1.3 Classificazione	2
1.2 Biomateriali polimerici	6
1.2.1 Struttura dei polimeri	7
1.2.2 Proprietà	8
1.2.3 Sintesi	12
1.3 Copolimeri	14
1.3.1 Copolimeri statistici	14
1.3.2 Copolimeri a blocchi	15
1.4 Poliesteri alifatici	16
1.4.1 Caratteristiche	16
1.4.2 Poliesteri alifatici ad uso biomedicale	17
1.5 Ingegneria tissutale	20
1.6 Rilascio controllato di farmaco	22
CAPITOLO 2: SCOPO DELLA TESI	26
CAPITOLO 3: POLI(BUTILENE SUCCINATO) E SUOI COPOLIMERI	28
3.1 Poli(butilene succinato)	28
3.2 Sistemi copolimerici a base di poli(butilene succinato).....	30
3.2.1 Copolimero statistico poli(butilene succinato/diglicolato)	30
3.2.2 Poli(butilene/dietilene glicole succinato)	34
3.2.3 Poli(butilene/tiodietilene succinato)	37
3.2.4 Poli(butilene/trietilene succinato)	38
3.2.5 Poli(butilene succinato/ditiodipropionato)	40

3.2.6	Copolimero statistico poli(butilene succinato/tiodiglicolato)	44
3.2.7	Copolimeri a blocchi del PBS contenenti legame eterei o tioeterei	44
3.2.8	Copolimeri triblocco a base di PLLA e poli(butilene/trietilene succinato)	46
3.2.9	Copolimeri triblocco a base di PLLA e poli(butilene succinato/azelato)	50
3.2.10	Sistema ibrido PBS/cheratina	53
3.2.11	Sistema ibrido PBS/Chitosano	55
3.2.12	Sistema ibrido PBS/nanocristalli di cellulosa	57
3.2.13	Sistema ibrido a base di PBS e PLA/nanofibrille di cellulosa	58
3.2.14	Materiale composito poli(butilene succinato)/ nano fluoroapatite	60
3.2.15	Materiale composito poli(butilene succinato)/ silicato di magnesio	61
3.2.16	Nanocompositi di poli(butilene succinato) contenenti ceramiche bioattive	62
CAPITOLO 4: CONCLUSIONI		64
BIBLIOGRAFIA		66
RINGRAZIAMENTI		70

CAPITOLO 1:

INTRODUZIONE

1.1 Biomateriali

1.1.1 Definizione

La prima definizione della parola “biomateriale” fu stilata nel 1974, indicando con questo termine “un materiale inerte, sia dal punto di vista dell’organismo sia dal punto di vista farmacologico, progettato per essere impiantato e incorporato in un sistema vivente”. Nel corso degli anni gli sviluppi scientifici resero necessario aggiornare il concetto di biomateriale, comprendendo anche tessuti e organi trapiantati, oltre a tutti i materiali utilizzati per realizzare dispositivi sia a contatto con il corpo che extracorporei non medici. Di conseguenza, nel 1982 si ridefinì biomateriale “un materiale sintetico o naturale, o una combinazione di essi, diverso da un farmaco, impiegato per qualunque periodo di tempo, da solo o come parte di un sistema più complesso, per trattare, migliorare o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo”. Successivamente, nel 1986, si giunse alla definizione tutt’oggi in uso: “sostanza non vivente utilizzata per la fabbricazione di un dispositivo medico che ha in qualche punto un’interfaccia con un tessuto vivente”.

È evidente come i biomateriali, a partire dai loro primi impieghi ed in maniera crescente fino ad oggi, siano stati in grado anche di influenzare alcuni processi biologici, tanto da poter essere considerati come “materiali sintetici progettati per un uso prolungato in ambienti biologici, tali da innescare nessuna o, al più, una minima reazione avversa da parte dell’organismo”.

1.1.2 Caratteristiche

Un biomateriale, per essere definito tale, deve soddisfare i seguenti requisiti:

- **Biocompatibilità:** un materiale deve avere la capacità di non provocare una serie di reazioni sfavorevoli e indesiderate da parte del sistema vivente con cui entra in contatto durante una specifica applicazione, tali da poter comprometterne la sua completa funzionalità. La biocompatibilità viene valutata in base al tipo di prestazione richiesta, ed è necessario che oltre alla compatibilità biologica, sopra descritta, siano verificate anche la compatibilità morfologica e quella funzionale. Nel primo caso si intende che il

biomateriale abbia forma, geometria, interfaccia, massa, dimensioni simili a quelli dei tessuti e degli organi da trattare e/o sostituire; con la seconda tipologia di compatibilità si intende invece che il biomateriale, una volta impiantato, svolga lo stesso ruolo per il quale era stato progettato.

- Atossicità: nel corso del loro utilizzo in ambiente biologico, i materiali non devono rilasciare sostanze nocive per l'organismo con cui interagiscono.
- Proprietà chimiche e fisiche, e di conseguenza meccaniche, quali resistenza a trazione, modulo elastico, tenacità e durezza compatibili con quelle del sito in cui vengono impiantati.
- Elevata resistenza alla corrosione: tale caratteristica è particolarmente importante per i materiali metallici, i quali sono soggetti al fenomeno della corrosione nel momento in cui vengono a contatto con i fluidi corporei, rilasciando ioni tossici per l'organismo ospite sia vicino al sito d'impianto sia a livello sistemico attraverso il sistema circolatorio. Inoltre, la corrosione può danneggiare anche il materiale stesso, modificandone le proprietà e riducendone anche la durata.
- Elevata resistenza all'usura: quando sono presenti elevati coefficienti di attrito, il manufatto deve essere in grado di resistere il più possibile per evitare l'insorgere di fenomeni di allentamento dell'impianto, dovuti ad una perdita progressiva di materiale; quest'ultima, così come la corrosione, è spesso causa di gravi risposte infiammatorie.
- Elevata resistenza a fatica: i materiali devono essere in grado di rispondere in maniera adeguata ai carichi ciclici ripetuti, minimizzando l'accumulo di danni nel tempo ed evitando la rottura per la fatica.
- Funzione corrispondente a quella di progetto: i biomateriali devono essere facilmente lavorabili e caratterizzabili, in modo tale da poterne controllare il comportamento durante tutte le fasi di produzione del manufatto, che a sua volta deve essere facilmente riproducibile e deve svolgere alla perfezione la funzione per cui è stato progettato.

1.1.3 Classificazione

I biomateriali vengono di solito suddivisi in cinque categorie, sulla base delle loro caratteristiche chimiche. Inoltre, spesso vengono utilizzati in combinazione tra loro per soddisfare al meglio alcune richieste in particolari applicazioni biomedicali.

- **Materiali metallici:** presentano buone proprietà meccaniche, in particolare sono duttili, caratterizzati da elevato modulo elastico e particolarmente resistenti a fatica ed usura. Sono inoltre ottimi conduttori elettrici e termici, e facilmente deformabili ad elevate temperature. Alla luce di tali caratteristiche risultano ideali per sostituire tessuti duri e realizzare dispositivi sottoposti a carichi ciclici, come le protesi ortopediche (Figura 1) e dentali, strumenti chirurgici, e dispositivi di fissaggio quali piastre e viti. Di contro, negli ambienti fisiologici sono soggetti a corrosione, quindi possono risultare tossici; per ridurre questo fenomeno, spesso al posto dei metalli puri si preferisce utilizzare leghe metalliche, come ad esempio quelle a base di cobalto-cromo e di titanio.



Figura 1 Protesi d'anca composta da materiali metallici

- **Materiali ceramici:** sono caratterizzati da proprietà meccaniche peculiari come elevate fragilità, durezza, resistenza a compressione, a corrosione e all'usura. Sono inoltre particolarmente biocompatibili e sono buoni isolanti elettrici e termici. Di contro, presentano costi abbastanza elevati e spesso le proprietà meccaniche non sono idonee per alcune applicazioni. I materiali ceramici trovano impiego in ambito ortopedico, otorinolaringoiatrico, odontoiatrico (Figura 2) e cardiocircolatorio, oltre ad essere adatti alla realizzazione di *scaffold* per la crescita e la proliferazione di osteoblasti. In ambito biomedicale, i materiali ceramici possono essere suddivisi in tre classi: bioinerti, se non suscitano nessun tipo di risposta da parte dell'organismo, bioattivi, se stimolano una reazione che induce processi chimici e biologici all'interfaccia, biorassorbibili, se capaci di biodegradarsi nel corpo.



Figura 2 Protesi dentaria in materiale ceramico

- **Materiali biologici:** sono materiali di origine umana o animale, impiantati solo dopo essere stati sottoposti ad un processo di devitalizzazione cellulare per non suscitare risposte immunitarie negative nell'organismo ricevente. Quando si parla di materiali biologici si fa riferimento principalmente a tessuti connettivi, con caratteristiche dure o molli a seconda del tipo di tessuto: alcuni esempi sono collagene (Figura 3) ed elastina, sostanze presenti nelle ossa, nella cartilagine, oltre ad essere i maggiori costituenti di endotelio, vene, pericardio e valvole cardiache. Questi materiali, grazie alla loro elevata biocompatibilità, vengono utilizzati per protesi vascolari, protesi valvolari, riempimenti di difetti ossei e rivestimenti superficiali. Di contro, la loro difficile conservazione e le proprietà meccaniche non omogenee ne limitano fortemente l'impiego.

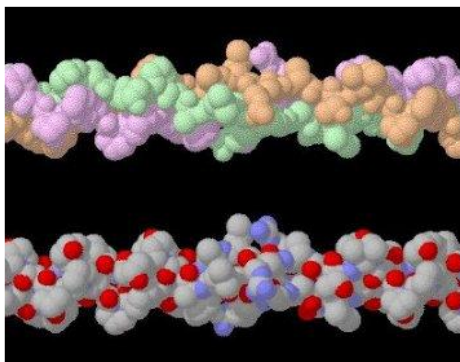


Figura 3 Fibre di collagene in una ricostruzione digitale

- **Materiali polimerici:** sono materiali versatili, facilmente lavorabili, che presentano grande variabilità di proprietà sia fisiche che meccaniche, caratteristica che li rende ingegnerizzabili per applicazioni specifiche. Sono utilizzati per sostituzioni di tessuti duri e molli, in campo dentistico, ortopedico e cardiovascolare (Figura 4), ad esempio per la realizzazione di cemento osseo, protesi ortopediche, valvole cardiache, innesti

vascolari, cateteri, protesi mammarie, lenti a contatto, suture e parti di dispositivi. Se ne parlerà più ampiamente in seguito.



Figura 4 Stent in materiale polimerico

- **Materiali compositi:** sono formati da due o più costituenti chimicamente diversi e separati da un'interfaccia, denominati matrice e rinforzo in base alla loro funzione. La matrice contiene il rinforzo, lo connette e lo mantiene in posizione; viceversa, il rinforzo, presente in fase dispersa, è solitamente più rigido, con un'elevata resistenza meccanica, e perciò assorbe la maggior parte del carico esterno. I materiali compositi godono in generale di buona biocompatibilità, inerzia chimica, elevate proprietà meccaniche e resistenza alla corrosione, grazie all'azione sinergica dei singoli componenti, ciascuno con proprietà specifiche; tuttavia, risultano spesso difficili da lavorare. Sono utilizzati come rivestimenti superficiali per migliorare la biocompatibilità di un dispositivo, riempitivi in ambito odontoiatrico, rinforzi per materiali polimerici.

In Tabella 1 sono raccolti i principali vantaggi e svantaggi delle classi di biomateriali sopra descritte, unitamente alle loro principali applicazioni.

Tabella 1 Classificazione dei biomateriali

Materiali	Vantaggi	Svantaggi	Applicazioni
<p>Metallici (acciai, titanio e leghe, leghe di cobalto)</p>	<p>Elevate proprietà meccaniche, resistenza a fatica e usura</p>	<p>Scarsa biocompatibilità, alta densità di massa, corrosione in ambiente biologico</p>	<p>Protesi ortopediche e odontoiatriche, mezzi di osteosintesi</p>
<p>Ceramici (ossidi di alluminio, alluminati di calcio, ossidi di titanio, carbonio)</p>	<p>Buona biocompatibilità, inerzia chimica, elevata resistenza a compressione e corrosione</p>	<p>Bassa affidabilità meccanica, fragilità, alta densità di massa, difficile lavorabilità</p>	<p>Protesi d'anca e dentali, dispositivi percutanei</p>
<p>Biologici (vene, pericardio, valvole cardiache)</p>	<p>Ottima biocompatibilità</p>	<p>Scarsa affidabilità meccanica, difficoltà di trattamento e conservazione</p>	<p>Protesi vascolari e valvolari, rivestimenti</p>
<p>Compositi (metalli rivestiti con ceramici, matrici rinforzate con fibre)</p>	<p>Buona biocompatibilità, inerzia chimica, buone caratteristiche meccaniche, resistenza alla corrosione</p>	<p>Scarsa coesione tra i componenti, difficile lavorabilità</p>	<p>Protesi valvolari cardiache, protesi ortopediche (ginocchio)</p>
<p>Polimerici (siliconi, poliuretani, polietilene, acrilati, fluorurati, poliesteri)</p>	<p>Tenacità, bassa densità, facile lavorabilità</p>	<p>Bassa resistenza meccanica, degradazione nel tempo</p>	<p>Suture, cateteri, drenaggi, protesi cardiovascolari, cementi ossei</p>

1.2 Biomateriali polimerici

I polimeri sono composti organici ottenuti dall'unione di due o più molecole a basso peso molecolare, dette monomeri. Con il termine polimeri si indicano sostanze ad elevato peso molecolare, mentre dall'unione di poche unità monomeriche si ottengono prodotti a più basso peso, detti oligomeri. La reazione che porta alla formazione del polimero a partire dai singoli monomeri è la reazione di polimerizzazione. In base al tipo e alla quantità relativa di monomeri utilizzati, i polimeri possono avere una composizione altamente variabile, che determina proprietà fisiche e meccaniche adattabili alle diverse applicazioni. Inoltre, in generale,

presentano un basso coefficiente d'attrito, buona resistenza all'usura, facile processabilità e lavorabilità. Numerosi polimeri sintetici sono poi realizzabili con una struttura molto simile a quella dei tessuti biologici, aumentando in questo modo la biocompatibilità. I polimeri possono essere classificati in base:

- alla natura dei loro costituenti: omopolimeri, se le catene sono formate da un solo tipo di monomero, copolimeri se formati da diversi monomeri;
- alla loro origine: naturali, sintetici, artificiali;
- al tipo di reazione con cui sono ottenuti: polimeri di condensazione oppure di addizione;
- alla loro struttura: lineari, ramificati o reticolati.

1.2.1 Struttura dei polimeri

Come già detto, i polimeri sono macromolecole costituite da monomeri tenuti insieme attraverso legami covalenti. La lunghezza e l'organizzazione nello spazio delle strutture formate, oltre alla composizione chimica, influenzano le proprietà finali del polimero. Le macromolecole polimeriche possono essere classificate in quattro tipologie di struttura (Figura 5):

- **Struttura lineare:** varie catene si legano tra loro attraverso le estremità formando lunghe macromolecole filiformi, spesso dense. Le catene sono tenute insieme da legami di Van der Waals, legami a idrogeno e interazioni dipolo-dipolo.
- **Struttura ramificata:** dalla catena principale lineare partono delle ramificazioni laterali unite attraverso legami deboli alla struttura filiforme.
- **Struttura a legami trasversali o intermolecolari:** presenta catene lineari adiacenti unite da ramificazioni laterali tramite legami covalenti, le quali creano così una struttura tridimensionale.
- **Struttura reticolata:** ha la forma di un'unica macromolecola reticolata, composta da monomeri multifunzionali che formano tre o più legami covalenti attivi, creando reti 3D.

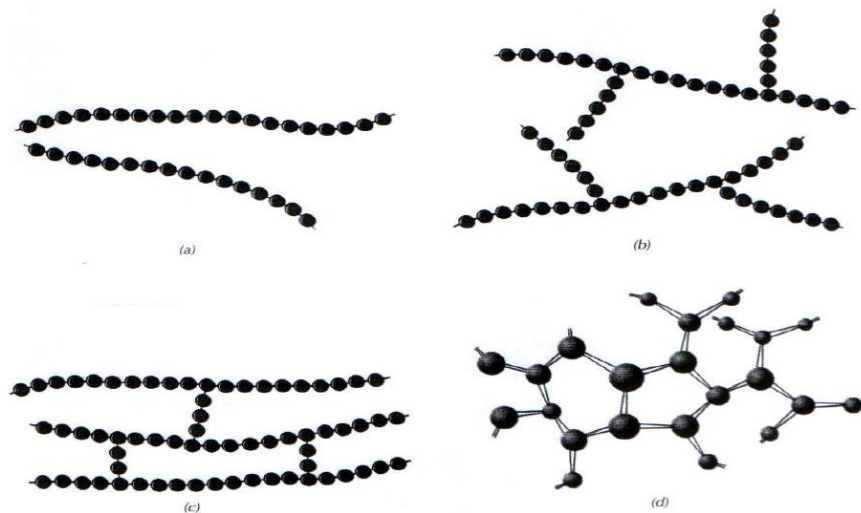


Figura 5 Strutture macromolecolari dei polimeri: a) lineare, b) ramificata, c) a legami trasversali o intermolecolari, d) reticolata

In generale, i polimeri a catena lineare o ramificata sono caratterizzati da proprietà meccaniche inferiori rispetto a quelle dei polimeri reticolati: nel primo caso, infatti, poiché le catene sono legate fra loro da legami deboli, quando sollecitati essi presentano scorrimenti viscosi tra le catene, i quali conferiscono un comportamento viscoelastico al polimero. Nel caso della struttura reticolata, invece, le catene sono unite da legami covalenti che impediscono lo scorrimento viscoso, e quindi conferiscono proprietà di maggiore rigidità e resistenza meccanica.

1.2.2 Proprietà

Nei materiali polimerici le catene sono organizzate come strutture a due fasi, una amorfa ed una cristallina. All'interno della fase cristallina le catene polimeriche sono disposte ordinatamente secondo una sequenza che si ripete nello spazio, chiamata cella elementare. Quest'ultima è la porzione più piccola della struttura che si ripete ordinatamente nello spazio e che presenta peculiari proprietà di simmetria del reticolo. Viceversa, nella fase amorfa, che è sempre presente, le catene sono disposte in modo disordinato, come accade tipicamente nello stato fuso. A tale proposito, si definisce grado di cristallinità il rapporto percentuale tra il peso di sostanza in forma cristallina ed il peso totale. Nei materiali polimerici questo valore è compreso tra il 5% e il 95%, e risulta superiore per polimeri a struttura lineare, le cui catene possono allinearsi

più facilmente nello spazio, mentre risulta minore per le macromolecole reticolate contenenti gruppi funzionali stericamente ingombranti.

Per quanto riguarda le proprietà, i materiali che presentano un'elevata cristallinità sono caratterizzati da elevate densità, rigidità e durezza grazie al maggiore impacchettamento delle catene, una più elevata resistenza meccanica, all'usura e agli agenti ambientali, mentre sono meno soggetti a fenomeni viscoelastici come rilassamento e *creep*.

Per effettuare una caratterizzazione completa, è importante considerare anche il peso molecolare del polimero, in quanto questo influisce particolarmente sulle proprietà fisiche e meccaniche. A causa degli eventi che intercorrono nel processo di polimerizzazione, si formano molecole aventi lunghezze diverse e quindi pesi molecolari diversi tra loro. Per stimare un peso molecolare complessivo del polimero, si calcola un grado di polimerizzazione medio, dato dal rapporto tra il numero di molecole di un certo tipo ed il numero totale di macromolecole. Il peso molecolare di una singola macromolecola è quindi dato dal prodotto tra il grado di polimerizzazione medio e la massa dell'unità ripetitiva. Inoltre, per calcolare il peso molecolare medio delle macromolecole si può far riferimento a due diversi valori:

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

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

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

- Il peso molecolare medio ponderale (M_w): esprime la media pesata sulla massa delle macromolecole presenti:

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

Quest'ultimo valore è influenzato soprattutto da molecole di grandi dimensioni, mentre il primo da quelle piccole, per cui si ha sempre $M_w > M_n$.

Infine, l'indice di polidispersità è definito dal rapporto

$$D = M_w / M_n$$

che rappresenta la larghezza della distribuzione dei pesi molecolari. Se $D = 1$ si parla di polimero monodisperso, cioè costituito interamente da molecole con lo stesso peso molecolare;

nei casi reali, però, questo valore è solitamente superiore a 1, in particolare per polimeri sintetici (il limite inferiore è compreso tra 1.5 e 2.5). In campo biomedicale si preferiscono polimeri ad alto peso molecolare e con basso D, affinché siano assicurate facile lavorabilità, buone proprietà meccaniche e bassa distribuzione dei pesi molecolari.

In base alle proprietà termomeccaniche, i materiali polimerici si definiscono:

- Termoplastici: polimeri a catena lineare o ramificata, al cui interno sono presenti legami a bassa resistenza termica. Se riscaldati rammolliscono, permettendo il modellamento plastico, riacquistando poi una consistenza solida quando la temperatura diminuisce. Finché si rimane in un determinato intervallo di temperature, questo ciclo è attuabile un numero teoricamente infinito di volte.
- Termoindurenti: polimeri a catena reticolata che, in seguito ad un aumento di temperatura, inizialmente rammolliscono, diventando in seguito non più lavorabili o modellabili proprio a causa del calore, il quale porta ad una reticolazione definitiva del materiale.

Alla luce di questi fattori, per determinare le proprietà meccaniche di un polimero è dunque necessario conoscerne lo stato alla temperatura d'esercizio. Si possono individuare alcune temperature caratteristiche in corrispondenza delle quali il polimero presenta risposte meccaniche diverse:

- Temperatura di transizione vetrosa (T_g): in corrispondenza di essa il materiale passa dallo stato vetroso, che è fragile e poco deformabile, a quello gommoso, caratterizzato da bassa rigidità e alte deformabilità e tenacità. Il valore di T_g è generalmente inferiore per polimeri termoplastici rispetto a quelli termoindurenti.
- Temperatura di rammollimento (T_r): per i polimeri amorfi, privi di struttura cristallina, essa segna il confine tra lo stato solido gommoso e quello liquido.
- Temperatura di fusione (T_m): identifica il punto di fusione termodinamico della fase cristallina, in corrispondenza del quale avviene il cedimento del reticolo.
- Temperatura limite di stabilità chimica (T_l): oltre questa temperatura il materiale si degrada a causa della rottura dei suoi legami chimici; il polimero diventa a tutti gli effetti un materiale diverso.

