

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÁ DI BOLOGNA SEDE DI CESENA  
SECONDA FACOLTÁ DI INGEGNERIA CON SEDE A CESENA  
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**Nuovi copolimeri statistici a base di poli(butilene succinato),  
realizzazione di "3-D Scaffolds" mediante elettrofilatura per  
applicazioni in ingegneria tissutale**

Elaborato in:

**FONDAMENTI DI CHIMICA**

Presentata da:  
**Francesco Bellavia**

Relatore:  
**Chiar.ma Prof.ssa Nadia Lotti**

Correlatore:  
**Ing. Matteo Gigli**

Sessione III

Anno Accademico 2011/2012

# INDICE

<b>CAPITOLO 1: Introduzione</b>	<b>1</b>
1.1 Biomateriali	1
1.1.1 Classificazione	2
1.2 Biomateriali polimerici in medicina	5
1.2.1 Struttura	7
1.2.2 Classificazione	9
1.2.2.1 Biodegradazione	11
1.2.2.2 Biodegradazione idrolitica	13
1.2.3 Lavorazione	15
1.3 Poliesteri alifatici	17
1.3.1 Sintesi	17
1.3.2 Proprietà fisiche	18
1.3.3 Cristallinità	19
1.3.4 Proprietà termiche	20
1.3.4.1 Temperatura di transizione vetrosa di fusione	21
1.3.5 Massa e peso molecolare	22
1.3.6 Poliesteri alifatici per uso biomedico	24
1.4 Copolimeri	28
1.4.1 Copolimeri statistici	29
1.4.2 Copolimeri a blocchi	32
1.5 Ingegneria tissutale	33
1.5.1 Elettrofilatura	34
1.5.2 Tessuti biologici	37
1.5.3 Supporti sintetici	39
1.5.4 Biomimetica	40
1.5.5 Biocompatibilità	41
1.5.5.1 Test <i>in vitro</i>	43
1.5.5.2 Test <i>in vivo</i>	45
1.5.5.3 <i>Trials</i> clinici	48
<b>Capitolo 2: Scopo della tesi</b>	<b>50</b>

<b>Capitolo 3: Materiali e Metodi</b>	52
3.1 Elettrofilatura	52
3.2 Cromatografia di permeazione su gel (GPC)	53
3.3 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	55
3.4 Termogravimetria (TGA)	58
3.5 Risonanza magnetica nucleare (NMR)	60
3.6 Angolo di contatto	62
3.7 Misure stress-strain	63
3.8 Degradazione idrolitica	65
3.10 Biocompatibilità	66
3.10.1 Cultura cellulare	66
3.10.2 Test di vitalità cellulare	66
<b>Capitolo 4: Risultati e Discussione</b>	67
4.1 Sintesi e caratterizzazione molecolare	67
4.2 Elettrofilatura	67
4.3 Misure di bagnabilità superficiale (WCA)	71
4.4 Caratterizzazione termica	72
4.5 Caratterizzazione meccanica	73
4.6 Degradazione idrolitica	74
4.7 Biocompatibilità	78
<b>Capitolo 5: Conclusioni</b>	80
<b>Bibliografia</b>	82

# 1-INTRODUZIONE

## 1.1 BIOMATERIALI

La scienza dei biomateriali costituisce ad oggi un settore di crescente interesse ed in rapida evoluzione all'interno del sistema culturale ed economico mondiale. Molte sono le risorse, umane e finanziarie, utilizzate per la messa a punto di tecnologie sempre più sofisticate e complesse, in grado di interfacciarsi con i sistemi biologici del corpo umano e superare gli attuali limiti chimico-fisici.

Per materiali innovativi si intende una serie molto ampia di composti, che si differenziano dai prodotti convenzionali poiché progettati su misura per far fronte ad un'esigenza specifica e predefinita, funzionalizzandoli ad assolvere la loro funzione in maniera 'intelligente' (F. Causa *et al.*, 2007).

Il requisito fondamentale di un biomateriale è la *compatibilità* vale a dire la capacità di svolgere una particolare funzione senza provocare reazioni dannose nel tessuto vivente con cui il materiale è a contatto (Karande TS and Agrawal CM, 2008). Tali reazioni indesiderate, che si esplicano in fenomeni infiammatori o di rigetto, possono derivare direttamente dall'interazione del dispositivo con l'organismo o a seguito del rilascio di prodotti tossici quali, ad esempio, additivi e/o prodotti di degradazione.

Tale compatibilità può esser divisa in tre aspetti principali:

- Compatibilità morfologica: aspetto che riguarda le interfacce tridimensionali di forma e massa.
- Compatibilità funzionale: si riferisce alle proprietà che un dispositivo deve possedere per riprodurre una determinata funzione dal punto di vista fisico e meccanico.
- Compatibilità biologica o biocompatibilità: aspetto che riguarda la capacità di un materiale di determinare, da parte di un sistema vivente, una reazione favorevole alla sua presenza in una specifica applicazione.

La caratterizzazione dei biomateriali e dei dispositivi destinati ad un contatto con l'organismo, a medio e lungo termine (fluidi biologici, tessuti e organi), non può essere completa senza una valutazione circa la loro risposta biologica.

Questa valutazione va condotta allo scopo di esaminare le prestazioni del biomateriale in condizioni simili a quelle dell'ambiente biologico.

La biocompatibilità dei dispositivi, e quindi quella dei loro componenti, deve essere acquisita con certezza (testata e documentata) e poi approvata dagli organismi deputati (per esempio, FDA, marchio CE, etc.) prima della commercializzazione e dell'utilizzo in ambito clinico. Questo è quanto prescritto dalle leggi nazionali ed internazionali che, in generale, richiedono la *prova della sicurezza ed efficacia* nell'utilizzo dei dispositivi medici in condizioni di lavoro realistiche. La valutazione della biocompatibilità viene di norma condotta all'interno di centri di ricerca accreditati, seguendo ben precise procedure e standard, facendo ricorso a strumentazione particolare ed a personale adeguatamente addestrato: di fatto, queste condizioni fanno sì che le valutazioni di

biocompatibilità esulino dalle possibilità economiche e dalle priorità scientifiche dei gruppi di ricerca e delle imprese di medio-piccole dimensioni.

### **1.1.1 CLASSIFICAZIONE**

A seconda della natura chimica e delle caratteristiche che ne rendono conveniente le applicazioni mediche, esistono cinque categorie di biomateriali:

- Metalli: impiegati per dispositivi biomedici, trovano applicazione anche nella fabbricazione di strumenti chirurgici, protesi ortopediche, dentali e mezzi di osteosintesi. Grazie alle loro proprietà biomeccanica, quali elevato modulo elastico, resistenza allo snervamento, duttilità e alta resistenza alla fatica meccanica, si adattano bene alla sostituzione di tessuti duri quali ossa e denti, prevenendo la fragilità e garantendo quelle performance meccaniche che costituiscono un requisito primario di strutturazione. Alcuni esempi sono il ferro, cromo, cobalto, nichel, titanio, tantalio, tungsteno e molibdeno; data la tossicità di alcuni, dovuta alla loro corrosione in ambienti fisiologici (acquoso ed altamente aggressivo) con conseguente perdita di materiale, sono state progettate diverse leghe in grado di rallentare i processi degradativi.



**Figura 1.1** Protesi d'anca tra le applicazioni dei biomateriali metallici

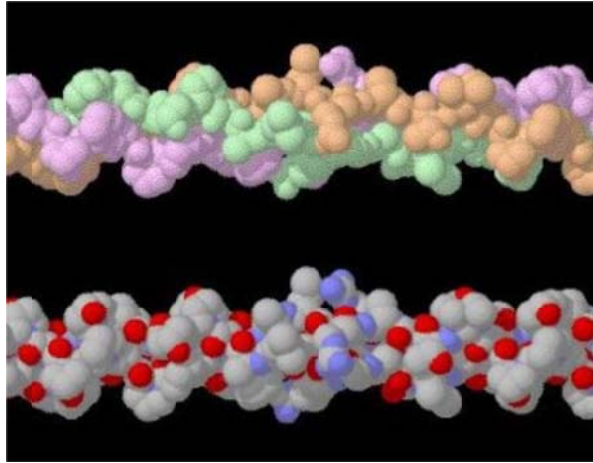
- Ceramici: materiali inorganici non metallici (policristallini), costituiti da elementi metallici e non metallici legati fra loro prevalentemente da legami ionici e/o covalenti. Le composizioni chimiche variano notevolmente, passando da composti semplici a miscele costituite da molte fasi complesse legate fra loro. Necessitano per la loro lavorazione di riscaldamenti ad alte temperature tramite cui acquisiscono rigidità e fragilità e proprietà generali quali isolamento termico ed elettrico, elevate durezza, refrattarietà e stabilità chimica. Si tratta di materiali *provvisi di rilevanti prestazioni strutturali* (capacità di resistere alle sollecitazioni meccaniche e all'usura in condizioni di temperatura e pressione molto elevate) *e/o funzionali*" (proprietà elettriche, elettroniche, ottiche e magnetiche).



**Figura 1.2** Capsule dentarie in materiale ceramico

- Biologici: materiali di origine sia animale che umana, il cui uso è possibile solo previa devitalizzazione, cioè eliminazione delle tracce cellulari responsabili della vitalità del materiale. Per i materiali costituiti da tessuti molli, il principale impiego è nel settore cardiovascolare per protesi valvolari e di vasi sanguigni, mentre per quanto riguarda i tessuti duri il maggiore utilizzo si è avuto in ambito ortopedico, per riempimenti di cavità

dovute a difetti ossei o ad asportazioni di tumori. I materiali connettivi sono la classe di tessuti biologici di maggiore interesse; appartengono a tale categoria ossa, cartilagini, sangue, endoteli e linfa.



**Figura 1.3** Fibre di collagene in una ricostruzione virtuale.

- Compositi: in cui si identificano materiali le cui proprietà fisiche differiscono considerevolmente da quelle dei singoli costituenti che, agendo in sinergia disomogenea ad asimmetrica, conferiscono qualità anisotrope al materiale derivante. Sono costituiti da una matrice e da una fase dispersa, in genere sotto forma particellare o fibrosa. La fase dispersa ha la funzione di migliorare notevolmente le proprietà meccaniche della matrice come la rigidità e la tenacità. Sono largamente impiegati perciò per la sostituzione di tessuti che devono possedere elevate prestazioni meccaniche come i legamenti del ginocchio, i tendini e l'osso dell'anca. Questi materiali sono realizzati mediante un processo di laminazione in cui gli strati vengono orientati in maniera predeterminata acquisendo caratteristiche volumetriche e geometriche che costituiscono la micromeccanica. L'applicazione di materiali composti è quindi rivolta prevalentemente al settore ortopedico.
- Polimeri: composti organici le cui molecole derivano dall'unione, mediante legame chimico omopolare, di due o più unità strutturali a basso peso molecolare detti monomeri. Tramite un processo di polimerizzazione controllata, attraverso cui vari monomeri vengono combinati tra loro, si giunge alla formazione di nuove molecole, il cui appellativo può rispecchiare il grado di polimerizzazione raggiunto: si può quindi parlare di dimeri, trimeri,

tetrameri, ecc. a seconda che il polimero sia costituito rispettivamente da due, tre, quattro o più monomeri. Nel caso in cui esso raggiunga un peso molecolare maggiore di 5000 Dalton si parla di macromolecola (o alto polimero). In alternativa la denominazione si basa sulla natura dei costituenti: esistono dunque omopolimeri e copolimeri a diversa composizione molare. Struttura, massa molecolare, polimerizzazione, degradazione, proprietà termiche, grado di cristallinità e procedure di lavorazione sono le caratteristiche che contribuiscono a determinare, in maggior misura, le proprietà di un generico polimero (Nicholas A. *et al.*, 2006).

E' solo negli ultimi decenni, però, che si assiste ad una vera e propria evoluzione nel settore dei biomateriali; attraverso manipolazione sempre più sofisticate ed il progredire della tecnologia, la comunità scientifica ha reso possibile la sostituzione intera di organi fondamentali (cuore artificiale, protesi d'anca, etc.).

Questa possibilità ha rivoluzionato la filosofia e gli obiettivi di progettazione, indirizzando la ricerca verso biosistemi sempre più personalizzati ed in grado di emulare degnamente il comportamento meccanico dei tessuti naturali.

Nel corso degli anni, grazie al controllo dell'intero processo produttivo sempre più accurato, si è ottenuto un crescente miglioramento della microstruttura e, conseguentemente, delle prestazioni, cui ha corrisposto una continua espansione degli impieghi.

## **1.2 BIOMATERIALI POLIMERICI IN MEDICINA**

Numerosi polimeri vengono attualmente impiegati nei dispositivi medici. I campi in cui trovano maggiore applicazione sono elencati nella Tabella 1.1:

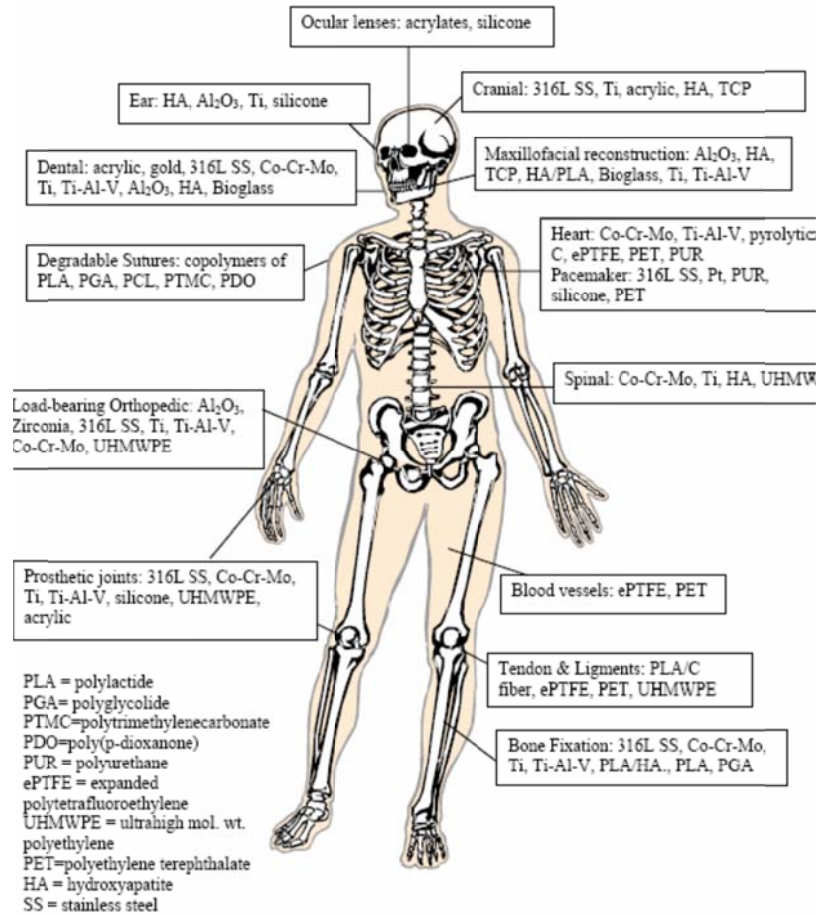
principali vantaggi che i polimeri presentano rispetto alle altre classi di materiali sono una maggiore biocompatibilità, la possibilità di modificarne ampiamente composizione e proprietà fisico-meccaniche, bassi coefficienti di attrito, facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture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



stato attuale i materiali polimerici sono adottati (nonostante la presenza di alcuni svantaggi, quali il possibile rilascio di sostanze tossiche nell'organismo, la facilità di assorbimento di acqua e biomolecole dall'ambiente circostante anche quando non richiesto e le scarse proprietà meccaniche, peraltro alterate da processi di sterilizzazione) nella produzione di numerosissimi dispositivi, tra cui suture, placche, viti, chiodi e tutte le strutture bioassorbibili, strumenti per il controllo dei fluidi corporei, valvole cardiache, protesi vascolari, organi bioartificiali, rivestimenti per sensori, dispositivi elettronici impiantabili, lenti a contatto ed intraoculari e rigenerazione tissutale.

**Tabella 1.1** Classi di materiali impiegati nel settore biomedico.

<b>Materiali</b>	<b>Vantaggi</b>	<b>Svantaggi</b>	<b>Campi d'applicazione</b>
Biologici vene, pericardio, valvole cardiache	Ottima biocompatibilità	Scarsa affidabilità, difficoltà di trattamento e conservazione	Protesi vascolari e valvolari, rivestimenti
Ceramici ossidi di alluminio, alluminati di Calcio, ossidi di Titanio, Carbonio	Buona biocompatibilità, inerzia chimica, resistenza alla compressione e corrosione	Bassa affidabilità meccanica, fragilità, difficile lavorabilità	Protesi d'anca e dentali, dispositivi percutanei
Composti metalli rivestiti con ceramici, matrici rinforzate con fibre	Buona biocompatibilità, inerzia chimica, buone caratteristiche meccaniche, resistenza alla corrosione	Scarsa coesione tra i componenti, difficile lavorabilità	Protesi valvolari cardiache, protesi di ginocchio
Metalli acciai, Titanio e leghe, leghe di Cobalto	Elevate caratteristiche meccaniche e resistenza alla corrosione	Scarsa biocompatibilità, rigidità, alta densità e corrosione in ambiente biologico	Mezzi di osteosintesi, protesi per ortopedia ed odontoatria
Polimeri siliconi, poliuretani, polietilene, acrilati, fluorurati, poliesteri	Tenaci, bassa densità, facile lavorabilità	Bassa resistenza meccanica, degradazione nel tempo	Suture, cateteri, drenaggi, protesi cardiovascolari, cementi per ossa



**Figura 1.4** Panoramica delle principali applicazioni di materiali polimerici per uso biomedico.

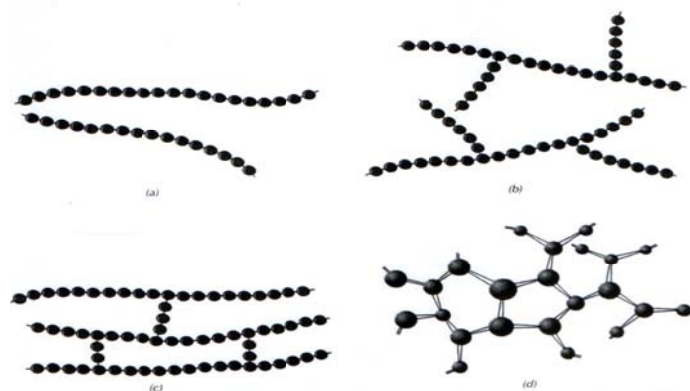
## 1.2.1 STRUTTURA

L'orientazione tridimensionale delle molecole del polimero è una caratteristica che condiziona le proprietà del materiale esaminato. Si parla di isomeria strutturale o stereoisomeria quando composti chimici con identica composizione, e quindi stessa formula bruta, presentano struttura differente, e di conseguenza proprietà chimiche differenti, data la possibilità di diversi legami tra le molecole.

La classificazione dei biomateriali polimerici si divide in base all'origine (sintetici e naturali), alle proprietà strutturali e al comportamento termico.

Le moderne tecniche di sintesi dei polimeri consentono ad oggi un notevole controllo sulla produzione delle varie alternative strutturali:

- **Polimeri lineari:** strutture filiformi costituite da unità monomeriche, tenute insieme da legami deboli come forze di Van der Waals, legami ad idrogeno ed interazioni dipolo-dipolo (polietilene, polistirene, nylon etc.).
- **Polimeri ramificati:** catene costituite da una struttura centrale lineare da cui si dipartono catene laterali più o meno lunghe. Con la formazione delle ramificazioni si riducono le capacità di impacchettamento della catena, per cui la densità del polimero diminuisce. Anche in questo caso le singole catene ramificate sono tenute insieme da legami deboli.
- **Polimeri a legami incrociati:** sono polimeri in cui le catene adiacenti lineari sono tenute unite l'una all'altra da legami covalenti. Questa struttura si può ottenere sia in fase di sintesi, sia con una reazione chimica, non reversibile, effettuata ad elevata temperatura.
- **Polimeri reticolati:** qui le unità monomeriche trifunzionali hanno tre legami covalenti attivi che formano reti tridimensionali. Questi materiali hanno proprietà meccaniche e termiche caratteristiche, e tra essi vi sono le resine epossidiche e le fenolo-formaldeide.



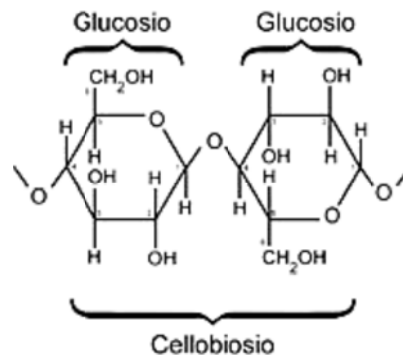
**Figura 1.5** Strutture macromolecolari dei polimeri: a) lineare, b) ramificata, c) a legami incrociati e d) reticolata.

In base alle loro proprietà possiamo distinguere tra resine, elastomeri (cioè gomme), e fibre, in base al loro comportamento al calore possiamo differenziare tra polimeri *termoplastici* (lavorabili a caldo, quindi riciclabili) e *termoindurenti* (che si induriscono a caldo in modo irreversibile). Come detto, le macromolecole possono essere costituite da un solo tipo di monomero (omopolimero) o da più di uno (copolimero); in quest'ultimo caso i monomeri si possono susseguire in modo casuale (copolimero statistico), in modo alternato (copolimero alternato), o ancora con ramificazione di un monomero innestate su una catena principale costituita dall'altro monomero (copolimero graffato).

## 1.2.2 CLASSIFICAZIONE

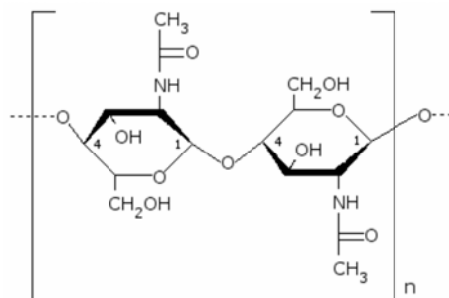
I polimeri studiati per applicazioni biomediche sono sia di origine naturale, che di origine sintetica. Per quanto riguarda i primi, quelli che rivestono un ruolo di maggiore importanza sono:

- *Polisaccaridi*: presenti negli organismi animali con funzione energetica, costituiscono una delle maggiori componenti dei tessuti vegetali (la cellulosa, è per esempio la principale componente del tessuto fibroso delle pareti cellulari vegetali). Risultano materiali molto interessanti in campo biomedico in quanto biodegradabili e caratterizzati da facile lavorabilità;



**Figura 1.6** Struttura della cellulosa

- *Chitina*: principale componente dell'esoscheletro di insetti e alcuni artropodi, della parete cellulare di funghi e batteri. Un suo derivato, il chitosano, presenta un'alta biocompatibilità *in vivo*, ed è considerato un potenziale materiale per la realizzazione di scaffold per la ricostruzione di ossa, cartilagini e pelle;



**Figura 1.7** Struttura della chitina

- *Proteine* come collagene, fibrina, gelatina e albumina. Esse vengono utilizzate in ingegneria tissutale per la ricostruzione sia di ossa e cartilagini che di tessuti molli. Questo è possibile grazie alla loro elevata biocompatibilità e alla possibilità di crescita cellulare sulle loro

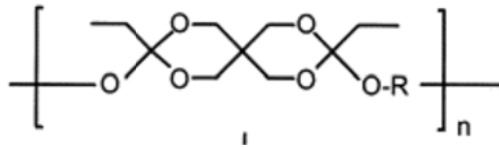
superfici, anche se la difficile lavorabilità e la diversa velocità di degradazione, variabile da paziente a paziente, costituiscono dei limiti al loro impiego.



**Figura 1.8** Fibrina

La categoria dei polimeri sintetici comprende numerosi materiali, tra cui i *poliesteri alifatici*, che verranno ampiamente trattati in seguito, ma anche:

- *Polianidridi*: idroliticamente instabili, si degradano nel giro di qualche giorno o qualche settimana se alifatiche, mentre se aromatiche i tempi si allungano fino a raggiungere molti mesi o addirittura anni. Per questa ragione costituiscono uno dei materiali più studiati nell'ambito del rilascio controllato di farmaci;
- *Policarbonati alifatici*: possiedono una struttura molecolare estremamente ordinata e cristallina. Questa caratteristica li rende estremamente tenaci e resistenti ad azioni meccaniche come il graffio, la perforazione e l'abrasione; inoltre la possibilità di sterilizzarli in autoclave ne ha permesso l'impiego per la fabbricazione di strumenti ardiocirurgici e dialisi;
- *Poli(ammidi)*: sono polimeri caratterizzati da legami molto stabili idroliticamente, che vengono erosi solo in presenza di enzimi. Rappresentano una classe molto interessante di materiali data la possibilità di modularne le sequenze di aminoacidi, anche se il loro utilizzo risulta limitato dalla non ottimale biocompatibilità;
- *Poli(ortoesteri)*: comprendono polimeri amorfi e idrofobi, adatti alla realizzazione di matrici per il rilascio controllato di farmaci in quanto degradano solo superficialmente e tendono a diventare sottili senza però sgretolarsi; non si sono invece rivelati ideali per altri tipi di applicazioni, data la loro elevata velocità di degradazione.



**Figura 1.9** Esempio di poliortoestere

### 1.2.3 BIODEGRADAZIONE

La biodegradazione consiste essenzialmente nell'alterazione chimica e fisica che un materiale subisce in ambiente biologico. E' un fenomeno molto vasto che va dalla biodegradazione dei materiali di scarto operata dai microrganismi nelle discariche, alle modificazioni che i biomateriali, utilizzati per costruire gli impianti medicali, subiscono *in vivo*. La biodegradazione interessa, in modo più o meno importante, tutti i materiali impiantati nell'organismo e quindi anche i biomateriali di natura polimerica. Può essere voluta, come nel caso dei polimeri utilizzati per il rilascio controllato dei farmaci e per le protesi riassorbibili, oppure può essere del tutto indesiderata, come nel caso di protesi programmate per durare per molti anni o, addirittura, per tutta la vita del paziente.

Il processo può essere artificialmente indotto ad un tempo specifico dopo l'inserimento dell'impianto oppure può scatenarsi inaspettatamente. I materiali impiantati, nel tempo, possono solubilizzarsi, sbriciolarsi e/o assumere indesiderate caratteristiche di deformabilità o di fragilità. I prodotti di degradazione possono risultare tossici per l'organismo oppure possono essere ben tollerati e/o svolgere un'azione farmacologica specifica. In applicazioni recenti, la degradazione di membrane polimeriche viene telecomandata e controllata da sistemi computerizzati esterni all'organismo, permettendo il rilascio di reagenti o di molecole bioattive nella successione e nella quantità richiesta. Un tipico esempio di questa promettente tecnologia è costituito dai sistemi che permettono la determinazione quantitativa della glicemia ed rilascio controllato di insulina *in situ*. La biodegradazione interessa tutti i biomateriali siano essi metalli, polimeri, ceramici o compositi. Le cosiddette "condizioni fisiologiche" sono caratterizzate da valori di pH intorno alla neutralità, da temperature blande e da basse concentrazioni saline. Tuttavia, contrariamente a quanto si potrebbe pensare, l'ambiente biologico risulta particolarmente "ostile" nei confronti di molti materiali che possono andare incontro, in queste condizioni, ad un degrado più o meno rapido. Il tipico ambiente salino acquoso rappresenta infatti il mezzo ideale, non solo per l'instaurarsi di

reazioni elettrochimiche di corrosione a carico dei materiali metallici, ma anche per innescare modificazione di carattere chimico e fisico nei materiali polimerici.

I principali fenomeni che possono portare al deterioramento di protesi impiantabili, costruite in tutto o in parte con materiali polimerici, possono essere di natura chimica, come l'ossidazione, oppure possono essere ricondotti a modificazioni chimiche innescate da processi di termolisi, fotolisi e radiolisi. Per quanto riguarda le modificazioni di carattere più propriamente fisico si passa dall'assorbimento, al rigonfiamento, al rammollimento, alla solubilizzazione, alla mineralizzazione, alla cristallizzazione. Inoltre, non può essere trascurata l'importanza per la degradazione di fattori meccanici quali: rotture causate da sollecitazioni meccaniche (*stress cracking*), fratture riconducibili a fatica del materiale o causate da impatti, tensioni dovute a carichi costanti o ciclici. Tutto ciò, aggiungendosi ad abrasioni e fratture superficiali che costituiscono ideali punti di attacco per reazioni chimiche e/o biochimiche, porta ad una accelerazione dei processi di degradazione.

Nella maggior parte dei casi, la degradazione del biomateriale è dovuta alla combinazione di più meccanismi che operano simultaneamente sul materiale.

Dal punto di vista biologico la situazione risulta particolarmente critica in quanto i biomateriali utilizzati per la costruzione degli impianti protesici sono considerati estranei dall'organismo ricevente; questo suscita inesorabilmente reazioni che, nei casi meno favorevoli, portano a danni irreversibili con conseguente compromissione della funzionalità e della durata dell'impianto.

Per garantire la funzionalità e la durata delle protesi impiantabili, oltre ad una scelta ragionata dei componenti, è indispensabile una vasta sperimentazione preclinica dei materiali e delle procedure seguite per la fabbricazione dei manufatti. Questa sperimentazione preventiva risulta molto difficile nel caso di impianti destinati a durare per anni o per decenni in condizioni d'uso e di intorno biologico variabili da paziente a paziente. Inoltre, simulazioni classiche, come ad esempio l'accelerazione artificiale dei processi di invecchiamento, le prove su animali e le proiezioni statistiche, non sono in grado di prevedere tutte le variabili che possono portare ad un prematuro calo delle prestazioni.

Pertanto è senz'altro auspicabile, e spesso necessario, il monitoraggio nel tempo delle condizioni e delle prestazioni delle protesi *in vivo*. Anche i trattamenti subiti dai materiali e dai manufatti prima dell'innesto possono condizionare, in senso positivo o negativo, la stabilità e la vita dell'impianto. Un classico esempio di questo tipo di degradazione si osserva nel caso del polietilene ad altissimo peso molecolare (UHMWPE) che viene largamente utilizzato per la

fabbricazione di giunture artificiali; queste protesi, prima dell'utilizzo, vengono sottoposte a sterilizzazione mediante irradiazione con raggi gamma. E' stato rilevato che il processo di irradiazione genera radicali liberi che, reagendo con l'ossigeno, formano prodotti indesiderati all'interno del materiale ed innescano reazioni di ossidazione che portano alla scissione delle catene polimeriche e sono causa di indebolimento e di fragilità del manufatto.

Pertanto, non solo è assolutamente necessario che tutti i trattamenti cui vengono sottoposti i biomateriali, e le protesi in generale, siano compatibili con il tipo di materiale scelto, ma è anche opportuno che le modalità e le condizioni operative utilizzate durante la fabbricazione, come anche le pratiche relative ai trattamenti finali, seguano protocolli precisi, riproducibili, e possibilmente certificati, a garanzia della sicurezza delle operazioni e dei prodotti.

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

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

### **1.2.3.1 BIODEGRADAZIONE IDROLITICA**

Il processo di idrolisi comporta la scissione di legami chimici ad opera dell'acqua. La suscettibilità di un polimero all'idrolisi è ricollegabile alla sua natura chimica, alla struttura, alle dimensioni e, naturalmente, all'ambiente (Chiara Gualandi *et al.*, 2012).

La velocità di idrolisi tende ad aumentare al crescere del numero di gruppi funzionali idrolizzabili (ad esempio, nel caso dei poliesteri il legame estereo), con una bassa cristallinità, con la mancanza o lo scarso numero di legami trasversali, e anche con la sollecitazione meccanica. Le strutture porose, a causa dell'elevato rapporto tra area superficiale e volume, sono particolarmente suscettibili all'idrolisi. Fattori che, al contrario, tendono a ridurre l'idrolisi sono la presenza nel



polimero di zone idrofobiche, la reticolazione, una elevata cristallinità, bassi valori di sollecitazione meccanica e forme compatte.

In situazioni normali, le condizioni all'interno del corpo umano tendono ad un equilibrio controllato attraverso l'omeostasi. E' quindi ragionevole attendersi che i parametri ambientali al contorno dell'impianto, in configurazione non traumatica e stazionaria, siano mantenuti isotermi (37°C), neutri (pH 7.4) ed asettici.

Tuttavia, la situazione *in vivo*, nonostante sia considerata blanda rispetto ai normali standard utilizzati *in vitro*, è complicata e resa drastica dalle complesse interazioni con attivatori, recettori, inibitori ed con altre sostanze contenute nei fluidi biologici o presenti come componenti cellulari. Tutto ciò provoca risposte aggressive che si manifestano attraverso processi di adesione, liberazione e trasporto di biomolecole particolarmente attive.

I fenomeni di infiammazione acuta e di infezione provocano spesso variazioni di pH localizzate nelle vicinanze dell'innesto, che possono portare ad un rapido aumento della velocità di idrolisi. Gli enzimi permettono di aumentare la velocità di reazione, senza essere consumati durante il processo e senza modificare l'equilibrio termodinamico. L'aumento di rugosità o l'insorgenza di fessurazioni, favoriscono l'azione enzimatica che può risultare più efficace in quanto aumenta la superficie del biomateriale accessibile alle cellule, tipo fagociti, che contengono grandi quantità di enzimi attivi. Il rilascio di enzimi può inoltre essere stimolato da campi di deformazione indotti sui tessuti circostanti la protesi.

**Tabella 1.2** Fattori strutturali e metodi di controllo della degradazione.

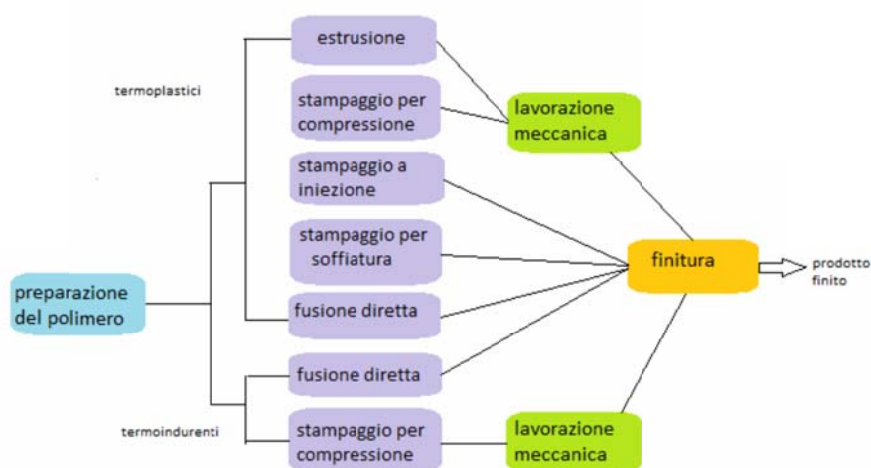
Fattori	Metodi di controllo
Struttura chimica della catena principale e dei gruppi laterali	Selezione di legami chimici e gruppi funzionali
Stato di aggregazione	Trattamento, copolimerizzazione
Stato cristallino	Miscela polimerica
Bilancio idrofilico-idrofobico	Copolimerizzazione, introduzione di gruppi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

La degradazione può essere monitorata attraverso misurazione delle variazioni di peso molecolare, derivanti dalla scissione dei legami, o di perdita di peso, imputabile al passaggio in soluzione di molecole a basso peso molecolare. La degradazione si concretizza in modifiche

morfologiche e topologiche, rilevabili al SEM, formazione di prodotti di degradazione ed alterazione delle proprietà meccaniche.

### 1.2.4 LAVORAZIONE

Il primo passo nella fabbricazione di un dispositivo costituito da materiale polimerico è la produzione del polimero stesso, il quale in genere viene fornito in soluzione, in polveri, in grani oppure, nel caso di polimeri termoindurenti, anche in fogli, barre, ecc. Questi ultimi possono essere lavorati con macchine utensili mediante i tradizionali metodi di asportazione di truciolo (gli stessi utilizzati per i metalli), ponendo particolare attenzione a non scaldare il materiale durante la lavorazione, al fine di non comprometterne stabilità dimensionale e proprietà meccaniche. I principali processi con cui vengono prodotti i dispositivi polimerici sono schematizzati in Figura 1.10.



**Figura 1.10** Fasi della lavorazione dei materiali polimerici

In genere i polimeri termoplastici vengono riscaldati fino al rammollimento e quindi rimodellati prima che raffreddino, mentre per quanto riguarda i termoindurenti, si adotta un processo che sfrutta una reazione chimica tramite la quale le catene polimeriche vengono legate fra loro in modo da formare una rete tridimensionale. La polimerizzazione finale è ottenuta grazie a calore e pressione, oppure per azioni catalitiche. Una delle tecniche maggiormente utilizzata è lo stampaggio, ovvero un metodo di formatura per mezzo di uno stampo, il quale si può contraddistinguere in tre tipologie: a compressione, ad iniezione o per soffiatura.

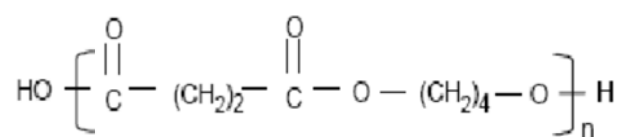
- *Stampaggio a compressione*: la forma più generale prevede l'utilizzo di una lastra preformata, e la successiva applicazione di pressione spinge la resina preriscaldata contro le pareti dello stampo; continuando il riscaldamento si giunge alla completa reticolazione della resina termoindurente.
- *Stampaggio ad iniezione*: i granuli di materia plastica vengono caricati sulla superficie di una vite roteante che li spinge verso lo stampo; la rotazione della vite forza contro le pareti riscaldate del cilindro i granuli, provocandone la fusione a causa del calore di compressione e dell'attrito. Il processo si arresta quando la giusta quantità di materia plastica arriva allo stampo posto al termine della vite; quest'ultimo viene poi raffreddato o reticolato. I vantaggi riscontrati con questo processo sono l'elevata velocità di produzione, l'alta qualità dei pezzi ottenuti, la complessità di forma che si può raggiungere ed una buona finitura superficiale.
- *Stampaggio per soffiatura*: consente di ottenere da una preforma di tipo semplice (in genere lastre o film), una forma complessa e di grandi dimensioni, mantenendo il polimero a temperatura tale da avere la fluidità richiesta. Il processo consiste nel posizionare la plastica preriscaldata all'interno di uno stampo caldo e comprimerla contro le pareti insufflando aria compressa. Analogamente, nella termoformatura, un foglio di materia plastica riscaldata viene forzato contro le pareti di uno stampo in seguito a pressione, solitamente ottenuta mediante il vuoto.

Una variante dello stampaggio per soffiatura è lo stampaggio o formatura sottovuoto: questa tecnica consiste nel riscaldamento di una piastra di polimero e la sua successiva adesione allo stampo mediante il vuoto.

Un ulteriore metodo di lavorazione dei materiali polimerici è l'estrusione, cioè l'operazione di compattamento e fusione (o rammollimento) di un materiale plastico, seguita dalla forzatura del materiale stesso in modo continuo, per mezzo di viti elicoidali, in una matrice di forma negativa rispetto a quella desiderata. Il pezzo deve essere successivamente portato al di sotto della sua temperatura di transizione vetrosa, con un sistema di insufflazione ad aria o ad acqua, in modo da assicurarne la stabilità dimensionale. L'estrusione è anche utilizzata per mescolare intimamente alla massa del polimero gli additivi o il secondo componente di una *blend* ed eventualmente per far avvenire reazioni chimiche (estrusione reattiva).

## 1.3 POLIESTERI ALIFATICI

I poliesteri, polimeri identificati dal ricorrere dell'unità funzionale esterea nella catena carboniosa, si differenziano in aromatici e alifatici in relazione alla presenza o meno di anelli aromatici all'interno della struttura. I poliesteri alifatici rappresentano la classe di polimeri biodegradabili di maggior successo, importanza e diffusione commerciale in riferimento all'applicazione in campo biomedico, ad oggi ampliata rispetto al tradizionale impiego in suture chirurgiche. Inoltre tale classe è la più intensamente studiata in termini di meccanismi di degradazione e relazioni struttura-proprietà (Hajar Seyednejad *et al.*, 2011).



**Figura 1.11** Struttura del PBS (Polibutilensuccinato), un poliesteri alifatico

### 1.3.1 SINTESI

Si definisce polimerizzazione il processo di preparazione dei polimeri mediante l'unione di più molecole di monomero e per quanto concerne i poliesteri alifatici si distinguono due diversi tipi di polimerizzazione: la policondensazione e la polimerizzazione ad apertura di anello (ROP).

Nella prima, facente uso di dioli e diacidi (o acidi derivati) o idrossiacidi quali reagenti, la formazione del legame chimico tra monomeri porta all'eliminazione di piccole molecole semplici, quali acqua, ammoniaca e acidi inorganici, identificate come prodotti secondari. Condizione necessaria affinché tale meccanismo a stadi abbia luogo è la presenza, tra i due monomeri coinvolti nella formazione del legame, di altrettanti gruppi funzionali in grado di interagire tra loro. Considerando che i materiali policondensati acquisiscono le loro proprietà d'impiego al raggiungimento di un peso molecolare dell'ordine di 10000-20000 e che tale processo di polimerizzazione, oltre ad attuarsi con relativa lentezza, tende a limitare il grado di polimerizzazione del polimero finale, sono state ideate reazioni chimiche che, partendo da poliesteri a basso peso molecolare, consentano

di limitare l'eccessiva produzione di sostanze secondarie. Anche agendo sulla diminuzione della temperatura di lavoro e dei tempi di reazione (i quali sono causa di reazioni secondarie quali la racemizzazione), si può giungere ad una risoluzione del problema.

La ROP di lattoni, diesteri ciclici ed acetali chetonici ciclici rappresenta un metodo alternativo per la sintesi di polimeri ad elevata massa molecolare rispettando miti condizioni di reazione. Si tratta di una poliaddizione che, potendo essere condotta in presenza di limitate reazioni secondarie, agevola il controllo di proprietà quali il peso molecolare e la sua distribuzione, o la presenza di opportuni gruppi funzionali terminali. La metodologia, concretizzata nella scissione di legame delle strutture ad anello al fine di ottenere una molecola lineare contenente un gruppo estereo, fu originariamente indagata, in riferimento ai lattoni, da Carothers. La ROP di lattoni costituisce il metodo standard per la produzione di poliesteri biocompatibili e biodegradabili.

Dati termodinamici rilevati dalla polimerizzazione di lattoni di piccole e medie dimensioni hanno evidenziato come tale processo sia guidato dalla variazione negativa di entalpia; in particolare, la presenza di sostituenti nell'anello carbonioso causa un innalzamento del carattere esotermico della reazione, potendo quest'ultima essere controllata previo utilizzo di iniziatori quali composti organometallici (ossidi, carbossilasi o alcossidi). I prodotti a più elevato peso molecolare sono stati ottenuti mediante ROP anionica e coordinativa.

### 1.3.2 PROPRIETÀ FISICHE

La composizione delle unità ripetitive, la presenza di gruppi polari, la flessibilità delle catene costituenti, il grado di ramificazione, la massa molecolare, così come la cristallinità e l'orientazione, sono tra i principali fattori che concorrono a determinare le proprietà fisiche dei poliesteri alifatici. Ramificazioni a catena corta, ad esempio, tendono a ridurre la cristallinità del polimero, mentre l'allungamento progressivo di queste è associato ad un abbassamento della viscosità allo stato fuso. Le proprietà del polimero sono peraltro modulabili mediante miscelazione, copolimerizzazione ed alterazione dell'architettura macromolecolare. Il primo di tali metodi, spesso riferito come *blending*, ha destato notevole interesse per la possibilità di sintesi di nuovi materiali con migliori proprietà. La copolimerizzazione, invece, è una procedura in grado di condizionare fortemente le proprietà fisiche, quali la cristallinità e la temperatura di fusione ( $T_m$ ). La copolimerizzazione a blocchi rappresenta un'altra possibilità di preparazione di polimeri innovativi, biodegradabili ed altamente flessibili: i copolimeri a blocchi detengono infatti proprietà

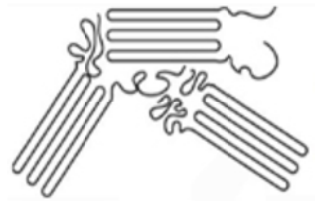
uniche, modulabili in un range che si estende da plastiche rigide ad elastomeri, per la combinazione della natura identificativa di entrambi gli omopolimeri. Infine, un esempio di alterazione della conformazione macromolecolare consiste nella sostituzione, nella catena alifatica, di un idrogeno con un gruppo alchilico. Il plausibile ostacolo del sostituito, così come la formazione, in fase di sintesi e in corrispondenza ai carboni sostituiti, di centri asimmetrici con formazione di racemi, potrebbe in tal caso condurre alla riduzione del carattere cristallino del polimero.

### 1.3.3 CRISTALLINITÀ

Definiti lo stato cristallino ed il grado di cristallinità rispettivamente come la disposizione geometricamente ordinata degli atomi costituenti entro la cella elementare ed il rapporto percentuale del peso di sostanza in forma cristallina rispetto al peso totale, i poliesteri, ed i polimeri in generale, sono identificabili come strutture a due fasi, l'una amorfa e l'altra cristallina. Lo stato amorfo, che seppure in percentuali variabili (più elevate in corrispondenza di strutture ramificate e reticolate) risulta sempre presente, è indicativo del mantenimento, da parte del polimero allo stato solido, di una struttura disordinata caratteristica dello stato fuso. La lunghezza delle molecole favorisce, infatti, una complessa distribuzione spaziale, passibile di distensioni elastiche e scorrimenti viscosi, responsabile delle proprietà viscoelastiche.

La componente cristallina, di solito più frequente in presenza di catene lineari e chimicamente e spazialmente regolari, è caratterizzata da piccola estensione e coinvolgimento di un numero limitato di catene, in grado di ordinarsi e cristallizzare grazie all'elevato peso molecolare dei poliesteri.

Il grado di cristallinità, dipendente dalla storia termica e meccanica della sostanza e valutabile per mezzo di misure di densità, diagramma di diffrazione ai raggi X, dello spettro infrarosso e di misure calorimetriche, assume pertanto valori molto bassi per quanto concerne il maggior numero dei casi, in particolar modo se si tratta di poliesteri caratterizzati da strutture ramificate o reticolate e presenza di monomeri asimmetrici, fino a raggiungere percentuali altissime in presenza di strutture lineari. In quest'ultimo caso, i polimeri sono caratterizzati da maggior densità (originata da un aumentato impacchettamento delle macromolecole), crescenti rigidità, durezza, resistenza all'usura, all'aggressione ambientale ed al *creep*.