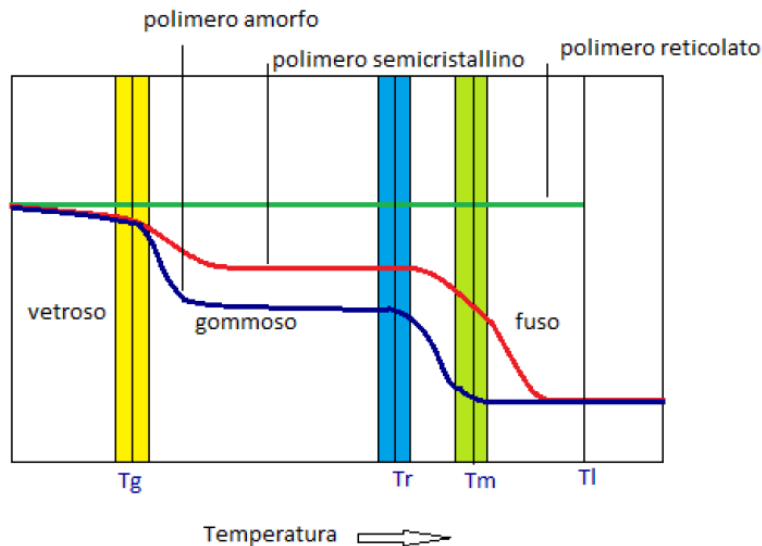


Figura 6 Andamento del modulo elastico in funzione della temperatura, per polimeri a differenti strutture

Se si rappresenta la variazione del modulo elastico E in funzione della temperatura (Figura 6) si possono individuare tre curve, una riferita ai polimeri a struttura reticolata, le altre due a polimeri lineari e ramificati in condizioni rispettivamente completamente amorfe o di parziale cristallinità. Si può notare che i polimeri a struttura reticolata mantengono costanti le loro proprietà fino a prima di T_l , quindi T_g e T_m non possono essere stabilite esattamente. Il modulo elastico di un polimero semicristallino, invece, è costante prima di T_g , diminuisce in corrispondenza di essa, poi cala nuovamente sopra T_m per la rottura dei legami della fase cristallina. Infine, per un solido amorfo, si ha una prima diminuzione del modulo elastico in corrispondenza di T_g , ovvero quando viene raggiunto lo stato gommoso, ed una seconda più marcata oltre T_r , in cui il polimero risulta fuso.

Un'altra caratteristica di particolare importanza nello studio dei materiali polimerici è la biodegradabilità, ovvero l'alterazione chimica della struttura del materiale, causata dalla rottura dei legami sia della catena principale sia dei gruppi laterali. Uno degli effetti principali della degradazione, che nel caso di applicazioni biomedicali deve avvenire possibilmente senza rilasciare molecole tossiche per l'organismo ospite, è la diminuzione del peso molecolare e, conseguentemente, il peggioramento delle proprietà meccaniche. Il processo di degradazione, e dunque la velocità di degradazione, sono legati alle caratteristiche chimico-fisiche del materiale (quali il tipo di unità ripetitiva, la composizione e la lunghezza delle sequenze, l'architettura, il peso molecolare, l'eventuale presenza di additivi, la differenza tra le

temperature di esercizio e di fusione, il grado di cristallinità e l'idrofilicità), nonché alle condizioni generali dell'ambiente di degradazione e alla risposta immunitaria dell'organismo in cui il materiale è impiantato.

1.2.3 Sintesi

Come già detto, i polimeri vengono ottenuti mediante un processo chimico che unisce tra loro più unità monomeriche, chiamato polimerizzazione. I principali metodi di polimerizzazione per la sintesi di materiali polimerici sono:

- **Policondensazione:** è una reazione che avviene tra monomeri aventi gruppi funzionali reattivi, e che è accompagnata dall'eliminazione di molecole più piccole come acqua, cloruro di sodio, metanolo ed acido cloridrico. In questo modo le unità strutturali del polimero finale presentano una formula chimica diversa da quella delle molecole iniziali. Gli svantaggi di questo metodo sono le tempistiche lunghe e l'ottenimento di un basso grado di polimerizzazione, quindi molecole a basso peso molecolare e catene corte. Se i monomeri di partenza presentano due soli gruppi funzionali, si ha una policondensazione bifunzionale, mentre se almeno uno dei monomeri ha più di due gruppi funzionali, la reazione è chiamata policondensazione polifunzionale. Nel primo caso si ottengono polimeri lineari, mentre nel secondo polimeri reticolati. Più in dettaglio, per ottenere policondensati lineari si opera solitamente allo stato fuso, ovvero in assenza di solvente: all'inizio della reazione la pressione è mantenuta a valori atmosferici, per evitare perdite dei componenti a basso peso molecolare alle elevate temperature necessarie. Nello stadio successivo si aumentano le temperature e si opera in condizioni di vuoto spinto, per modificare l'equilibrio, spostandolo verso i prodotti. Questo processo di sintesi è solitamente utilizzato per produrre poliesteri, poliammidi, poliuretani e polisilossani.
- **Polimerizzazione per apertura di anello (ROP):** è una tecnica di sintesi in cui, attraverso una propagazione ionica, il gruppo terminale di una catena polimerica svolge il ruolo di centro attivo, a cui altri monomeri ciclici si legano creando catene polimeriche di lunghezza via via crescente. Il meccanismo di polimerizzazione può essere di diverso tipo, a seconda del tipo di iniziatore coinvolto: si parlerà dunque di polimerizzazione cationica, anionica, enzimatica, allo stato solido oppure con un meccanismo di inserzione-coordinazione. La ROP può essere effettuata in condizioni blande, sia dal

punto di vista delle temperature e dei tempi di reazione, ma anche per quanto riguarda il controllo della stechiometria; inoltre, si possono ottenere pesi molecolari anche molto elevati. Di contro, i costi elevati e la minore disponibilità di monomeri, limitano fortemente l'utilizzo di tale strategia sintetica.

- Estensione di catena: attraverso tale strategia è possibile ottenere polimeri multi-blocco dal peso molecolare molto elevato. Solitamente, la reazione ha luogo a partire da omopolimeri o copolimeri policondensati, contenenti un'elevata percentuale di gruppi terminali ossidrilici, e che costituiscono i diversi "blocchi". Essi vengono dunque fusi e mescolati insieme, e fatti poi reagire con un estensore di catena, che tramite un legame uretanico permette l'unione dei blocchi, fino al raggiungimento di un elevato peso molecolare. È necessario, in fase di sintesi, porre particolare attenzione alla quantità di estensore di catena utilizzata, in quanto un sovradosaggio, anche minimo, porta alla gelificazione del polimero, che rende impossibile ogni sua successiva lavorazione.
- Poliaddizione: è una reazione a catena in cui i monomeri di partenza generano le macromolecole per unione diretta, senza quindi il rilascio di molecole secondarie. La formula chimica del monomero e quella delle unità strutturali del polimero ottenuto sono uguali, ed i pesi molecolari raggiungono valori anche molto elevati in tempi brevi. I monomeri utilizzati presentano una bifunzionalità interdipendente, come ad esempio quelli contenenti un doppio legame $C=C$, ed è necessario che il monomero sia attivato affinché la reazione avvenga, ovvero uno dei due legami tra gli atomi di carbonio deve aprirsi in modo che questi atomi abbiano un elettrone libero. Tale attivazione può essere ottenuta tramite calore, raggi ultravioletti o la presenza di un composto attivo; in quest'ultimo caso si parla di polimerizzazione radicalica. Il processo di poliaddizione può essere suddiviso in quattro fasi:
 1. fase iniziale o induzione, in cui le molecole di iniziatore attivano il monomero;
 2. fase di propagazione, in cui avviene la crescita della catena polimerica;
 3. fase di chiusura, che consiste nella chiusura della catena polimerica, la quale può avvenire in diversi modi: per accoppiamento diretto di molecole in crescita, tramite l'attaccamento di un radicale, o per scambio di un atomo di idrogeno.
 4. trasferimento di catena: una molecola in crescita può arrestare il suo accrescimento attivando una molecola di un monomero o di una catena precedentemente chiusa.

Questo metodo di sintesi è utilizzato per ottenere materiali quali ad esempio il polietilene, il polimetilmetacrilato ed il polistirene.

1.3 Copolimeri

I copolimeri sono formati dall'unione di due o più monomeri di diverso tipo, diversamente dagli omopolimeri, che sono invece costituiti da catene dello stesso monomero. L'introduzione di una seconda unità polimerica nella struttura e quindi la sua influenza sulla molecola finale sono variabili importanti che permettono di modificare e modulare le proprietà e le caratteristiche del materiale finale in base alle diverse necessità e ai singoli impieghi previsti. Perciò, al fine di caratterizzare dettagliatamente un copolimero è necessario conoscere alcuni parametri quali la composizione e la distribuzione relativa dei monomeri, la tipologia di unità ripetitiva, l'ordine dei monomeri e la loro disposizione all'interno della catena, la dimensione delle catene in termini di peso molecolare. In base a come si ripetono le molecole di monomero all'interno della catena, i copolimeri sono classificati in diverse tipologie:

- Copolimeri statistici (o random): le unità monomeriche sono disposte casualmente all'interno della catena principale;
- Copolimeri alternati: le unità monomeriche si dispongono in modo alternato con regolarità lungo la catena;
- Copolimeri a blocchi: le unità ripetitive sono costituite da blocchi dello stesso monomero uniti ed alternati a blocchi dell'altro monomero;
- Copolimeri ad innesto (o graffati): un solo tipo di monomero costituisce la catena principale, mentre l'altro monomero costituisce le ramificazioni che dipartono da essa.

1.3.1 Copolimeri statistici

Nel caso dei copolimeri statistici, essi sono ottenuti principalmente mediante processi di poliaddizione radicalica, ionica o di coordinazione, oppure mediante policondensazione allo stato fuso a partire da una combinazione di subunità diacide e diglicoliche. Poiché la reattività dei monomeri cambia durante la reazione, la composizione del copolimero evolve continuamente nel tempo, ed è definibile istante per istante come l'esito di conversioni infinitesime di monomeri. Così come nel caso degli omopolimeri, anche per i copolimeri esistono transizioni termiche cruciali, quali la fusione della fase cristallina e la transizione

vetrosa della componente amorfa. Per quanto riguarda la transizione vetrosa, nel caso dei copolimeri statistici essa varia in maniera monotona crescente con la composizione, e se una o entrambe le unità monomeriche sono in grado di cristallizzare, essa si manifesta ad una T_g intermedia rispetto a quelle dei due omopolimeri.

Tra le equazioni che descrivono l'andamento di T_g in funzione della composizione, si riporta, a titolo di esempio, quella di Fox:

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

in cui A e B sono le due unità comonomeriche, w_A e w_B sono le loro frazioni in peso, T_{gA} e T_{gB} sono le loro temperature di transizione vetrosa.

Per quanto riguarda invece la capacità di cristallizzazione di un copolimero statistico, composto dalle unità A e B, si presentano due situazioni: si può formare un sistema a due fasi, in cui la fase cristallina è composta interamente da unità A ed è in equilibrio con la fase amorfa mista di A e B non cristallizzabili, quindi le unità B sono escluse dal reticolo, oppure queste ultime possono far parte del reticolo cristallino, sia in forma di difetti, sia in condizioni di equilibrio, (si parla di inclusione del comonomero), ed entrambe le fasi sono considerate pure.

1.3.2 Copolimeri a blocchi

Nel caso dei copolimeri a blocchi, in base alla distribuzione e al numero dei singoli blocchi possono essere identificate diverse strutture:

- Di-blocchi: A_m-B_n . I blocchi possono contenere gruppi terminali (-OH), di giunzione (-CO-), oppure il secondo blocco può includere dentro di sé un terzo monomero C (A_m-BC), distribuito in modo casuale, alternato, etc;
- Tri-blocchi: $A_m-B_n-A_m$, $A_m-B_n-A_q$, $A_m-B_n-C_q$, sono rappresentazioni semplificate di copolimeri contenenti tre blocchi distribuiti in questi modi;
- Multi-blocchi: copolimeri segmentati di tipo $A_m-B_n-A_m-B_q-A_m-B_q$;
- Copolimeri a di-blocchi ripetuti: $(A_m-B_n)_x$;
- Copolimeri a stella: presentano multi-braccia collegate da un'unità di giunzione e sono considerati un caso particolare di copolimeri ad innesto.

Inoltre, per quanto riguarda la capacità di cristallizzare, si possono distinguere 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 che porti a microdomini nettamente distinti, è facilmente correlabile alla T_g dell'omopolimero corrispondente. La situazione reale si avvicina a quella descritta solo quando il peso molecolare dei blocchi è elevato e l'incompatibilità tra i blocchi è molto marcata.
- Blocchi cristallizzabili: se nel copolimero uno o entrambi i blocchi sono cristallizzabili, la segregazione di fase comporta anche la formazione di domini cristallini; questi possono dare luogo a strutture organizzate con un arrangiamento periodico, come nel caso di copolimeri a due o tre blocchi, oppure a strutture prive di organizzazione, come per i polimeri multi-blocco. Quando entrambi i blocchi sono cristallizzabili, la morfologia è dettata dal blocco che cristallizza per primo, quindi il secondo componente deve adattarsi a cristallizzare in presenza dell'ingombro creato dai domini cristallini già formati.

La copolimerizzazione a blocchi rappresenta una possibile via per preparare polimeri innovativi altamente flessibili, in quanto questi materiali possiedono proprietà modulabili in un range che va dalle plastiche rigide agli elastomeri.

1.4 Poliesteri alifatici

1.4.1 Caratteristiche

I poliesteri sono polimeri che presentano nella catena carboniosa uno o più gruppi esterei, e sono ottenuti soprattutto mediante policondensazione di un acido carbossilico polifunzionale con un alcol polifunzionale. Essi si differenziano in aromatici e alifatici in base alla presenza o meno di anelli benzenici aromatici all'interno della struttura (Figura 7).

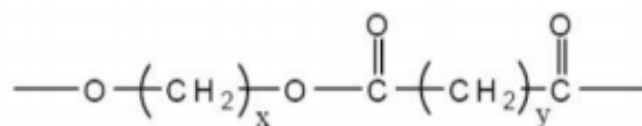


Figura 7 Struttura chimica di un poliestere alifatico

Alcuni poliesteri, oltre che biocompatibili, sono anche biodegradabili, quindi possono essere facilmente e gradualmente degradati ed eliminati dall'organismo, rilasciando soltanto particelle a basso peso molecolare e non nocive. All'interno di questa classe di polimeri, quelli più utilizzati in ambito biomedicale presentano una catena lineare ed alifatica, caratteristiche che, dal punto di vista delle proprietà, implicano un modulo elastico non troppo elevato e basse temperature di fusione. Essi risultano particolarmente idonei per impieghi nell'ambito del rilascio controllato di farmaci, vaccini e proteine. Inoltre, forniscono ottime prestazioni sia a breve che a lungo termine per quanto riguarda altre applicazioni, quali *stent* intravascolari, dispositivi dentali, suture e *scaffold* per l'ingegneria tissutale.

Per quanto riguarda le strategie sintetiche, nel caso della policondensazione, attraverso un meccanismo a stadi che impiega come reagenti dioli e diacidi oppure un acido idrossilico, sono ottenuti poliesteri alifatici ad alto peso molecolare, il quale è necessario per garantire buone proprietà meccaniche. In questo processo vengono eliminati i prodotti secondari, cioè alcune piccole molecole come acqua, ammoniaca e acidi inorganici. Nel caso della ROP, invece, si possono utilizzare tre diversi reagenti, ovvero lattoni, diesteri ciclici e acetali chetonici ciclici, in cui si induce la scissione dei legami delle strutture ad anello per ottenere una molecola lineare con un gruppo estereo all'interno. Successivamente la macromolecola è costruita per policondensazione.

1.4.2 Poliesteri alifatici ad uso biomedicale

Tra i poliesteri alifatici maggiormente utilizzati in campo biomedico, oltre al poli(butilene succinato), che verrà trattato in seguito, figurano ^[1]:

- Acido poliglicolico (PGA): è stato tra i primi ad essere stato studiato ed è il poliesteri alifatico più semplice dal punto di vista chimico (Figura 8). Può essere ottenuto mediante policondensazione dell'acido glicolico oppure attraverso ROP del glicolide. Allo stato solido risulta essere semicristallino e presenta una temperatura di fusione intorno ai 224-226°C, temperatura di transizione vetrosa tra 36°C e 40°C, modulo elastico elevato (circa 12.5GPa). Grazie a queste caratteristiche il PGA fu impiegato già negli anni '70 per realizzare suture degradabili, risultando molto biocompatibile. Poiché velocemente biodegradabile e insolubile in molti solventi, si passò dall'utilizzarlo nell'ambito del rilascio controllato di farmaci alla realizzazione di *scaffold* per

l'ingegneria tissutale, in particolare per la rigenerazione di tessuti ossei, cartilaginei, tendinei, intestinali, linfatici, spinali e denti. Altro problema che ne limita l'impiego in ambito biomedicale è il rilascio, durante la degradazione, di acido glicolico, il quale risulta riassorbibile nell'organismo ospite, ma può provocare, se presente in quantità elevate, gravi risposte infiammatorie nei tessuti circostanti.

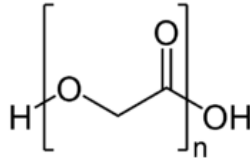


Figura 8 Struttura dell'acido poliglicolico (PGA)

- Acido polilattico (PLA): è ottenuto sia mediante policondensazione dell'acido lattico, sia attraverso ROP del dimero dell'acido lattico. Esso presenta due isomeri ottici, L e D (Figura 9), e le quantità di enantiomeri che si ottengono sono 99,5% in forma L-isomero e 0,5% in forma D-isomero. In particolare, la polimerizzazione del lattide verso polimeri ricchi di L-isomero porta alla formazione di prodotti semicristallini, mentre PLA contenenti più del 15% di D-isomero risultano amorfi. Variando la quantità relativa dei due enantiomeri è possibile poi ottenere diversi polimeri, come ad esempio il PDLLA, costituito da una miscela 50:50 di D e L, il quale, essendo amorfo, presenta un basso carico a rottura, elevata deformazione a rottura e tempi di degradazione abbastanza brevi. Il PLLA, invece, costituito solo dall'enantiomero L, è semicristallino, ha buona resistenza a trazione e compressione, bassa deformazione a rottura, T_g di 60-65°C, T_m di circa 175°C, modulo elastico di circa 4.8 GPa. Inoltre, risulta più solubile del PGA in solventi organici. Grazie alle proprietà di biodegradabilità e biocompatibilità, il PLLA è utilizzato per la realizzazione di sistemi a rilascio controllato di farmaci (anche se spesso i tempi di degradazione sono troppo lunghi), e in ingegneria tissutale come materiale per suture e *scaffold* per la rigenerazione di tessuti quali ossa, cartilagini, tendini, nervi, vasi sanguigni. Di contro, le caratteristiche che limitano il campo di applicazione del PLA sono il suo comportamento meccanico fragile, la scarsa stabilità termica ed i costi piuttosto elevati.

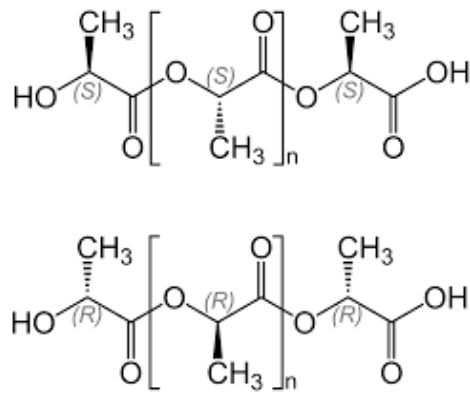


Figura 9 Struttura dell'acido polilattico (L e D)

- Acido polilattico-co-glicolico (PLGA): è un copolimero statistico ottenuto dalla copolimerizzazione di PGA e PLA (nelle forme L-lattico e D,L-lattico); in base alle quantità relative di questi due comonomeri si ottengono copolimeri con caratteristiche modulabili in funzione delle applicazioni richieste (Figura 10). In particolare, quando amorfo presenta un T_g tra 40°C e 60°C , è solubile in molti solventi organici e presenta una velocità di degradazione proporzionale alla quantità di acido glicolico. Il PLGA viene impiegato come materiale per suture, per sistemi a rilascio controllato di farmaci, vaccini, proteine e molecole di RNA, e per la realizzazione di *scaffold*, grazie alle sue buone proprietà di adesione e proliferazione cellulare.

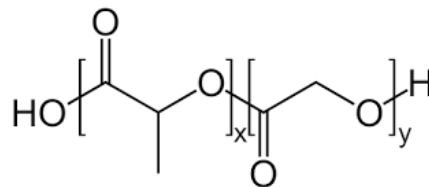


Figura 10 Struttura dell'acido polilattico-co-glicolico (PLGA)

- Poli(ϵ -caprolattone) (PCL): è un polimero che viene comunemente sintetizzato mediante ROP del monomero ciclico ϵ -caprolattone (Figura 11). Esso risulta semicristallino ed idrofobico, facilmente solubile in solventi organici, ed ha T_m compresa tra 55°C e 69°C ed una T_g di circa -60°C . Poiché presenta una lenta degradazione *in vivo* (oltre due anni), ed un'elevata permeabilità ai farmaci, il PCL viene impiegato nei sistemi a rilascio controllato a lungo termine. Inoltre, esso presenta un modulo elastico di circa 23 MPa, elevato allungamento a rottura, e, grazie alla sua buona biocompatibilità, risulta idoneo per applicazioni nell'ingegneria tissutale, in

particolare per la realizzazione di *scaffold* per la rigenerazione di tessuti come ossa, cartilagini, legamenti, pelle, nervi e vasi sanguigni.

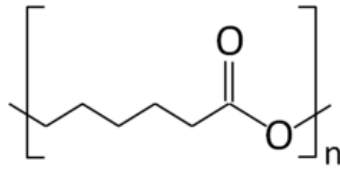


Figura 11 Struttura del poli(ε-caprolattone) (PCL)

1.5 Ingegneria tissutale

L'ingegneria tissutale è una tecnologia interdisciplinare definita come “l'applicazione di principi e metodi dell'ingegneria e delle scienze della vita verso la comprensione fondamentale delle relazioni struttura-funzione nei tessuti mammiferi normali e patologici e lo sviluppo di sostituti biologici per ripristinare, mantenere o migliorare la funzione del tessuto”. Si tratta di un settore terapeutico d'avanguardia che si pone l'obiettivo di ingegnerizzare tessuti e organi ricreandoli, favorendone la riparazione e ristabilendo, quindi, le loro originarie funzioni biologiche, danneggiate o perse a causa di condizioni patologiche o traumi. Può essere potenzialmente utilizzata per la rigenerazione di differenti tipologie di tessuto, come pelle, ossa, vasi sanguigni, condotti nervosi, ma anche di organi, e si sta imponendo sempre più come valida alternativa ai trattamenti tradizionali, spesso non risolutivi, quali il trapianto di organo (che presenta i problemi di scarsità di donatori e possibile rigetto) ed il trattamento farmacologico (che nella maggior parte dei casi si rivela utile per alleviare i sintomi senza però risolvere definitivamente il problema).

La rigenerazione tissutale avviene all'interno di bioreattori, a partire dall'inseminazione di cellule, di tipo diverso a seconda dell'applicazione richiesta, in opportune impalcature tridimensionali, di varia natura, che sostengono la crescita e la proliferazione cellulare, dette *scaffold*. Questi *scaffold*, che insieme alle fonti cellulari e ad opportuni fattori di crescita costituiscono la cosiddetta “triade” dell'ingegneria tissutale (Figura 12), possono essere impiantati direttamente nel sito danneggiato *in vivo*, oppure essere inseminati di cellule *in vitro*, per favorire la realizzazione di un tessuto che verrà impiantato successivamente.