**Figura 1.12** Esempio di fasi cristallina e amorfa

Poiché la cristallinità, funzione della struttura e della temperatura, nonché della velocità con cui si verificano variazioni di quest'ultima, condiziona le proprietà meccaniche, sono stati ideati processi che apportino migliorie a queste ultime (come ad esempio la filatura) e classificazioni fondate sull'alterazione conformale delle sostanze in relazione alla somministrazione di calore.

Si definiscono pertanto:

- **Termoplastici:** i poliesteri, aventi struttura lineare o ramificata, tra le cui macromolecole si nota la sola presenza di legami secondari, aventi bassa resistenza termica e suscettibili, in seguito a graduale incremento termico, di un progressivo rammollimento privo di trasformazioni chimiche. Essi risultano pertanto modellabili plasticamente, in opportuni intervalli di temperatura, un numero pressoché illimitato di volte.
- **Termoindurenti:** i poliesteri, a struttura reticolata, nei quali la somministrazione di calore induce un iniziale rammollimento che consente la formatura, cui segue il completamento della polimerizzazione iniziata in fase industriale. L'elevata reticolazione raggiunta implica l'irreversibile durezza e rigidità della sostanza, impedendone la successiva modellazione plastica.

#### **1.3.4 PROPRIETÀ TERMICHE**

Per la gran parte delle applicazioni è necessario che un materiale polimerico risulti stabile in determinate condizioni di temperatura; questo può essere verificato in molti modi, in particolare mediante l'impiego della *termogravimetria*. Tale tecnica consiste nella determinazione delle variazioni di peso del campione quando questo è sottoposto ad un aumento di temperatura. Nel caso dei polimeri, infatti, il riscaldamento provoca delle modificazioni chimiche (scissioni di legami spesso accompagnate dalla formazione di prodotti volatili) con conseguente alterazione delle proprietà. In particolare per i materiali polimerici viene valutata la stabilità termica, in relazione alle possibilità di utilizzo al di sopra della temperatura ambiente. Da questo punto di vista può

essere utile la definizione di Korshak, della cosiddetta “resistenza termica”, cioè la massima temperatura alla quale si può riscaldare un polimero prima che esso subisca modificazioni chimiche irreversibili, con conseguente alterazione delle sue proprietà. Normalmente questa valutazione viene effettuata in gas inerte, per stabilire correlazioni tra resistenza termica e struttura chimica del polimero, escludendo le possibili interazioni con l’ossigeno dell’aria. Per simulare il comportamento dei materiali polimerici nelle condizioni di impiego, si eseguono comunque anche analisi termogravimetriche in aria. In queste condizioni, alla scissione dei legami dovute al calore, si aggiungono quelle dovute alle reazioni tra l’ossigeno dell’aria e il polimero o le specie reattive (radicaliche) generate durante la degradazione.

#### **1.3.4.1 TEMPERATURA DI TRANSIZIONE VETROSA E DI FUSIONE**

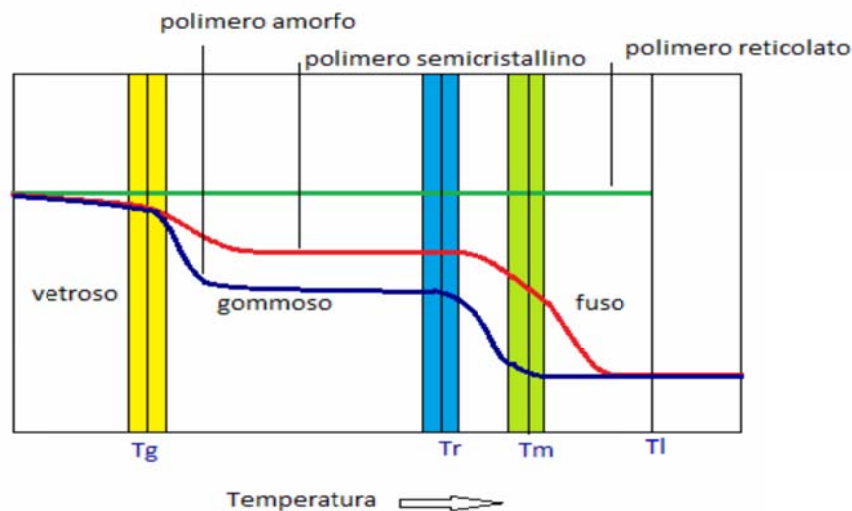
Come noto, un polimero allo stato solido può essere amorfo o semicristallino. Nel primo caso esso è caratterizzato da una disposizione spaziale pressochè casuale e disordinata delle catene ed al variare della temperatura subisce una transizione chiamata *transizione vetrosa*: la temperatura a cui avviene è nota come temperatura di transizione vetrosa,  $T_g$ . Macroscopicamente tale transizione si manifesta attraverso cambiamenti drastici di molte proprietà fisiche; tra queste la più importante dal punto di vista tecnologico è il passaggio da un solido relativamente fragile e rigido (al di sotto di  $T_g$ ) ad una gomma o ad un liquido viscoso (al di sopra di  $T_g$ ). A livello molecolare la transizione vetrosa è associata a moti cooperativi che coinvolgono lunghi segmenti di catena: si tratta specificamente di moti conformazionali che si generano per rotazione delle catene attorno ai legami singoli che connettono gli atomi. Diversamente da altre sostanze, un polimero non è mai totalmente cristallino: le zone cristalline infatti sono intimamente connesse con le zone disordinate amorphe. Ne consegue che la frazione cristallina risulta piena di difetti e la relativa fusione non ha luogo ad un valore di temperatura ben definito ( $T_m$ ), ma in un intervallo più o meno ampio. Nel caso di poliesteri amorfi l’assenza di struttura cristallina impone l’adozione di una nuova accezione: la *temperatura di rammollimento* ( $T_r$ ) che stabilisce la soglia termica alla quale si concretizza il passaggio dallo stato gommoso a quello liquido.

L’aumento di temperatura, origine di alterazioni chimiche dovute alla rottura di legami e possibile formazione di prodotti volatili, modifica le proprietà fisiche dei poliesteri. Tale aspetto, in relazione all’applicazione della sostanza in dispositivi medici, richiede la valutazione del comportamento a temperature di funzionamento (la corporea varia tra 35°C e 41°C) superiori a quella ambiente.



I polimeri presentano anche una *temperatura limite di stabilità chimica* ( $T_L$ ), che rappresenta la massima temperatura oltre il quale il polimero perde la sua struttura ed ogni tipo di caratterizzazione meccanica.

L'andamento delle proprietà termiche di un polimero in base alla temperatura è illustrato nella figura seguente, dove è riportato l'andamento del  $\log E$  del modulo elastico e l'aumentare della temperatura per tre diversi tipi di strutture polimeriche: amorfa, semicristallina e reticolata.



**Figura 1.13** Andamento del modulo di elasticità, in funzione della temperatura, per polimeri a differente struttura.

### 1.3.5 MASSA E PESO MOLECOLARE

La massa molecolare di un polimero è generalmente espressa ricorrendo al grado di polimerizzazione: nel caso di omopolimeri esso è calcolabile mediante rapporto tra le masse molecolari della sostanza e dell'unità strutturale, mentre nel caso di copolimeri il rapporto precedente è calcolato considerando una massa media dell'unità strutturale. A causa della complessità con cui i meccanismi di polimerizzazione operano, la massa di un polimero è ripartita tra macromolecole aventi grado di polimerizzazione, e quindi massa molecolare, diversi.

Risulta pertanto indispensabile analizzare statisticamente la determinazione delle masse molecolari, individuando valori medi e funzioni che le caratterizzino e ne descrivano adeguatamente la distribuzione. Applicando la definizione di peso molecolare all' $i$ -esima frazione di un campione non uniforme, in cui sono collocate  $N_i$  moli di peso molecolare  $M_i$  e massa complessiva  $W_i$ , il peso molecolare medio del campione è dato da:

$$\overline{M}_n = \sum_{i=0}^n W_i / \sum_{i=0}^n N_i$$

Definita la frazione numerica (detta anche molare o molecolare)  $n_i$  della specie  $i$ esima il rapporto tra il numero di moli di una certa sostanza e il numero totale di moli presenti nel campione:

$$n_i = N_i / \sum N_i$$

il peso molecolare medio numerico è esprimibile come:

$$\overline{M}_n = \sum N_i M_i$$

Con analogo ragionamento si giunge a formulare il grado di polimerizzazione medio numerico:

$$\overline{X}_n = \sum n_i X_i$$

Valutato l'ampio intervallo di variabilità, sebbene il peso molecolare ed il grado di polimerizzazione siano proprietà discrete, risulta conveniente considerarli quali proprietà continue. In tal caso essi sono riformulabili come segue:

$$\overline{M}_n = \int M \cdot n(M) \cdot dM$$

$$\overline{X}_n = \int X \cdot n(X) \cdot dX$$

Tali equazioni evidenziano come il valore medio della massa molecolare sia dato dalla somma dei valori assunti dalla proprietà nelle diverse specie, ciascuno moltiplicato per un opportuno peso statistico (individuabile come la frazione di molecole in cui la proprietà assume un valore specifico o come la probabilità che, analizzate un certo numero di molecole, la proprietà assuma in esse un dato valore). Le caratteristiche di ogni peso statistico, esemplificate per la frazione numerica, sono:

$$0 \leq n_i \leq 1$$

$$\sum n_i = 1$$

Nell'ipotesi di proprietà continua, le sommatorie sono sostituibili con integrali ed il peso statistico è ottenibile come prodotto della funzione di distribuzione della proprietà per l'incremento infinitesimo della proprietà stessa. Considerando come peso statistico la frazione ponderale  $w_i$ , rapporto tra il peso molecolare  $M_i$  ed il peso del campione:

$$w_i = (N_i M_i) / \sum N_i M_i$$

in cui  $N_i$  è il numero di moli con massa molecolare  $M_i$ , il peso molecolare medio ponderale risulta essere:

$$\overline{M}_n = \sum w_i M_i$$

Il grado di polidispersività, definito come:

$$I_d = \overline{M}_w / \overline{M}_n$$

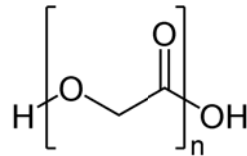
è un parametro adottato quale indice pratico dell'ampiezza della distribuzione dei pesi molecolari. Sebbene il limite teorico inferiore per esso previsto sia 1, gli esiti sperimentali nell'ambito dei polimeri sintetici mostrano che solo la polimerizzazione anionica consente di ottenere valori inferiori a 1.1, mentre nella maggioranza dei casi  $I_d$  vale 2; valori del grado di polidispersività inferiori e superiori a questo identificano, rispettivamente, distribuzione dei pesi molecolari strette e larghe. Nelle applicazioni biomediche peso molecolare elevato e una distribuzione relativamente stretta, garanti di buone proprietà meccaniche e bassa dispersione della distribuzione dei pesi molecolari, costituiscono, unitamente all'assenza di monomero residuo potenzialmente tossico, requisiti importanti.

### 1.3.6 POLIESTERI ALIFATICI PER USO BIOMEDICO

Di seguito sono riportati i poliesteri più usati in campo biomedico:

- **Acido poliglicolico (PGA):** sintetizzato per la prima volta nel 1893 quando, nonostante la sua elevata instabilità idrolitica, venne riconosciuto come materiale potenziale per la lavorazione in fibre, e successivamente messo in commercio nel 1970, esso rappresenta il più semplice poliesteri lineare alifatico. Il PGA può essere ottenuto con le più comuni tecniche di fabbricazione come estrusione, iniezione e stampaggio a compressione, le quali ne influenzano anche proprietà e degradabilità; è un polimero avente  $T_m$  e  $T_g$  poste rispettivamente negli intervalli 220-226°C e 35-40°C e struttura semicristallina (45-55% di cristallinità). La sua rapida degradazione *in vivo*, la quale comporta una notevole perdita di prestazioni meccaniche dopo 1-2 mesi se sottoposto ad idrolisi, perdita quasi totale di peso in 6-12 mesi e nel corpo umano frammentazione in glicina (successivamente secreta attraverso l'urina o convertita in diossido di carbonio e acqua tramite il ciclo dell'acido citrico), determina l'uso di tale polimero, generalmente copolimerizzato, come materiale per suture chirurgiche. Le suture realizzate in PGA hanno gradualmente sostituito le precedenti, in collagene, per la miglior compatibilità tissutale del polimero, idonee proprietà meccaniche (elevata flessibilità, resistenza meccanica) e prevedibile biodegradazione (E. Piskin *et al.*, 2007). Recenti studi nell'ambito dell'ingegneria tissutale si sono focalizzati sull'utilizzo del PGA come materiale di riempimento o per la fabbricazione di scaffold destinati alla rigenerazione di tessuti ossei, intestinali, linfatici, spinali, oltre a cartilagini, tendini e denti. Alcune limitazioni nell'uso di tale materiale sono legate alla

solubilità in pochi e costosi solventi organici, all'elevata temperatura di fusione e sensibilità all'umidità, alla perdita, in seguito alla degradazione, di proprietà meccaniche ed al rilascio di acido glicolico: quest'ultimo, nonostante sia riassorbibile fino ad alte concentrazioni da parte dell'organismo, potrebbe causare una rilevante risposta infiammatoria nei tessuti interessati.



**Figura 1.14** Unità monomerica del PGA

- Acido polilattico (PLA):** derivante dalla policondensazione dell'acido lattico o dalla ROP del dimero ciclico lattato, è un polimero che presenta due isomeri ottici, L e D; fermentato, l'acido lattico è per il 99,5% in forma L-isomero e per lo 0,5% in forma D-isomero. La polimerizzazione del lattide verso polimeri ricchi di L-isomero porta ad ottenere prodotti cristallini, mentre risultano amorfi quelli contenenti più del 15% di D-isomero. Le proprietà variano a seconda dell'isomeria: il PDLLA 50:50, caratterizzato da una distribuzione random di unità L e D, è amorfo, con basso carico a rottura, elevata deformabilità e tempi di degradazione relativamente brevi, mentre il PLLA, semicristallino (le cui  $T_m$  e  $T_g$  sono comprese tra 175-178°C e 60-65°C), è caratterizzato da resistenza a trazione e compressione, bassa deformazione a rottura e modulo elastico tale da renderlo adatto per applicazioni che richiedono resistenza ai carichi. Il PLLA ha struttura lineare e possiede un gruppo metile che lo rende più amorfo e idrofobico del PGA, con conseguente aumento della solubilità in solventi organici come cloroformio, cloruro di metilene, metanolo, etanolo, benzene, acetone, DMF, ecc. Ottenibile tramite stampaggio a iniezione, estrusione, soffiaggio e termoformatura, venne studiato per la prima volta come possibile materiale per il rilascio controllato di farmaci nel 1971, anche grazie alle sue eccellenti proprietà di biodegradabilità e biocompatibilità. Tali proprietà ne hanno sancito l'utilizzo in sistemi a rilascio controllato di farmaci, in ingegneria tissutale, come materiale per suture, fissaggio ortopedico e fabbricazione di scaffold (per la rigenerazione di ossa, cartilagini, tendini, nervi e vasi sanguigni). Rigidezza, ridotta stabilità termica ed elevati costi limitano il suo sviluppo quale generica plastica, nonostante la possibilità di rimpiazzo dei tradizionali materiali a base di petrolio. Notevoli sforzi della ricerca sono volti a diminuirne la rigidità.

Sono state proposte varie strategie e ad oggi l'opzione più plausibile sembra la sintesi di copolimeri mediante introduzione di componenti flessibili nella struttura del PLLA.

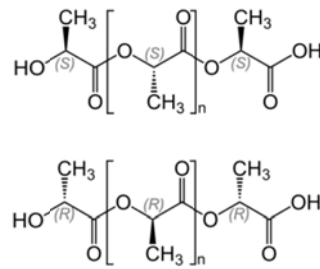
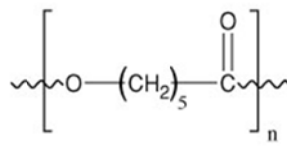


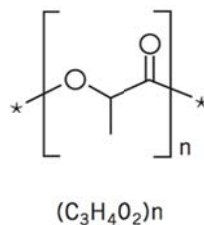
Figura 1.15 Unità monomerica del PLA

- Poli ( $\epsilon$ -caprolattone) (PCL):** originariamente sintetizzato da Carothers mediante ROP dell'estere ciclico  $\epsilon$ -caprolattone, è un polimero idrofobico e semicristallino, con  $T_m$  e  $T_g$  prossime, rispettivamente, a 59-64°C e - 60°C. Il fatto che a temperatura ambiente si trovi nello stato gommoso e l'elevata elongazione finale (>700%) giustificano l'impiego del PCL ad elevato peso molecolare come additivo, presente generalmente in quota maggioritaria, in molti sistemi polimerici. Connotato da proprietà uniche di solubilità nei confronti degli altri polimeri (risulta infatti solubile in tetraidrofurano, cloroformio, cloruro di metile, tetracloruro di carbonio, benzene, toluene, 2-nitropropano e parzialmente solubile in acetone, 2- butanone, etil acetato, acetonitrile e dimetil fumarato), permeabilità a molteplici sostanze, un elevato potenziale osteoinduttivo, buone proprietà meccaniche e basso rilascio di prodotti dannosi per l'organismo, il PCL è stato oggetto di studio per lo sviluppo di sistemi a rilascio controllato impiantabili e a lungo termine. La degradazione di tale polimero si attua in due fasi, in maniera simile al PLA (scissione random di gruppi esteri e successiva perdita di peso tramite la diffusione di unità monomeriche dal volume), anche se ciò avviene con tempistiche di circa 2 anni, quindi superiori rispetto a quelle dei poli ( $\alpha$ -idrossiacidi); per tale ragione sono stati sintetizzati copolimeri i quali, riducendo il grado di cristallizzazione del PCL, ne consentono l'aumento della velocità di degradazione. Altre possibili applicazioni sono nell'ambito dell'ingegneria tissutale, per la realizzazione di *scaffold* impiegati per la rigenerazione di ossa, legamenti, cartilagini, pelle, tessuto vascolare e nervoso.



**Figura 1.16** Polycaprolactone

- Acido polilattico-co-glicolico (PLGA):** si tratta di un copolimero statistico ottenuto mediante copolimerizzazione dei dimeri ciclici dell'acido glicolico e lattico con il proposito di modulare le proprietà dei due omopolimeri. Spesso identificato tramite il rapporto tra i monomeri usati, il PLGA, nelle sue diverse forme, tende ad essere amorfo più che cristallino, con una  $T_g$  compresa tra 40-60°C. Solubile in molti solventi comuni, differentemente dagli omopolimeri costituenti, il PLGA degrada ad una velocità direttamente proporzionale al contenuto di acido glicolico. Utilizzato per la prima volta nel 1974 come materiale per suture, oggi trova varie applicazioni anche grazie alla modulabilità delle sue proprietà: ad esempio in forma di nanosfere, nanofibre, microsfeere e microcapsule è impiegato per dispositivi a rilascio controllato di farmaci, farmaci chemioterapici, antibiotici, proteine, analgesici, antinfiammatori, molecole di RNA. Buoni risultati si sono ottenuti anche in ambito dell'ingegneria tissutale in quanto il PLGA presenta buone proprietà di adesione e proliferazione cellulare: per questo motivo gli *scaffold* ottenuti da questo materiale mediante per esempio sinterizzazione, elettrospinning, stampaggio, o loro combinazioni, risultano particolarmente funzionali. I problemi legati all'impiego di tale polimero risultano però la difficoltà di modulazione della velocità di degradazione e l'elevata acidità dei prodotti risultanti da quest'ultima.



**Figura 1.17** Unità monomerica del PLGA

## 1.4 COPOLIMERI

Tutti i copolimeri, molecole polimeriche contenenti due o più unità monometriche differenti, così come i copoliesteri, sono composti connotati da proprietà chimico fisiche altamente modulabili, le quali ne determinano una grande variabilità applicativa. L'introduzione del secondo monomero, la sua disposizione rispetto al primo, la sua concentrazione relativa nonché la sua influenza sul processo di sintesi e sulla struttura polimerica che ne deriva, sono infatti variabili condizionanti il meccanismo di reazione e l'assetto delle catene allo stato solido. La descrizione dei processi di concatenamento e distribuzione intracatena delle unità monomeriche, resa possibile dalla presenza di modelli cinetici e statistici (teoria della copolimerizzazione) idonei alla definizione ed al calcolo di opportuni parametri, rende possibile la descrizione completa della struttura di un copolimero. A tal fine è necessario avere nozione di:

- Composizione, vale a dire la concentrazione relativa dei monomeri A e B, e distribuzione delle composizioni;
- Tipologie delle unità ripetitive create nella catena dai due monomeri, valutate rispetto alle caratteristiche intrinseche del monomero (disposizioni testa-coda, creazione di strutture isometriche nei monomeri polifunzionali o eventuali arrangiamenti);
- Ordine di incorporazione di A rispetto a B, il quale determina l'insorgere di sequenze di diversa lunghezza, e le modalità con cui queste ultime si distribuiscono;
- Pesi molecolari delle catene e loro distribuzione statistica, determinabili previa misura sperimentale delle costanti di velocità di accrescimento e terminazione;
- Presenza di processi non controllati che diano origine a ramificazioni, ciclizzazioni o reticolazioni indesiderate.

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

- *Copolimeri statistici o random*, nei quali le unità monomeriche assumono collocazioni casuali nella catena principale;

**ABAABABBBABBA**

- *Copolimeri alternati*, in cui i monomeri sono regolarmente alternati nella catena;

**ABABABABABABA**

- *Copolimeri a segmenti* (o a blocchi), in cui è evidenziabile una distribuzione regolarmente alternata dei comonomeri;

AAAABBBBAABBA

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



### 1.4.1 COPOLIMERI STATISTICI

La descrizione della composizione di un copolimero statistico, ottenuto mediante meccanismi di poliaddizione radicalica, ionica o di coordinazione, nota la concentrazione iniziale dei monomeri nel mezzo di reazione, costituì una problematica centrale della teoria della copolimerizzazione. La composizione del prodotto è infatti funzione del tempo, poiché la variazione di reattività dei monomeri durante il processo di copolimerizzazione induce una permanente discordanza tra la composizione del mezzo di reazione e quella copolimero. Ne deriva che quest'ultima, in relazione ad una specifica miscela di alimentazione, ha carattere istantaneo ed è definibile come l'esito di conversioni infinitesime di monomeri. Differentemente da quanto affermato per gli omopolimeri, la possibile presenza di molteplici fasi amorfe e cristalline determina l'individuazione di altrettanti processi, quindi temperature, di transizione vetrosa e fusione. La transizione vetrosa, caratteristica della fase amorfa e variabile in maniera monotona con la composizione, si palesa ad una temperatura intermedia a quelle dei due omopolimeri,  $T_{gA}$  e  $T_{gB}$ . L'andamento di  $T_g$  in funzione della composizione polimerica può essere formulato analiticamente ricorrendo all'equazione di Fox:

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

in cui  $w_A$  e  $w_B$  rappresentano le frazioni in peso dei rispettivi monomeri, ovvero alla più recente equazione di Couchman, adottata anche nel caso di andamenti regolari di  $T_g$ :

$$\ln T_g = \frac{\ln T_{gA} + \left(K \cdot \frac{w_B}{w_A}\right) \cdot \ln T_{gB}}{1 + \left(K \cdot \frac{w_B}{w_A}\right)}$$



in cui  $k$  denota il rapporto tra gli incrementi di calore specifico alla transizione vetrosa degli omopolimeri.

Le due equazioni, solidali nel delineare un andamento monotono crescente di  $T_g$  al variare della composizione, non sembrano validare regolarmente le evidenze sperimentali: alcuni copolimeri evidenziano infatti un massimo o un minimo di  $T_g$  a composizioni intermedie.

Supponendo che le diadi AA, BB, AB (o BA) determinino il valore di  $T_g$  del copolimero, l'equazione di Fox può essere posta nella forma:

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

essendo  $T_{gAB}$  la  $T_g$  del copolimero ad unità A e B alternate,  $T_{gAA}$  e  $T_{gBB}$  le  $T_g$  degli omopolimeri  $w_{AA}$ ,  $w_{AB}$  e  $w_{BB}$  le frazioni in peso delle rispettive diadi.

Adottando tale formulazione, estesa in studi successivi anche alla considerazione di triadi, si è giunti ad un buon compromesso tra previsioni ed evidenze sperimentali. Con riferimento alla capacità di cristallizzazione di un copolimero, è prevedibile che essa sia alterata dall'introduzione, nella catena omopolimerica (A), di un'unità strutturalmente e chimicamente differente (B). Il comportamento di cristallizzazione del copolimero si complica qualora entrambe le unità monomeriche possano cristallizzare. In termini generali, le unità B possono: essere completamente escluse dal reticolo cristallino o entrarne a far parte sia in condizioni di equilibrio che in forma di difetto; nel primo caso entrambe le fasi cristalline risultano pure. Per i copolimeri statistici, con riferimento alla *teoria di Flory* per la fusione all'equilibrio, la temperatura di fusione  $T_m$  è fornita da:

$$1 / T_m - 1 / T_m^\circ = - ( R - \Delta H_u ) \cdot \ln X_A$$

dove  $T_m^\circ$  è la temperatura di fusione di equilibrio dell'omopolimero cristallizzabile (A),  $\Delta H_u$  è l'entalpia di fusione per unità ripetitiva di A nel cristallo perfetto e  $X_A$  è la frazione molare di A nel copolimero.

La precedente equazione prevede che la temperatura di fusione del copolimero a distribuzione statistica sia indipendente dalla natura del comonomero B, posto che esso sia effettivamente escluso dal reticolo cristallino. Inoltre, poichè la  $T_m^\circ$  sperimentale si riferisce alla scomparsa di sequenze di A più brevi di quanto richiesto dalla teoria di fusione all'equilibrio dinamico, i copolimeri, seppure cristallizzati accuratamente, manifestano  $T_m^\circ$  inferiori al valore teorico previsto e tale scarto è crescente in corrispondenza ad un aumentato contenuto di co-unità B.

L'effetto della lunghezza delle sequenze cristallizzabili è contemplato dalla successiva equazione di Baur:

$$1/T_{m,co}^{\circ} = 1/T_m^{\circ} - (R - \Delta H_u) [\ln X_c - 2X_c(1 - X_c)]$$

dove  $T_{m,co}^{\circ}$  è la temperatura di fusione di equilibrio dell'omopolimero cristallizzabile (C),  $\Delta H_m^{\circ}$  è l'entalpia di fusione per unità ripetitiva di C nel cristallo perfetto e  $x_c$  è la frazione molare di C nel copolimero.

Qualora i copolimeri statistici mostrino co-cristallizzazione, vale a dire sostituzione isomorfa delle unità comonomeriche, essi, differentemente da quanto riportato in precedenza, assumono un elevato grado di cristallinità in tutto il campo di composizione. La sostituzione isomorfa, in relazione alla similarità della struttura cristallina dei due omopolimeri, porta a due distinti esiti:

- Il copolimero prodotto è connotato da una fase cristallina i cui parametri variano gradualmente con la composizione di un omopolimero all'altro qualora questi ultimi presentino una struttura cristallina molto simile;
- In presenza di strutture cristalline differenti si parla di isodimorfismo ed esiste una composizione precisa in corrispondenza alla quale il copolimero passa da una struttura cristallina all'altra. I parametri del reticolo cristallino, per la presenza di unità estranee, sono alterati rispetto a quelli del corrispondente omopolimero.

In entrambi i casi l'andamento della  $T_m^{\circ}$  si discosterà dal valore predetto per copolimeri a fase cristallina pura. I modelli di esclusione di Baur e quello di inclusione del comonomero nella fase cristallina del componente cristallizzabile di Sanchez-Eby sono stati recentemente unificati da Wendling e Suter il cui modello, definita la concentrazione del comonomero B nel cristallo formato dalle unità A come:

$$X_{CB}^{eq} = \frac{X_B e^{-\varepsilon/RT}}{1 - X_B + X_B e^{-\varepsilon/RT}}$$

può essere formulato come:

$$\frac{1}{T_m^{\circ}} - \frac{1}{T_m(X_B)} = \frac{R}{\Delta H_m^{\circ}} [\ln - (1 - X_B + X_B e^{-\varepsilon/RT}) - (\tilde{\xi})^{-1}]$$

dove  $T_m^{\circ}$  e  $\Delta H_m^{\circ}$  rappresentano la temperatura di fusione di equilibrio ed il calore di fusione dell'omopolimero cristallizzabile (A),  $X_B$  è la frazione molare di B nel copolimero,  $X_{CB}$  quella del comonomero B nel cocristallo,  $(\tilde{\xi})$  l'energia libera media di Gibbs di difetto e la lunghezza media delle sequenze cristallizzabili.

A partire da esso, per  $X_{CB} = X_B$  si ricade nel modello di inclusione, mentre per  $X_{CB} = 0$  ( $\varepsilon \rightarrow 0$ ) in quello di Baur.

## 1.4.2 COPOLIMERI A BLOCCHI

Tra le numerose strutture copolimeriche progettate è possibile menzionare:

- Di-blocchi: Am-Bn. I blocchi possono contenere gruppi terminali o gruppi di giunzione ed il secondo blocco può includere un terzo monomero C (Am-B-C) con distribuzione casuale, alternata, ecc;
- Tri-blocchi: Am-Bn-Am, Am-Bn-Aq, Am-Bn-Cq, semplificazioni di copolimeri contenenti tre blocchi distribuiti come da rappresentazione;
- Multi-blocchi, copolimeri segmentati: Am-Bn-Am-Bq- Am-Bq;
- Copolimeri a di-blocchi ripetuti: (Am-Bn) x;
- Copolimeri a blocchi sovrapposti, o overlapped, Am-(Ax, By)-Bn;
- Copolimeri a stella, multibraccia collegate da un'unità di giunzione, considerabili come un caso particolare di copolimeri ad innesto.

Blocchi cristallizzabili e non cristallizzabili di sequenze A e B, costituenti i copolimeri, portano alla rispettiva formazione, in seguito a una segregazione/separazione di fase, di domini cristallini e microdomini amorfi. Il metodo di preparazione del campione, unitamente alle caratteristiche molecolari del copolimero a blocchi, determina la morfologia e quindi le transizioni termiche dei sistemi multifasici microsegregati così formati. I copolimeri, in relazione alla natura cristallizzabile dei blocchi costituenti, sono pertanto distinguibili in:

1. *Blocchi non cristallizzabili.* Nell'ipotesi teorica che la separazione di fase induca la formazione di microdomini nettamente distinti, ad ogni fase amorfa corrisponde una transizione vetrosa correlabile alla  $T_g$  del corrispondente omopolimero. La formazione di domini separati origina interazioni tra microfasi distinte, imputabili all'esigua estensione dei domini ed alla continuità della catena nell'interfaccia tra essi, responsabili di spostamenti e variazioni di intensità e ampiezza delle transizioni termiche caratteristiche. In presenza di volume interfacciale cospicuo e di una vera e propria interfase, alla  $T_g$  delle due microfasi si affianca una transizione vetrosa, collocata a temperatura intermedia tra esse, che può divenire la principale transizione termica.
2. *Blocchi cristallizzabili.* I domini cristallini, generati dalla segregazione di fase, possono dar luogo a strutture organizzate con arrangiamento periodico o prive di organizzazione. Nell'eventualità in cui entrambi i blocchi siano cristallizzabili, il primo a cristallizzare genera le restrizioni steriche cui il secondo si adatta per il conseguimento della morfologia finale.

In presenza di un solo blocco cristallizzabile (A), invece, se il componente amorfo (B) vetrifica prima della cristallizzazione di A, questa può risultare inibita. L'uso di solventi che solvatino selettivamente uno dei due blocchi condiziona la morfologia del copolimero finale. Poliuretani e poliesteri "segmentati" sono esempi di copolimeri a multi-blocchi che danno origine a microdomini cristallini dispersi in una fase amorfa, articolata in segmenti flessibili e in una frazione di componente rigido incapace di cristallizzare.

## 1.5 INGEGNERIA TISSUTALE

Le terapie attualmente più diffuse per la cura dei tessuti danneggiati ne prevedono la sostituzione con dispositivi artificiali o con tessuto proveniente da un soggetto estraneo.

Nonostante i continui progressi delle tecnologie biomediche, queste soluzioni spesso non sono soddisfacenti, o perché molto costose oppure per insufficienza di donatori e di problemi di compatibilità. Il trapianto di tessuto, per esempio, prevede l'utilizzo di materiale prelevato da organismi della stessa specie (allograpianto) o da specie diverse (xenotrapianto). In entrambi i casi si possono verificare, con alte probabilità, fenomeni più o meno acuti di rigetto. Un'alternativa è quella di prelevare materiale biologico dal paziente (trapianto autologo) e di innestarlo nella zona da curare. Questa possibilità deve fronteggiare comunque problemi dovuti alla diversa tipologia di tessuto rispetto a quello originale e all'insufficienza della quantità di materiale disponibile.

La risposta a molti di questi problemi sembra poter venire dall'ingegneria tissutale, un settore di ricerca emerso attorno ai primi anni novanta nell'ambito della scienza di biomateriali (Seema Agarwal *et al.*, 2009). L'ingegneria tissutale è stata formalmente definita come "una scienza che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione dei tessuti e di sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorare le funzioni del tessuto". Questo settore di ricerca è caratterizzato da una forte interdisciplinarietà: sono necessari contributi delle scienze di base, della bioingegneria, delle biotecnologie, della biologia molecolare e della medicina. L'approccio dell'ingegneria tissutale è differente da quello delle più tradizionali terapie sopra descritte: i tessuti ingegnerizzati sono progettati non solo per integrarsi con quelli del paziente ma anche per favorire la rigenerazione di tessuto sano (M.S. Rizvi *et al.*, 2012). La strategia classica dell'ingegneria tissutale prevede per prima cosa di isolare cellule specifiche dal paziente (approccio autologo). Occorre poi progettare con cura supporti tridimensionali (*scaffolds*) che

devono possedere caratteristiche opportune per promuovere la proliferazione e la differenziazione delle cellule. È noto, infatti, che, in genere, le cellule isolate non sono in grado di formare un nuovo tessuto in maniera autonoma, ma necessitano di un ambiente specifico che include, tra le altre cose, la presenza di un materiale di supporto. La crescita cellulare viene condotta *in vitro* in condizioni opportune. Lo “scaffold” contenente le cellule viene in seguito impiantato nel paziente dove nel tempo subirà il processo di degradazione. Il supporto viene quindi riassorbito dall’organismo e sostituito con tessuto rigenerato dalle cellule sane impiantate.

### **1.5.1 ELETTROFILATURA**

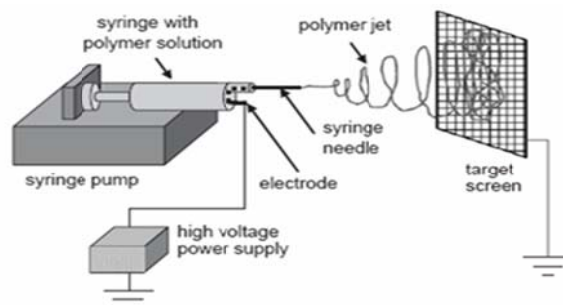
L’elettrofilatura, detta anche “filatura elettrostatica” o *electrospinning*, è attualmente l’unica tecnologia che permette la produzione di fibre continue polimeriche o inorganiche con dimensioni che possono andare da decine di nanometri a qualche micron. Si tratta essenzialmente di un processo di stiro, generato da campi di forza elettrostatici ad elevato potenziale, che agisce su una soluzione polimerica ad alta viscosità o su un fuso polimerico.

Le potenzialità di questa tecnologia sono state rivalutate negli ultimi dieci anni. Recentemente, infatti, la scienza e tecnologia dei materiali ha indirizzato fortemente il proprio ambito di indagine verso un approccio multidisciplinare nuovo, basato sulla nanotecnologia e sulle proprietà dei materiali su nanoscala. Le nanofibre prodotte attraverso l’elettrofilatura vengono generalmente raccolte in forma di tessuto-non-tessuto (deposizione disordinata), ottenendo strutture micro- o nanofibrose (*mat*) che possiedono interessanti proprietà. Tali materiali sono infatti caratterizzati da una elevata porosità, con pori di piccole dimensioni, una notevole area superficiale specifica (elevato rapporto superficie / volume), da buone proprietà meccaniche, adatte per applicazioni in diversi settori (filtrazione, sensoristica, biomedicale, ecc.).

Una delle caratteristiche dell’elettrofilatura, che la rendono particolarmente attraente per i gruppi di ricerca che si occupano di materiali polimerici, è la semplicità, la versatilità e il basso costo dell’apparecchiatura. A tutt’oggi la strumentazione viene costruita nei vari laboratori di ricerca, componendo elementi disponibili sul mercato e adattandola alle particolari esigenze.

La tipica apparecchiatura sperimentale per elettrofilatura è costituita principalmente da tre componenti: una siringa che contiene la soluzione polimerica da elettrofilare, collegata ad un capillare metallico; un generatore di tensione ad alto potenziale (10-50 kV) collegato all’ago della siringa mediante un elettrodo; un collettore metallico messo a massa che ha la funzione di

controelettrodo. Durante il processo, si carica elettrostaticamente la soluzione polimerica che fuoriesce in forma di goccia sospesa dal capillare. Si viene così a creare un campo elettrico ad elevato potenziale tra il capillare e il controelettrodo messo a terra, che provoca una distorsione della goccia fino a farle assumere una forma conica (cono di Taylor). Quando la forza elettrostatica che agisce sulla goccia carica supera la tensione superficiale, cioè al di sopra di un valore 'critico' del potenziale elettrico, si forma un sottile getto di fluido polimerico che viene attratto verso il collettore metallico. Il getto carico viene quindi allungato e accelerato dal campo elettrico, subendo processi di instabilità che gli fanno percorrere un cammino a spirale (instabilità a frustata o whipping instability) che aumenta il rapporto di stiro, causando quindi un assottigliamento del getto stesso.



**Figura 1.18** Apparecchiatura per elettrofilatura.

È proprio questo processo di instabilità che permette di spiegare i due fenomeni che stanno alla base della formazione di nanofibre solide:

- 1) la riduzione del diametro del getto da dimensioni dell'ordine del millimetro (orifizio del capillare) a dimensioni fino a quattro ordini di grandezza inferiori;
- 2) l'evaporazione del solvente che causa la solidificazione delle nanofibre.

Il moto caotico del getto produce la deposizione delle fibre in modo casuale sul piano del collettore, in forma di tessuto-non-tessuto. La semplicità operativa di un'attrezzatura per l'elettrofilatura si scontra, tuttavia, con la complessità della messa a punto delle variabili sperimentali che consentono di ottenere nanofibre con morfologia controllata (F. Causa *et al.*, 2007).

Il processo di elettrofilatura è infatti influenzato da numerosi parametri, strettamente correlati tra di loro. Ogni polimero necessita quindi di una messa a punto individuale, che risulta essere spesso molto più complicata di quanto si possa immaginare.

La morfologia delle nanofibre, in termini di valore medio del diametro, distribuzione dei diametri e presenza o meno di difetti, dipende da due serie di parametri principali: (1) *parametri della soluzione* e (2) *parametri specifici del processo* (Seeram Ramakrishna *et al.*, 2005).

Tra i *parametri della soluzione polimerica* è necessario considerare: il peso molecolare e la distribuzione dei pesi molecolari del polimero; le proprietà del sistema solvente (tensione di vapore, conducibilità, costante dielettrica); la concentrazione e di conseguenza la viscosità della soluzione.

I *parametri di processo* comprendono invece: il potenziale elettrico; la velocità di flusso della soluzione (portata del fluido); la distanza tra il capillare e il collettore; il tipo di collettore (statico, dinamico, conduttore, isolante...); il diametro interno del capillare; le condizioni ambientali (temperatura e umidità).

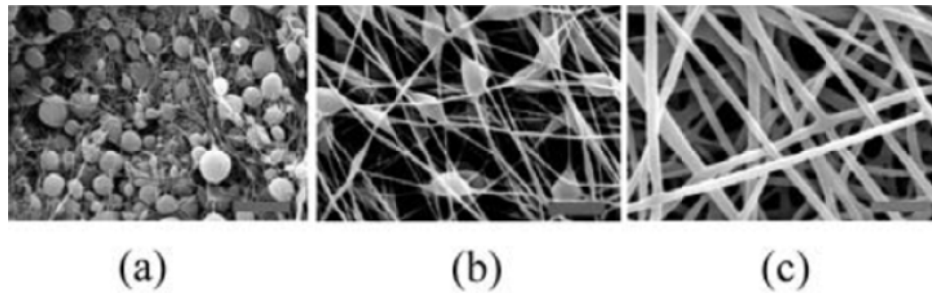
In generale (a parità di tutte le altre variabili sperimentali) il diametro delle fibre diminuisce al diminuire della concentrazione della soluzione e del flusso di soluzione che esce dal capillare, all'aumentare del potenziale applicato, all'aumentare della distanza tra il capillare e il collettore.

La concentrazione della soluzione rappresenta il parametro sperimentale più critico. Infatti, una delle condizioni necessarie affinché si formino delle fibre in un processo di elettrofilatura è che le macromolecole abbiano un peso molecolare e una concentrazione sufficientemente elevati per dare luogo alla formazione di concatenamenti (entanglements).

Solo in questo caso si forma una fibra, invece di ottenere la suddivisione del getto in singole 'goccioline' (come avviene nel processo di *electrospray*). La Figura 1.19 mostra la variazione di morfologia, all'aumentare della concentrazione, in una soluzione di poli(lattide-co-glicolide) (50/50,  $M_w = 72\text{kDa}$ ,  $M_w/M_n = 3.0$ ). Si passa da particelle (a) generate da spray, a fibre con difetti (b) a fibre con diametro costante (c).

Un altro parametro particolarmente critico è la costante dielettrica del solvente, che deve essere sufficientemente elevata per favorire la formazione di un'alta densità di carica nella soluzione.

La versatilità del processo di elettrofilatura consente la raccolta di nanofibre non solo in maniera disordinata ma anche con geometrie ordinate. Sono stati messi a punto molteplici sistemi per ottenere l'allineamento delle nanofibre, come ad esempio fibre allineate in un'unica direzione.



**Figura 1.19** Variazione di morfologia, all'aumentare della concentrazione, in una soluzione di poli(lattide-co-glicolide) (50/50,  $M_w = 72\text{kDa}$ ,  $M_w/M_n = 3.0$ ): particelle (a) generate da spray, a fibre con difetti (b) a fibre con diametro costante (c).

Tale scopo è raggiunto mediante il controllo del campo elettrico esistente tra il capillare e il controlettrodo. Tra i vari sistemi impiegati si può citare, a titolo di esempio, l'utilizzo di una coppia di controelettrodi paralleli tra loro, che inducono la deposizione delle fibre elettrofilate a ponte tra i due elettrodi, e quindi un ottimo allineamento in una singola direzione. Altri sistemi prevedono l'utilizzo di elettrodi ausiliari di vario tipo.

Un effetto di allineamento di tipo 'meccanico' si può invece realizzare mediante l'utilizzo di un collettore dinamico come un rullo rotante ad elevata velocità.

Infine, mediante opportune modifiche dell'attrezzatura di elettrofilatura è possibile ottenere strutture composite che presentano eterogeneità in termini di: (a) dimensione delle fibre; (b) composizione chimica delle fibre; (c) inclusione di nano-particelle, di molecole bioattive ecc. Tali materiali sono ottenibili mediante elettrofilatura multi-strato o elettrofilatura che utilizza due o più sistemi di eiezione contemporanei ottenendo, ad esempio, strutture con fibre di natura diversa mescolate.

Nell'ambito dell'ingegneria tissutale, la necessità di riprodurre l'ambiente naturale delle cellule (la matrice extracellulare è costituita da fibre con diametri compresi tra 10 e 300 nm) ha spinto la ricerca ad orientarsi verso la produzione di scaffold elettrofilati, come supporti biomimetici (E. Lavik and R. Langer, 2004).

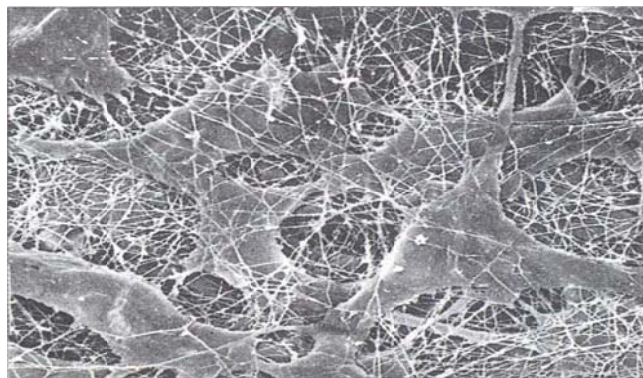
### 1.5.2 TESSUTI BIOLOGICI

I tessuti biologici sono costituiti da cellule disperse in una matrice complessa che funge da supporto, chiamata matrice extracellulare, in genere indicata con l'acronimo ECM. Tale matrice è costituita da una varietà di proteine e polisaccaridi che sono secreti localmente dalle cellule e



assemblati in una rete organizzata. La tipologia delle cellule e le caratteristiche chimico- fisiche della ECM determinano le diverse proprietà dei tessuti, che si distinguono in: tessuto epiteliale, muscolare, connettivo, nervoso, ematico e linfoide. La matrice extracellulare è una struttura molto complessa formata da eteropolisaccaridi, che si aggregano per formare proteoglicani, e da proteine fibrose (principalmente collagene ed elastina). I proteoglicani sono costituiti da catene lineari di acido ialuronico a cui sono legate non covalentemente catene polipeptidiche, le quali legano a loro volta molecole di glicosamminoglicani.

Questa struttura complessa si presenta sotto forma di gel idratato ad elevata viscosità che conferisce proprietà lubrificanti e di assorbimento degli urti. Le proteine fibrose, con diametri da poche decine a qualche centinaio di nanometri, formano un complesso reticolo all'interno del gel dei proteoglicani e conferiscono rigidità e resistenza a tutta la matrice (Dunlop J.W.C. et Fratzl P., 2010). I numerosi canali presenti nel reticolo consentono la diffusione all'interno della matrice di sostanze nutritive e di ossigeno alle cellule. La figura di seguito mostra cellule di fibroblasti nel tessuto connettivo della cornea di un ratto. È visibile il complicato intreccio di fibre che circonda le cellule (il trattamento enzimatico ha permesso di rimuovere il gel idratato che fungeva da riempitivo).



**Figura 1.20** Cellule di fibroblasti nel tessuto connettivo corneo di ratto

I complessi meccanismi di formazione dei tessuti e crescita cellulare sono regolati principalmente dall'attività di due classi di proteine presenti nella matrice extracellulare: i fattori di adesione e i fattori di crescita. L'adesione delle cellule alla ECM è un processo fondamentale per la formazione e il mantenimento della struttura tridimensionale dei tessuti che si realizza attraverso interazioni altamente specifiche tra particolari proteine presenti sulla membrana cellulare (le più diffuse sono le integrine) e proteine presenti nella matrice (come la fibronectina).