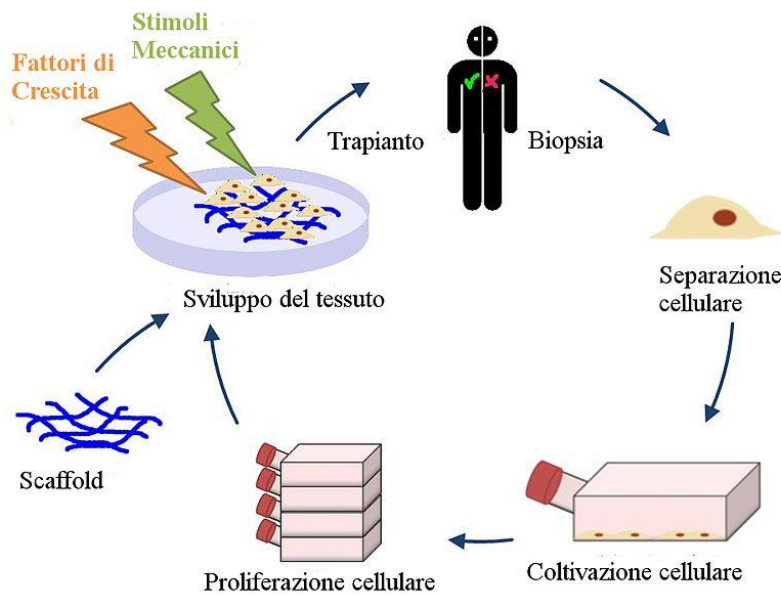


Figura 12 Triade dell'ingegneria tissutale

Per quanto riguarda gli *scaffold*, essi vengono definiti come supporti solidi, porosi e tridimensionali, realizzati con opportuni biomateriali e progettati per eseguire alcune specifiche funzioni, svolgendo un ruolo attivo nel processo di rigenerazione. Gli *scaffold* ^[2] devono possedere alcune caratteristiche fondamentali:

- **Biocompatibilità:** lo *scaffold* deve promuovere l'interazione cellula-biomateriale, cioè le cellule devono poter aderire, proliferare e migrare sia sulla superficie sia attraverso la struttura tridimensionale, costruendo la loro matrice extracellulare. Dopo l'impianto, lo *scaffold* non deve suscitare una reazione immunitaria e deve essere evitato ogni tipo di risposta infiammatoria grave, che potrebbe rallentare la guarigione o addirittura causare il rigetto dell'impianto da parte dell'organismo;
- **Biodegradabilità:** tali supporti devono degradarsi con una velocità controllata e compatibile con quella della crescita delle cellule, che via via andranno a rigenerare il tessuto e sostituire lo *scaffold*. Inoltre, i sottoprodotti della degradazione devono essere non tossici per l'organismo ospite;
- **Proprietà meccaniche coerenti con il sito anatomico di impianto,** unitamente ad una buona resistenza, tale da consentirne la manipolazione chirurgica in fase di impianto. Anche le proprietà superficiali devono essere opportunamente studiate, in modo da favorire il più possibile l'adesione, la proliferazione e/o il corretto differenziamento cellulare;

- Elevata porosità, con pori interconnessi, di opportune dimensioni (il diametro dei pori è tipicamente compreso tra i 200 e i 500 μm) e aventi distribuzione uniforme, al fine di permettere la diffusione e la crescita cellulare, il trasporto di sostanze nutritive e gas e, al tempo stesso, la rimozione dei cataboliti;
- Riproducibilità ed economicità del processo di produzione, poiché, per poter essere utilizzati su larga scala, gli *scaffold* devono essere prodotti con materiali piuttosto economici e attraverso procedure facilmente attuabili a livello industriale.

In generale, gli *scaffold* sono suddivisi a seconda della loro natura, in biologici o sintetici: nel primo caso derivano da tessuti umani o animali, nel secondo da materiali di sintesi, comunemente polimeri (omopolimeri e copolimeri). Questi ultimi, presentano l'enorme vantaggio di essere facilmente reperibili e di avere caratteristiche e proprietà variabili e modulabili a seconda del tipo di tessuto da trattare, anche se risultano caratterizzati da una ridotta bioattività. Al contrario, i polimeri di origine naturale, benché altamente biocompatibili e biologicamente attivi, presentano forti limitazioni in termini di proprietà meccaniche non sempre soddisfacenti e disomogenee, in quanto legate al tessuto e all'organismo di provenienza, oltre alla difficile reperibilità e ai costi elevati legati al processo di decellularizzazione, tutti fattori che ne restringono il campo di applicabilità.

Per quanto riguarda le tecniche di realizzazione degli *scaffold*, ad oggi una delle più utilizzate è l'elettrofilatura, che permette di ottenere fibre continue di materiale polimerico o inorganico con dimensioni che possono andare da decine di nanometri a qualche micron, con una metodologia semplice e dai costi contenuti (Figura 13).

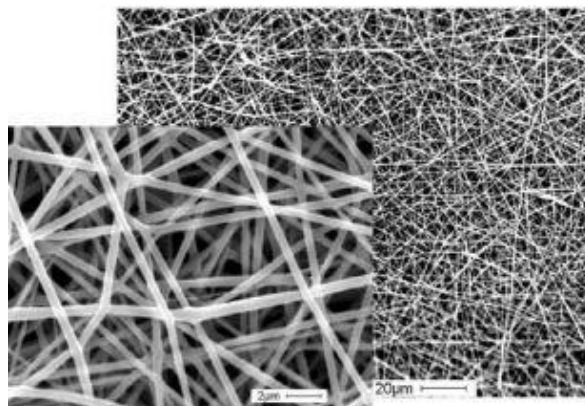


Figura 13 Fotografia al microscopio elettronico a scansione (SEM) di uno scaffold costituito da fibre elettrofilate

1.6 Rilascio controllato di farmaco

Quella del rilascio controllato di farmaco (o *controlled drug delivery*) è una applicazione biomedicale d'avanguardia che si pone come obiettivo il superamento di uno dei principali limiti della somministrazione di farmaco convenzionale, ovvero la distribuzione del farmaco stesso in tutto il corpo, che avviene in maniera sistemica ed incontrollata attraverso la circolazione sanguigna: la quantità desiderata di farmaco non è quindi sempre in grado di raggiungere i tessuti bersaglio. Ciò rende necessario l'impiego di dosi maggiori, con rischio di tossicità per l'organismo e ulteriori disagi per il paziente. Inoltre, nel caso di farmaci a breve emivita, per poter mantenere un adeguato livello terapeutico, è indispensabile l'utilizzo di dosaggi ripetuti, che si traducono in un andamento della concentrazione del farmaco nel sangue di tipo pulsatile, con indesiderati picchi di massimo (anche oltre i limiti di tossicità), e gole di minimo (le quali possono scendere anche al di sotto del livello di efficacia) (Figura 14).

La tecnologia del *controlled drug delivery*, dunque, prevede l'utilizzo di sistemi, in genere polimerici, che consentono di:

- Mantenere costante l'azione del farmaco conservando, per l'intera durata della terapia, la concentrazione desiderata nell'organismo, riducendo così gli effetti collaterali associati ad un modello cinetico del tipo "dente di sega", tipico di dosaggi ripetuti;
- Localizzare spazialmente l'azione del farmaco, limitandola al tessuto o all'organo che necessita del trattamento;
- Individuare in maniera specifica e mirata il target d'azione del farmaco a livello cellulare;
- Proteggere e garantire la stabilità di principi attivi che hanno emivita molto breve;
- Creare condizioni riproducibili, prevedibili e controllabili di rilascio per il periodo di tempo desiderato.

Una vasta classe di farmaci può usufruire dei benefici dei sistemi a rilascio controllato, tra cui chemioterapici, immunosoppressori, agenti antiinfiammatori, antibiotici, oppiacei, steroidi, ormoni, anestetici, vaccini.

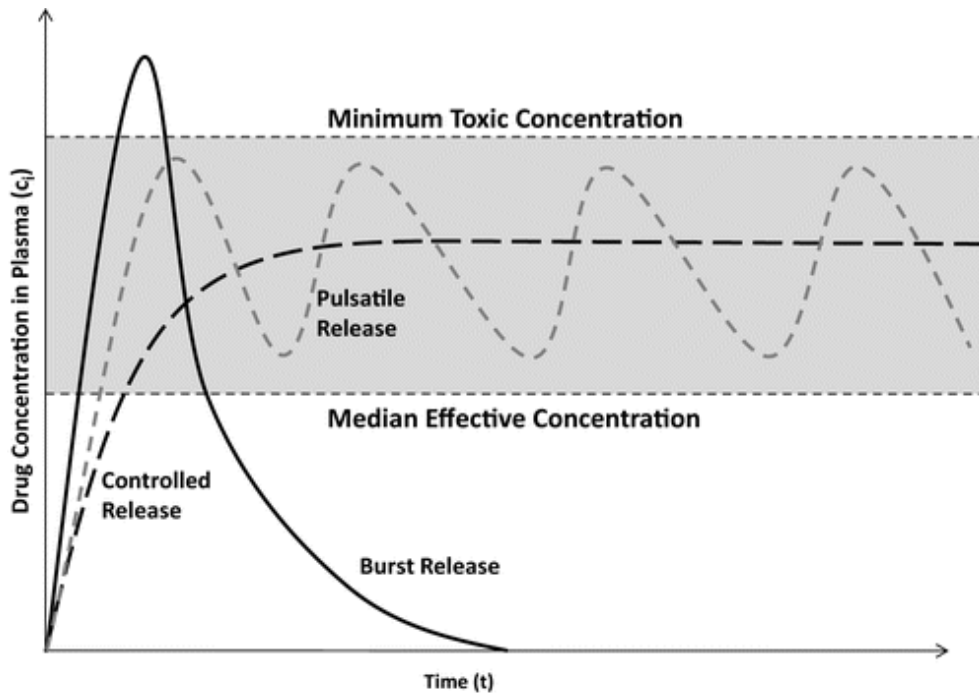


Figura 14 Andamento della concentrazione del farmaco nei tessuti secondo la tecnica tradizionale e mediante rilascio controllato

I sistemi a rilascio controllato possono essere classificati a seconda del meccanismo di rilascio in:

- Sistemi a diffusione controllata, che sfruttano il meccanismo di diffusione del farmaco attraverso la matrice polimerica, la quale a sua volta va incontro a degradazione dopo aver svolto la propria funzione:
 - mediante serbatoio (sistemi a membrana);
 - mediante matrice (sistemi monolitici);
- Sistemi controllati chimicamente, in cui il rilascio avviene in ambiente acquoso, dove il polimero si degrada grazie alla presenza di legami che possono subire attacco idrolitico o enzimatico, sia a livello della superficie che dell'intera massa:
 - sistemi bioerodibili e biodegradabili;
 - sistemi a catena pendente;
- Sistemi attivati da solvente, in cui le molecole polimeriche, quando vengono a contatto con un solvente compatibile termodinamicamente, si rilassano, permettendo un flusso di acqua verso l'interno e la diffusione del farmaco verso l'esterno:
 - sistemi controllati mediante osmosi;

- sistemi controllati mediante rigonfiamento;
- Sistemi a rilascio modulato, in cui il rilascio viene controllato da stimoli esterni quali la temperatura, il pH, campi elettrici e magnetici, radiazioni elettromagnetiche, ecc.

Un'ulteriore classificazione dei meccanismi a rilascio controllato può essere effettuata sulla base della tipologia dei dispositivi ad oggi impiegata. Tra i principali figurano micro- e nanoparticelle, patch transdermiche, idrogeli e *stent*. Più in dettaglio:

- Micro- e nanoparticelle: con il termine microparticelle si intendono particelle iniettabili dalle dimensioni massime di 250 μm , mentre le nanoparticelle presentano diametri nell'ordine di 1-100 nm, caratteristica che ne permette il passaggio anche attraverso i capillari e le membrane cellulari. L'elevato rapporto superficie/volume di queste particelle consente di legare chimicamente diversi gruppi funzionali, come agenti diagnostici e terapeutici, e tale versatilità permette di creare sistemi capaci di riconoscere il sito bersaglio dove è in atto la patologia. Esistono numerose tecniche di incapsulazione (ad esempio miniemulsione *oil-in-water* e *water-in-oil*, separazione di fase, spray a secco) e la scelta di quella più appropriata dipende da diversi fattori, riguardanti sia il materiale polimerico utilizzato sia il farmaco, la destinazione d'uso e la durata della terapia.
- Patch transdermiche: si tratta di membrane adesive medicate che vengono posizionate sulla pelle per rilasciare una specifica dose di farmaco attraverso la pelle stessa, per il trattamento o la prevenzione di disturbi locali o sistemici. La via di rilascio transdermica rappresenta una valida alternativa alle tradizionali tecniche di somministrazione, come quella orale o endovenosa, poiché permette di superare problemi quali il metabolismo epatico, la digestione enzimatica, l'idrolisi del farmaco in ambiente acido ed irritazioni gastrointestinali, aumentando allo stesso tempo la *compliance* del paziente, in quanto non invasiva e indolore.

CAPITOLO 2:

SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni, lo sviluppo tecnologico ha portato ad una cooperazione sempre maggiore delle varie aree scientifiche al fine di trovare risposte sempre più efficaci per il trattamento e la cura di diverse patologie. I principali ambiti di applicazione in cui tale sviluppo ha dato maggiori risultati sono senza dubbio la medicina rigenerativa, un campo multidisciplinare che ha tra i suoi obiettivi lo sviluppo di dispositivi per la rigenerazione tissutale (in alternativa agli approcci tradizionali quali il trapianto di organo ed il trattamento farmacologico), ed il rilascio controllato di farmaci, una tecnica finalizzata al rilascio del principio attivo in modo controllato e mirato nel tessuto target, e che permette di superare i limiti legati alle convenzionali posologie.

In questi ambiti, tra i biomateriali più utilizzati figurano i polimeri, grazie alla loro versatilità in termini di proprietà fisico-meccaniche, bassi coefficienti di attrito, facile processabilità e lavorabilità, possibilità di immobilizzare molecole al loro interno, biodegradabilità e biocompatibilità con il tessuto ospite. All'interno di questa grande famiglia, i materiali di maggiore successo si sono rivelati i poliesteri alifatici, grazie alle loro buone proprietà meccaniche, il costo relativamente contenuto delle materie prime ed il semplice processo di sintesi. Tra i principali figurano l'acido poliglicolico (PGA), il policaprolattone (PCL), l'acido polilattico (PLA), il poli(butilene succinato) (PBS) ed i loro copolimeri e blend. In particolare, il PBS, già presente in commercio come materiale per imballaggi biodegradabili, presenta buona stabilità termica, elevata temperatura di fusione ed ottima biocompatibilità, anche se i suoi tempi di degradazione piuttosto lunghi, a causa dell'elevato grado di cristallinità, e le sue proprietà meccaniche (elevato modulo elastico e basso allungamento a rottura) non sono adatti per alcune applicazioni biomedicali, quali l'ingegneria dei tessuti molli. Tali limiti possono essere superati egregiamente attraverso la copolimerizzazione, che permette di modificare e modulare nei singoli casi le proprietà di un materiale in base alle specifiche richieste da soddisfare, agendo sulla struttura chimica e/o sulla tipologia di unità comonomerica, migliorando le caratteristiche non soddisfacenti senza andare a detrimento di quelle già buone. Anche la miscelazione con altri polimeri, sia sintetici che naturali e la realizzazione di compositi organico/inorganici possono essere considerate valide strategie migliorative.

In questo contesto, il presente lavoro di Tesi si ripropone di fornire una *overview* delle applicazioni in ambito biomedico del poli(butilene succinato) e di alcuni suoi copolimeri, blend

e compositi, effettuando un'analisi critica e comparativa delle numerosi fonti bibliografiche apparse nella letteratura più recente. Per quanto riguarda gli ambiti di applicazione, la presente Tesi è focalizzata sui sistemi a rilascio mirato e controllato di farmaci, e la realizzazione di dispositivi per l'ingegneria tissutale.

CAPITOLO 3: POLI(BUTILENE SUCCINATO) E SUOI COPOLIMERI

3.1 Poli(butilene succinato)

Il poli(butilene succinato) (PBS) è un poliestere alifatico (la Figura 15 riporta la sua struttura chimica) oggetto di numerose ricerche per valutare possibili svariati utilizzi in ambito biomedico quali, ad esempio, la realizzazione di impianti in chirurgia vascolare o ortopedica, supporti tridimensionali per la crescita e la rigenerazione di tessuti cartilaginei, la sintesi di membrane, micro- e nanoparticelle e matrici impiantabili per il rilascio controllato di farmaci. I monomeri impiegati nella sintesi del PBS sono l'acido succinico (SA) (o il suo estere dimetilico, il dimetil succinato, DMS) e l'1,4-butandiolo (BD), che sono comunemente ottenuti da risorse fossili, ma possono essere derivati anche da fonti rinnovabili, ad esempio attraverso la fermentazione di zuccheri, amidi e cellulosa, rendendo il PBS un potenziale polimero 100% *bio-based* ^[3]. Negli ultimi anni, sono stati perfezionati alcuni processi biotecnologici che utilizzano microrganismi di vario tipo (lieviti e batteri in grado di metabolizzare zuccheri a 5 e 6 atomi di carbonio) per la produzione di SA con buona resa, il quale può essere poi convertito in 1,4-butandiolo attraverso un processo di idrogenazione.

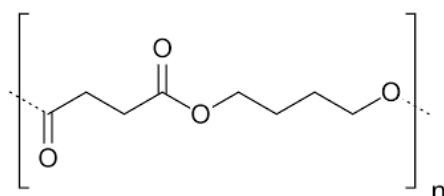


Figura 15 Struttura chimica del poli(butilene succinato)

Comunemente, il PBS viene sintetizzato per policondensazione in massa a due fasi (Figura 16): nella prima si verifica una reazione di esterificazione (o transesterificazione qualora il monomero di partenza sia il DMS) con rimozione di acqua (o metanolo), mentre nella seconda, condotta a temperatura più elevata e a pressione ridotta, viene rimosso il glicole in eccesso (generalmente si usa un eccesso di glicole di circa 10-20%), ottenendo PBS ad alto peso molecolare. La reazione viene condotta in presenza di un catalizzatore, solitamente a base di titanio, come ad esempio il titanio (IV) butossido (TBT).

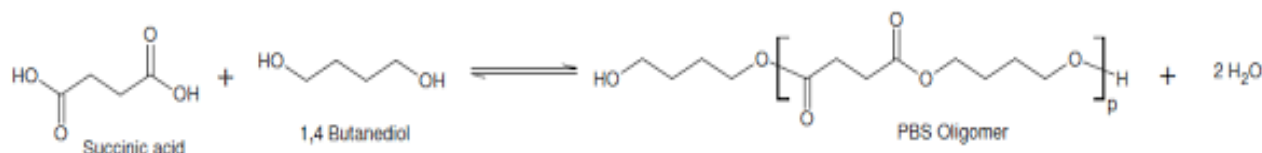


Figura 16 Schema della reazione di polimerizzazione del PBS

Per quanto riguarda le proprietà, il PBS è un polimero semicristallino con elevata capacità a cristallizzare ($\chi_c = 35-45\%$) e con temperatura di fusione di circa $110-115^\circ\text{C}$, una delle più alte tra i poliesteri alifatici, e temperatura di transizione vetrosa ben al di sotto della temperatura ambiente, compresa tra -34°C e -15°C . Le temperature delle transizioni termiche caratteristiche, ovvero fusione e transizione vetrosa, del PBS determinano per questo polimero un ampio intervallo di lavorabilità che consente di processarlo per estrusione, stampaggio a iniezione e termoformatura. Dal punto di vista meccanico, questo materiale mostra un comportamento fragile, con allungamenti a rottura estremamente ridotti (circa $5-20\%$), ma buona resistenza agli urti, resistenza a rottura di circa $30-35\text{ MPa}$, e modulo elastico compreso tra 300 e 350 MPa , con i valori di tali grandezze che risentono del grado di cristallinità. Infine, il PBS è caratterizzato da comprovate biodegradabilità (con tempi di degradazione piuttosto lunghi in condizioni fisiologiche) e biocompatibilità, caratteristiche di fondamentale importanza per applicazioni in ambito biomedico. A tutti questi vantaggi, occorre aggiungere anche il moderato costo di produzione ed un processo di sintesi semplice, già consolidato a livello industriale. Ad oggi, il PBS trova già applicazione come materiale per imballaggi, reti, teli per pacciamatura e sacchetti per il compost.

Come già detto precedentemente, la copolimerizzazione ha lo scopo di migliorare le proprietà di un omopolimero di riferimento per una specifica applicazione, possibilmente senza alterarne le caratteristiche già buone; nel caso del PBS, la copolimerizzazione risulta un approccio vincente per diminuirne la cristallinità, migliorarne le proprietà meccaniche in termini di flessibilità, e aumentarne la velocità di biodegradazione, mantenendo ad esempio la buona stabilità termica e la biocompatibilità.

Le proprietà del materiale finale ottenuto a partire dal poli(butilene succinato) sono influenzate in modo significativo dalla strategia di sintesi adottata e dal tipo di comonomero utilizzato per la sua modifica chimica. Tra queste proprietà, di particolare importanza per un impiego in ambito biomedico sono il grado di cristallinità (χ_c) e la bagnabilità (*water contact angle WCA*), che influiscono sia sulla velocità di degradazione sia sulla biocompatibilità del materiale. In

particolare, maggiore è il grado di cristallinità, minore è la velocità di degradazione idrolitica ed enzimatica, poiché l'attacco dell'acqua sia in presenza che in assenza di enzima interessa inizialmente le regioni amorfe del materiale; inoltre, più elevata è l'idrofilicità, maggiore è il grado di idrolisi grazie ad un maggiore assorbimento di acqua. Infine, è risaputo che le cellule aderiscono maggiormente su substrati idrofilici, con conseguente aumento anche della loro proliferazione.

3.2 Sistemi copolimerici a base di poli(butilene succinato)

La letteratura riguardante sistemi a base di PBS per applicazioni biomedicali è copiosa. Una consistente frazione di questi articoli riguarda la modifica chimica del PBS per introduzione in catena di unità comonomeriche con diversa struttura chimica. La maggior parte degli studi descritti in questi lavori valutano il possibile utilizzo dei nuovi materiali a base di PBS per l'ingegneria tissutale e per il rilascio controllato di farmaci.

Nella presente Tesi, ci si è focalizzati sui sistemi copolimerici progettati e realizzati dal gruppo di ricerca della Prof. Lotti, relatore del presente elaborato, che si caratterizzano per la presenza nella co-unità introdotta di un eteroatomo, nello specifico ossigeno o zolfo. Le ricerche descritte nel seguito si ripropongono di correlare le proprietà finali dei materiali alla modifica chimica introdotta e in particolare valutano l'effetto sulle proprietà finali dovute a:

- Tipo di eteroatomo introdotto
- Quantità di eteroatomo introdotta
- Distribuzione lungo la catena macromolecolare dell'eteroatomo.

Il gruppo di ricerca della Prof. Lotti ha anche proceduto alla sintesi e allo studio di copolimeri triblocco a base di acido polilattico e poli(butilene succinato), di cui nella presente Tesi verranno presentati e discussi due casi.

3.2.1 Copolimero statistico poli(butilene succinato/diglicolato)

La ricerca ha riguardato la realizzazione di tappetini elettrofilati caratterizzati sia da una distribuzione statistica che allineata delle fibre, ottenuti a partire dal PBS e da un copolimero statistico opportunamente realizzato contenente in catena un atomo di ossigeno etero (il poli(butilene succinato/diglicolato) (P(BS80BDG20))). L'obiettivo della ricerca era valutare

l'effetto sulla crescita ed il differenziamento di osteoblasti *i*) della diversa disposizione delle fibre (statistiche *vs.* allineate) a parità di polimero di partenza e *ii*) della diversa struttura chimica del polimero ^[4]. Entrambi i polimeri oggetto dello studio sono stati sintetizzati mediante policondensazione in massa a due stadi, a partire da dimetil succinato e butandiolo nel caso del PBS, da butandiolo ed una miscela di dimetil succinato e acido diglicolico (con rapporto molare BS:BDG pari a 80:20) nel caso del copolimero statistico. In tutti i casi è stato utilizzato il $Ti(OBu)_4$ come catalizzatore. I polimeri sintetizzati sono stati processati utilizzando l'elettrofilatura. Tramite tale tecnica è stato possibile ottenere *scaffold* caratterizzati da distribuzione random (r-PBS e r-P(BS80BDG20)) oppure allineata (a-PBS e a-P(BS80BDG20)) delle fibre, grazie all'utilizzo di un diverso collettore delle fibre stesse. L'ottimizzazione delle condizioni di elettrofilatura ha garantito l'ottenimento in entrambi i casi di fibre dai diametri comparabili (Figura 17). Lo *scaffold* a base di P(BS80BDG20) è risultato caratterizzato da una più elevata velocità di degradazione idrolitica, data la minore cristallinità e una più elevata idrofilicità rispetto allo *scaffold* ottenuto dall'omopolimero di riferimento. Le caratteristiche del tappetino preparato dal copolimero sono correlate alla presenza degli atomi di ossigeno etero, che come noto dalla Chimica Generale ha dimensioni più piccole dell'atomo di carbonio (ne risulta diminuita la regolarità costituzionale di catena con conseguente ridotta capacità a cristallizzare) ed è altamente elettronegativo (ne risulta un aumento considerevole dell'idrofilicità).