Nonostante questi recettori siano molecole molto grandi, l'integrina della cellula riconosce brevi sequenze peptidiche contenute nella struttura primaria del recettore, in particolare la sequenza RGD (arginina-glicina-acido aspartico), identificata come la più piccola sequenza di riconoscimento per promuovere l'adesione cellulare alla ECM e presente in tipi diversi di recettori (Saltzman W.M., Olbricht W.L., 2002). L'altra importante classe di proteine che regola la crescita cellulare è costituita dai fattori di crescita (GF), molecole solubili che vengono secrete dalle cellule e diffondono attraverso i pori della ECM verso altre cellule. I GF si legano a particolari recettori sulla membrana ed attivano il processo di proliferazione e differenziamento cellulare (Kretlow J.D., Mikos A.G., 2008).

### 1.5.3 SUPPORTI SINTETICI

La riparazione dei tessuti nell'ambito dell'ingegneria tissutale prevede la progettazione di un supporto artificiale appropriato il quale deve possedere proprietà particolari che lo rendano efficace per sostituire tessuti specifici e per la crescita di certi tipi di cellule (Appelman T.P. *et al.*, 2009).

Le caratteristiche ideali di uno "scaffold", in generale, sono:

- biocompatibilità e biorisorbibilità, con velocità di degradazione compatibile con i tempi di rigenerazione del tessuto vivente;
- elevata porosità, con pori interconnessi che permettano la diffusione delle cellule attraverso il supporto e il trasporto di sostanze nutritive;
- opportune proprietà superficiali che favoriscano l'adesione cellulare;
- proprietà meccaniche simili a quelle del tessuto da sostituire.

La tecnica di rigenerazione dei tessuti viene già utilizzata nelle strutture ospedaliere, per esempio nella rigenerazione della pelle, dell'esofago, della cartilagine e dell'osso. In genere gli "scaffolds" vengono fabbricati con materiali polimerici, eccetto quelli destinati alla crescita del tessuto osseo il quale richiede in aggiunta la presenza di una matrice inorganica. Sono stati sperimentati una varietà di polimeri, sia naturali che di sintesi, per la costruzione dei supporti. I polimeri di origine naturale includono polisaccaridi (alginato, agarosio, acido ialuronico e agarosio) e proteine (collagene e gelatina). I materiali di sintesi comprendono: la famiglia di polimeri derivanti dall'acido lattico e glicolico, il policaprolattone, le polianidridi, i poliortoesteri, i policarbonati e i

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

#### **1.5.4 BIOMIMETICA**

La natura è una fonte di ispirazione per la scienza dei materiali e le discipline ad essa associate come la chimica, la fisica, la biologia e l'ingegneria. In tutti gli organismi, dai più elementari ai molto complessi, si può osservare una molteplicità di esempi di materiali, architetture, sistemi e funzioni. L'approfondimento dello studio dei modelli naturali e i progressi in ambito scientifico hanno contribuito negli ultimi anni alla creazione di nuovi materiali con svariate applicazioni che spaziano dall'alta tecnologia alla vita quotidiana (Jang J.H. *et al.*, 2009). Alcuni esempi sono le note fibre sintetiche come il nylon, che ricorda la seta naturale, o il velcro, ispirato alla forma uncinata di semi vegetali; oppure i più recenti rivestimenti di superficie, già usati in ingegneria aerospaziale per ridurre l'attrito idrodinamico, la cui struttura imita quella dell'epidermide di grandi pesci. Le *performances* altamente sofisticate che caratterizzano i materiali biologici, sono il risultato di una stringente selezione, operata nel lungo corso dell'evoluzione, del materiale disponibile più adatto a svolgere una determinata funzione. La pressione evolutiva favorisce un numero limitato di componenti o principi in modo che, nello stesso organismo, pochi elementi possano ricoprire differenti ruoli. Un esempio è il collagene di tipo I, che presenta una diversa morfologia a seconda della funzione che svolge nei vari tessuti. Le strutture biologiche sono complessi altamente integrati, dove i componenti vengono assemblati seguendo definiti *pattern* e in cui è stato raggiunto il giusto compromesso tra struttura e funzione. In molti biosistemi tale alto livello di integrazione associa tre aspetti principali: la miniaturizzazione, cioè il massimo delle funzioni nel minimo volume, l'ibridazione, tra componenti organiche ed inorganiche ottimizzando funzioni e potenzialità, e una organizzazione di tipo gerarchico. La gerarchia strutturale, che si ripete identica dalla scala nanometrica a quella millimetrica, è una caratteristica delle strutture biologiche che offre la capacità di rispondere ad 'esigenze' chimiche e fisiche ad ognuno di questi livelli. L'analisi dei modelli presenti in natura e l'applicazione delle più raffinate tecnologie odierne offrono la

possibilità di ottenere materiali innovativi a partire dai più disparati elementi a disposizione ed il vantaggio di poterlo fare in breve tempo.

### **1.5.5 BIOCOMPATIBILITA'**

La caratterizzazione dei biomateriali e dei dispositivi destinati ad un contatto sul medio e sul lungo termine con l'organismo (fluidi biologici, tessuti e organi) non può essere completa senza una valutazione circa la loro "biocompatibilità". Questa valutazione va condotta allo scopo di esaminare le prestazioni del biomateriale in condizioni simili a quelle dell'ambiente biologico.

La biocompatibilità di un materiale, infatti, non consiste unicamente nell'assenza di effetti tossici sui tessuti con cui viene a contatto, ma piuttosto nella sua abilità a svolgere la funzione per la quale è stato progettato, innescando una risposta appropriata nell'ospite.

Un dispositivo deve essere realizzato in funzione della problematica medica che si vuole risolvere: un materiale utilizzato in modo soddisfacente per una data applicazione e quindi considerato biocompatibile in un certo ambito, può, se usato in modo differente o impiantato in un sito diverso da quello solito, indurre una differente risposta dell'organismo, cioè può, in definitiva, dar luogo ad un risultato insoddisfacente.

La biocompatibilità di un impianto, dunque, viene valutata sulla base di diversi parametri relativi sia alle caratteristiche chimico-fisiche del materiale, che alle caratteristiche dell'ospite (Fournier E *et al.*, 2004).

I principali fattori dipendenti dall'organismo ospite sono la specie, il corredo genetico, il sito dell'impianto e il suo microambiente, mentre quelli che dipendono dal materiale sono la forma, le dimensioni, la chimica di superficie, la ruvidità, il *design*, la morfologia e la porosità, la composizione, le tecniche di sterilizzazione, le procedure di applicazione, la durata del contatto e la facilità o meno a degradarsi (Karande T.S *et al.*, 2008).

La ruvidità riveste un ruolo importante nel determinare l' "emocompatibilità" di un materiale dal momento che il sangue coagula più facilmente e più velocemente su superfici ruvide piuttosto che su quelle lisce. Ad esempio, la superficie di alcune protesi valvolari meccaniche viene finemente lucidata, sia per limitare la coagulazione, sia per facilitare il distacco di formazioni trombotiche microscopiche, prima che raggiungano dimensioni pericolose. Un'accurata sterilizzazione del dispositivo impiantabile è fondamentale al fine di evitarne la colonizzazione batterica; anche il fattore tempo è rilevante nella determinazione della biocompatibilità: una membrana per

emodialisi è utilizzabile soddisfacentemente perché rimane a contatto con il sangue per poche ore, un contatto prolungato comporterebbe danni per il paziente; analoghe considerazioni possono essere fatte per un catetere che può rimanere inserito al più per una settimana, o per una protesi ortopedica, che può invece rimanere impiantata per tutta la durata della vita del paziente. La biocompatibilità è strettamente connessa ai fenomeni di superficie, rappresentati dalle interazioni cellula-cellula, cellula-polimero, polimero-proteina (Laurencin C.T. *et al.*, 1994). Da questo punto di vista, un vantaggio notevole è offerto dai “polimeri sintetici” poiché possono essere facilmente modificati, soprattutto nella chimica di superficie, in modo da ottenere variazioni nell’intensità e nella durata della reazione tissutale che innescano.

Sfortunatamente la biocompatibilità non è una grandezza misurabile e di conseguenza non esistono metodi per effettuare delle misure precise. Il giudizio finale per stabilire la biocompatibilità rimane solamente la verifica di una soddisfacente prestazione clinica.

In ogni caso, prima che un dispositivo medico possa essere commercializzato e dunque utilizzato in ambito clinico, è necessario che la sua biocompatibilità venga acquisita con certezza (testata e documentata) e poi approvata dagli organismi deputati (FDA, marchio CE, ecc.). Questo è quanto prescritto dalle leggi nazionali ed internazionali che, in generale, richiedono la prova della sicurezza ed efficacia nell’utilizzo dei dispositivi medici sotto le circostanze previste.

Il primo passo nella valutazione della biocompatibilità consiste nella caratterizzazione *in vitro* delle proprietà chimico-fisiche delle materie prime con cui verranno costruiti i “prototipi” dei dispositivi biomedici; questi dati vanno comparati con i risultati che si hanno al termine di ogni fase del processo produttivo (manifattura, sterilizzazione, confezionamento, stoccaggio).

La verifica della biocompatibilità, intesa come analisi delle interazioni materiale-organismo, viene eseguita sui soli dispositivi che abbiano superato queste prove preliminari e consiste nell’applicazione di test *in vitro* (con cellule e tessuti), test *in vivo* (su modelli animali) e *trials* clinici. A questo scopo, le organizzazioni nazionali ed internazionali che si occupano di standardizzazione come ASTM (*American Society for Testing and Materials*), ISO (*International Standards Organization*), FDA (*Food and Drug Administration*), NIH (*National Institutes of Health*) hanno già sviluppato ed adottato specifiche linee guida e specifiche procedure.

### 1.5.5.1 Test *in vitro*

I principali vantaggi dei test *in vitro* sono legati ai costi contenuti, alle piccole dimensioni delle apparecchiature richieste e alla relativa velocità di esecuzione che permette di valutare rapidamente, e confrontare, molti materiali e molti dispositivi. Solitamente si utilizzano come modelli sperimentali le “linee cellulari stabilizzate” disponibili presso banche cellulari nazionali ed internazionali (come, ad esempio, *l’American Type Culture Collection, ATCC*); esse, a differenza delle colture primarie (cellule appena isolate dagli organi), garantiscono una maggiore riproducibilità, efficienza e disponibilità (Northup S.J. *et al.*, 2004).

I test *in vitro* comprendono principalmente saggi di citotossicità, citocompatibilità, mutagenicità, emocompatibilità. I test di citotossicità, in accordo con lo “standard ISO 10993-5”, rappresentano un “metodo di valutazione dei danni biologici acuti provocati dalle sostanze rilasciate dai dispositivi medici tramite l’osservazione degli effetti che queste producono su cellule coltivate *in vitro* in un mezzo nutriente”. Tali test possono basarsi sull’utilizzo diretto del materiale oppure sull’utilizzo di un estratto ricavato con il metodo dell’eluizione. Nel primo caso, il campione da esaminare e quello di riferimento vengono posti direttamente nel mezzo di coltura; nel secondo caso, gli estratti ottenuti vengono utilizzati come nuovo nutriente delle colture cellulari.

I monostrati cellulari, se si tratta di cellule in adesione come i fibroblasti di topo L929, vengono quindi osservati al microscopio per scoprire l’insorgere nel tempo di eventuali segnali di un’azione tossica (cambiamenti nelle dimensioni o nell’aspetto dei componenti cellulari, lisi cellulare, ecc.).

La vitalità cellulare, oltre ad essere valutata mediante osservazioni morfologiche, può essere esaminata con l’analisi della funzionalità della cellula; in questo caso si eseguono test colorimetrici che permettono di effettuare dosaggi degli enzimi o delle proteine totali.

I test più comunemente utilizzati sono:

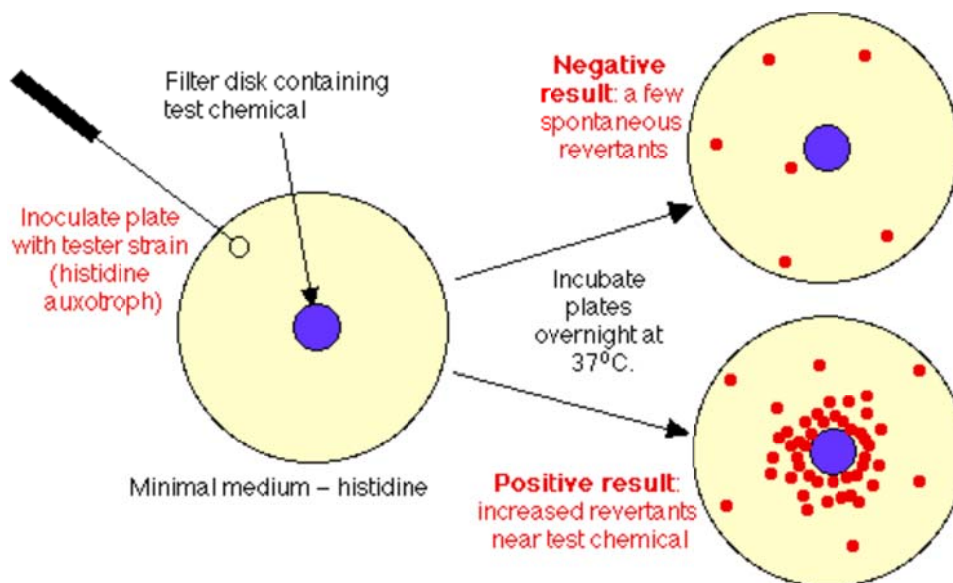
- Test del Neutral Red (*Neutral Red Uptake Assay*): si basa sulla capacità dei lisosomi perfettamente funzionanti nelle cellule vive di incorporare il colorante *Neutral Red* assumendo una tipica colorazione rossa, la cui intensità può essere misurata spettrofotometricamente. Viceversa se i lisosomi cellulari sono danneggiati rilasceranno nel citoplasma enzimi idrolitici che provocheranno la distruzione della stessa cellula.

- Test MTT: si basa sulla capacità dell’enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, presente nelle cellule metabolicamente attive, di trasformare il sale MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-

Difeniltetrazolio Bromide) in sale di formazano di colore blu-viola. L'intensità del colore, proporzionale al numero di cellule vitali, viene determinata spettrofotometricamente.

- Test del Kenacid Blue (KB): permette di valutare il numero di cellule vive attraverso un dosaggio delle proteine totali. Il test si basa sull'uso di un colorante che, aggiunto alle cellule dopo che queste siano state fissate, si lega specificamente alle proteine. Dopo l'aggiunta di una specifica sostanza decolorante, il KB viene rilasciato e quantificato attraverso la misura spettrofotometrica dell'assorbanza.

Tra i saggi di mutagenicità *in vitro* quello più utilizzato è il "test di Ames", messo a punto nel 1975 dal professor Ames dell'Università di Berkeley, California. In questo caso, il modello sperimentale non è rappresentato da linee cellulari, bensì da ceppi di *Salmonella typhimurium* resi auxotrofi per l'istidina (cioè istidinadipendenti), che, quindi, non sono in grado di crescere in un terreno privo di questo aminoacido, essendo divenuti geneticamente incapaci di sintetizzarlo.



**Fig. 1.21** Test di Ames.

Pertanto, possono fungere da indicatori dell'attività mutagenica di agenti genotossici poiché, in loro presenza, i geni alterati deputati alla sintesi dell'istidina riprendono la loro primitiva funzionalità (*retromutazione*), consentendo ai batteri di crescere formando colonie visibili. Il numero delle colonie batteriche cresciute in assenza di istidina (*revertenti*) fornisce una misura dell'attività mutagenica del composto (per es. un biomateriale) o della miscela in esame.

Infine, tra i test *in vitro* vanno ricordati quelli di emocompatibilità che possono essere eseguiti in condizioni statiche o dinamiche (in flusso), a seconda della destinazione d'uso del

materiale/dispositivo biomedico. Tali test valutano le alterazioni morfologiche e funzionali a carico delle cellule del sangue e di quelle endoteliali.

Le analisi morfologiche (osservazioni al microscopio ottico o a quello elettrico a scansione) implicano lo studio di eventuali alterazioni strutturali, quali degenerazione, lisi o morte che possono verificarsi in seguito ad applicazione dell'impianto. Le analisi funzionali riguardano la valutazione di alcune caratteristiche delle cellule endoteliali come la capacità di adesione, il loro indice mitotico, la loro attività secretiva in presenza dell'impianto. L'emocompatibilità di materiali e dispositivi viene determinata, inoltre, verificando la formazione di coaguli sulla superficie, l'adesione delle piastrine, l'attivazione del complemento e dei leucociti (Siddarth D. *et al.*, 2012).

I test *in vitro* sono attualmente considerati efficaci per una valutazione preliminare della biocompatibilità dei materiali. Come per qualsiasi altro modello, anche in questo caso va prestata parecchia attenzione nell'interpretare i risultati, evitando rischiose estrapolazioni. Tali test ci consentono di studiare le funzioni e i meccanismi di singole linee cellulari e questo comporta evidenti limiti in considerazione della notevole complessità dell'ambiente biologico reale (Ratner B.D., 2004). Per queste ragioni, i dati dei test *in vitro* vanno integrati con i risultati che si devono ottenere attraverso studi su modelli animali per fornire una spiegazione più adeguata dei meccanismi che dirigono, mediano e controllano le interazioni tra materiali e tessuti, in un ambiente che è di per sé estremamente complesso, interattivo e dinamico.

### **1.5.5.2 Test *in vivo***

Sono sicuramente i test più validi per verificare la biocompatibilità dei materiali e dei dispositivi, ma la loro applicazione spesso risulta difficile a causa di problemi etici, alti costi, tempi lunghi.

Inoltre, risultati positivi non necessariamente provano la compatibilità sull'uomo: come è noto, differenze nelle specie animali compromettono l'estrapolazione degli esiti delle prove in vivo fra modelli diversi. In virtù della loro omologia con l'uomo, sono i primati non umani i modelli animali più attendibili. L'utilizzo di animali in laboratorio per la ricerca e per le prove di biocompatibilità implica una grande responsabilità e dovrebbe essere preso in considerazione solo dopo una completa caratterizzazione preliminare dei materiali/dispositivi, dopo adeguate simulazioni al computer ed esauriente verifica *in vitro*. I ricercatori dovrebbero identificare, di volta in volta, la specie animale più adatta al tipo di studio, selezionando il minimo numero di individui che possa condurre a risultati statisticamente significativi.



I test su animali utilizzati per la valutazione della biocompatibilità dei materiali possono essere suddivisi in tre principali categorie:

- Test non funzionali
- Test *ex-vivo*
- Test funzionali

Nel caso di test non funzionali, campioni di forma arbitraria sono impiantati nei tessuti molli (per esempio, per sotto cute, nel muscolo, nella cavità peritoneale) mediante interventi chirurgici poco invasivi. Hanno breve durata (giorni-mesi), ma forniscono significative informazioni circa le interazioni locali tra materiale e tessuto e le eventuali complicanze sistemiche.

I dati sono raccolti in assenza di carichi meccanici e mancano di ogni valutazione circa la funzionalità della protesi.

I test *ex-vivo* si basano sull'utilizzo di derivazioni arteria-vena e vena-vena che permettono al sangue dell'animale di fluire attraverso i materiali da testare in un circuito esterno. In questo caso si valutano l'accumulo di proteine, l'adesione delle piastrine, la formazione di coaguli, allo scopo di verificare la compatibilità del materiale con il sangue.

L'esecuzione di test funzionali prevede l'inserimento nell'animale del dispositivo che si vuole testare in scala appropriata (ad esempio, una protesi d'anca o una valvola cardiaca opportunamente dimensionate), per svolgere la funzione prevista nell'animale, in condizioni analoghe a quelle previste per l'impiego nell'uomo. Si

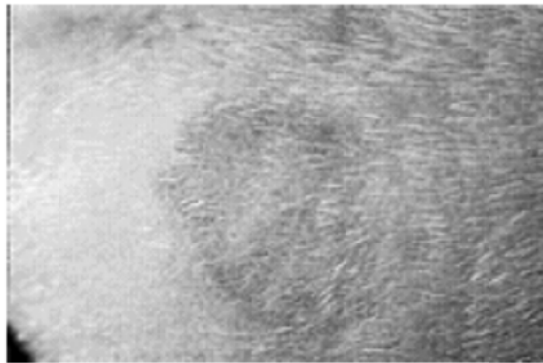
tratta di studi a lungo termine che richiedono speciali progettazioni e risultano pertanto assai costosi e complessi.

Anche per l'esecuzione dei test *in vivo*, come per quelli *in vitro*, metodologie e procedure dettagliate sono disponibili nelle pubblicazioni di ASTM e NIH; inoltre, un utile riferimento è rappresentato dalle tabelle basate sulle linee guida FDA/ISO: esse permettono di identificare le tipologie di test da adottare in funzione dell'uso previsto (esterno, comunicante con l'esterno, interno), del tipo di tessuto a contatto con il materiale, della durata del contatto (temporaneo, breve termine, lungo termine). Evidentemente, quanto più prolungato è il contatto con l'organismo, tanto maggiore è il numero dei test prescritti.

I test *in vivo* più comunemente utilizzati sono:

- Test di sensibilizzazione (standard ISO 10993-10): viene effettuato sulla pelle di cavie (soprattutto porcellino d'India) ed è finalizzato all'osservazione dell'insorgere di reazioni di sensibilizzazione in conseguenza dell'azione ripetuta e prolungata di sostanze rilasciate dal materiale, capaci di

interagire con il sistema immunitario. La reazione di sensibilizzazione si manifesta come arrossamento e rigonfiamento dei tessuti. Vi sono due modi alternativi di condurre il test di sensibilizzazione: Test di Buehler e Test massimizzazione o di Magnuson-Kligman. Il primo prevede una fase di “induzione” in cui il materiale da saggiare viene posto direttamente a contatto con la pelle rasata del dorso di porcellini d’India (operazione ripetuta almeno tre volte a settimana per tre settimane). Segue un periodo di riposo di due settimane per permettere il manifestarsi di una risposta nella cavia; quindi avviene l’esposizione finale al biomateriale. Il secondo prevede l’applicazione ripetuta a gruppi separati di porcellini d’India di estratti del materiale con soluzioni saline o con olii. Questo metodo è più sensibile del precedente e trova applicazione al caso di dispositivi che entreranno in contatto con aree diverse dalla pelle.



**Fig. 1.22** Risposta positiva al test di Magnuson-Kligman eseguito su pelle di porcellino d’India (da [www.dpci.unipd.it](http://www.dpci.unipd.it)).

- Test di irritazione (standard ISO 10993-10): valuta la risposta infiammatoria locale ad applicazioni singole, ripetute e continue della sostanza in prova, senza che sia coinvolto un meccanismo immunitario. Per questo tipo di test vengono utilizzati estratti fluidi salini o in olio vegetale o direttamente il materiale in esame. L’applicazione del campione avviene generalmente a livello intracutaneo o della pelle primaria o oculare. Sintomi tipici dell’irritazione sono arrossamento, gonfiore, riscaldamento e dolore.

- Test di impianto (standard ISO 10993-6): fornisce indicazioni sulla specie animale da impiegare come cavia, sul tipo di tessuto più adatto all’impianto, su quanto tempo il materiale deve rimanere impiantato, sul metodo d’impianto, sulla valutazione della risposta biologica.

L’applicazione generale di questi test prevede il taglio del materiale in un campione della forma desiderata, la sterilizzazione di tale campione, il suo impianto in condizioni asettiche, l’esame finale dei tessuti circostanti il luogo dell’impianto, dopo un periodo variabile tra una settimana e alcuni mesi.