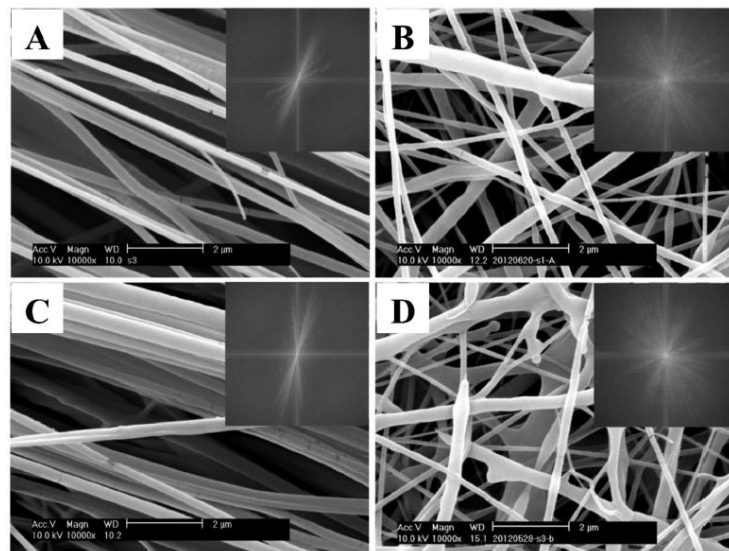


Figura 17 Immagini SEM delle fibre elettrofilate: A) a-PBS, B) r-PBS, C) a-P(BS80BDG20), D) r-P(BS80BDG20)

Per i test di vitalità cellulare, è stata scelta la linea cellulare SAOS-2 (osteoblasti umani), ampiamente riconosciuta per questa tipologia di studi. La quantificazione del gene fosforilato FAK ha evidenziato come il tappetino a-P(BS80BDG20) sia quello che garantisce la migliore interazione cellule-biomateriale nelle prime fasi (Figura 18 e Figura 19). Anche il differenziamento in cellule osteogeniche è risultato più elevato nel caso del a-P(BS80BDG20) (Figura 20). Infine, si è trovato che gli scaffold preparati dal copolimero sono caratterizzati da una maggiore adesione cellulare rispetto a quelli ottenuti dal PBS. Il copolimero, grazie alla presenza degli atomi di ossigeno eterici, è in grado di formare un più elevato numero di legami ad idrogeno con i componenti della membrana cellulare (integrine, recettori), favorendo l'adesione cellulare. Gli stessi atomi di ossigeno eterico presenti nel copolimero favorendo le interazioni intercatena (come evidenziato dal più elevato valore di T_g del copolimero rispetto al PBS) permettono un più efficiente allineamento delle fibre, essenziale per l'instaurarsi di un idoneo intorno per la proliferazione e il funzionamento degli osteoblasti in termini di mineralizzazione della matrice extracellulare (Cartoon in Figura 21).

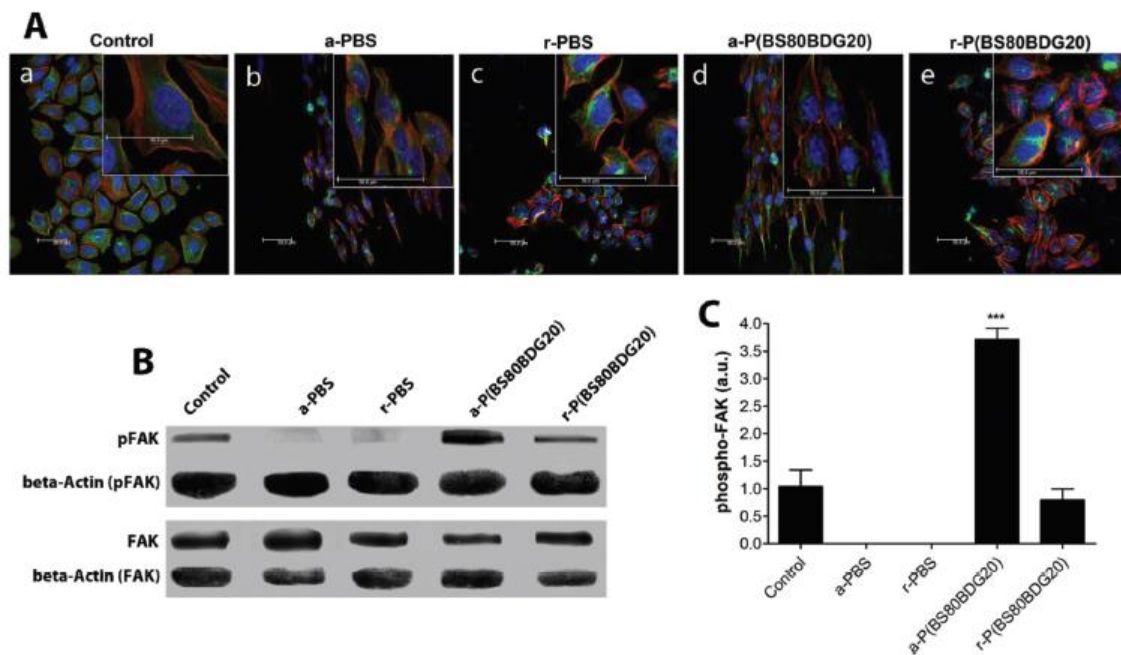


Figura 18 (A) Immagini al microscopio confocale di cellule SAOS-2 sui diversi scaffold elettrofilati, ad 1 giorno dalla semina; (B) Immagine della membrana di nitrocellulosa del Western Blotting (WB) utilizzato per separare la proteina FAK; (C) Analisi delle intensità delle bande ottenute da WB per i diversi materiali analizzati.

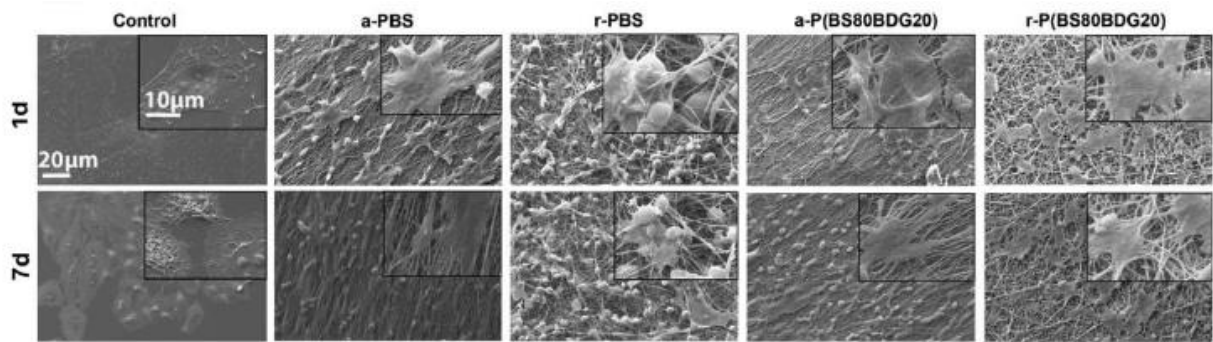


Figura 19 Immagini SEM cellule SAOS-2 sui diversi scaffold elettrofilati, ad 1 e 7 giorni dalla semina

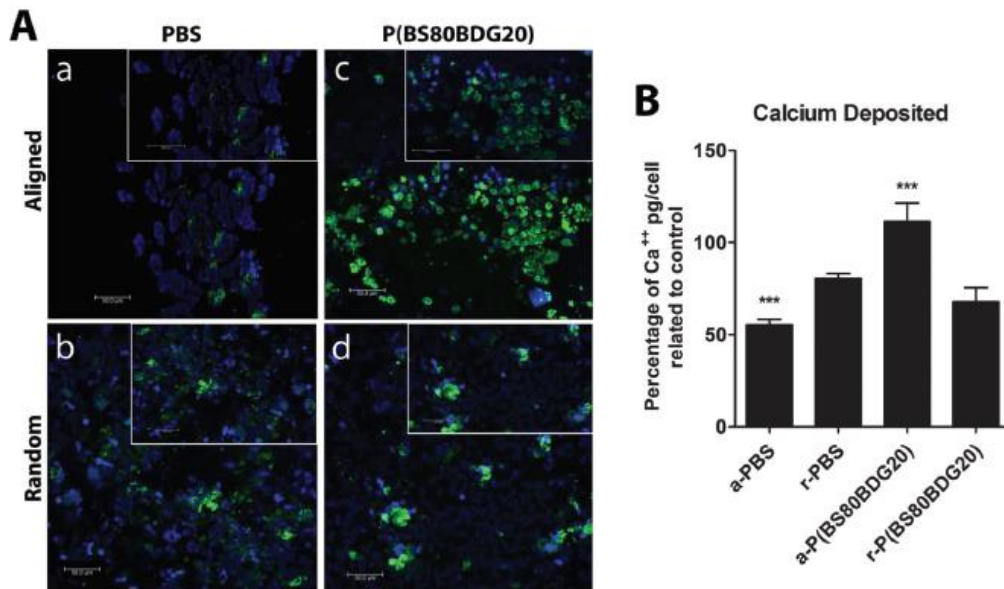


Figura 20 (A) Immagini al microscopio confocale del calcio depositato dalle cellule SAOS-2 a 21 giorni dalla semina sui diversi tappetini (B) Contenuto di calcio presente sui vari tappetini, proporzionale all'entità della mineralizzazione della matrice extracellulare prodotta dalle cellule SAOS-2 seminate sui diversi scaffold elettrofilati,

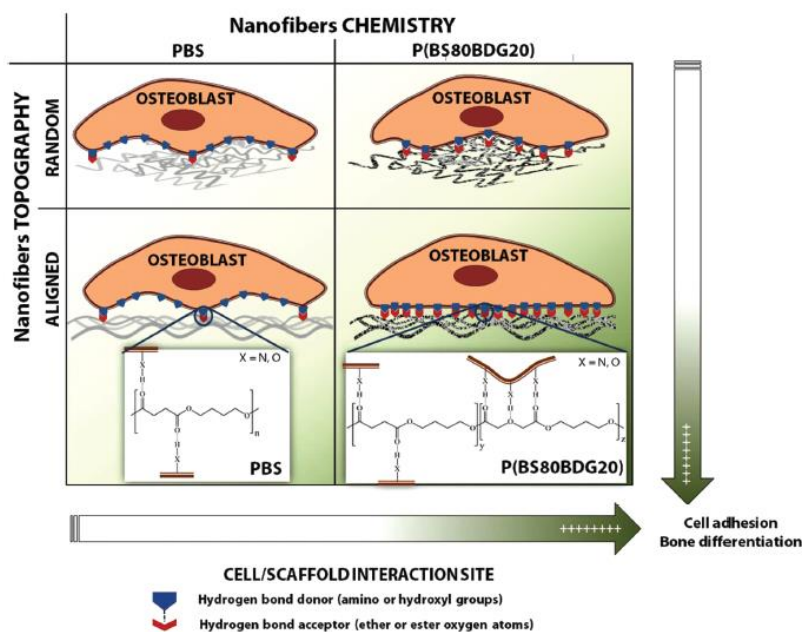


Figura 21 Schema riassuntivo della risposta dei diversi polimeri analizzati (dipendente dalla struttura chimica e dalla topografia superficiale) in termini di adesione cellulare e differenziamento in osteoblasti

In conclusione, i risultati ottenuti indicano come la struttura chimica e l'orientamento delle fibre espletino un'azione sinergica nel favorire l'interazione biomateriale-cellule.

3.2.2 Poli(butilene/dietilene glicole succinato)

In questo studio, l'atomo di ossigeno etero è presente nella sub-unità glicolica, diversamente dal sistema precedentemente discusso in cui era inserito nella sub-unità acida. Nello specifico l'atomo di ossigeno etero è introdotto al centro di 4 gruppi metilenici presenti nella sub-unità glicolica. Inoltre, mentre nel caso discusso precedentemente l'unità comonomerica era distribuita statisticamente lungo la catena del PBS, il copolimero oggetto del presente studio, il poli(butilene/dietilene glicole succinato) (P(BS-b-DGS)) ha un'architettura a blocchi ed è stato preparato sfruttando una diversa strategia sintetica, la miscelazione reattiva. La modifica chimica in questo caso è stata realizzata allo scopo di realizzare un biomateriale nuovo con caratteristiche idonee per l'ingegneria dei tessuti molli [5]. I due omopolimeri, poli(butilene succinato) (PBS) e poli(dietilenglicole succinato) (PDGS), ottenuti mediante policondensazione in massa a due stadi a partire rispettivamente da dimetil succinato e butandiolo, e da dimetil succinato e dietilenglicole, sono stati mescolati per 30 minuti in fuso, in rapporto molare 1:1, con ottenimento del copolimero a blocchi P(BS-b-DGS). Il tempo di

miscelazione è stato scelto appositamente per ottenere una lunghezza dei blocchi tale da garantire lo sviluppo di una quantità non troppo elevata di fase cristallina, e di una fase amorfa gommosa, condizioni necessarie per avere un comportamento meccanico di tipo elastomerico. I film e gli *scaffold* copolimerici (nonché quelli di PBS, utilizzati come riferimento) sono stati ottenuti rispettivamente tramite stampaggio a compressione ed elettrofilatura. Quest'ultima tecnica ha come scopo quello di ricreare il più fedelmente possibile la morfologia della matrice extracellulare. Le immagini SEM mostrano come gli *scaffold* siano molto porosi, con fibre prive di difetti e con orientamento random (Figura 22).

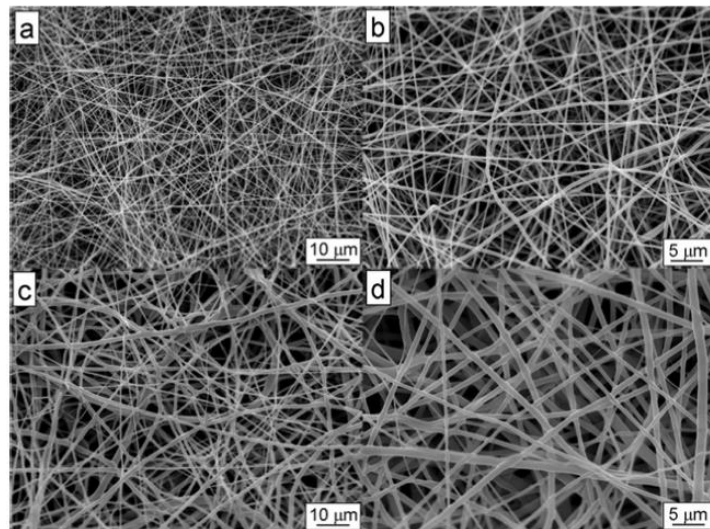


Figura 22: Immagini SEM dei tappetini in PBS (a e c) e del copolimero a blocchi (b e d) a due diversi ingrandimenti.

Dalle prove di bagnabilità, è emerso come il copolimero sia leggermente più idrofilico del PBS, mentre dal punto di vista meccanico, il P(BS-b-DGS) ha mostrato una minore rigidità ed un maggiore allungamento a rottura rispetto all'omopolimero di riferimento (Figura 23a e b). I film sono risultati caratterizzati da una minore deformazione a rottura ed un modulo elastico più elevato rispetto ai rispettivi *scaffold*. Studi di degradazione idrolitica hanno evidenziato come il P(BS-b-DGS) idrolizzi più velocemente del PBS, con perdite di peso maggiori nel tempo, grazie alla sua minore cristallinità e maggiore bagnabilità. I film si idrolizzano più velocemente dei corrispondenti *scaffold* grazie ad un effetto autocatalitico dei gruppi carbossilici (Figura 23c e d).

Per valutare la biocompatibilità di questi polimeri sono state usate cellule cardiache di embrione di ratto H9c2, seminate su film e *scaffold*. Dalle analisi SEM (Figura 24) è possibile notare come i processi di adesione e proliferazione siano avvenuti con successo, formando uno strato

di cellule compatto a 35 giorni dalla semina. In particolare, il miglior risultato si è verificato sul P(BS-b-DGS) in forma di *scaffold*, mentre un andamento peggiore è stato osservato sui film: in questo caso le cellule hanno dato vita ad una struttura meno organizzata, probabilmente a causa del substrato liscio. Da ultimo, i marcatori tipici delle cellule cardiache sono preservati.

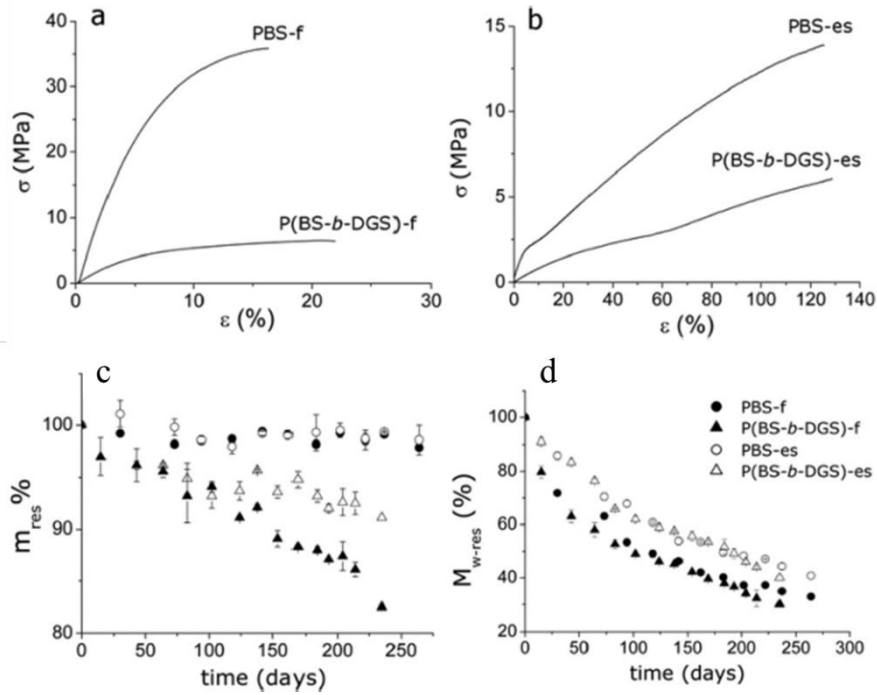


Figura 23 Curve stress-strain dell'omopolimero e del copolimero in forma di a) film e b) tappetino elettrofilato; c) peso gravimetrico residuo percentuale e d) peso molecolare residuo percentuale dei due materiali, in forma di film e scaffold, in funzione del tempo di incubazione.

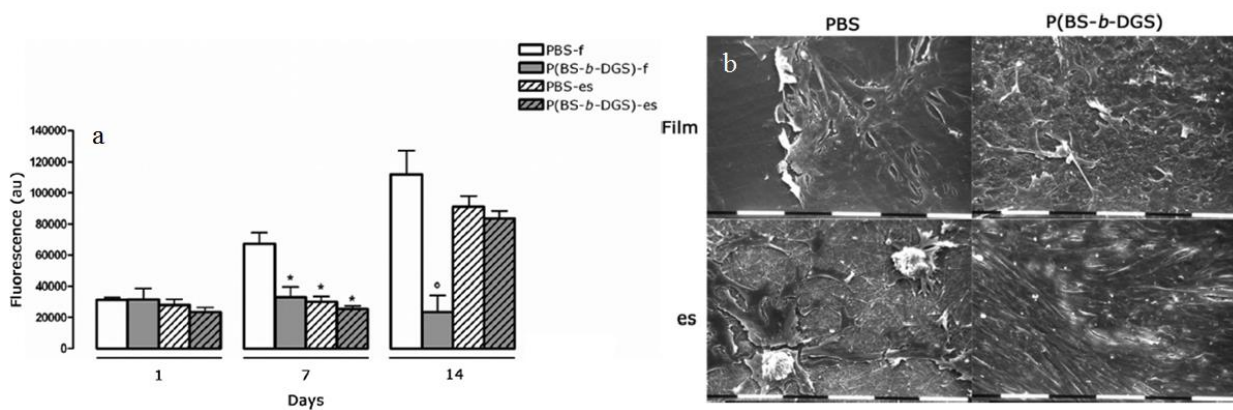


Figura 24. a) Valutazione dell'adesione e della proliferazione cellulare sui tappetini elettrofilati di PBS e P(BS-b-DGS) a 1, 7 e 14 giorni dalla semina; b) Immagini SEM delle cellule sui film di PBS e P(BS-b-DGS) e sugli scaffold elettrofilati dopo 35 giorni dalla semina

3.2.3 Poli(butilene/tiodietilene succinato)

In questo studio l'attenzione della ricerca è stato rivolto a copolimeri a blocchi, ottenuti come nel caso precedente per miscelazione reattiva di due diversi omopolimeri, uno dei quali ovviamente è il PBS. Il secondo omopolimero ha struttura chimica equivalente al poli(dietilene glicole succinato), presentato nel precedente paragrafo, con l'ossigeno etero sostituito da un atomo di zolfo (poli(tiodietilene succinato), o PTDGS). Ossigeno e zolfo sono entrambi elementi del VI gruppo della Tavola periodica, il primo appartenente al II periodo, il secondo al III periodo. L'ossigeno, come previsto dall'andamento periodico delle proprietà elettronegatività e raggio atomico, è caratterizzato da una sensibilmente più elevata elettronegatività e da dimensione ridotte rispetto allo zolfo. La maggiore elettronegatività dell'ossigeno favorisce le interazioni intercatena e rende il materiale finale più idrofilo. Le maggiori dimensioni dello zolfo di contro rendono i legami tioeterei più lunghi di quelli eteri con conseguente aumento della flessibilità di catena, come reso evidente da un inferiore valore di T_g e da una aumentata capacità a cristallizzare per i polimeri contenenti zolfo. Quest'ultima risulta incrementata anche perché la presenza di zolfo con raggio di Wan der Waals simile al gruppo CH_2 non pregiudica significativamente la regolarità costituzionale, requisito base per la cristallizzabilità di un polimero. Cambiando semplicemente il tempo di mescolamento (5, 20, 40, 60, 90, 120, 180 minuti) in fuso tra PBS e PTDGS è stato possibile preparare una famiglia di nuovi copolimeri, indicati come PBSPTDGSt, dove t indica il tempo di miscelazione, caratterizzati da composizione fissa (equimolare) e diversa lunghezza dei blocchi ^[6]. Tramite *compression molding* sono stati ottenuti dei film che sono risultati semicristallini, benchè la perfezione e la quantità di cristalli siano apparsi influenzati dal tempo di miscelazione: con l'aumentare di t, infatti, si osservano una diminuzione della temperatura di fusione che indica un minore grado di perfezione dei cristalli, e del calore di fusione relativo ad una più bassa frazione di fase cristallina presente. Inoltre, l'aggiunta di atomi di zolfo polari del PTDGS nella catena del PBS provoca un aumento dell'idrofilicità (riscontrabile nella diminuzione del valore WCA). Per quanto riguarda le proprietà meccaniche, esse sono risultate coerenti con i valori di cristallinità determinati sia tramite DSC che WAXS: in particolare, il copolimero random, caratterizzato dal più basso valore di cristallinità, mostra un comportamento elastomerico, oltre ad essere quello con il modulo elastico minore ed allungamento a rottura più elevato, con valori compatibili con quelli richiesti per l'ingegneria dei tessuti molli. Per confermare tale potenzialità, sono stati condotti esperimenti di vitalità cellulare *in vitro* sui film polimerici, utilizzando come linea di riferimento cellule cardiache embrionali di ratto H9c2. Dalle misure

di citotossicità indiretta si è potuto confermare come tali film, mostrando valori di fluorescenza (direttamente proporzionali all'attività metabolica delle cellule) comparabili con quelli del riferimento, non risultino citotossici (Figura 25a). Inoltre, i dati di adesione e proliferazione cellulare sui due copolimeri PBSPTDGS30 e PBSPTDGS40 sono incoraggianti, con valori crescenti nel tempo (Figura 25b), ad indicare come tali materiali siano dei potenziali substrati sui quali le cellule possono aderire e proliferare.