La risposta biologica all'impianto viene valutata osservando al microscopio sezioni di tessuto opportunamente colorate con le tecniche di immunostochimica; ciò consente di determinare il tipo di cellule presenti, l'eventuale presenza di necrosi, la presenza di collagene e molti altri parametri. Per gli impianti a breve termine si utilizzano, generalmente, come cavie, topi, ratti, porcellini d'India o conigli; per i test a lungo termine (impianti in tessuto sottocutaneo, muscolo, osso) si utilizzano anche cani, pecore, capre ed altri animali che abbiano una lunga aspettativa di vita.

Come previsto dagli standard ISO 10993, esistono altri test *in vivo* per valutare la biocompatibilità dei materiali utilizzati nei dispositivi biomedicali. Tra questi ricordiamo i test di tossicità sistemica acuta, subacuta e subcronica che forniscono indicazioni sugli effetti potenzialmente nocivi provocati dai materiali o dispositivi o estratti su tessuti e organi *target* lontani dal sito di impianto; un esempio è rappresentato dal "test di pirogenicità" eseguito sul coniglio, che valuta la comparsa di febbre come manifestazione di una reazione infiammatoria sistemica successiva all'impianto. Infine, tra i test *in vivo*, ricordiamo quelli di genotossicità ("test dei micronuclei"), carcinogenicità, tossicità sulla funzione riproduttiva e sullo sviluppo embrionale (teratogenicità), biodegradazione (Anderson J.M. and Schoen F.J., 2004).

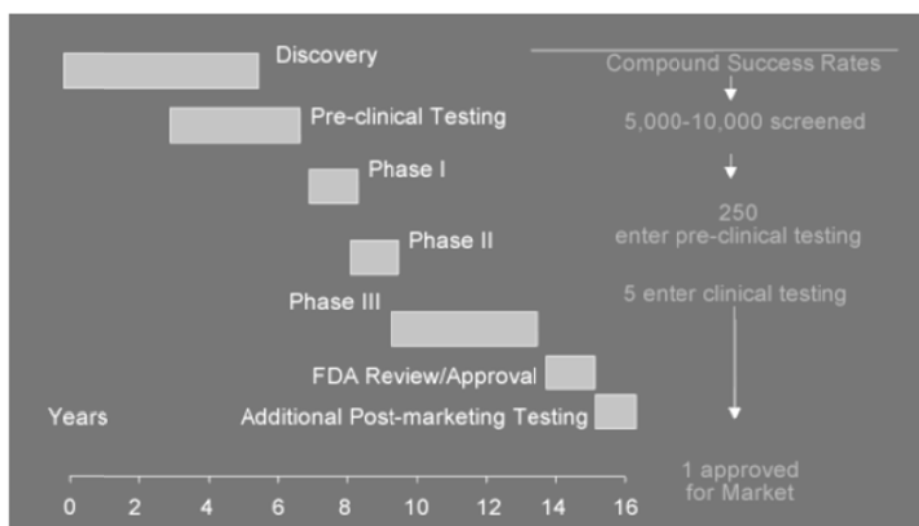
### **1.5.5.3 Trials clinici**

A prescindere dal successo dei precedenti test *in vitro* e su modello animale, non è possibile prevedere le prestazioni di materiali e dispositivi sull'uomo senza *trials* clinici. La sperimentazione clinica è necessaria prima di rendere disponibile al pubblico il materiale/dispositivo.

Per poter richiedere alle agenzie nazionali ed internazionali (per esempio, FDA o Ministero della Salute) l'autorizzazione alla sperimentazione clinica, è necessario documentare con precisione e chiarezza gli esiti positivi della precedenti test (*in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*). Va poi data prova dei benefici per i riceventi e dell'assenza di rischi. Inoltre, devono essere descritti nel dettaglio il materiale/dispositivo, la procedura chirurgica, il trattamento post-operatorio e il tipo di valutazione attesa. La valutazione può riguardare il confronto tra le condizioni del paziente prima e dopo l'applicazione del dispositivo biomedico, oppure il confronto con altri soggetti sani di un gruppo di controllo scelto adeguatamente per sesso, età, salute. I protocolli sperimentali sono sottoposti al giudizio degli organismi deputati, la cui approvazione assicura il rispetto non solo delle

leggi vigenti, ma anche dei diritti e della dignità dei pazienti che si sottopongono alla sperimentazione fornendo il loro consenso informato.

Una volta approvata, la sperimentazione prevede di inserire il materiale/dispositivo in un certo numero di soggetti come parte di uno studio, limitato ma ben controllato e monitorato, finalizzato allo svolgimento di una sequenza di tre fasi (I, II e III). Gli esiti della sperimentazione con l'indicazione dei risultati (sia positivi che negativi), dei dati del decorso clinico (*follow-up*), dei dati quantitativi e dei pareri circa il significato delle conclusioni, devono essere presentati all'organismo notificato che avrà la responsabilità della approvazione finale prima della commercializzazione.



**Fig. 1.23** Fasi dello sviluppo di un presidio biomedico dalla progettazione fino alla commercializzazione (da [www.dpci.unipd.it](http://www.dpci.unipd.it)).

Ovviamente le aziende che vogliono condurre questi studi così complessi devono programmare ingenti investimenti prima di arrivare al termine del processo di sviluppo di prodotti biomedici commerciali, il che richiede generalmente 15-16 anni.

Infine, informazioni importanti possono essere ricavate dal recupero degli impianti, delle protesi e dei tessuti circostanti da pazienti che sono al termine della loro vita o che hanno subito il fallimento dell'impianto. L'esame dei materiali espianati fornisce utili evidenze circa la loro sicurezza ed efficacia, permette di determinare le cause dell'eventuale fallimento e di aumentare le conoscenze circa le interazioni materiali-tessuti biologici. Queste informazioni potrebbero essere cruciali per migliorare la progettazione e la fabbricazione, per stabilire criteri di selezione, per sviluppare protocolli e tecniche per le diverse fasi della valutazione degli impianti.

## 2-SCOPO

L'elettrofilatura (o *electrospinning*) è una tecnica estremamente promettente per la realizzazione di *scaffold* da impiegarsi nel campo dell'ingegneria tissutale.

Tale tecnica permette di ottenere tessuti simili alle strutture fibrillari della matrice extracellulare (ECM) e che inoltre offrono elevate aree superficiali e facilità di modulazione delle proprietà per adattarle a scopi differenti.

La scelta del materiale adatto per l'elettrofilatura dipende soprattutto dalla natura dei tessuti che devono essere rigenerati e dalla loro velocità di rigenerazione. Effettuare la scelta corretta risulta di cruciale importanza, dato che il materiale giusto permette di ottenere le volute proprietà meccaniche e la velocità di biodegradazione richiesta.

Tenuto conto di tali stringenti caratteristiche, negli ultimi anni sono stati elettrofilati numerosi polimeri, sia commerciali sia sintetizzati appositamente, per regolare l'organizzazione, la crescita e la differenziazione cellulare in un particolare tessuto.

Tra i vari polimeri presi in esame, i poliesteri alifatici rappresentano senza dubbio la classe di materiali sintetici biodegradabili più studiata: su tutti spiccano il policaprolattone (PCL), l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA) ed i loro copolimeri, per altro gli unici approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per la realizzazione di dispositivi biomedicali.

In tale contesto si inserisce il presente lavoro di Tesi, avente come obiettivo la fabbricazione e la caratterizzazione di *scaffold* biomimetici a partire da nuovi poliesteri alifatici di sintesi.

Il primo passo verso la realizzazione di tali dispositivi è consistito nella scelta del materiale polimerico più adatto allo scopo. Una valida alternativa ai già menzionati PLA e PGA può essere rappresentata dal poli(butilene succinato) (PBS). Nonostante la comprovata biodegradabilità e biocompatibilità, il PBS presenta proprietà meccaniche non adeguate per tutti gli utilizzi e, inoltre, è caratterizzato da una cinetica di degradazione troppo lenta. Come noto, le proprietà non soddisfacenti di un polimero possono essere migliorate attraverso la copolimerizzazione, senza che ciò alteri sensibilmente quelle già buone e senza incrementi significativi nei costi. Tale strategia permette inoltre di modulare le proprietà finali del materiale agendo sul tipo, quantità e distribuzione delle unità comonomeriche lungo la catena.

Per ridurre sia i tempi di degradazione che la rigidità del PBS, si è proceduto all'inserimento statistico all'interno della catena polimerica del PBS di atomi di ossigeno etero, i quali ci si aspetta contribuiscano ad abbassare la cristallinità del polimero e, nel contempo, a migliorare sia le proprietà meccaniche sia l'idrofilicità.

La ricerca si è articolata nelle seguenti fasi:

- preliminare analisi bibliografica per conoscere gli sviluppi più recenti sull'argomento trattato;
- realizzazione di *scaffold* tramite elettrofilatura, previa ottimizzazione delle condizioni operative;
- caratterizzazione termica mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC) per studiare le transizioni termiche e analisi termogravimetrica (TGA) per verificare il campo di stabilità degli elettrofilati e l'eventuale presenza di residui di solvente derivanti dal processo di *electrospinning*;
- analisi diffrattometrica a raggi X per ottenere informazioni sulla fase cristallina;
- caratterizzazione meccanica degli elettrofilati attraverso prove di trazione;
- misure di angolo di contatto per conoscere la bagnabilità dei campioni;
- studi di biodegradabilità idrolitica in tampone fosfato, per studiare i tempi di degradazione;
- caratterizzazione degli *scaffold* parzialmente degradati;
- prove di biocompatibilità in vitro;
- analisi dei risultati ottenuti ed estrapolazione di correlazioni proprietà-struttura.

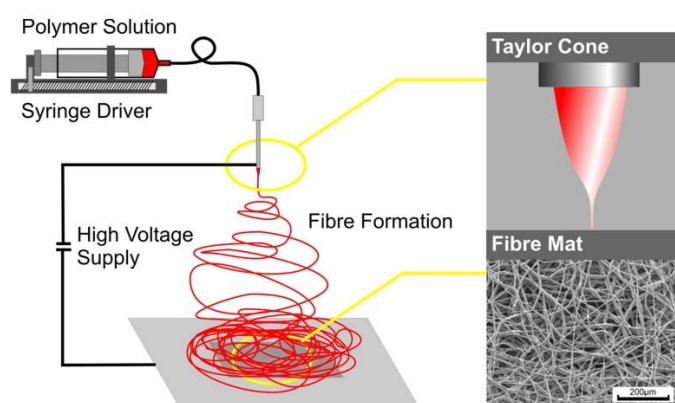
## 3-MATERIALI E METODI

### 3.1 ELETTROFILATURA

La tecnica di elettrofilatura permette di produrre, a partire da una soluzione polimerica, fibre di dimensioni nanometriche o micrometriche, in funzione delle condizioni sperimentali.

L'apparato strumentale (figura 3.1) è costituito da:

- un generatore di potenziale ad alta tensione Spellman SL50\*10 con le seguenti specifiche tecniche: voltaggio massimo consentito di 50 kV, polarità positiva e potenza massima di 10 Watt;
- Una pompa dosatrice KDSscientific serie 200 che alloggia la siringa contenente la soluzione polimerica. La pompa consente di regolare la velocità di uscita della soluzione dalla siringa in un intervallo compreso tra 0.001  $\mu\text{l/h}$  e 70.57 ml/min. La soluzione fuoriesce dalla siringa ed attraversa un tubicino in teflon collegato ad un ago metallico con diametro interno di 0.5 mm;
- Un collettore, costituito da una piastra di rame con forma circolare (diametro 5 cm), posizionato ad una distanza regolabile dall'ago metallico.



**Figura 3.1:** macchinario per elettrofilatura dove viene messo in evidenza il cono di Taylor.

La tecnica di elettrofilatura sfrutta la differenza di potenziale applicata tra una soluzione di polimero (contenuta in una siringa) ed una piastra di raccolta (collettore), per forzare un getto di

soluzione fuoriuscente dalla siringa a dirigersi verso la piastra di raccolta. Nel tempo che il getto impiega per raggiungere il collettore, il solvente evapora lasciando un filamento di polimero che sotto l'azione del campo elettrico si allunga e si assottiglia fino alla sua deposizione sulla piastra di raccolta sotto forma di fibra solida molto sottile. Se il campo elettrico è poco intenso la goccia di soluzione ha forma sferica e cade sulla piastra in forma liquida. Aumentando la differenza di potenziale si osserva una progressiva distorsione della goccia fino alla formazione del cosiddetto "cono di Taylor" da cui fuoriesce un sottile getto, in genere poco visibile a occhio nudo. Ciò si verifica quando il potenziale applicato è sufficientemente alto e le forze elettrostatiche repulsive sulla goccia superano la tensione superficiale.

La presenza di legami fisici, chiamati concatenamenti, caratteristici delle macromolecole ad alto peso molecolare, permette la trasmissione dell'effetto di "stiro" da una macromolecola all'altra e provoca la formazione di una fibra che si deposita sulla piastra metallica. La deposizione continua e caotica di queste fibre genera un "tappetino"(mat) di tessuto-non-tessuto costituito da fibre orientate in modo casuale nelle due dimensioni definite dal piano della piastra metallica. Gli studi condotti nel campo dell'elettrofilatura hanno evidenziato che i parametri che influenzano e controllano il processo e la morfologia delle fibre prodotte sono molteplici. I parametri, per semplicità, possono essere suddivisi in due gruppi:

- 1) *Proprietà della soluzione*: peso molecolare medio del polimero, distribuzione dei pesi molecolari, viscosità della soluzione, concentrazione della soluzione, conducibilità del solvente, tensione di vapore del solvente, costante dielettrica del solvente.
- 2) *Parametri strumentali*: potenziale elettrico, velocità di flusso della soluzione, distanza tra il capillare ed il collettore, diametro interno dell'ago, condizioni ambientali (temperatura, umidità, etc.).

I diversi parametri non sono indipendenti l'uno dall'altro e le loro interazioni sono spesso complesse e difficili da prevedere. Alcune delle variabili sopra elencate sono state analizzate in dettaglio in un precedente lavoro di tesi condotto nel laboratorio di Macromolecole del Dipartimento di Chimica "G. Ciamician", sotto la supervisione della Dott.ssa Focarete.



## 3.2 Cromatografia di permeazione su gel (GPC)

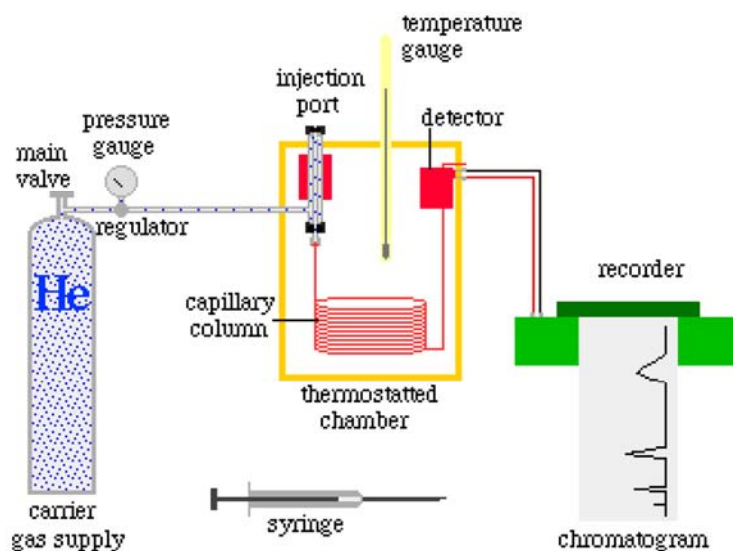
La cromatografia di permeazione su gel è una tecnica di separazione fisica utilizzata principalmente per l'analisi di materiali polimerici ad alto peso molecolare.

I gel utilizzati oggi per l'impaccamento delle colonne lavorano con il principio del "setaccio molecolare": il soluto che passa attraverso la colonna subisce un rallentamento proporzionale alle dimensioni delle particelle e alle dimensioni dei pori.

Poiché non vi è alcun tipo di legame chimico tra soluto e gel (o almeno nessun legame che abbia forza tale da determinare un'ulteriore separazione), l'ordine dei picchi in uscita andrà dalle molecole a peso molecolare maggiore (che non passano attraverso i pori e quindi escono rapidamente) a quelle di peso inferiore, le quali, percorrendo i percorsi creati dalla porosità del gel, impiegheranno un tempo maggiore a percorrere la colonna.

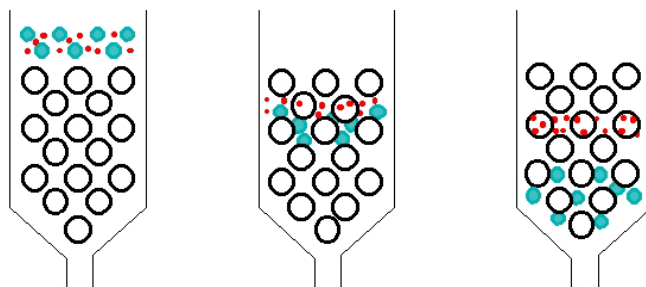
Il metodo di analisi dei campioni si basa sulla creazione di curve di taratura attraverso standard di polimeri a peso noto e su una successiva analisi per confronto.

Lo strumento è costituito da una pompa volumetrica, una colonna riempita di particelle porose (costituite da polistirene reticolato con divinilbenzene) ed un rivelatore:



**Figura 3.2:** Schematizzazione cromatografo

Durante la scansione in colonna viene fatto circolare un solvente con portata volumetrica costante. I campioni da analizzare vengono sciolti nello stesso solvente circolante in colonna,



filtrati (attraverso l'utilizzo di un'apposita siringa al fine di eliminare eventuali particelle non solubili che potrebbero ostruire i pori della colonna) e quindi iniettati.

**Figura 3.3:** schematizzazione separazione molecolare

La soluzione uscente dalla colonna viene analizzata da un sensore che fornisce, istante per istante, un segnale la cui intensità è proporzionale alla concentrazione del soluto. Il risultato dell'analisi è un grafico che riporta l'andamento dell'intensità del segnale in funzione del tempo.

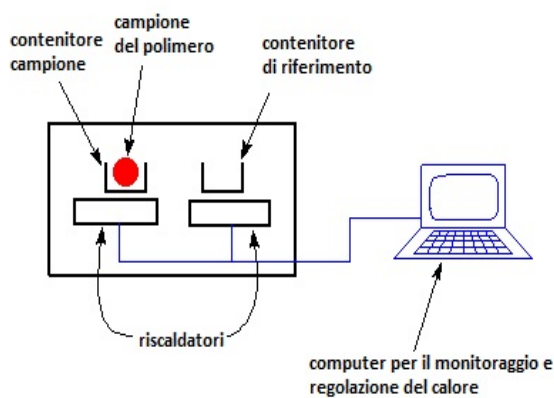
Per convertire i tempi in pesi molecolari ci si deve riferire alle curve di taratura, ottenute analizzando campioni standard di peso molecolare noto. Le misure di GPC sono state ottenute a 30°C con un cromatografo HP Series 1100 HPLC per mezzo di una colonna PL gel 5 $\mu$  Mini MIX-C (rapporto lunghezza/diametro in mm interno 250/4.6). I cromatogrammi sono stati registrati con HP Chemstation versione A.05.04 ed elaborati con GPC Calculator 7.6 software sviluppato dalla General Electric Company. Come eluente è stato usato cloroformio (flusso in colonna 0.3 mL/min). Le soluzioni utilizzate erano tutte caratterizzate da una concentrazione di polimero pari a 2 mg/mL. Per costruire la curva di taratura sono stati impiegati vari standard di polistirene con peso molecolare variabile tra 2000 e 100000, usando una curva del terzo ordine.

### 3.3 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

La calorimetria differenziale a scansione è una tecnica usata per studiare le transizioni termiche di un polimero.

Le misure sono state condotte con un DSC7 Perkin-Elmer fornito di accessori per il raffreddamento, fino a temperature inferiori a 0°C, e calibrato con standard ad elevata purezza, quali indio e cicloesano. Come osservabile dalla schematizzazione e dall'immagine in basso (Figura 3.4 e Figura 3.5), la strumentazione prevede due piatti dedicati all'alloggiamento di altrettante capsule, contenenti il campione (10 mg circa) ed il riferimento. Le celle calorimetriche che racchiudono tali capsule costituiscono "microcalorimetri", mantenuti in atmosfera di azoto inerte

durante le misure e soggette allo stesso programma termico. In assenza di transizioni di fase campione e riferimento si trovano pertanto alla stessa temperatura, mentre in loro presenza è rilevabile il configurarsi di uno squilibrio termico. La differenza di temperatura, misurata da termoresistenze, consente di controllare la potenza elettrica fornita ai due calorimetri: tale flusso di energia è predisposto al fine di annullare la differenza di temperatura tra campione e riferimento. L'impiego di un calcolatore interfacciato con il calorimetro ha consentito l'impostazione del programma termico, la rilevazione e la successiva elaborazione dei dati.



**Figura 3.4:** Schematizzazione DSC



**Figura 3.5:** Foto riportante macchinario per DSC

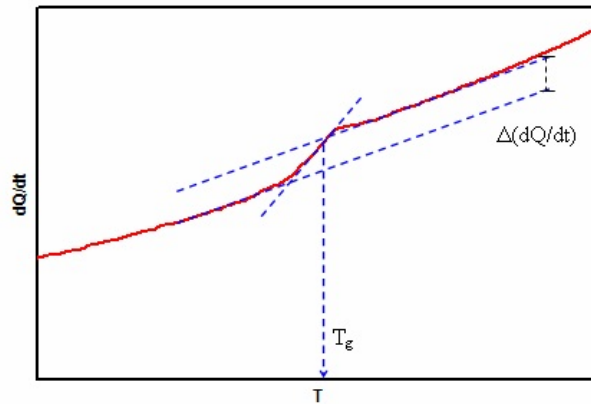
La temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) è un parametro caratteristico dei solidi polimerici, rappresenta la soglia termica alla quale si verifica il passaggio dallo stato solido rigido-vetroso ad uno liquido viscoso-gommoso. Nel caso di un polimero amorfo la transizione vetrosa si manifesta come una variazione endoterma della linea di base ed il valore di  $T_g$  è determinato in corrispondenza della metà della variazione di calore specifico associata alla transizione.

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

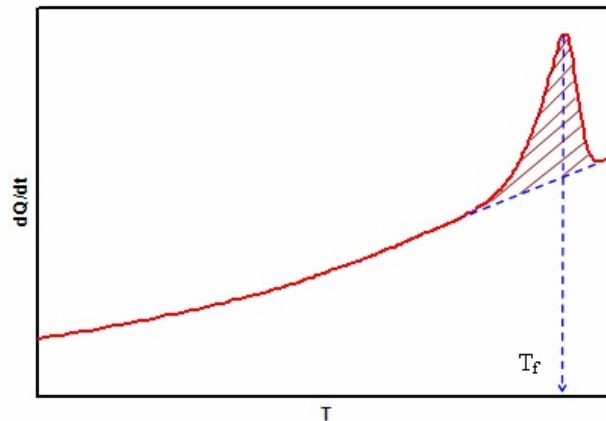
$$\Delta c_p = \Delta \left( \frac{dQ}{dT} \right) = \Delta \left( \frac{dQ}{dt} \right) \cdot \left( \frac{dT}{dt} \right)^{-1}$$

dove  $dT/dt$  è la velocità di scansione.

La temperatura di fusione ( $T_m$ ), costituente la soglia termica alla quale si verifica il passaggio dallo stato solido al liquido, caratterizza l'omonimo fenomeno, interpretabile come una transizione termodinamica del primo ordine che, nel tracciato DSC, si presenta come un picco endotermico.



**Figura 3.6 :** Calcolo  $T_g$



**Figura 3.7:** Determinazione della temperatura e del calore di fusione

Il valore di  $T_m$  si riferisce all'ascissa del picco, mentre l'area sottesa da esso, proporzionale alla cristallinità del polimero, corrisponde al calore di fusione  $\Delta H_m$  (J/g). Il rapporto tra quest'ultima grandezza ed il calore di fusione del polimero completamente cristallino costituisce il grado di cristallinità, parametro la cui coerenza rende possibili confronti tra il modulo di elasticità dei campioni analizzati.

Le misure sono state condotte seguendo una procedura strutturata in scansioni successive:

- 1<sup>a</sup> scansione: riscaldamento, effettuato ad una velocità di 20°C/min, da -65°C sino ad una temperatura pari a  $T_m+40^\circ\text{C}$ , seguito da un'isoterma della durata di 3min e da un rapido raffreddamento (velocità 100°C/min) fino alla temperatura iniziale (-65°C);

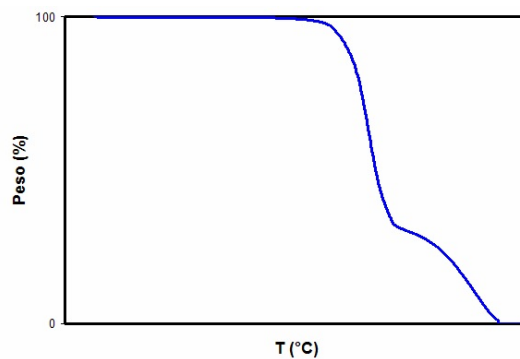
- 2<sup>a</sup> scansione: riscaldamento, in analoghe condizioni di temperatura e velocità a seguito del raffreddamento veloce sopra indicato;
- 3<sup>a</sup> scansione: analogo riscaldamento, seguito da un'isoterma, della durata di 3min, e da raffreddamento, a 5°C/min, fino a temperatura di circa -5°C.

### 3.4 Termogravimetria (TGA)

La termogravimetria è una metodica di analisi nella quale si effettua la registrazione continua delle variazioni di massa di un campione, in atmosfera controllata e in funzione della temperatura o del tempo. Il risultato dell'analisi viene espresso solitamente con un termogravigramma che riporta in ascissa la temperatura o il tempo e sulle ordinate la variazione di massa come valore assoluto o percentuale; tale grafico viene anche definito curva di decomposizione termica (Figura 3.8).

Tali informazioni sono di fondamentale importanza per definire il valore di temperatura che non deve essere oltrepassato nel trattamento del polimero.

La tecnica consiste nella determinazione delle variazioni di peso del campione quando è sottoposto ad un graduale aumento di temperatura .



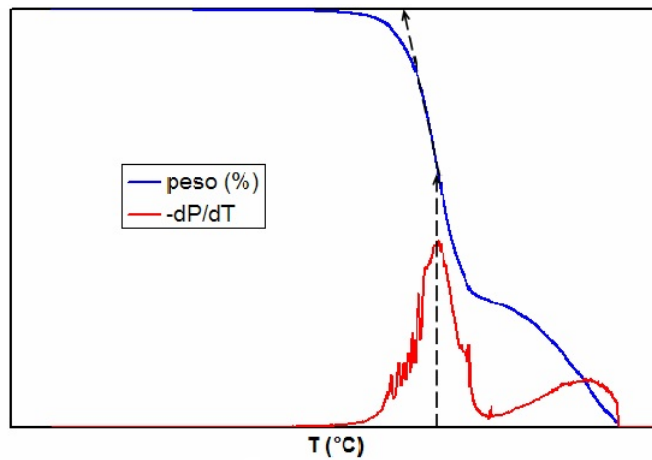
**Figura 3.8:** Variazione del peso

Le prove sono state condotte con circa 10 mg di campione alla velocità di 10°C/min nell'intervallo di temperature 60-850°C, utilizzando il macchinario TGA7 Perkin-Elmer (Figura 3.10).

Per poter confrontare la stabilità di polimeri diversi in modo quantitativo è necessario adottare un metodo per fissare in modo univoco la temperatura di inizio della degradazione.

Un criterio comunemente impiegato è basato sulla determinazione della temperatura di ONSET, che il programma di calcolo associato allo strumento permette di calcolare graficamente: si trova il

punto a cui corrisponde la massima pendenza della curva di degradazione e da quel punto si traccia la tangente alla curva; la temperatura di ONSET corrisponde al punto di intersezione tra la tangente e la retta (Figura 3.9).



**Figura 3.9:** Determinazione della temperatura di ONSET

La temperatura di ONSET viene considerata come temperatura di inizio decomposizione ( $T_{id}$ ). Nella presente Tesi verranno però considerate la temperatura a cui corrisponde la perdita di peso pari al 5% ( $T_{5\%,loss}$ ) e la temperatura corrispondente alla massima velocità di perdita di peso ( $T_{max}$ ).



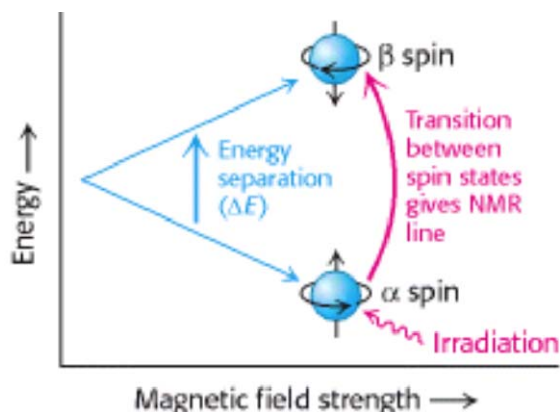
**Figura 3.10:** Macchinario TGA (TGA7 Perkin-Elmer)

### 3.5 Risonanza magnetica nucleare (NMR)

La risonanza magnetica nucleare (NMR) è una tecnica particolare che permette di analizzare la struttura chimica di un polimero: essa sfrutta il principio per cui i nuclei degli atomi di alcuni elementi, se sottoposti a un campo magnetico esterno, si orientano nella direzione del campo imposto.

In generale ogni nucleo è dotato di uno specifico numero di spin ( $I$ ), ad esempio  $I=0,1/2,1,3/2\dots$ , che dipende dal numero di massa e dal numero atomico. I nuclei che possiedono spin non intero, ruotando, danno origine ad un campo magnetico elementare  $\mu$ , che li rende simili a piccoli magneti. I nuclei degli isotopi più comuni di ossigeno e carbonio ( $^{12}\text{C}$  e  $^{16}\text{O}$ ) non sono magnetici ( $I=0$ ) e non danno luogo a fenomeni di risonanza magnetica nucleare; gli atomi più utilizzati per questo tipo di analisi, e che sono comunemente presenti nei polimeri, sono  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , i quali sono dotati di numero di spin pari a  $1/2$ .

Se si introduce un nucleo magnetico in un campo magnetico uniforme imposto dall'esterno, il nucleo si orienterà in una delle due sole possibili direzioni, corrispondenti ad un livello energetico di  $\pm\mu H_0$  (dove  $H_0$  è l'intensità del campo magnetico esterno).



**Figura 3.14:** Principio di funzionamento NMR

L'orientazione a bassa energia corrisponde alla situazione in cui il momento magnetico del nucleo è allineato in modo parallelo al campo magnetico esterno, l'orientazione ad alta energia si verifica invece quando il momento magnetico del nucleo risulta antiparallelo al campo esterno. Il passaggio di un nucleo da una possibile orientazione all'altra è il risultato dell'assorbimento o

dell'emissione di una certa quantità di energia, pari a  $E = h\nu = 2\mu H_0$  dove  $h$  è la costante di Planck e  $\nu$  è la frequenza della radiazione elettromagnetica che viene assorbita o emessa.

Se la frequenza di risonanza fosse la stessa per tutti i nuclei dello stesso tipo di una molecola, si osserverebbe nello spettro di risonanza un singolo picco per ogni specie atomica presente. In realtà non è così: è possibile osservare lievi differenze nella frequenza di risonanza NMR di uno stesso atomo al variare dei gruppi presenti nella molecola. Gli elettroni circostanti, infatti, schermano il nucleo in modo differente, a seconda della struttura chimica, quindi il campo magnetico effettivamente avvertito da un nucleo non è identico a quello imposto dall'esterno.

Per distinguere queste sottili differenze si usa uno spettrometro NMR che è costituito da un elettromagnete molto potente che stabilisce un campo magnetico stabile ed omogeneo, un emettitore di onde radio, un ricevitore ed un'apparecchiatura in grado di variare la frequenza della radiazione in un intervallo ristretto.

Lo scostamento della frequenza di risonanza dei nuclei rispetto ad un certa molecola assunta come standard prende il nome di chemical shift. Questa grandezza viene espressa in forma adimensionale come:

$$\delta(ppm) = \frac{(\nu_r - \nu)}{\nu_r} * 10^6$$

dove  $\nu_r$  è la frequenza di risonanza di un particolare nucleo di riferimento, e  $\nu$  è la frequenza di risonanza del campione considerato.

Tipicamente per il nucleo dell'atomo di  $^1H$  e per gran parte delle molecole organiche,  $\delta$  risulta compresa nell'intervallo 0-10ppm.

L'analisi NMR sul nucleo  $^{13}C$  è possibile ma abbastanza difficile, questo perché la maggior parte del carbonio presente in natura (99,89 %) è  $^{12}C$  (non dà fenomeni di risonanza magnetica nucleare), quindi solo pochi atomi di carbonio si orienteranno, di conseguenza si ridurrà il rapporto tra il segnale ed il rumore di fondo.

In uno spettro  $^1H$ -NMR si può notare che ad atomi di idrogeno con "intorni chimici" diversi corrispondono picchi diversi; inoltre considerando l'area sottesa da ogni picco, la quale non ha valore in senso assoluto, poiché varia a seconda della concentrazione della soluzione, possiamo determinare il rapporto tra i vari tipi di atomi di idrogeno presenti. L'area di un picco infatti, è indipendente dalla struttura a cui è legato l'idrogeno corrispondente, dipende solo dalla frequenza con cui tale atomo è ripetuto all'interno della molecola. Dividendo poi l'area di ogni picco per il



numero di idrogeni a cui corrisponde, si ottengono valori perfettamente confrontabili con quelli dati dalla formula chimica che corrisponde al polimero analizzato.

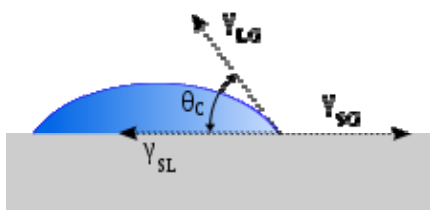
L'indagine spettroscopica rappresenta un metodo di studio universalmente impiegato per il riconoscimento analitico e strutturale dei polimeri.

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

Gli spettri  $^{13}\text{C}$ -NMR sono stati ottenuti utilizzando una concentrazione dei polimeri pari 10 wt% (con tempo di rilassamento pari a 1 secondo, tempo di acquisizione di 1 secondo per 700 ripetizioni).

### 3.6 ANGOLO DI CONTATTO

Le misure di angolo di contatto sono generalmente utilizzate per determinare la bagnabilità di una superficie, dove per angolo di contatto si intende una grandezza termodinamica descritta dall'angolo formato dall'incontro di un solido con la tangente formata dal profilo della goccia del liquido nel punto di contatto (Figura 3.15).



**Figura 3.15:** Angolo di contatto



**Figura 3.16:** Immagine macchinario per misura angolo di contatto

L'angolo di contatto, tenendo conto di queste ipotesi, corrisponde alla grandezza termodinamica che minimizza l'energia libera superficiale del sistema, ed è fisicamente descritto dalla legge di

Young, la quale corrisponde al bilancio delle forze orizzontali agenti su una goccia di volume trascurabile deposta su una superficie ideale:

$$\gamma_S = \gamma_L \cos\theta + \gamma_{SL}$$

Per convenzione si definiscono idrofobiche le superfici aventi un angolo di contatto con l'acqua maggiore di 90 gradi, idrofiliche le superfici con angoli minori di 90 gradi. Le misure dell'angolo di contatto sono state effettuate mediante lo strumento Krüss DSA30S – Drop Shape Analysis, il quale è formato da un banco ottico costituito da una sorgente di luce ad intensità regolabile, una telecamera digitale dotata di zoom ottico con funzione di rivelatore, e da un piatto portacampione mobile interposto tra le due; sopra al portacampione è installato un sistema dosatore del liquido comandato elettronicamente. La telecamera è interfacciata con un software in grado di acquisire ed analizzare l'immagine. Il software gestisce algoritmi che, tramite il calcolo ad approssimazioni successive, è in grado di ottenere il profilo della goccia che meglio si adatta al contorno reale ottenuto dall'immagine. Per ogni campione sono state depositate 5 gocce di 4  $\mu\text{L}$  ciascuna, ad una velocità di 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , in punti del provino sempre diversi al fine di evitare il contatto con superfici già bagnate. I dati di angolo di contatto per ogni provino sono espressi come valori medi  $\pm$  deviazione standard. Le prove sono state condotte alla temperatura di 25 °C in condizioni di umidità relativa pari al 38%.

### 3.7 MISURE STRESS-STRAIN

Le misure di resistenza meccanica vengono utilizzate per studiare il comportamento dei materiali polimerici in presenza di sollecitazioni di diverso tipo.

Nelle prove tensili si definisce *stress* (tensione) il rapporto tra lo sforzo normale e l'area della sezione del provino a riposo:

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

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

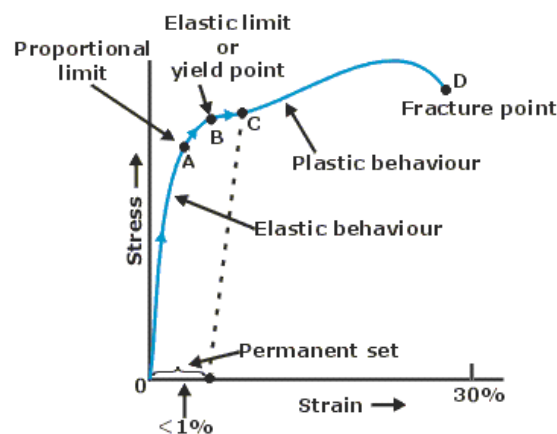
$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l}$$

Durante la prova si misura il valore dell'allungamento in funzione del carico applicato. I risultati vengono trasportati su un diagramma che presenta in ascissa  $\epsilon$  e in ordinata  $\sigma$ , ottenendo la curva sforzo-deformazione, caratteristica del materiale. Un andamento tipico è mostrato nella Figura 3.17.

La prima parte di questa curva è sempre lineare: il materiale segue dunque, fino ad un certo carico, la legge di Hooke:

$$\sigma = E * \epsilon$$

in cui la costante di proporzionalità E è il modulo elastico di Young, il quale corrisponde alla pendenza del tratto iniziale rettilineo della curva sforzo-deformazione. All'aumentare della deformazione si arriva ad un punto, detto di snervamento, in cui la deformazione permane anche una volta rimosso il carico; tale comportamento è dovuto allo scorrimento dei piani reticolari: il materiale ha subito una deformazione permanente e si è entrati così nel campo plastico. Dall'area sottesa alla curva è possibile inoltre valutare la tenacità, che è una misura dell'energia necessaria per rompere il materiale. E' necessario ricordare che i dati ottenuti risentono, oltre che del materiale utilizzato nel test, anche delle condizioni ambientali, quali temperatura e umidità, e delle condizioni sperimentali, come velocità di scorrimento, forma e dimensioni dei provini.

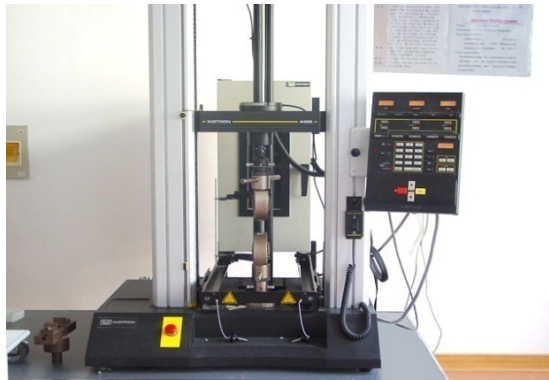


A typical stress-strain curve for a ductile metal

**Figura 3.17:** Curva sforzo/deformazione

Le prove meccaniche sono state condotte utilizzando un dinamometro Instron 4465 con cella di carico 100 N. Lo strumento è costituito principalmente da una struttura rigida di base e una traversa mobile posta nella parte superiore. I polimeri, sotto forma di striscioline dalle dimensioni di 5 x 40 mm, vengono fissati tramite agganci, l'applicazione del carico è effettuata tramite il

movimento verso l'alto della struttura superiore; la forza impressa è misurata dalla cella di carico, mentre l'allungamento viene determinato in base alla distanza percorsa dalla traversa mobile. Le prove sono state condotte a temperatura ambiente con velocità pari a 5 mm/min e per ogni campione sono state effettuate misure su 5 provini diversi. Il modulo elastico, calcolato dalla pendenza del tratto iniziale della curva sforzo-deformazione ottenuta, è stato riportato come valore medio delle 6 prove.



**Figura 3.18:** Immagine riportante il macchinario utilizzate per le prove di Stress-strain

### 3.8 DEGRADAZIONE IDROLITICA

Le prove di degradazione idrolitica permettono di testare il comportamento del polimero in ambienti che simulano l'ambiente corporeo. Queste prove sono state effettuate per verificare la velocità di degradazione in un ambiente simile a quello biologico. Gli esperimenti di degradazione idrolitica sono stati condotti, in condizioni di temperatura e pH fisiologici, su film 10x35mm di circa 25 mg dei diversi polimeri. I campioni sono stati inizialmente essiccati e pesati, successivamente sono stati inseriti in provette contenenti circa 7 ml di soluzione acquosa tamponata a pH 7.4 con tampone fosfato e sono stati mantenuti ad una temperatura costante di 37 °C per periodi di tempo variabili all'interno di un bagno termostatico con scuotitore (80giri/minuto) (Julabo SW22). La soluzione tampone, cambiata periodicamente per mantenere costante il pH, è stata preparata seguendo la procedura di seguito riportata: in 800ml di acqua distillata, vengono disciolti 8g di NaCl, 0.2g di KCl, 1.44g di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0.24g di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; il pH della soluzione è aggiustato al valore di 7.4 per aggiunta di HCl e il volume finale portato ad 1 litro. Da ultimo la soluzione è sterilizzata in autoclave per evitare la crescita di microorganismi al suo interno.

Per analizzare i cambiamenti provocati dal processo di degradazione nel tempo si è stabilito un calendario dei prelievi. Nei giorni fissati è stato prelevato un campione (serie da 3 provette per ogni polimero) dal bagno. Il trattamento di ciascun campione dopo il prelievo ha previsto:

- lavaggio con acqua distillata per eliminare i sali della soluzione tampone;
- asciugatura del campione con carta assorbente;
- essiccamento sotto vuoto su  $P_2O_5$  per eliminare l' $H_2O$  residua;
- misura del peso finale di ciascun campione.

## **3.9 BIOCOMPATIBILITÀ**

### **3.9.1 CULTURA CELLULARE**

La linea cellulare C2C12 di mioblasti, estratti da un murino, è stata regolarmente coltivata in un mezzo completo costituito da DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium). Questo mezzo è stato poi integrato con 10% siero bovino fetale (FBS), 1% di penicillina/ streptomicina, 1% di L-glutamina e sodio piruvato 1%.

### **3.9.2 TEST VITALITÀ CELLULARE**

Le C2C12 sono state seminate su scaffold con una densità di  $3 \times 10^4$  e incubate a  $37^\circ\text{C}$  ed atmosfera del 5% di anidride carbonica. La vitalità cellulare è stata valutata grazie al test del Cell Counting Kit 8 (CCK-8). Questo test viene valutato dopo 24 ore e dopo 7 giorni. Il mezzo di coltura è stato sostituito con  $200\mu\text{L}$  di DMEM e  $20\mu\text{L}$  di CCK-8. Questo nuovo mezzo è stato poi aggiunto ad ogni scaffold. Dopo un'incubazione a  $37^\circ\text{C}$  per 2 ore, sono stati campionati ed analizzati frazioni di  $100\mu\text{L}$  mediante un lettore ELISA (BioRad Laboratories, Hercules, CA) a 450 nm. Per rappresentare i risultati espressi in forma percentuale sono state usate delle curve standard della vitalità delle cellule.

## 4-RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

I polimeri oggetto della presente Tesi sono stati precedentemente sintetizzati presso i laboratori del DICAM presso i quali è stata svolta anche l'attività sperimentale qui illustrata.

In Tabella 4.1 sono riportati i dati di caratterizzazione molecolare del PBS e del P(BS80BDG20): il peso molecolare medio numerico ( $M_n$ ) e l'indice di polidispersità ( $D$ ) ottenuti tramite GPC, e la composizione effettiva, il grado di statisticità ( $b$ ) e la lunghezza media dei blocchi del copolimero P(BS80BDG20) ricavati tramite spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$ .

**Tabella 4.1** Dati di caratterizzazione molecolare

polimeri	$M_n$	$D$	PBS (mol %) $^1\text{H-NMR}$	$L_{BS}$	$L_{BDG}$	$b$
PBS	51200	2,3	100	/	/	/
P(BS80BDG20)	53900	2	80,9	5,2	1,2	1,04

Come si può notare dalla Tabella 4.1, entrambi i polimeri risultano caratterizzati da un peso molecolare molto elevato; ciò indica un buon controllo del processo di polimerizzazione e permette di escludere una sua influenza sulle proprietà termiche e meccaniche.

Inoltre il valore di  $b$  risulta circa 1, indicando che il copolimero in esame è effettivamente statistico. Tale risultato non sorprende considerate le elevate temperature di reazione e l'impiego di  $\text{Ti}(\text{OBu})_4$  come catalizzatore. E' ben noto, infatti, che tale catalizzatore favorisce le reazioni di transesterificazione.

### 4.2 ELETTROFILATURA

Come già sottolineato nel capitolo introduttivo, la tecnica di elettrofilatura permette di produrre, a partire da una soluzione polimerica, fibre di dimensioni nanometriche o micrometriche, in funzione delle condizioni sperimentali. Il processo di elettrofilatura è controllato da molteplici parametri tra loro correlati. Le condizioni sperimentali per l'*elettrospinning* dei polimeri oggetto

del presente studio sono state ottimizzate eseguendo diverse prove che hanno previsto la variazione dei parametri di seguito riportati uno alla volta:

1. la concentrazione della soluzione
2. il potenziale
3. la distanza ago-collettore
4. la velocità di flusso della soluzione.

Nel processo di elettrofilatura la scelta del solvente è la fase critica, poiché essa determina sia la possibilità di ottenere delle fibre sia, quando queste sono presenti, la loro morfologia. Inoltre, non sempre un solvente in grado di solubilizzare completamente un determinato polimero, possiede anche le caratteristiche adatte per essere utilizzato in un processo di elettrofilatura. La costante dielettrica del solvente, che è una misura della polarità delle molecole del solvente, costituisce uno dei parametri principali da considerare nella scelta del sistema polimero/solvente. Come già detto, il requisito fondamentale affinché la soluzione possa essere elettrofilata è che la carica elettrica superi la tensione superficiale. L'utilizzo quindi di un solvente con un valore elevato di costante dielettrica favorisce la formazione di una notevole densità di carica nella soluzione e quindi facilita la formazione di fibre. In genere si è osservato che, se il solvente ha un'alta costante dielettrica, le fibre polimeriche mostrano un diametro inferiore.