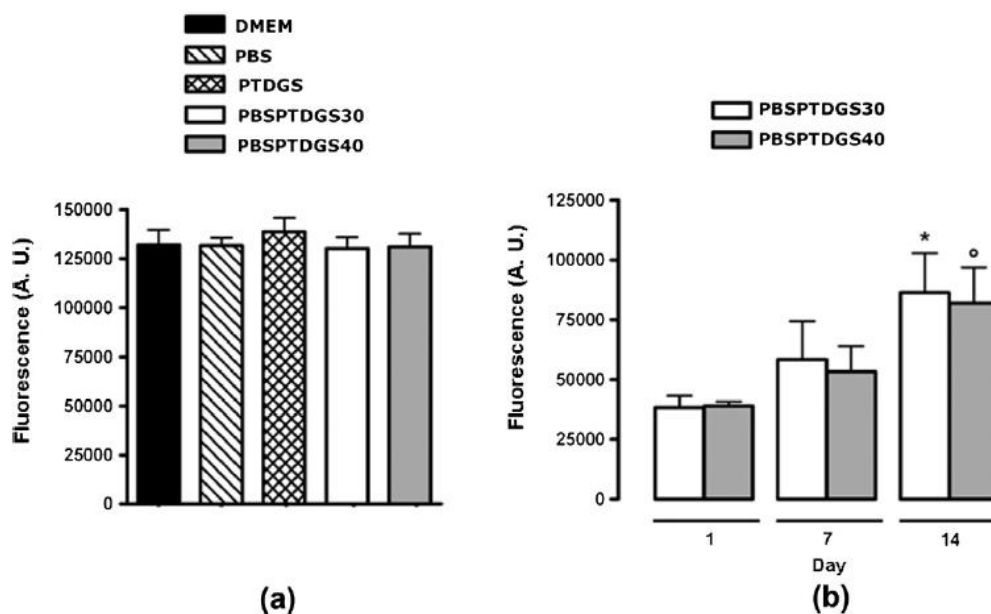


Figura 25 (a) Valutazione della citotossicità indiretta di PBS, PTDGS, PBSPTDGS30 e PBSPTDGS40; (b) Valutazione dell'adesione e della proliferazione delle cellule H9c2 sui film PBSPTDGS30 e PBSPTDGS40 al giorno 1, 7 e 14

3.2.4 Poli(butilene/trietilene succinato)

I polimeri oggetto del presente lavoro di ricerca sono statistici e con diversa composizione. Nello specifico si tratta di copolimeri a base PBS (poli(butilene/trietilene succinato) P(BSmTESn)) contenenti diverse quantità di sequenze PEG-like, ottenuti mediante policondensazione in massa a due stadi a partire da dimetil succinato e da miscele butandiolo/trietilenglicole in diversi rapporti molari (m e n)^[7]. Le caratterizzazioni condotte su questi nuovi materiali avevano lo scopo di valutare le loro potenzialità in due ambiti biomedici, quello dell'ingegneria tissutale e quello del rilascio controllato di farmaco.

L'introduzione nella catena del PBS di segmenti PEG-like determina un aumento dell'idrofilicità superficiale, evidenziata dalla diminuzione del valore del WCA (misurato sui film ottenuti per stampaggio a compressione); tale decremento è risultato direttamente

proporzionale alla quantità di unità TES presenti in catena. All'aumento di queste ultime, inoltre, corrispondono una diminuzione della temperatura di fusione e del grado di cristallinità, e di conseguenza, un aumento della velocità di degradazione idrolitica.

La copolimerizzazione ha permesso inoltre di modulare le proprietà meccaniche del PBS, in quanto i copolimeri mostrano valori di modulo elastico più bassi e allungamenti a rottura più alti e dipendenti dal contenuto di co-unità PTES (la diminuzione di E e l'aumento di ϵ_B risultano tanto più consistenti quanto maggiore la quantità in catena di co-unità TES).

Per valutare la biocompatibilità dei film copolimeri sono state utilizzate cellule cardiache embrionali di ratto H9c2. Dai test di citotossicità indiretta è emerso come dopo 72 ore di incubazione, nel terreno di coltura non siano presenti residui tossici, mentre per quanto riguarda i test di vitalità e proliferazione cellulare si evince che i campioni P(BS95TES5) e P(BS80TES20) siano i migliori.

Infine, per valutare le potenzialità di questi materiali anche nell'ambito del rilascio controllato di farmaci, a partire dal copolimero P(BS60TES40) sono state realizzate nanoparticelle mediante la tecnica della miniemulsione; queste ultime sono state caricate con desametasone, un noto farmaco corticosteroideo. È stato possibile osservare come il copolimero risulti migliorativo sia in termini di efficienza di incapsulamento del principio attivo (69% contro il 7% del PBS), grazie alla sua minore cristallinità (il farmaco occupa preferenzialmente le regioni amorfe della particella), sia in termini di rilascio cumulativo nel tempo. Il profilo di rilascio del farmaco, insieme a quello del PBS, utilizzato come riferimento, è riportato in Figura 26: come si può notare, le particelle copolimeriche rilasciano più velocemente il farmaco; la ragione di tale comportamento è da ricercare nella loro minore cristallinità, nella loro temperatura di fusione, vicina a 37°C, temperatura alla quale è stato condotto l'esperimento, e nella loro maggiore idrofilicità, che favorisce l'ingresso dell'acqua nella matrice polimerica.

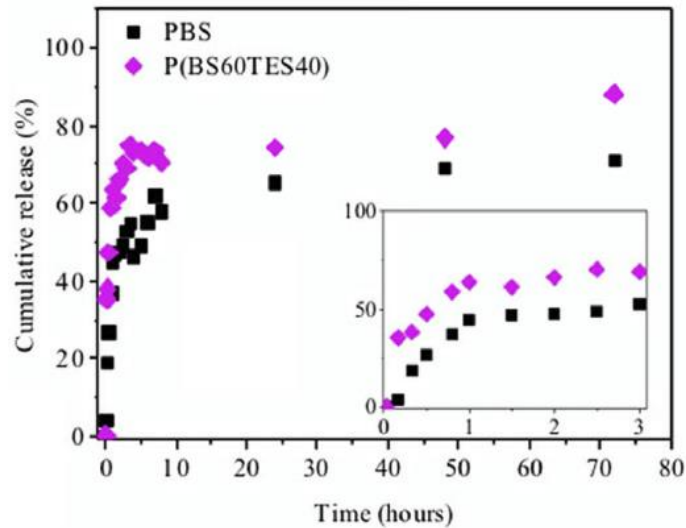


Figura 26 Profilo di rilascio del desametasone dalle nanoparticelle PBS e P(BS60TES40)

3.2.5 Poli(butilene succinato/ditiodipropionato)

Il presente lavoro ha avuto come obiettivo la sintesi di un nuovo copolimero statistico del PBS, il poli(butilene succinato/ditiodipropionato) P(BSBDTDP), caratterizzato dalla presenza del legame S-S lungo la catena macromolecolare, per applicazioni nell'ingegneria dei tessuti molli [8]. Dopo la sintesi, sono stati realizzati film mediante stampaggio a compressione e *scaffold* elettrofilati (vedi Figura 27).

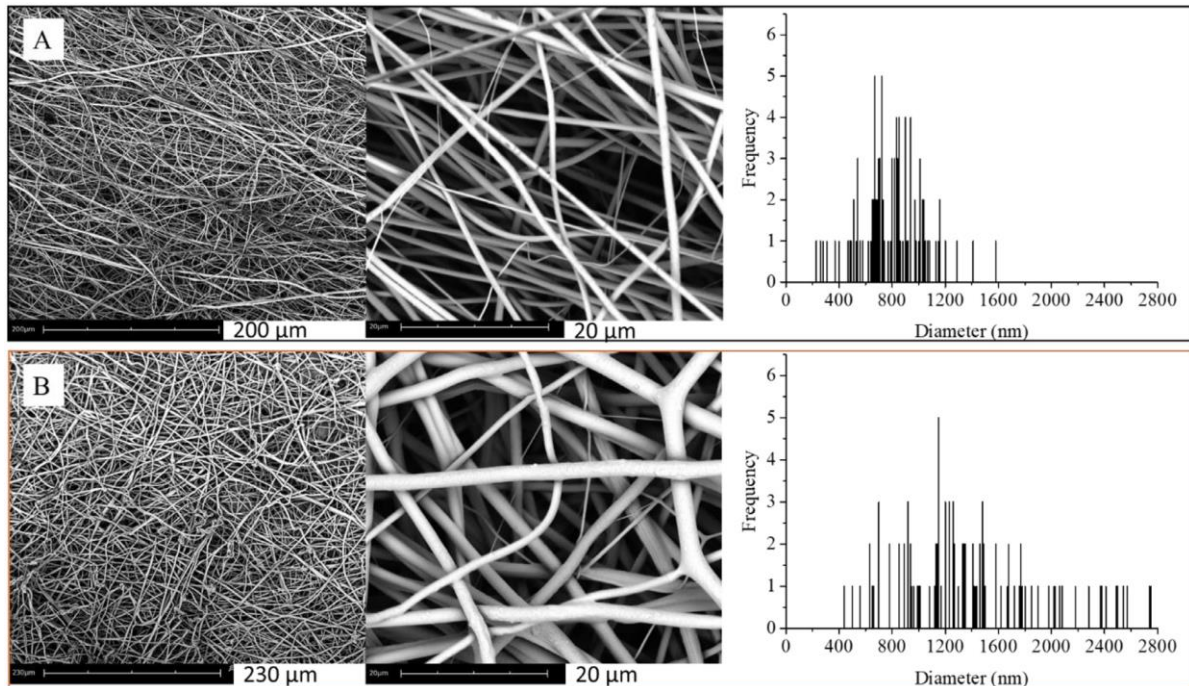


Figura 27. Immagini SEM a diversi ingrandimenti e distribuzione statistica dei diametri delle fibre dei tappetini elettrofilati di A) PBS; B) P(BSBDTDP).

Mediante copolimerizzazione è stato possibile ridurre il grado di cristallinità del PBS, mantenendone buona la stabilità termica, e migliorare le proprietà meccaniche, rendendole più simili a quelle dei tessuti molli in termini soprattutto di modulo elastico. Grazie al minore grado di cristallinità, inoltre, il tappetino copolimerico degrada più velocemente rispetto a quello realizzato con l'omopolimero (Tabella 2). Infine, sono state condotte prove di biocompatibilità sugli *scaffold* utilizzando come linea cellulare fibroblasti di topo NIH-3T3. I risultati ad 1 e 5 giorni dalla semina (Figura 28) dimostrano come il copolimero supporti in maniera migliore l'adesione e la proliferazione cellulare: la copolimerizzazione con la co-unità contenente il legame S-S, dunque, oltre a migliorare le proprietà meccaniche del materiale, rendendolo più simile a quelle dei tessuti molli, migliora anche l'adesione e la proliferazione delle cellule, facendo del copolimero un valido candidato per la realizzazione di supporti per l'ingegneria dei tessuti molli.

Tabella 2. Dati di caratterizzazione del PBS e del copolimero P(BSBDTDP) in forma di film e di scaffold elettrofilato

	PBS		P(BSBDTDP)	
MOLECULAR CHARACTERIZATION				
M _n (g/mol)	50000		42500	
D	2.1		2.2	
WCA (°)	92 ± 3		95 ± 2	
STRUCTURAL CHARACTERIZATION				
	<i>film</i>	<i>scaffold</i>	<i>film</i>	<i>scaffold</i>
X _c (%)	46	51	36	40
THERMAL CHARACTERIZATION				
Thermogravimetric Analysis				
	<i>film</i>	<i>scaffold</i>	<i>film</i>	<i>scaffold</i>
T _{id} (°C)	385	363	310	306
T _{max} (°C)	407	398	389	375
Differential Scanning Calorimetry				
<i>1st scan</i>				
	<i>film</i>	<i>scaffold</i>	<i>film</i>	<i>scaffold</i>
T _g (°C)	-35	-34	-38	-37
ΔC _p (J/g°C)	0.118	0.088	0.156	0.169
T _m (°C)	114	114	80	80
ΔH _m (J/g)	57	63	36	40
<i>2nd scan</i>				
	<i>film</i>	<i>scaffold</i>	<i>film</i>	<i>scaffold</i>
T _g (°C)	-35	-34	-38	-37
ΔC _p (J/g°C)	0.122	0.125	0.235	0.166
T _c (°C)	-	-	4	-
ΔH _c (J/g)	-	-	6	-
T _m (°C)	114	114	80	80
ΔH _m (J/g)	51	50	28	24
MECHANICAL CHARACTERIZATION				
	<i>film</i>	<i>scaffold</i>	<i>film</i>	<i>scaffold</i>
E (MPa)	301 ± 25	20 ± 3	181 ± 16	12 ± 3
σ _B (MPa)	16 ± 2	6 ± 1	11 ± 1	1.2 ± 0.2

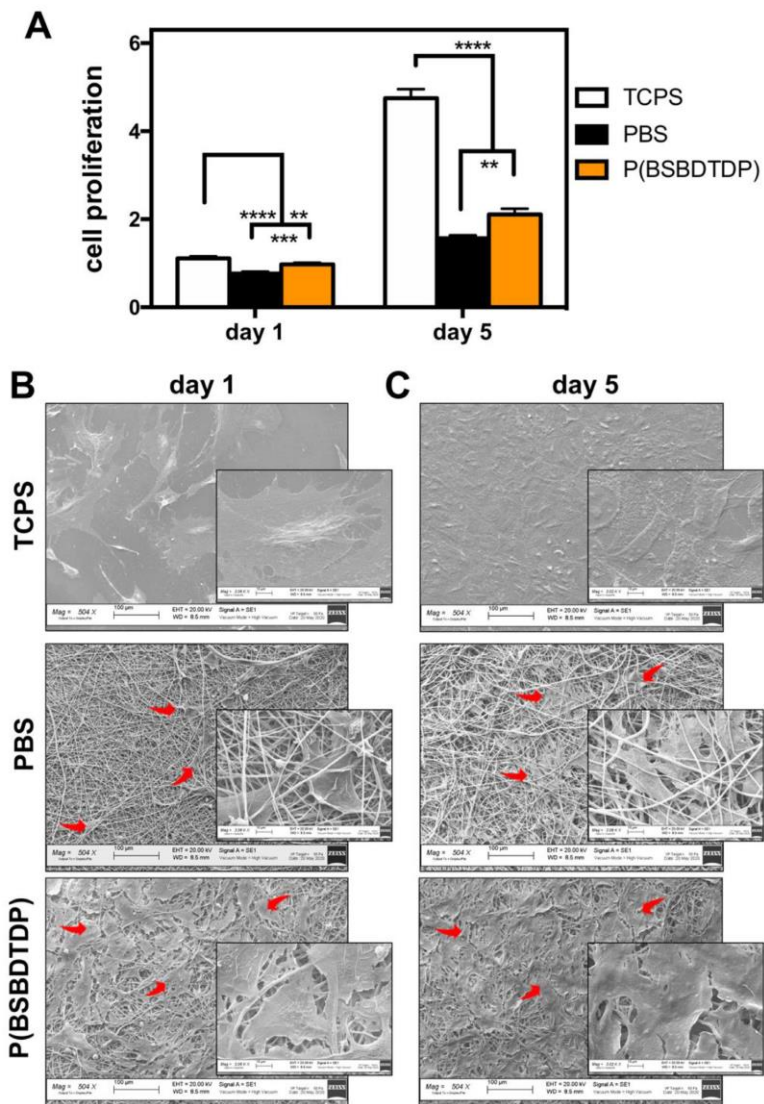


Figura 28 A) Valutazione della proliferazione cellulare ad 1 e 5 giorni dalla semina e immagini SEM delle cellule seminate su scaffold polimerici a B) 1 giorno e C) 5 giorni dalla semina

I risultati più rilevanti sono riassunti nel cartoon di seguito mostrato (Figura 29).

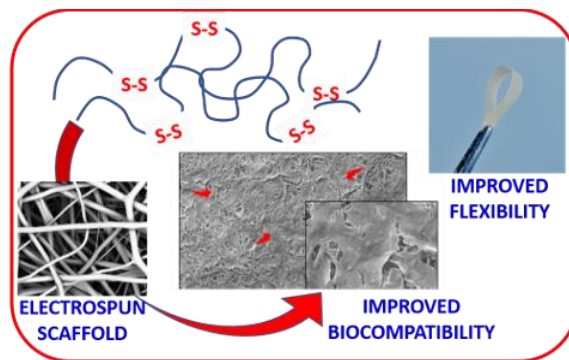


Figura 29. Schema riassuntivo dei miglioramenti ottenuti introducendo nella catena del PBS una subunità contenente legami

S-S.

3.2.6 Copolimero statistico poli(butilene succinato/tiodiglicolato)

In questo lavoro ^[9] gli Autori hanno incentrato la loro attenzione su un copolimero statistico contenente nella sub-unità acida un legame tioetereo (Poli(butilene succinato/tiodiglicolato), ottenuto sempre per policondensazione in massa a due stadi partendo da butandiolo e da una miscela acido succinico/acido tiodiglicolico con composizione molare 85/15. Il PBS omopolimero è sottoposto alle stesse caratterizzazioni per poter effettuare dei confronti. Entrambi i polimeri sono stati filmati per pressofusione e sottoposti a trattamento al plasma freddo che, come noto da letteratura, funzionalizzando la superficie dei materiali, migliora la biocompatibilità. Le proprietà dei due materiali risultano influenzate dalla struttura chimica: infatti, il copolimero risulta meno cristallino, più idrofilo e meno rigido, con un modulo elastico ridotto del 15% rispetto a quello del PBS. La minore cristallinità e la maggiore idrofilicità spiegano la più elevata velocità di degradazione idrolitica del copolimero.

I film trattati al plasma degradano più velocemente data la maggiore idrofilicità e mostrano una migliorata biocompatibilità. Le proprietà meccaniche sono al contrario preservate.

3.2.7 Copolimeri a blocchi del PBS contenenti legame eterei o tioeterei

In questo lavoro ^[10], gli Autori comparano due famiglie di copolimeri a blocchi a base di PBS, la prima contenente legami eterei, l'altra legami tioeterei. La composizione è uguale per entrambe le famiglie (equimolare). In particolare, si confrontano due miscele polimeriche e due copolimeri a blocchi con lunghezza dei blocchi comparabili (blocchi di lunghezza circa 10) (vedi schemi in Figura 30). Lo studio di tali campioni ha permesso di valutare l'effetto sulle proprietà finali dovuto a:

- a) Tipo di eteroatomo introdotto
- b) Lunghezza dei blocchi, ovvero architettura molecolare

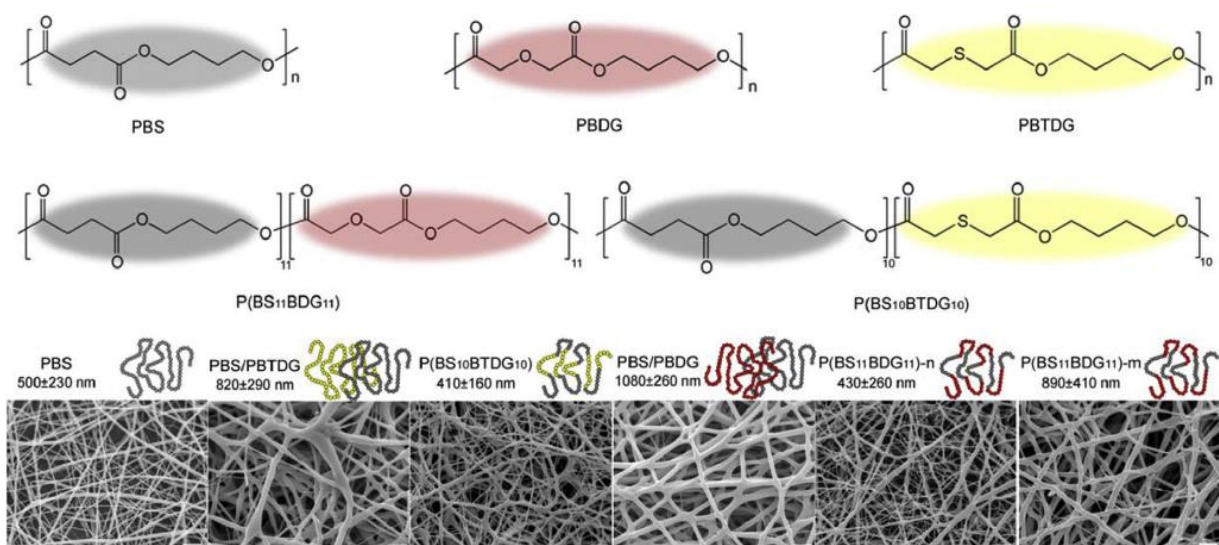


Figura 30. Strutture chimiche degli omopolimeri e dei copolimeri ottenuti e immagini SEM dei tappetini elettrofilati a partire da tali materiali

I tre omopolimeri di riferimento, PBS, poli(butilene diglicolato) (PBDG) e poli(butilene tioglicolato) (PBDTG) sono stati ottenuti per policondensazione in massa a due stadi. Sia le miscele che i copolimeri a blocchi delle due famiglie oggetto di studio sono stati ottenuti per miscelazione reattiva del PBS con PBDG o PBDTG. La lunghezza dei blocchi è stata modulata semplicemente cambiando il tempo di mescolamento in fuso (10 minuti per le miscele, 30 nel caso del sistema P(BSBDG) e 45 minuti per il sistema P(BSBTDG)).

Sia le proprietà meccaniche che la velocità di degradazione idrolitica sono risultate facilmente modulabili agendo sul tipo di eteroatomo e sull'architettura molecolare. Nello specifico sia le miscele che i copolimeri a blocchi sono apparsi meno rigidi del PBS con un modulo elastico più basso ed un allungamento a rottura più elevato. A parità di architettura molecolare, i campioni contenenti zolfo sono risultati più flessibili per la maggiore lunghezza dei legami tioeterei rispetto a quelli eterei e le più deboli interazioni intercatena, data la minore elettronegatività dell'atomo di zolfo rispetto all'atomo di ossigeno. I copolimeri a blocchi sono a loro volta risultati più flessibili e meno rigidi delle corrispondenti miscele data la loro inferiore cristallinità.

Per quanto concerne la velocità di degradazione idrolitica, tutti i campioni oggetto del presente studio degradano più velocemente del PBS. Dei quattro campioni studiati, il copolimero a blocchi contenente il legame etereo è quello caratterizzato dalla più alta velocità di

degradazione. Tale risultato è spiegabile sulla base della più elevata idrofilicità e più bassa cristallinità esibite da questo campione.

Da ultimo, gli studi di biocompatibilità hanno mostrato come i campioni contenenti legami tioeterei favoriscano la condrogenesi delle Cellule Staminali Mesenchimali adulte (hMSCs), mentre lo *scaffold* di PBS induce una differenziazione osteogenica delle hMSCs.

Da ultimo, è stato appurato che anche l'architettura molecolare ha un effetto sul processo di differenziamento delle cellule hMSC. Infatti, la miscela contenente il legame tioetereo si è rivelata migliore del corrispondente copolimero a blocchi nel favorire il differenziamento nel fenotipo cartilagineo.

3.2.8 Copolimeri triblocco a base di PLLA e poli(butilene/trietilene succinato)

Lo scopo del presente lavoro è stato la sintesi e la caratterizzazione di nuovi copolimeri triblocchi A-B-A a base di acido polilattico (blocco A); il blocco centrale (B) è un copolimero a base di PBS, specificamente il poli(butilene/trietilene succinato) P(BSTES), quest'ultimo caratterizzato da due diverse lunghezze dei blocchi BS e TES ^[11]. La struttura chimica è stata progettata *ad hoc* per la preparazione di micro- e nanoparticelle per la somministrazione controllata di farmaci e per la realizzazione di film polimerici con proprietà elastomeriche per applicazioni di ingegneria dei tessuti molli ^[12]. Per quanto concerne il blocco B, la diversa architettura molecolare (a blocchi oppure random) è stata ottenuta miscelando in fuso per tempi diversi gli omopolimeri PBS e poli(trietilene succinato) PTES in uguale rapporto molare. Tale parametro si è rivelato uno strumento efficace nel modulare l'idrofilicità, il grado di cristallinità ed il tipo di fase cristallina presente, nonché la cinetica di degradazione idrolitica dei materiali finali. Da questi, poi, sono state ottenute mediante la tecnica della miniemulsione particelle micro- e nanometriche al cui interno è stato incapsulato desametasone, (Figura 31). Sono state quindi condotte prove di rilascio del farmaco in condizioni fisiologiche, che hanno mostrato come sia stato possibile modulare sia la cinetica che il meccanismo di rilascio agendo sia sull'architettura del blocco B che sulla dimensione delle particelle, ad indicare la versatilità di tale sistema per applicazioni nell'ambito del rilascio controllato di farmaco (Figura 32).

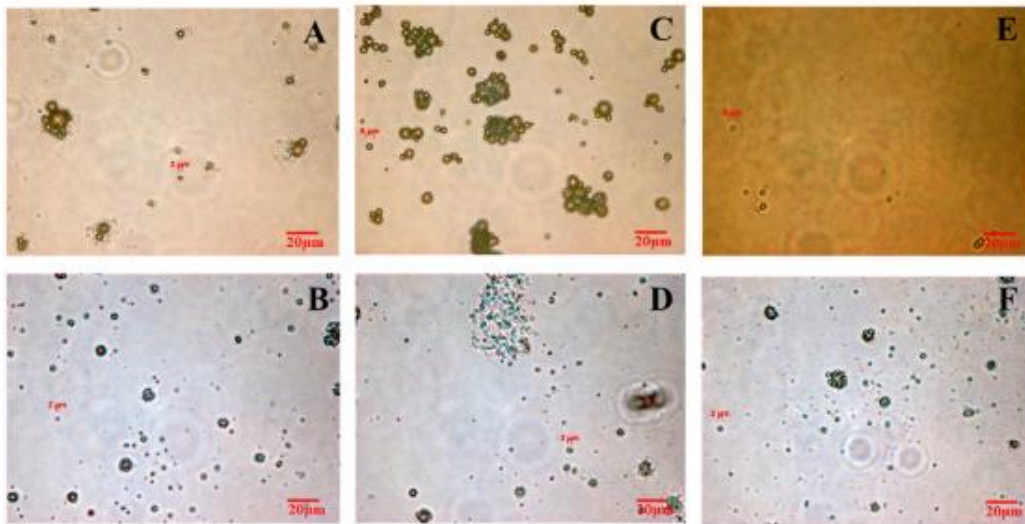


Figura 31 Immagini al microscopio ottico delle particelle vuote (A-C-E) e caricate con desametasone (B-D-F) ottenute dal PLLA e dai due copolimeri multiblocco

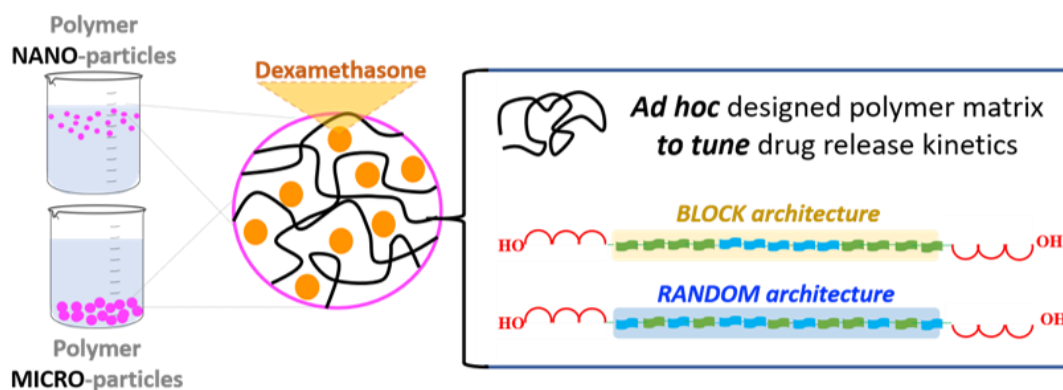


Figura 32. Schema riassuntivo che riassume come l'architettura molecolare e la dimensione delle particelle siano due fattori chiave per modulare il rilascio di farmaco

Per quanto riguarda invece le applicazioni di tale sistema nel campo dell'ingegneria dei tessuti molli, si è scelto di realizzare un copolimero ad elevato peso molecolare mediante estensione di catena del copolimero triblocco a basso peso molecolare. Nello specifico si è utilizzato il copolimero triblocco contenente come blocco centrale il copolimero random. A valle della sintesi, il materiale è stato sottoposto a due diversi trattamenti termici, attraverso cui è stato possibile modulare la tipologia e la quantità di fase cristallina presente (Figura 33), e di conseguenza la risposta meccanica (è stato possibile, infatti, ottenere un copolimero dal comportamento elastomerico, con valori di modulo elastico comparabili a quelli del tessuto cardiaco) e la velocità di degradazione idrolitica in condizioni fisiologiche (Figura 34).

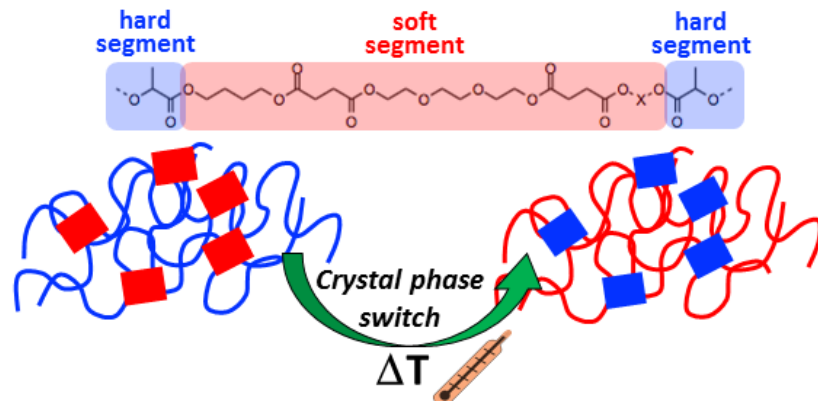


Figura 33. Schema riassuntivo che riassume come a parità e di composizione molecolare, il trattamento termico sia efficace nel modulare il tipo e la quantità di fase cristallina sviluppata

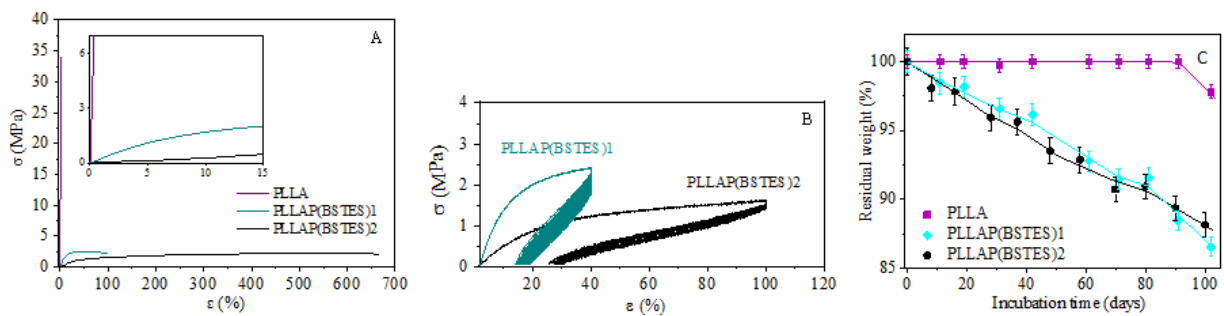


Figura 34. A) Grafico stress-strain dell'omopolimero PLLA e del copolimero sottoposto a diverso trattamento termico; B) prove cicliche sul copolimero sottoposto ai due trattamenti termici; C) Peso gravimetrico residuo in funzione del tempo di incubazione.

Studi di biocompatibilità *in vitro* sono stati condotti utilizzando cellule endoteliali umane EAhy926: dalle prove di vitalità a 3 e 7 giorni è stato possibile verificare che in tutti i casi già a 3 giorni dalla semina, le cellule proliferano fino a formare uno strato continuo (Figura 35).

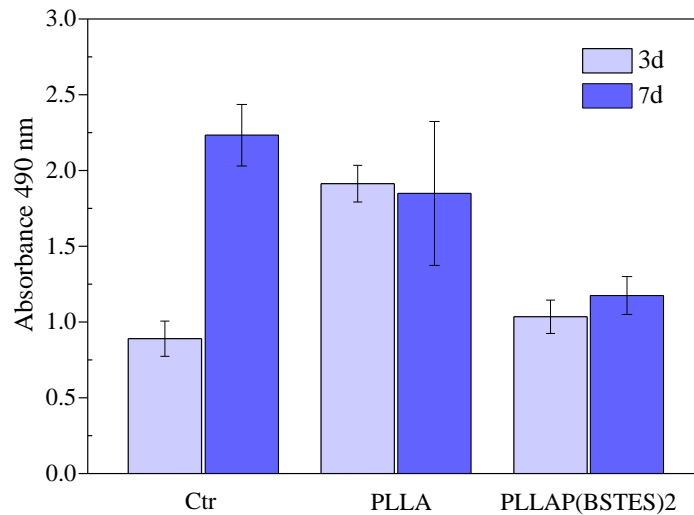


Figura 35 Valori di vitalità cellulare sull'omopolimero e sul copolimero trattato termicamente a 3 e 7 giorni dalla semina, confrontati con i valori di riferimento.

Inoltre, la morfologia risulta molto simile a quella delle cellule cresciute sul controllo, ad indicare l'ottima biocompatibilità di questo nuovo materiale, che risulta inalterata rispetto a quella dell'omopolimero PLLA (Figura 36).

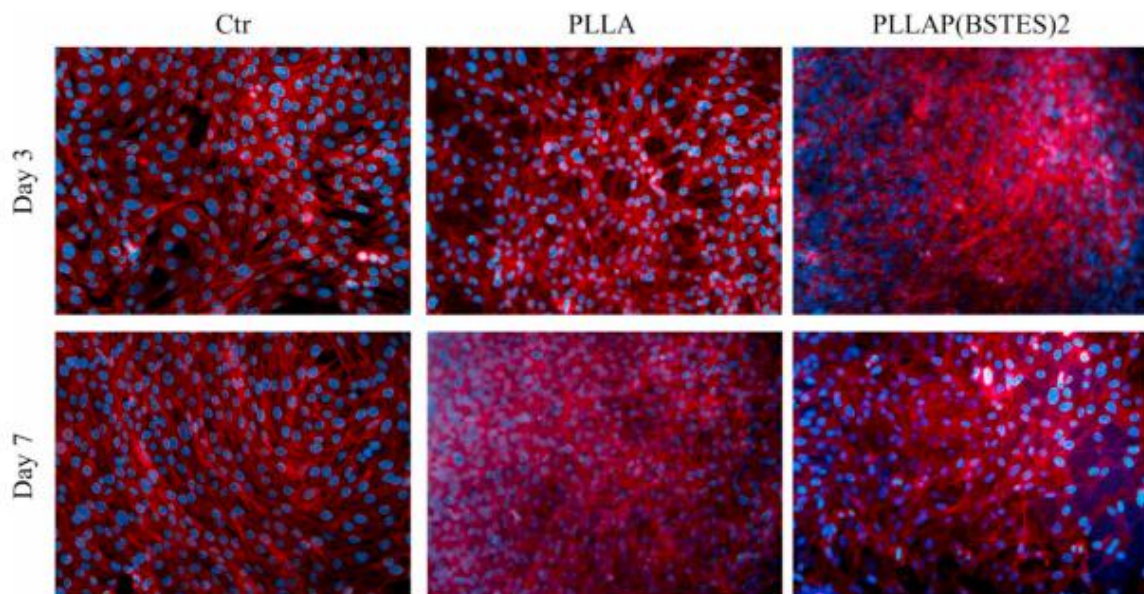


Figura 36 Immagini al microscopio confocale delle cellule seminate sul PLLA e sul copolimero a 3 e 7 giorni dalla semina

3.2.9 Copolimeri triblocco a base di PLLA e poli(butilene succinato/azelato)

Nel presente studio, sono stati realizzati nuovi copolimeri triblocco A-B-A con diverse composizioni, dove il blocco A, rigido, è rappresentato dal PLLA, mentre il blocco B, flessibile, è costituito dal copoliestere statistico poli(butilene succinato/azelato) o P(BS80BAz20) ^[13]. Quest'ultimo è stato sintetizzato mediante policondensazione in massa facendo reagire con il butandiolo due dimetil esteri, il dimetil succinato ed il dimetil azelato, in rapporto molare tra loro pari a 80:20, usando un largo eccesso di glicole al fine di ottenere un polimero idrossil-terminato. Per unire i due blocchi tra loro si è proceduto prima alla reazione di apertura dell'anello del lattide, poi ad una reazione di estensione di catena che, grazie all'aggiunta di esametilene diisocianato (comune estensore di catena), ha permesso di ottenere copolimeri triblocco ad elevato peso molecolare e con diverso rapporto in peso tra il blocco A e il blocco B. Tramite questa strategia sintetica è stato possibile modulare *ad hoc* le proprietà del PLLA, in funzione della quantità di blocco B flessibile, in particolare di migliorarne la stabilità termica, diminuirne la cristallinità e la rigidità, ed aumentarne la velocità di degradazione in condizioni fisiologiche.

Le prove di biocompatibilità sono state condotte su film polimerici utilizzando come linea cellulare fibroblasti di pelle embrionale umana (HFB). Tutti i materiali sono risultati non citotossici dopo 21 giorni di incubazione; inoltre, dalle prove di vitalità cellulare è stato possibile confermare che tutti i materiali risultano biocompatibili, anche se l'adesione e la proliferazione sono risultate più elevate nei copolimeri contenenti una maggiore quantità di PLLA (Figura 37). Viceversa, la minore adesione cellulare nei due campioni meno ricchi in PLLA può essere attribuita alla degradazione idrolitica di questi materiali, soprattutto dopo 3 settimane di incubazione, la quale favorirebbe il distacco dei fibroblasti dalla superficie dei film.

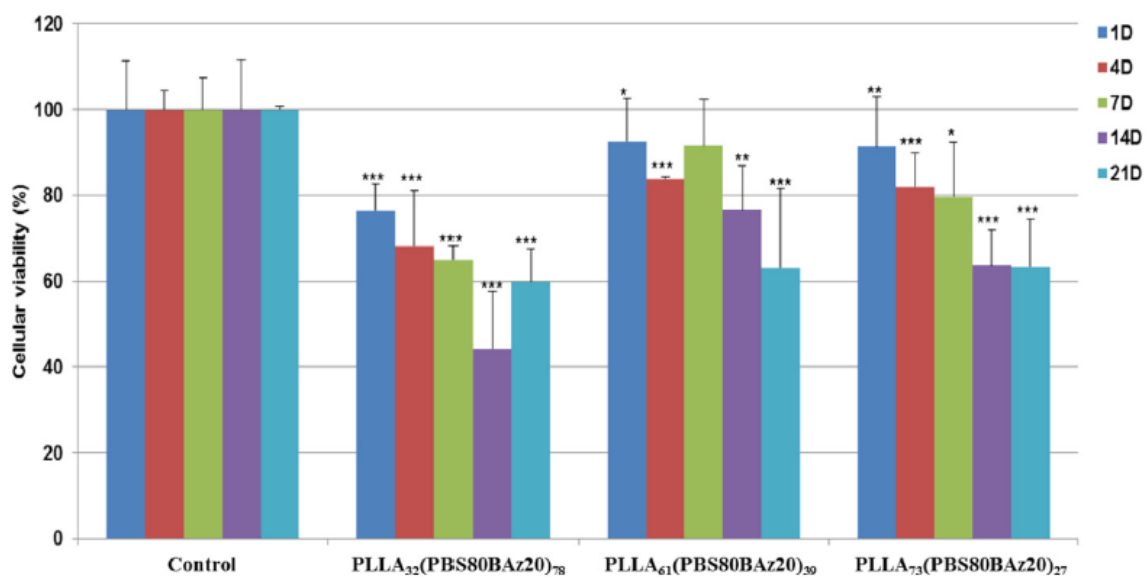


Figura 37 Risultati dei test di proliferazione cellulare sui film copolimerici a diversi tempi dalla semina.

In un altro studio, sono stati realizzati tappetini elettrofilati a partire dagli stessi copolimeri, con fibre in parte random ed in parte allineate, all'interno dei quali è stato caricato anche desametasone, un farmaco corticosteroido (Figura 38) [14].

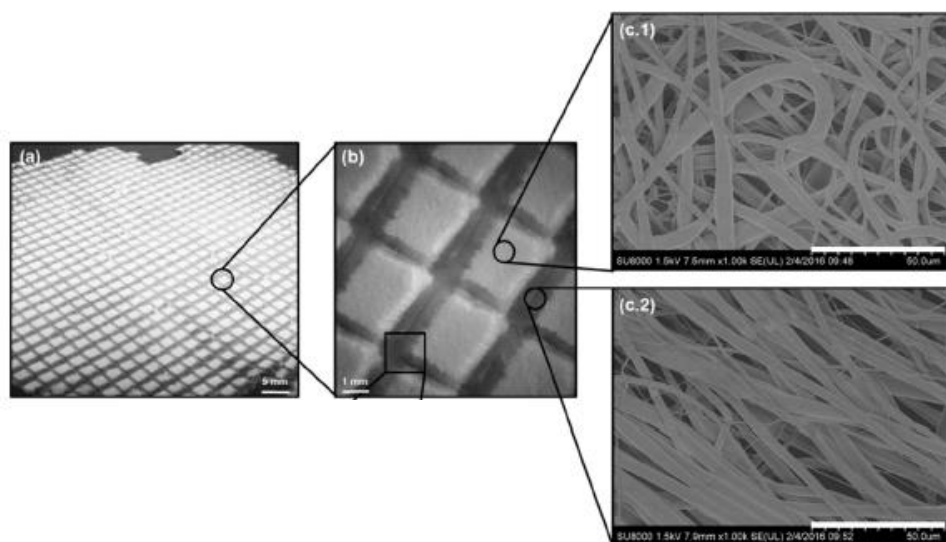


Figura 38 (a) Immagine macroscopica del tappetino elettrofilato relativo al copolimero PLLA₃₂P(BSBAz)₆₈; (b) Immagine microscopica delle aree allineate e di quelle random; (c) Immagini SEM delle fibre random (c.1) e di quelle allineate (c.2)

La biocompatibilità di queste fibre è stata testata con fibroblasti di pelle embrionale umana (HFB) e con cellule mammarie tumorali della linea MCF7 (Figura 39), mostrando ottimi

risultati in termini di citocompatibilità, vitalità cellulare, adesione e proliferazione, tanto che a 21 giorni dalla semina si è giunti alla formazione di uno strato completo di cellule e allo sviluppo della matrice extracellulare, confermando le potenzialità di questi materiali come supporti per la rigenerazione tissutale. Inoltre, è stato possibile osservare anche un effetto della disposizione delle fibre, in particolare a tempi brevi (24 ore dalla semina), in quanto le cellule si dispongono preferenzialmente sulle porzioni allineate di tappetino. Infine, la presenza di desametasone, che viene rilasciato dalle fibre in maniera graduale nel tempo e modulabile a seconda della composizione copolimerica, permette di limitare la risposta infiammatoria senza influenzare la crescita cellulare, rendendo questi materiali idonei anche per il trattamento di patologie che sviluppano infiammazioni a livello locale, andando a limitare gli effetti collaterali legati ad un rilascio di desametasone a livello sistemico (Figura 40).

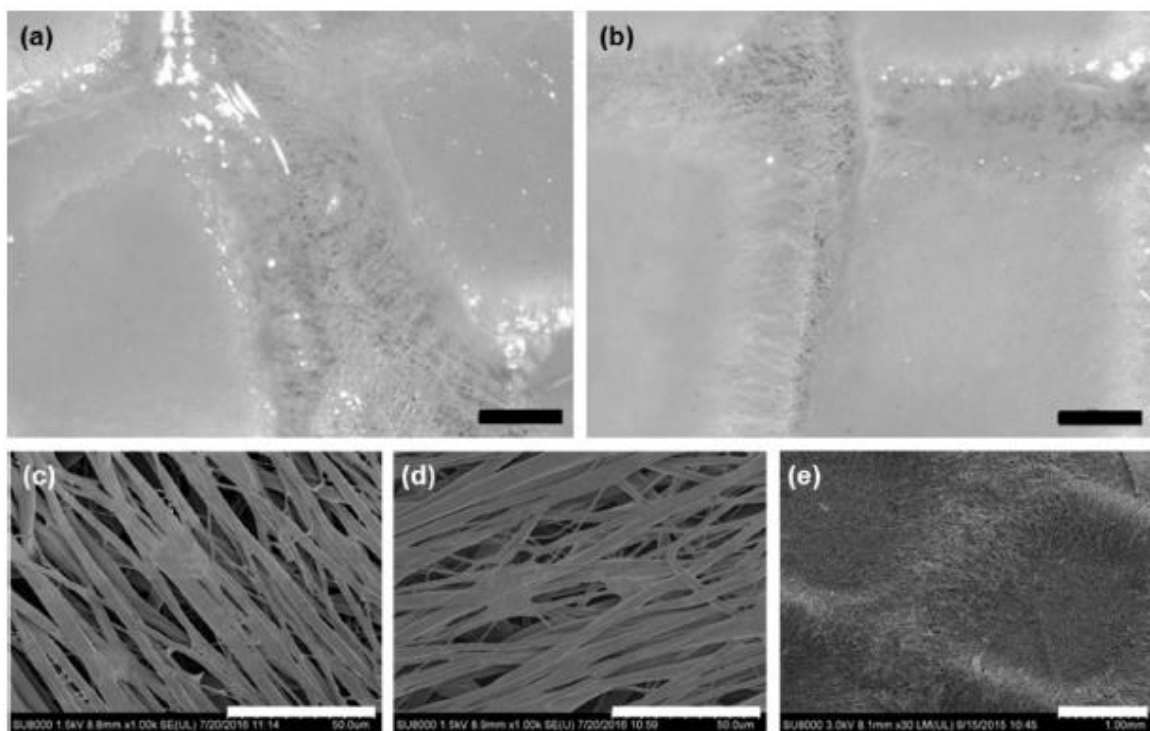


Figura 39 Immagini al microscopio di fibroblasti (a) e cellule di tumore mammario (b) seminate sugli scaffold ed immagini SEM delle cellule sui tappetini copolimerici a 24h dalla semina (c-e)

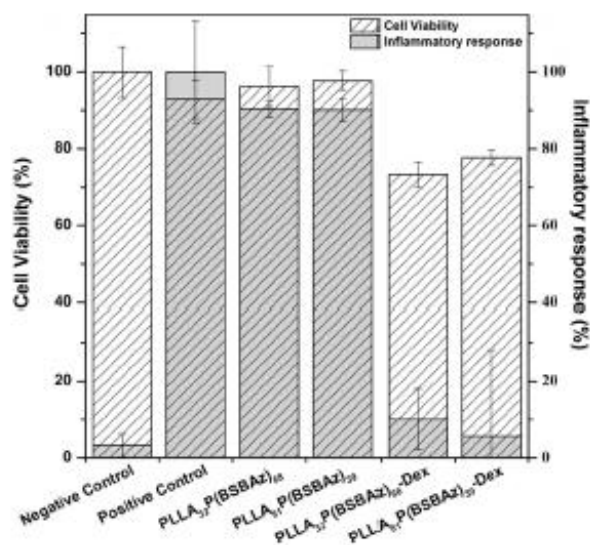


Figura 40 Vitalità cellulare e risposta antinfiammatoria dei macrofagi a contatto con i tappetini elettrofilati dei vari copolimeri

3.2.10 Sistema ibrido PBS/cheratina

Nel presente studio, è stato realizzato un materiale ibrido a base di PBS e cheratina. Quest'ultima è un polimero naturale molto diffuso in natura, in particolare è presente in diversi tessuti umani quali unghie e capelli. Gli Autori si sono prefigurati due possibili ambiti di applicazione per il nuovo materiale, ovvero ingegneria dei tessuti molli e rilascio controllato di farmaci ^[15]. Nello specifico gli Autori si sono riproposti di ottenere un materiale dalla migliorata biodegradabilità e biocompatibilità, caratteristiche impartite dalla cheratina, mantenendo buone le proprietà meccaniche del PBS. Più in dettaglio, la cheratina è stata miscelata in soluzione con il PBS, nelle stesse quantità in peso, usando l'esafuoro-isopropanolo come solvente. Alle miscele pure di PBS e di PBS e cheratina, denominata Ker-PBS 50-50, è stato aggiunto il Diclofenac, un comune antinfiammatorio. Le soluzioni sono state dunque elettrofilate: il tappetino ibrido si presenta omogeneo, maneggiabile, e con ottime proprietà di adesione alla pelle leggermente bagnata (vedi Figura 41).

Per quanto riguarda la caratterizzazione meccanica, l'introduzione di PBS ha reso possibile ottenere tappetini con proprietà migliorate rispetto a quelle della sola cheratina, la quale risulta troppo rigida e fragile per essere lavorata in dispositivi capaci di auto-sostenersi. Anche gli studi di degradazione enzimatica hanno permesso di confermare come nel sistema ibrido si

raggiunga un profilo di degradazione modulabile e intermedio rispetto a quello dei due omopolimeri di riferimento.



Figura 41. Immagini relative all'adesione dei tappetini alla pelle a diversi tempi dall'applicazione

A valle delle prove meccaniche, si è proceduto all'analisi della quantità cumulativa di Diclofenac rilasciata in funzione del tempo, da cui è emerso che la presenza della cheratina aiuta a modulare il rilascio di farmaco, rendendolo più veloce, nelle 6-8 ore successive, rispetto a quello ottenuto a partire dal tappetino di PBS (Figura 42): tale risultato può essere interpretato alla luce dei fenomeni repulsivi tra farmaco e cheratina, entrambi carichi negativamente a pH fisiologico, e ascrivito alla maggiore superficie specifica dei tappetini di Ker-PBS 50-50, caratterizzati da fibre dal diametro leggermente minore di quelli realizzati con solo PBS.

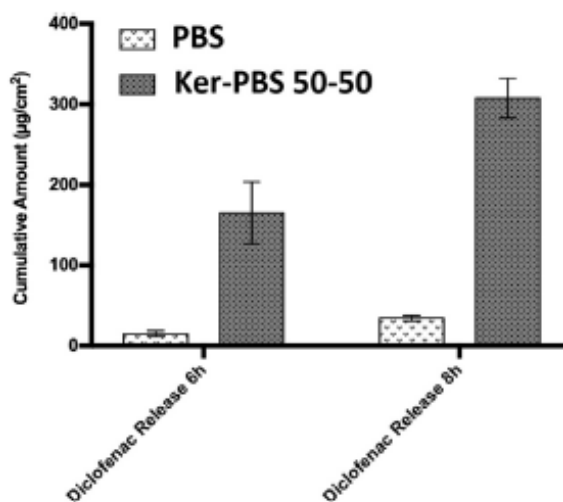


Figura 42 Curve di rilascio di Diclofenac dai tappetini di PBS e di blend Ker-PBS 50-50.

Infine, i tappetini sono stati sottoposti ad esperimenti di vitalità cellulare, utilizzando fibroblasti NIH-3T3 come cellule modello, per verificare se la biocompatibilità della cheratina viene mantenuta anche in seguito alla miscelazione con il PBS. Più in dettaglio (Figura 43), già dopo 24 ore dalla semina l'adesione cellulare è ben supportata in entrambi i casi, anche se è evidente come sul materiale ibrido adesione e proliferazione cellulare siano nettamente migliori. Tale risultato costituisce un'ulteriore riprova di come il tappetino ibrido presenti proprietà migliorative rispetto a quelle degli omopolimeri di partenza, e risulti un candidato particolarmente idoneo e versatile per diverse applicazioni biomedicali.

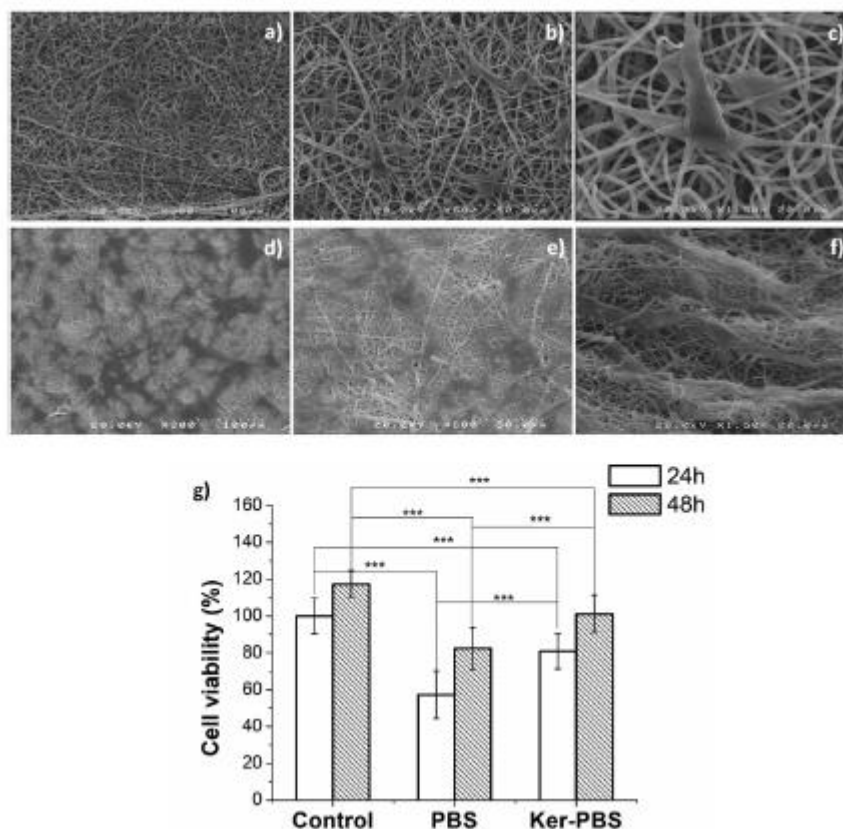


Figura 43: Immagini SEM dei tappetini a base di PBS (a-c) e della blend (d-f) e grafico di vitalità cellulare a 24 e 48 ore dalla semina

3.2.11 Sistema ibrido PBS/Chitosano

Nel presente studio è stata realizzata e studiata una miscela di chitosano e PBS per applicazioni nell'ingegneria tissutale del tessuto cartilagineo [16]. La scelta del chitosano è dovuta al fatto che esso è un polimero naturale derivato dalla chitina, semicristallino, non tossico, biodegradabile e biocompatibile, e soprattutto con struttura simile ai componenti della matrice

extracellulare della cartilagine. Più in dettaglio, il PBS e il chitosano, in rapporto ponderale 1:1, sono stati miscelati in fuso con un estrusore a vite; da tale miscela è stato prodotto uno *scaffold* con porosità elevata e interconnessa mediante *compression moulding* e poi *salt leaching*.

La linea cellulare utilizzata per valutare la non tossicità della miscela è costituita da cellule progenitrici mesenchimali di topo (BMC9). Oltre all'assenza di fenomeni di citotossicità, sia diretta che indiretta, è stato possibile osservare che le cellule aderiscono bene alla superficie dello *scaffold*, sviluppando una morfologia inizialmente simile a quella dei fibroblasti e poi dei condrociti, si diffondono nella struttura tridimensionale creando strati multipli, sui quali, dopo tre settimane, è possibile notare la formazione di collagene di tipo II, indice della produzione di matrice extracellulare da parte delle cellule e di un buon grado di differenziamento (Figura 44).

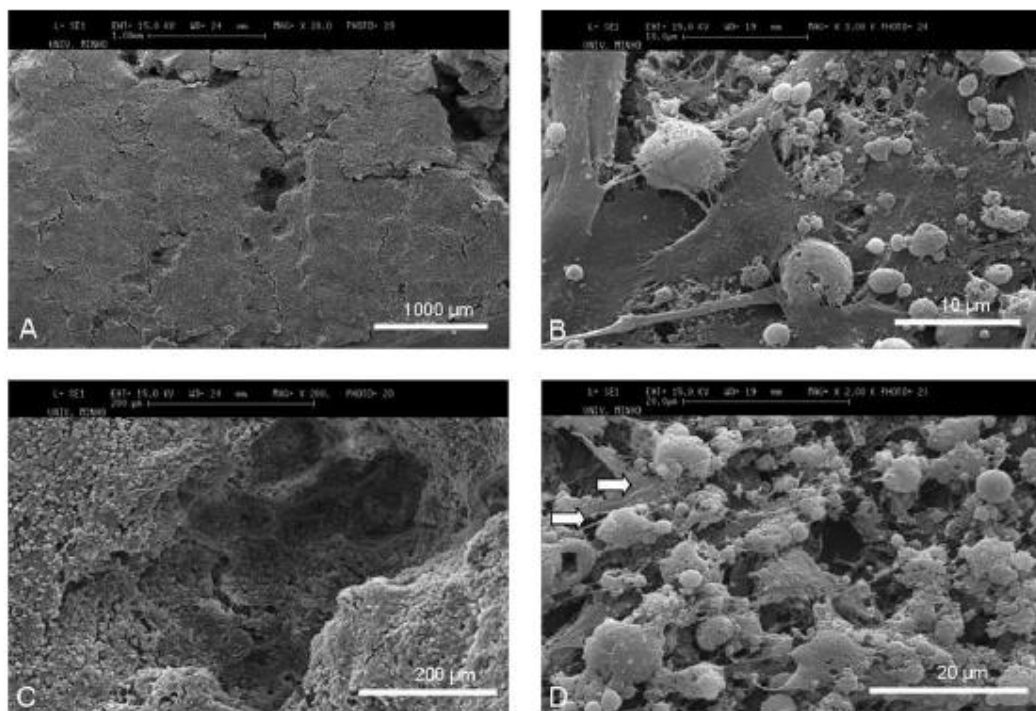


Figura 44 Immagini SEM delle cellule BMC9 dopo 3 settimane di cultura sugli scaffold

In uno studio successivo, gli stessi scaffold sono stati testati per la rigenerazione di tessuto osseo [17]. Più in dettaglio, sono stati eseguiti test *in vitro* con cellule staminali mesenchimali del midollo osseo umano (hBMSCs), che hanno mostrato una buona adesione e proliferazione, e la formazione di una struttura multistrato sullo *scaffold* (Figura 45), confermando l'adeguata affinità tra cellule e substrato. Dopo tre settimane, è stato possibile osservare anche la

formazione della matrice extracellulare da parte di hBMSCs, ad indicare che il processo di differenziamento verso il tessuto osseo è avvenuto con successo. Inoltre, dopo due settimane di cultura *in vitro*, i supporti sono stati impiantati *in vivo* in topi, utilizzati come modello animale, al fine di riparare difetti cranici indotti appositamente. Dopo 8 settimane dall'impianto, è stato possibile osservare una buona integrazione con il tessuto circostante, nonché la formazione di tessuto osseo, a riprova del fatto che tali *scaffold* non solo sono in grado di supportare la crescita e la proliferazione cellulare, ma sono anche capaci di indurre la formazione di tessuto osseo in corrispondenza del sito di impianto.

Inoltre, la presenza di depositi di Ca-P ha indicato la produzione di una ECM mineralizzata e confermato la differenziazione cellulare insieme all'aumento di ALP. Quindi gli *scaffold* di Chitosano-PBS sembrano essere adatti per la rigenerazione della cartilagine sia dal punto di vista meccanico e di sostegno, sia per la citocompatibilità, l'adesione e la proliferazione cellulare.

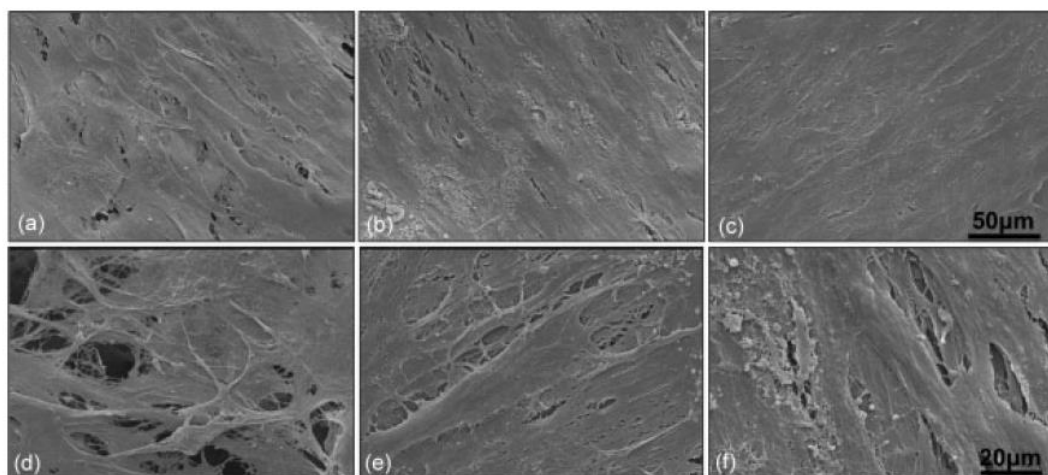


Figura 45 Immagini SEM delle cellule coltivate sugli *scaffold* in condizioni di induzione osteogenica dopo 1 (a, b), 2 (c, d) e 3 (e, f) settimane

3.2.12 Sistema ibrido PBS/nanocristalli di cellulosa

Nel presente lavoro, è stato realizzato uno *scaffold* a pori aperti e interconnessi a base di PBS, contenente nanocristalli di cellulosa (CNCs), per applicazioni nell'ambito dell'ingegneria tissutale [18]. Questa particolare porosità è stata ottenuta attraverso il controllo sinergico della variazione di temperatura e della pressione, che è stata diminuita in due fasi durante il processo di *foaming* in anidride carbonica supercritica. L'aggiunta dei CNCs e la particolare struttura a

pori aperti ha permesso di ottenere una buona resistenza a compressione, bagnabilità, ed un notevole aumento della velocità di degradazione rispetto a quanto osservato per il solo PBS.

La vitalità cellulare è stata testata *in vitro* con cellule di fibroblasti di topo NIH-3T3 ad 1, 4 e 7 giorni: dalle immagini ottenute mediante microscopia a fluorescenza, mostrate in Figura 46, che evidenzia in verde le cellule vive, è possibile osservare un'ottima biocompatibilità ed una buona adesione e proliferazione cellulare, crescenti nel tempo e dalla morfologia appiattita, ad indicare che l'interazione tra cellule e substrato è massimizzata. Per queste ragioni, tale tappetino ibrido con architettura a pori aperti risulta un ottimo candidato per applicazioni in ingegneria tissutale.

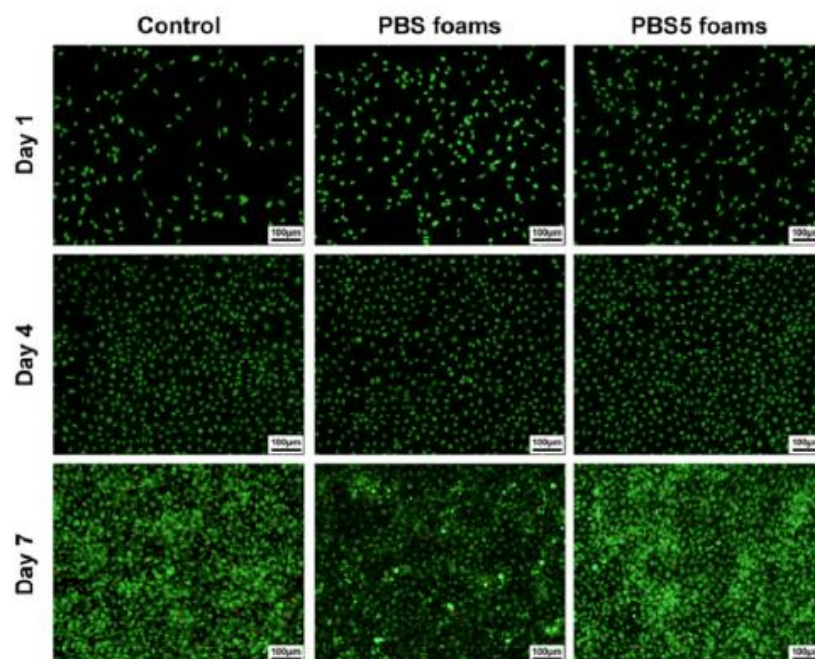


Figura 46 Immagini al microscopio a fluorescenza delle cellule sui tappetini di PBS e di PBS contenenti CNCs, ad 1, 4 e 7 giorni dalla semina

3.2.13 Sistema ibrido a base di PBS e PLA/nanofibrille di cellulosa

Nel presente studio, sono stati realizzati degli *scaffold* elettrofilati a base di miscele di PBS e PLA a composizione variabile, arricchite e rinforzate con nanofibrille di cellulosa (CNFs) in quantità variabile dall'1 al 5% [19]. Le caratteristiche degli *scaffold* sono risultate notevolmente migliorate in seguito all'introduzione delle CNFs nelle miscele copolimeriche, tali da soddisfare alcuni requisiti essenziali per la rigenerazione dei tessuti vascolari. In particolare, i tappetini mostrano una struttura uniforme, con una superficie adatta alla crescita cellulare, e la dimensione delle fibre risulta dello stesso ordine di grandezza della matrice extracellulare. Per

quanto riguarda le proprietà meccaniche, il tappetino ottenuto miscelando pari quantità di PBS e PLLA è risultato quello con caratteristiche più simili (in termini di modulo elastico ed allungamento a rottura) a quelle del tessuto vascolare. Tale tappetino, inoltre, è quello caratterizzato da valori di angolo di contatto ottimali (inferiori rispetto a quelli dei due omopolimeri di riferimento) per l'adesione e la proliferazione cellulare. Infine, sono stati condotti studi di biocompatibilità utilizzando fibroblasti provenienti da pelle umana (Figura 47): a 7 giorni dalla semina, tutti i tappetini ottenuti dalle miscele mostrano una migliore adesione e vitalità cellulare rispetto ai tappetini ottenuti a partire dai singoli omopolimeri, grazie alla maggiore bagnabilità ad una distribuzione delle fibre più omogenea. La presenza delle CNFs migliora ulteriormente le performance degli *scaffold*: la cellulosa, infatti, consente di ottenere fibre dai diametri ancora minori, dell'ordine di grandezza della matrice extracellulare, ed aumenta ulteriormente la bagnabilità della superficie, fattori che svolgono un ruolo fondamentale nelle fasi di adesione. Occorre poi ricordare che la cellulosa, come tutti i polimeri di origine naturale, presenta una biocompatibilità migliore rispetto ai polimeri di sintesi. Alla luce dei risultati ottenuti, dunque, gli scaffold oggetto del presente studio hanno dimostrato buone potenzialità per applicazioni nell'ingegneria dei tessuti vascolari.

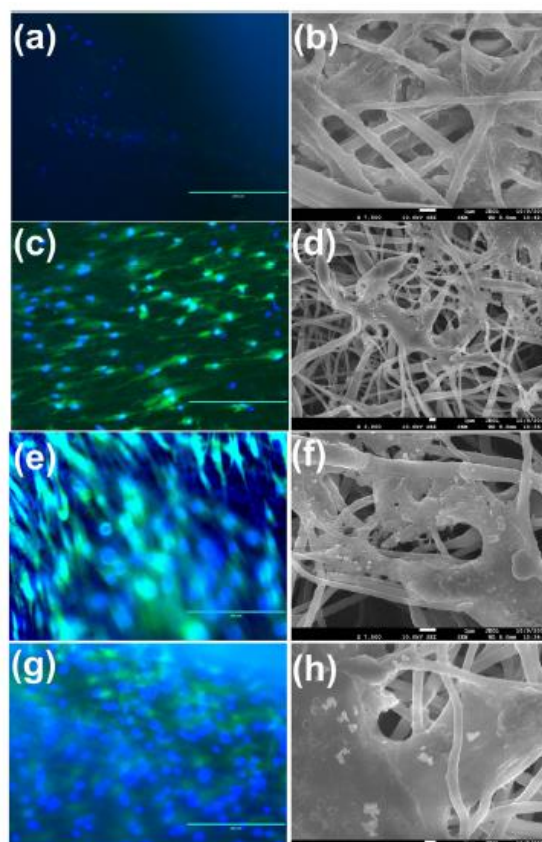


Figura 47 Immagini al microscopio a fluorescenza e SEM dei tappetini di PLA (a–b), PBS (c–d), della miscela PLA/PBS 50/50 (e–f) e della stessa miscela contenente CNFs (g–h) a 7 giorni dalla semina

3.2.14 Materiale composito poli(butilene succinato)/nano fluoroapatite

In tale lavoro, è stato realizzato un materiale nanocomposito bioattivo organico/inorganico a base di PBS e nano fluoroapatite (n-FA) per la rigenerazione del tessuto osseo, mediante la tecnica della co-soluzione [20]. Questo tipo di rinforzo è stato scelto poiché caratterizzato da una struttura molto simile a quella dell'idrossiapatite (HA) dei tessuti umani, ma risulta più stabile chimicamente e termicamente, più facile da sintetizzare, ed è ritenuto capace di stimolare la proliferazione ed il differenziamento delle cellule ossee.

Più in dettaglio, la n-FA è stata sintetizzata usando il metodo della precipitazione chimica a partire da nitrato di calcio, fosfato trisodico e fluoruro di sodio; successivamente, tramite co-soluzione, sono stati uniti PBS e n-FA a formare n-FA-PBS, con diverse quantità di fluoroapatite (0, 20, 40, 60 wt%). I materiali così ottenuti sono stati processati mediante stampaggio a iniezione, per ottenere substrati con una dispersione uniforme di n-FA all'interno della matrice polimerica. Per quanto riguarda le proprietà meccaniche, l'aggiunta di n-FA nel PBS ha aumentato la resistenza a compressione ed il modulo elastico, con valori in assoluto più elevati in corrispondenza del 40% di n-FA. Nei materiali compositi, inoltre, si è riscontrato un aumento dell'idrofilicità, che come già detto è un parametro chiave per l'adesione e la proliferazione cellulare. Per quanto riguarda le prove di biocompatibilità, è stato in primo luogo dimostrato che l'aggiunta di n-FA inibisce l'adesione batterica (*E. coli*) sul composito, caratteristica necessaria per evitare si generi infezione a seguito dell'impianto. Inoltre, per le prove di vitalità ad 1, 4 e 7 giorni, sono state scelte le cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs), le quali hanno mostrato una buona adesione e proliferazione, significativamente maggiore per i compositi rispetto al PBS (Figura 48).

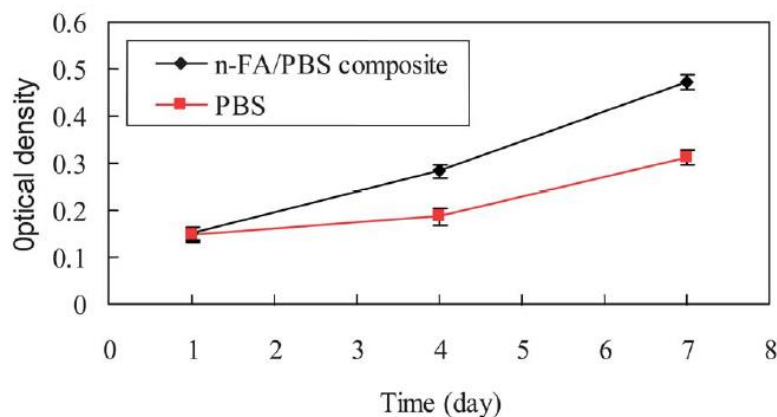


Figura 48 Proliferazione di hMSCs coltivate su n-FA-PBS e su PBS per 1, 4 e 7 giorni

In entrambi i casi, la morfologia delle cellule risulta buona (Figura 49), con la formazione di strati cellulari confluenti, anche se nel campione n-FA-PBS, le cellule mostrano una maggiore affinità con il substrato, aderendo ad esso in maniera più intima. Infine, mediante l'impianto *in vivo* di tali supporti all'interno di femori di coniglio, è stato possibile ottenere la crescita di nuovo tessuto osseo sulla superficie del composito, con una buona interazione con il tessuto nativo ed una notevole osteoconduttività.

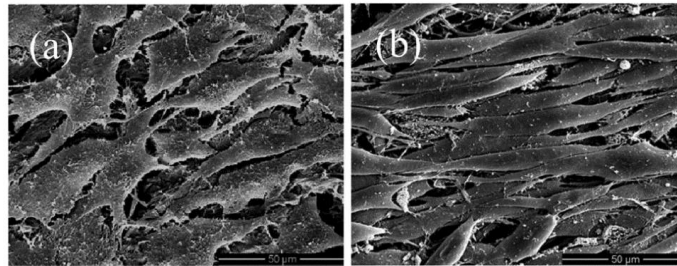


Figura 49 Immagini SEM di hMSCs coltivate su (a) n-FA-PBS e (b) PBS al giorno 4.

3.2.15 Materiale composito poli(butilene succinato)/silicato di magnesio

Il silicato di magnesio mesoporoso (m-MS) è considerato un rinforzo bioattivo e biocompatibile capace di stimolare il differenziamento degli osteoblasti e la formazione di tessuto osseo, quindi il suo utilizzo negli *scaffold* può essere utile nel migliorare la biocompatibilità della matrice, solitamente polimerica. Nel presente studio ^[21], tale rinforzo è stato studiato in combinazione con il poli(butilene succinato). Più in dettaglio, quantità predefinite di m-MS (20 e 40 % in peso) sono state aggiunte ad una soluzione di PBS e dimetilformammide, agitando fino a rendere la dispersione uniforme; successivamente sono state aggiunte anche particelle di cloruro di sodio (NaCl). Le soluzioni ottenute sono state poi colate in stampi, e al termine dell'evaporazione del solvente, gli *scaffold* presentano una struttura tridimensionale altamente porosa, con porosità controllata ed omogenea. L'aggiunta di m-MS al PBS ha permesso di incrementare la capacità di assorbire l'acqua, la biodegradabilità e la resistenza a compressione, in maniera proporzionale alla quantità di rinforzo presente. La bioattività è stata confermata immergendo gli *scaffold* per 5 giorni in un ambiente simulante i fluidi corporei: al termine dell'esperimento, è stato possibile osservare la presenza, sulle superfici, di fluoroapatiti, in quantità crescente con l'aumentare di m-MS. Per quanto riguarda le prove di biocompatibilità, è stata utilizzata una linea cellulare preosteoblastica di topo (MC3T3-E1) che, dopo essere stata seminata sui vari *scaffold*, ha mostrato sopravvivenza (3, 6, 12 ore) buona nel composito contenente il 20% di m-MS, ottima in quello contenente il 40% di m-MS. In quest'ultimo caso,

inoltre, a 3 giorni dalla semina, le cellule hanno sviluppato una morfologia tipica dei fibroblasti, ed un'ottima capacità di diffusione, non solo sulla superficie ma anche all'interno dei macropori (Figura 50). Infine, test *in vivo* condotti impiantando le matrici in femori di coniglio, hanno mostrato la formazione di abbondante tessuto osseo nel campione contenente il 40% di m-MS, a differenza di quello meno ricco di rinforzo e di quello a base di solo PBS, sui quali la crescita cellulare è stata molto meno marcata. Anche la densità del tessuto formatosi è risultata proporzionale alla quantità di rinforzo presente nella matrice, ad ulteriore conferma che la presenza di silicato di magnesio è in grado di migliorare la biocompatibilità e la capacità osteogenica del PBS, sia *in vitro* che *in vivo*.

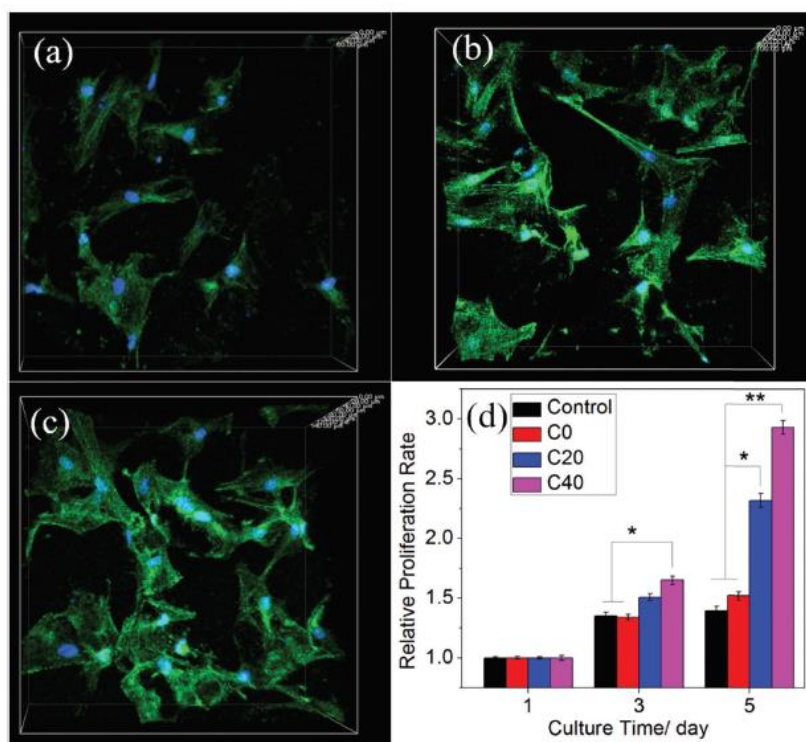


Figura 50 Immagini al microscopio confocale delle cellule dopo 3 giorni dalla semina sugli scaffold C0 (a), C20 (b), C40 (c) e velocità di proliferazione ad 1,3 e 5 giorni (d)

3.2.16 Nanocompositi di poli(butilene succinato) contenenti ceramiche bioattive

Nel presente studio, ceramiche bioattive aventi microstrutture simili alla struttura del tessuto osseo sono state prodotte sotto forma di nanoparticelle per poi essere aggiunte al PBS, al fine di migliorarne la bioattività [22]. In particolare, sono stati usati nanocristalli di idrossiapatite (nHAp), microparticelle di vetro bioattivo (mBG) ed una miscela mBG/nHAp, che sono stati aggiunti al PBS, in quantità pari al 2.5% in peso, mediante policondensazione *in situ*. Per quanto

riguarda le proprietà dei compositi così ottenuti, è emerso che le proprietà meccaniche non risultano particolarmente diverse rispetto a quelle del PBS; inoltre, il grado di cristallinità è diminuito e l'idrofilicità è aumentata, con conseguente aumento della velocità di degradazione in ambiente enzimatico. La biocompatibilità è stata testata *in vitro* a diversi tempi (1, 7, 14 e 28 giorni), con cellule staminali adipose di ratto geneticamente modificate (rASCs), che hanno mostrato buona vitalità, adesione e diffusione sulle superfici dei campioni (fino a formare strati continui e omogenei), in tutti i casi migliori rispetto a quelle osservate per lo *scaffold* a base di solo PBS. Inoltre, la presenza dei rinforzi bioattivi influenza notevolmente la morfologia delle cellule (Figura 51): sul composto PBS/mBG/nHAp le cellule hanno sviluppato una morfologia tipica degli osteociti, mentre sul PBS/nHAp è stato evidenziato un significativo potenziale di differenziamento in osteociti, a conferma della buona interazione tra cellule e substrato e del forte stimolo esercitato dalle particelle bioattive sulla formazione di tessuto osseo. Dunque, alla luce dei risultati ottenuti, l'aggiunta di ceramiche bioattive al PBS si è rivelata una strategia in grado di incrementare la bioattività, l'adesione ed il differenziamento cellulare, stimolando la formazione di nuovo tessuto osseo.

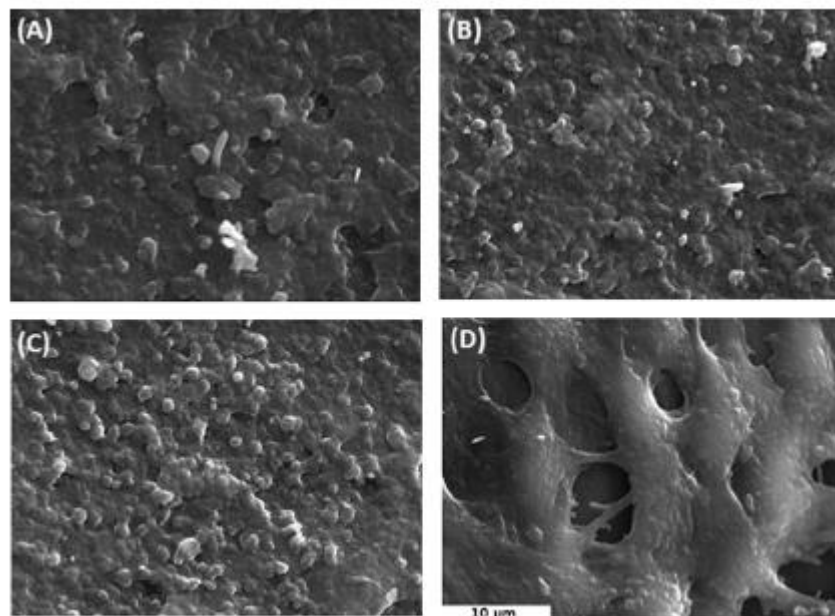


Figura 51 Immagini SEM delle cellule a 28 giorni dalla semina su (A) PBSu, (B) PBSu/nHAp, (C) PBSu/mBG, (D) PBSu/nHAp/mBG

CAPITOLO 4:

CONCLUSIONI

Il continuo e consistente progresso scientifico e tecnologico nel campo delle applicazioni biomedicali, quali ad esempio, l'ingegneria tissutale ed il rilascio controllato di farmaci, rende necessaria la ricerca di biomateriali con i quali si possano realizzare dispositivi per supportare la crescita tissutale e per effettuare un rilascio di principio attivo in maniera mirata e controllata, al fine di migliorare la salute e la *compliance* del paziente. Questi biomateriali, dunque, oltre a soddisfare importanti requisiti, soprattutto in termini di biocompatibilità, devono poter fornire un'ampia gamma di proprietà chimico-fisiche, variabili e modulabili in funzione delle diverse applicazioni e dei diversi tessuti da trattare. I polimeri, ed in particolare i poliesteri alifatici, sono i biomateriali più utilizzati in ingegneria tissutale, grazie alla loro versatilità in termini di proprietà meccaniche, biodegradabilità e biocompatibilità con il tessuto ospite. Tra i principali figurano l'acido poliglicolico (PGA), il policaprolattone (PCL), l'acido polilattico (PLA), il poli(butilene succinato) (PBS), ed i loro copolimeri e blend. Quest'ultimo, già ampiamente utilizzato a livello industriale per gli imballaggi riciclabili, grazie alla sua notevole biocompatibilità, la sua buona stabilità termica, il costo di produzione relativamente basso e un processo di sintesi semplice, presenta però un limite in termini di elevata cristallinità e lenta biodegradabilità, che non lo rendono perfettamente idoneo per alcune applicazioni biomedicali. In questo senso, la copolimerizzazione risulta un'ottima soluzione, in quanto consente di modificare e modulare per ciascun caso le proprietà di un materiale agendo sulla struttura chimica e sulla tipologia di unità comonomerica, senza alterare le caratteristiche del polimero già adatte allo scopo. Anche la miscelazione con altri polimeri o composti inorganici, può rappresentare una strategia vincente per realizzare nuovi materiali con proprietà migliorate, senza alterare quelle già idonee.

Il presente lavoro di Tesi ha avuto come obiettivo riportare i principali studi che sono stati eseguiti negli ultimi anni sul poli(butilene succinato) e suoi copolimeri, blend e compositi, esaminando le loro caratteristiche e valutare il loro possibile utilizzo per diverse applicazioni biomedicali, sia per quanto riguarda la rigenerazione tissutale, sia in sistemi di rilascio controllato di farmaci in ambiente fisiologico. Sebbene ci sia ancora molto da fare, il lavoro effettuato finora conferma le enormi potenzialità del PBS come biomateriale applicabile nel

campo dell'ingegneria tissutale e del *controlled drug release*, nonché l'efficacia delle svariate strategie adottate per migliorare e modulare le proprietà finali del materiale.

BIBLIOGRAFIA

- [1] F. Asghari, M. Samiei, K. Adibkia, A. Akbarzadeh & S. Davaran, *Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review*, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* (2017), 45:2, 185-192.
- [2] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, D. Sakthi Kumar, *Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review*, *International Journal of Polymer Science* (2011).
- [3] M. Gigli, M. Fabbri, N. Lotti, R. Gamberini, B. Rimini, A. Munari, *Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: a review*, *European Polymer Journal* (2016), 75, 431-460.
- [4] F. Cristofaro, M. Gigli, N. Bloise, H. Chen, G. Bruni, A. Munari, L. Moroni, N. Lotti, L. Visai, *Influence of the nanofiber chemistry and orientation of biodegradable poly(butylene succinate)-based scaffolds on osteoblast differentiation for bone tissue regeneration*, *Nanoscale* (2018), 10, 8689.
- [5] 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*, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* (2012), 27(3), 244-265.
- [6] M. Soccio, N. Lotti, M. Gazzano, M. Govoni, E. Giordano, A. Munari, *Molecular architecture and solid-state properties of novel biocompatible PBS-based copolyesters containing sulphur atoms*, *Reactive & Functional Polymers* (2012), 72, 856-867.
- [7] M. Fabbri, G. Guidotti, M. Soccio, N. Lotti, M. Govoni, E. Giordano, M. Gazzano, R. Gamberini, B. Rimini, A. Munari, *Novel biocompatible PBS-based random copolymers containing PEG-like sequences for biomedical applications: From drug delivery to tissue engineering*, *Polymer Degradation and Stability* 153 (2018), 53-62.

- [8] G. Guidotti, M. Soccio, M. Gazzano, N. Bloise, G. Bruni, A. Aluigi, L. Visai, A. Munari, N. Lotti, *Biocompatible PBS-based copolymer for soft tissue engineering: Introduction of disulfide bonds as winning tool to tune the final properties*, *Polymer Degradation and Stability* 182 (2020), 109403.
- [9] M. Fabbri, M. Gigli, M. Costa, M. Govoni, P. Seri, N. Lotti, E. Giordano, A. Munari, R. Gamberini, B. Rimini, G. Neretti, A. Cristofolini, C. A. Borghi, *The effect of plasma surface modification on the biodegradation rate and biocompatibility of a poly(butylene succinate)-based copolymer*, *Polymer Degradation and Stability* 121 (2015), 271-279.
- [10] H. Chen, M. Gigli, C. Gualandi, R. Truckenmüller, C. van Blitterswijk, N. Lotti, A. Munari, M. L. Focarete, L. Moroni, *Tailoring chemical and physical properties of fibrous scaffolds from block copolyesters containing ether and thio-ether linkages for skeletal differentiation of human mesenchymal stromal cells*, *Biomaterials* (2016), 76, 261-272.
- [11] G. Guidotti, M. Soccio, M. Gazzano, E. Salatelli, N. Lotti, A. Munari, *Micro/nanoparticles fabricated with triblock PLLA-based copolymers containing PEG-like subunit for controlled drug release: Effect of chemical structure and molecular architecture on drug release profile*, *Polymer Degradation and Stability* 180 (2020), 109306.
- [12] G. Guidotti, M. Soccio, M. Gazzano, L. Fusaro, F. Boccafoschi, A. Munari, N. Lotti, *New thermoplastic elastomer triblock copolymer of PLLA for cardiovascular tissue engineering: Annealing as efficient tool to tailor the solid-state properties*, *Polymer* (2021), 213, 123336.
- [13] M. Fabbri, M. Soccio, M. Costa, N. Lotti, M. Gazzano, V. Siracusa, R. Gamberini, B. Rimini, A. Munari, L. Garcia-Fernandez, B. Vazquez-Lasa, J. San Roman, *New fully bio-based PLLA triblock copoly(ester urethane)s as potential candidates for soft tissue engineering*, *Polymer Degradation and Stability* (2016), 132, 169-180.
- [14] M. Fabbri, L. Garcia-Fernandez, B. Vazquez-Lasa, M. Soccio, N. Lotti, R. Gamberini, B. Rimini, A. Munari, J. San Roman, *Micro-structured 3D-electrospun scaffolds of biodegradable block copolymers for soft tissue regeneration*, *European Polymer Journal* (2017), 94, 33-42.

- [15] G. Guidotti, M. Soccio, T. Posati, G. Sotgiu, M. Tiboni, M. Barbalinardo, F. Valle, L. Casettari, R. Zamboni, N. Lotti, A. Aluigi, *Regenerated wool keratin-polybutylene succinate nanofibrous mats for drug delivery and cells culture*, *Polymer Degradation and Stability* (2020), 179, 109272.
- [16] J. T. Oliveira, V. M. Correlo, P. C. Sol, A. R. Costa-Pinto, P. B. Malafaya, A. J. Salgado, M. Bhattacharya, P. Charbord, N. M. Neves, R. L. Reis, *Assessment of the suitability of chitosan/polybutylene succinate scaffolds seeded with mouse mesenchymal progenitor cells for a cartilage tissue engineering approach*, *Tissue Engineering* (2008), part A, 14, 10.
- [17] A. R. Costa-Pinto, V. M. Correlo, P. C. Sol, M. Bhattacharya, S. Srouji, E. Livne, R. L. Reis, N. M. Neves, *Chitosan-poly(butylene succinate) scaffolds and human bone marrow stromal cells induce bone repair in a mouse calvaria model*, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* (2012), 6:21-28.
- [18] J. Ju, Z. Gu, X. Liu, S. Zhang, X. Peng, T. Kuang, *Fabrication of bimodal open-porous poly(butylene succinate)/cellulose nanocrystals composite scaffolds for tissue engineering application*, *International Journal of Biological Macromolecules* (2019), 147, 1164-1173.
- [19] T. Abudula, U. Saeed, A. Memic, K. Gauthaman, M. A. Hussain, H. Al-Turaif, *Electrospun cellulose nano fibril reinforced PLA/PBS composite scaffold for vascular tissue engineering*, *Journal of Polymer Research* (2019), 26:110.
- [20] Y. Niu, L. Cao, J. Wei, Y. Ma, S. Song, W. Weng, H. Li, C. Liu, J. Su, *Development of a bioactive composite of nano fluorapatite and poly(butylene succinate) for bone tissue regeneration*, *Journal of Materials Chemistry B* (2014), 2, 1174.
- [21] Z. Wu, K. Zheng, J. Zhang, T. Tang, H. Guo, A. R. Boccaccini, J. Wei, *Effects of magnesium silicate on the mechanical properties, biocompatibility, bioactivity, degradability, and osteogenesis of poly(butylene succinate)-based composite scaffolds for bone repair*, *Journal of Materials Chemistry B* (2016), 4, 7974.

[22] M. Nerantzaki, I. Koliakou, M. G. Kaloyianni, I. Koumentakou, E. Siska, E. Diamanti, M. A. Karakassides, A. R. Boccaccini, D. N. Bikiaris, *A biomimetic approach for enhancing adhesion and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells on poly(butylene succinate) composites with bioactive ceramics and glasses*, European Polymer Journal (2016), 87, 159-173.

RINGRAZIAMENTI

Questo traguardo lo devo alle persone che sono parte della mia vita, che hanno contribuito in questo percorso ognuno a proprio modo.

Innanzitutto ringrazio la mia famiglia, i miei genitori, per avermi sempre sostenuta sotto qualsiasi punto di vista, non soltanto economico, e mia sorella, così diverse eppure più legate che mai. Loro sono le persone che più mi hanno supportata, spronata e incoraggiata, che hanno sempre creduto in me nonostante le difficoltà più di chiunque altro, che sono sempre al mio fianco anche quando si è lontani, che amo e che volevo rendere orgogliosi.

Ringrazio le persone con le quali ho sentito di avere una seconda famiglia a Cesena, sia le coquiline (Rebecca, Lucija, Beatrice C, Beatrice D, Laura, Maria Giovanna), sia i compagni di corso (Sofia, Maria Giovanna, Lisa, Giulia, Marco, Elia, Elia, Sara, Veronique, Anna, Ilaria), persone con cui ho potuto condividere momenti di gioia e di dispiacere, risate ed esami, viaggi, giornate e soprattutto serate. Un ringraziamento speciale a Maria Giovanna, che è stata una vera amica fin dai primi giorni e ancora di più oggi. Ringrazio anche gli amici che mi sono rimasti accanto nonostante la lontananza e le strade diverse scelte.

Ringrazio la città di Cesena, nella quale sono stata accolta benissimo, a volte piccola, ma che ricorderò come la prima volta che mi sono affacciata alla mia vita adulta, dove ho vissuto tantissime emozioni diverse ed intense, e dove ho compreso quali sono le cose che per me veramente contano nella vita.

Ringrazio la relatrice e la correlatrice di questa Tesi (Nadia Lotti e Giulia Guidotti), per avermi permesso di concludere questo percorso, di conoscere nuovi ambiti importanti e di imparare moltissime cose.

Infine, ringrazio me stessa, per non essermi mai arresa, anche quando il dolore è stato forte e le difficoltà sembravano troppe, per aver seguito il mio istinto e la mia voglia di riuscire e migliorarmi, per essere stata forte, per essermi rialzata dopo ogni caduta, per aver imparato tanto, per essere arrivata fin qui. Dedico questo percorso e questi tre anni a me e alla mia crescita, con la speranza di fare sempre di più e sempre meglio.