L'ottimizzazione del processo ha il duplice scopo di:

- ottenere fibre con diametri micrometrici, dell'ordine delle centinaia di nanometri;
- perdere meno materiale elettrofilato possibile tentando di rendere minima la quantità di sostanza che si deposita all'esterno della piastra di raccolta durante il processo.

Il primo sistema solvente utilizzato è stata una miscela costituita da cloroformio e dimetilformammide (DMF). La scelta di tale sistema si è basata su precedenti ottimizzazioni condotte in laboratorio su un polimero di composizione simile. Il DMF possiede un'alta costante dielettrica e favorisce l'accumulo di un'alta densità di carica nella soluzione, ma ciò nonostante i tappetini presentano difetti di forma sferica chiamati comunemente "*beads*" (perle).

Le condizioni operative adottate per le prime prove sperimentali sono state le seguenti:

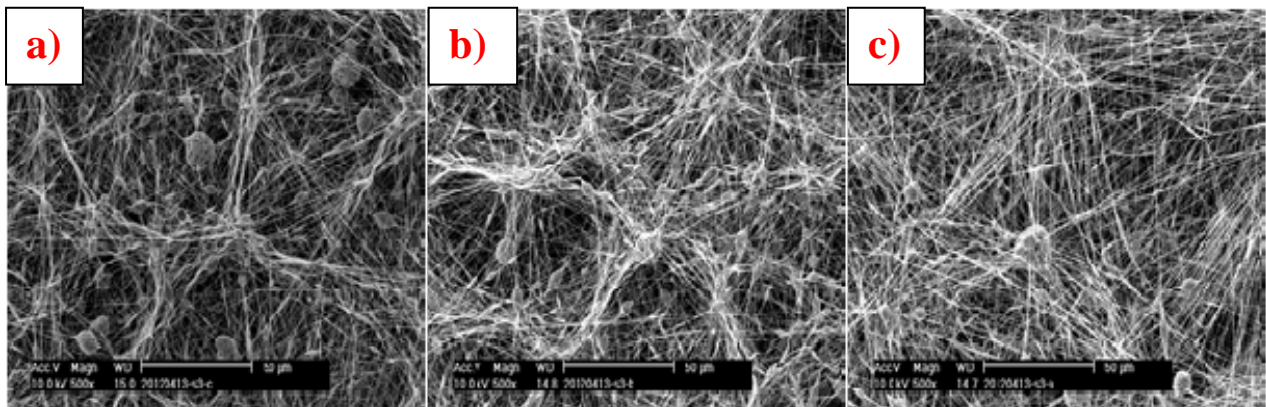
- differenza di potenziale = **15 kV**
- distanza ago-collettore = **15 cm**
- diametro ago = **0,84 mm**
- velocità di flusso = **0,5 ml/h**

- soluzione al **21 % (w/V)** in **DMF/CHCl<sub>3</sub> (v/v=1/4)**

Il “bead” si genera in un punto della fibra dove la tensione superficiale è ancora elevata rispetto alle forze repulsive. L’aumento di densità di carica nella soluzione, che si realizza utilizzando un sistema solvente con costante dielettrica globale maggiore, ha l’effetto di aumentare le forze elettrostatiche repulsive e quindi di limitare la formazione di questi difetti (H. Fong *et al.*, 1999).

Nel corso delle prove di ottimizzazione sono stati variati alcuni parametri strumentali: distanza ago-collettore, differenza di potenziale (il cui effetto è mostrato in Figura 4.1), velocità di flusso, e concentrazione delle soluzione polimerica.

Diverse osservazioni sperimentali (J.S. Choi *et al.*, 2004), hanno infatti dimostrato che l’aumento della concentrazione della soluzione ha l’effetto di modificare progressivamente la morfologia delle fibre: a basse concentrazioni il polimero si deposita sulla piastra di raccolta in forma di micro e nano “perline”; all’aumentare della concentrazione si ottengono fibre molto sottili ricche di *beads*, che vanno via via scomparendo. Infine, ad alte concentrazioni si ottengono fibre più grosse, ma prive di difetti. Questo andamento morfologico viene strettamente connesso al numero di concatenamenti fisici tra le catene in soluzione (S.L. Shenoy *et al.*, 2005).



**Figura 4.1.** Fibre di PBS elettrofilate in cloroformio:DMF a) in volume 15kv, b) 18 kv, c) 20 kv.

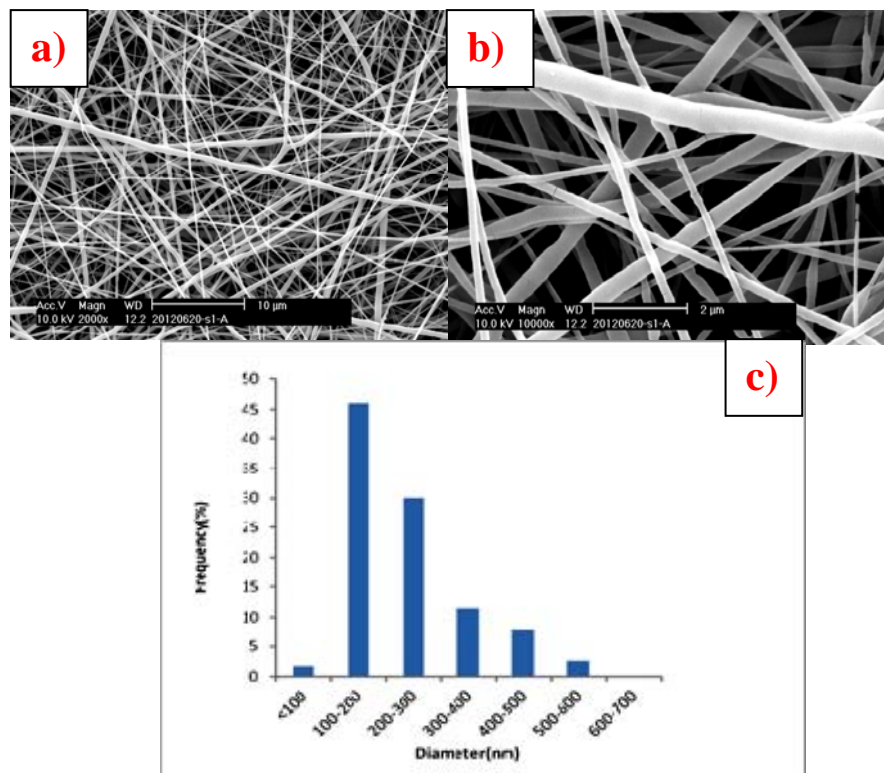
A parità di potenziale applicato, la velocità di flusso stabilisce la quantità di materiale in uscita dal capillare che deve essere stirata dal campo elettrico: se la velocità è troppo bassa il cono di Taylor non si forma perché la soluzione viene tirata direttamente da dentro l’ago. Se la velocità è troppo elevata la soluzione cade in forma di gocce sul collettore. Dati di letteratura riportano che nell’intervallo di velocità in cui si forma il cono di Taylor, la velocità minore porta alla formazione di fibre più sottili e quella maggiore produce fibre più grosse che possono presentare i *beads* (X. Zong *et al.*, 2002). Di fatto il cambiamento dei parametri sopra elencati non modifica in maniera



sostanziale né il diametro, che si mantiene dell'ordine di qualche submicrometro, né la morfologia, che è caratterizzata dalla presenza di *beads*. Alla luce di queste considerazioni e dei risultati ottenuti si è deciso cambiare la miscela solvente e passare all'esafluoroisopropanolo (HFIP), ottenendo, nelle condizioni sperimentali sotto riportate, fibre prive di difetti.

Per il PBS le condizioni operative ottimizzate sono state:

- differenza di potenziale = **18 kV**
- distanza ago-collettore = **15 cm**
- diametro ago = **0,84 mm**
- velocità di flusso = **0,3 ml/h**
- soluzione al **15 % (w/V)**



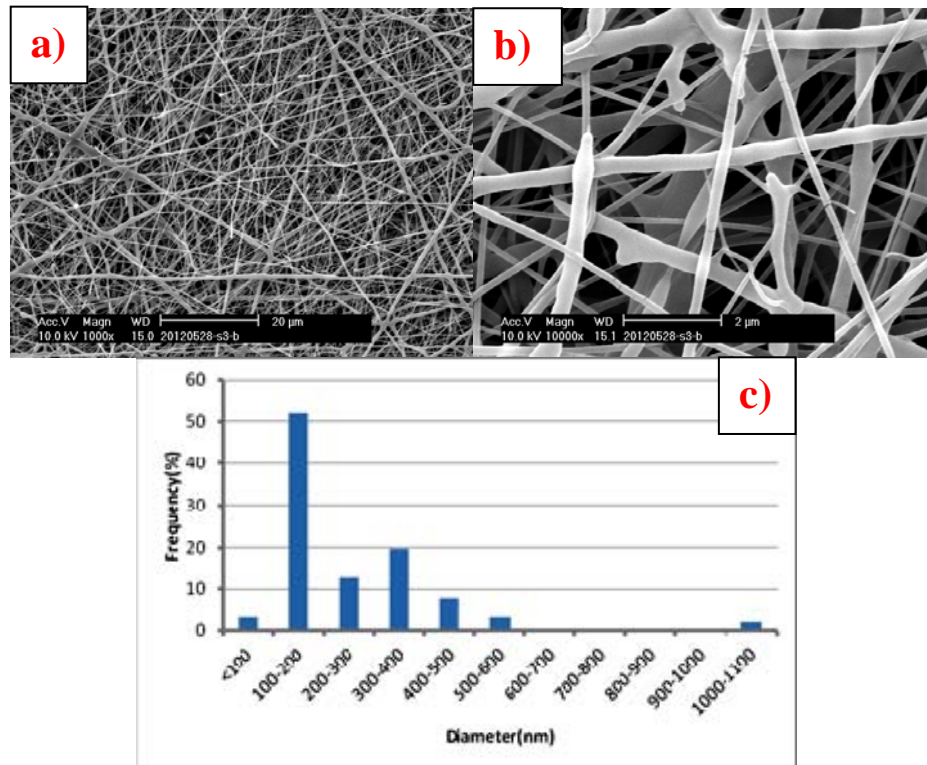
**Figura 4.2** Scaffold a base di PBS: micrografie SEM: a) 1000x e b) 10000x; c) distribuzione delle fibre.

Per il copolimero P(BS80BDG20), le condizioni ottimizzate sono invece le seguenti:

- differenza di potenziale = **18 kV**
- distanza ago-collettore = **15 cm**
- diametro ago = **0,84 mm**
- velocità di flusso = **0,3 ml/h**

- soluzione al **15 % (w/V)**

Gli *scaffolds* appaiono come intrecci altamente porosi con pori interstiziali in microscala (Figura 4.2 per il PBS e Figura 4.3 per il P(BS80BDG20)). Entrambi in polimeri hanno prodotto delle fibre prive di difetto e aventi diametri micrometrici pari a  $237 \pm 81$  nm e  $245 \pm 127$  nm per il PBS ed il P(BS80BDG20) rispettivamente.



**Figura 4.3** Scaffold a base di P(BS80BDG20): micrografie SEM: a) 1000x e b) 10000x; c) distribuzione delle fibre.

### 4.3 MISURE DI BAGNABILITA' SUPERFICIALE (WCA)

Per poter analizzare l'idrofilicità dei campioni elettrofilati è stata analizzata la bagnabilità superficiale attraverso misure dell'angolo di contatto. L'alta porosità della matrice elettrofilata ha impedito una misura diretta sugli *scaffold*. Pertanto le analisi WCA sono state effettuate su film ottenuti tramite pressofusione; i risultati ottenuti sono riportati in Tabella 4.2.

L'introduzione di co-unità BDG contenenti atomi di ossigeno etero all'interno della catena polimerica del PBS ha aumentato la bagnabilità superficiale dell'omopolimero, anche se la

percentuale molare di unità BDG non elevata (20%) e la distribuzione statistica delle unità, ne hanno limitato l'incremento.

#### 4.4 CARATTERIZZAZIONE TERMICA

L'analisi termica dei campioni elettrofilati è stata effettuata attraverso misure termogravimetriche e calorimetria differenziale a scansione.

L'analisi termogravimetrica permette di registrare la variazione di massa di un campione polimerico sottoposto a velocità di riscaldamento costante. Infatti, l'aumento della temperatura provoca delle variazioni strutturali delle macromolecole e l'innescio di reazioni di degradazione che portano alla formazione di sottoprodotti volatili. Attraverso questa tecnica si può quindi valutare la stabilità termica dei campioni e stabilire la massima temperatura alla quale si può lavorare a caldo il polimero, con la sicurezza di non degradarlo.

Entrambi i campioni sono risultati stabili dal punto di vista della degradazione termica fino alla temperatura di circa 300°C e hanno mostrato una curva TGA con un unico scalino, indice del fatto che i polimeri subiscono una degradazione termica in un unico stadio. A titolo di esempio, la temperatura in corrispondenza alla quale si ha una perdita di peso del 5% ( $T_{5\%,w.loss}$ ) è riportata in Tabella 4.2.

Inoltre tramite questa tecnica è stato possibile evidenziare la completa assenza di solvente nelle fibre elettrofilate.

**Tabella 4.2** Dati di caratterizzazione termica

polimeri	$T_{5\%,loss}$ (°C)	$T_{max}$ (°C)	$T_g$ (°C)	$\Delta C_p$ (J/°C g)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	$\chi_c$ (%)	WCA (°)
PBS	305	395	-35	0,101	115	85	42,5	96 ± 1
P(BS80BDG20)	321	393	-34	0,231	96	62	31	92 ± 2

I campioni sono stati quindi caratterizzati mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC). I dati calorimetrici sono riportati in Tabella 4.2, insieme al grado di cristallinità dei campioni, determinato a partire dal calore di fusione del PBS completamente cristallino riportato in letteratura e pari a 200 J/g (Ren *et al.*, 2005).

Il PBS è un materiale semicristallino, essendo la relativa curva calorimetrica caratterizzata da una modesta variazione endoterma della linea di base associata alla transizione vetrosa, alla

temperatura ( $T_g$ ) di circa  $-35^\circ\text{C}$  e da una endoterma di fusione a  $T_m = 115^\circ\text{C}$  (curva non mostrata). Anche il P(BS80BDG20) è un materiale semicristallino, ma presenta un grado di cristallinità ed una temperatura di fusione più bassi rispetto all'omopolimero. Questo andamento indica che nel copolimero P(BS80BDG20) la fase cristallina è caratterizzata da un minor grado di perfezione e da cristalli di dimensione ridotta.

In conclusione, le proprietà termiche degli elettrofilati non differiscono in maniera significativa da quelle osservate per gli stessi campioni sotto forma di film.

## 4.5 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA

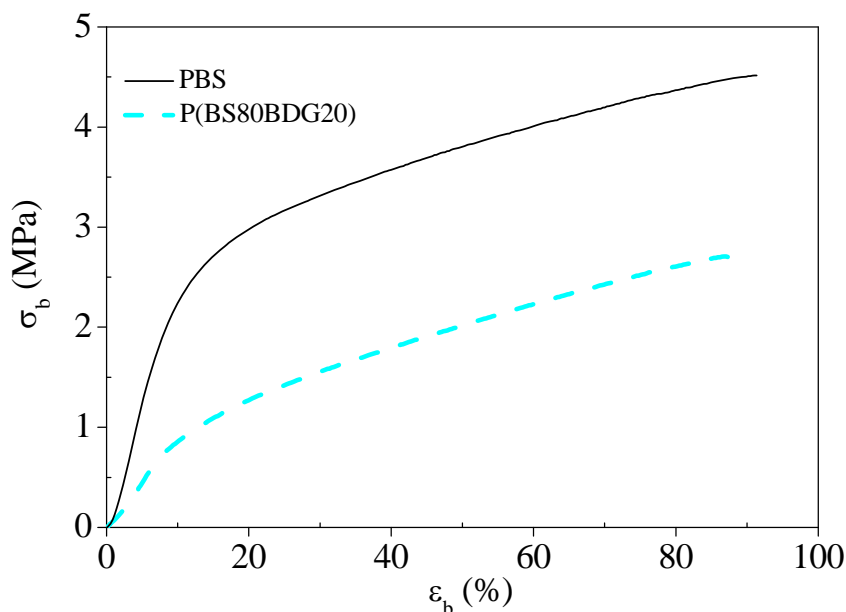
Le proprietà meccaniche dei campioni elettrofilati sono state studiate mediante misure di sforzo-deformazione, applicando al provino una forza di trazione per deformare il provino stesso ad una velocità costante di 5 mm/min. La Tabella 4.3 riporta i valori di modulo elastico (E), di sforzo a rottura ( $\sigma_b$ ) e di deformazione a rottura ( $\epsilon_b$ ) dei campioni analizzati. Il valore di questi parametri è riportato come valore medio ricavato dall'analisi di 6 provini e relativa deviazione standard. La Figura 4.4 riporta per il PBS ed il P(BS80BDG20) una curva sforzo-deformazione rappresentativa dei valori medi ricavati dall'analisi di tutti i provini.

Dai dati riportati in tabella si evince come l'omopolimero sia più rigido rispetto al P(BS80BDG20), con un modulo elastico pari a circa 3 volte quello del copolimero. Questi risultati dimostrano che l'introduzione di co-unità BDG, seppur in percentuale ridotta, lungo la catena polimerica del PBS risulta in una significativa variazione delle proprietà meccaniche.

**Tabella 4.3** Proprietà meccaniche dei campioni elettrofilati

polimeri	E (MPa)	$\epsilon_b$ (%)	$\sigma_b$ (MPa)
PBS	18±7	93±15	4±1
P(BS80BDG20)	6±2	90±15	1.6±0.4

L'andamento del modulo elastico E dei materiali in esame è certamente da mettere in relazione con: la quantità di fase cristallina presente (è noto infatti che le proprietà meccaniche dipendono fortemente dalla morfologia del materiale, intesa come quantità relativa di fase cristallina e di fase amorfa) e la diversa flessibilità della catena.



**Figura 4.4** Curva sforzo deformazione degli *scaffolds* a base di PBS e P(BS80BDG20).

La deformazione a rottura rileva invece dati discordanti da quanto osservato da prove meccaniche, eseguite sullo stesso materiale, sotto forma di film. Non si osserva infatti alcun allungamento a rottura del P(BS80BDG20) rispetto al PBS. Dati di letteratura spiegano come lo sviluppo del modello teorico di materiali fibrosi si basi sulla approssimazione che la maggior parte delle fibre, in una matrice fibrosa, sia inizialmente curvata (M.S. Rizvi *et al.*, 2012).

Questo piegamento diminuisce la capacità di carico fino a quando le fibre, raddrizzandosi, cominciano a resistere all'allungamento longitudinale. Pertanto, quando viene applicata una trazione di carico, ogni fibra tende inizialmente a raddrizzarsi per poi entrare in trazione. Come risultato si ottiene che solo una frazione della fibre porterà direttamente il carico. Di fatto, la deformazione  $\epsilon_b$  della matrice fibrosa dipende dal modulo elastico di ogni singola fibra, dalla loro organizzazione e dal reclutamento delle fibre 'portanti,' ovvero le prime fibre che stendendosi determineranno il comportamento meccanico osservato del materiale fibroso.

## 4.6 DEGRADAZIONE IDROLITICA

Entrambi i campioni in esame sono stati sottoposti a esperimenti di degradazione idrolitica *in vitro* in condizioni fisiologiche di temperatura (37°C) e di pH (7.4). Tali esperimenti vengono condotti al fine di valutare la tempistica di degradazione di questi materiali nell'ottica di utilizzarli come

biomateriali impiantati all'interno dell'organismo. Il primo prelievo è stato effettuato dopo 28 giorni, l'ultimo dopo 203 giorni.

Dopo il prelievo ciascun campione è stato sottoposto a:

1. Lavaggio: ciascun campione viene mantenuto in immersione in acqua distillata per circa un'ora, cambiando l'acqua ogni quarto d'ora. Il lavaggio in acqua pura ha lo scopo di rimuovere dai pori della struttura i sali provenienti dalla soluzione tampone, che, senza questo trattamento di lavaggio, andrebbero a falsare la pesata finale del campione.
2. Essiccamento: dopo la procedura di lavaggio il campione viene sottoposto ad essiccamento sotto vuoto su  $P_2O_5$  per due giorni.

Di ciascun campione sottoposto a degradazione idrolitica è stata calcolato il peso residuo percentuale ( $m_R\%$ ) attraverso la seguente equazione:

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

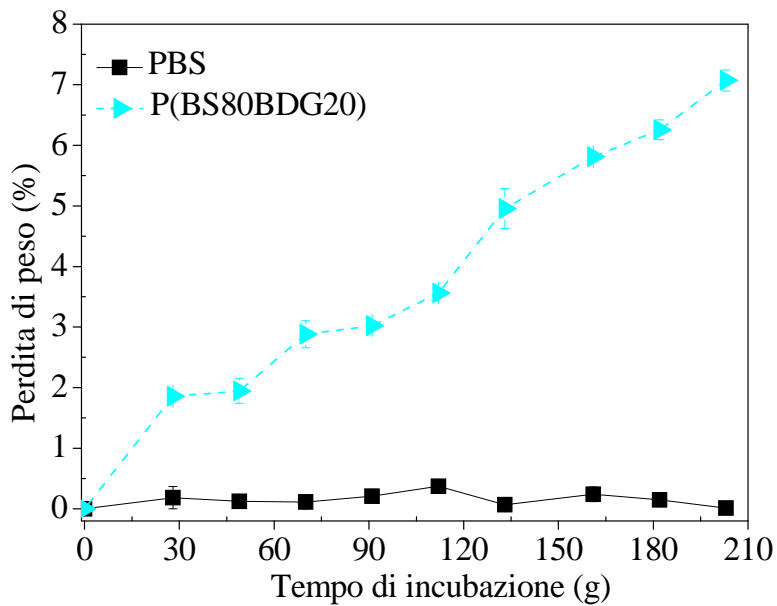
dove  $m_{fin}$  è la massa del campione registrata dopo il processo di degradazione e  $m_{in}$  è la massa iniziale del campione.

Dei medesimi campioni è stata inoltre ricavata la distribuzione dei pesi molecolari mediante misura GPC. Da tali dati sono stati calcolati i rispettivi valori di peso molecolare medio numerico residuo percentuale ( $M_{n-R}\%$ ), calcolato con la seguente equazione:

$$M_{n-R} (\%) = 100 - \left( \frac{M_{n-in} - M_{n-fin}}{M_{n-in}} \cdot 100 \right)$$

dove  $M_{n-fin}$  è il peso molecolare medio numerico del campione dopo il processo di degradazione e  $M_{n-in}$  è il peso molecolare medio numerico iniziale del campione. Ogni prelievo è stato condotto in triplicato (come descritto nella parte sperimentale) e nei grafici vengono riportati la media e la deviazione standard di ogni prelievo.

Per quanto concerne le misure di perdita di peso, nell'intervallo di tempo considerato il PBS non ha subito perdite di peso significative, a indicare che il processo di degradazione idrolitica è caratterizzato da una cinetica molto lenta, mentre il P(BS80BDG20) ha subito apprezzabili variazioni del suo peso iniziale, come riportato in Figura 4.5.



**Figura 4.5** Perdita di peso percentuale di PBS e P(BS80BDG20) in funzione del tempo di incubazione

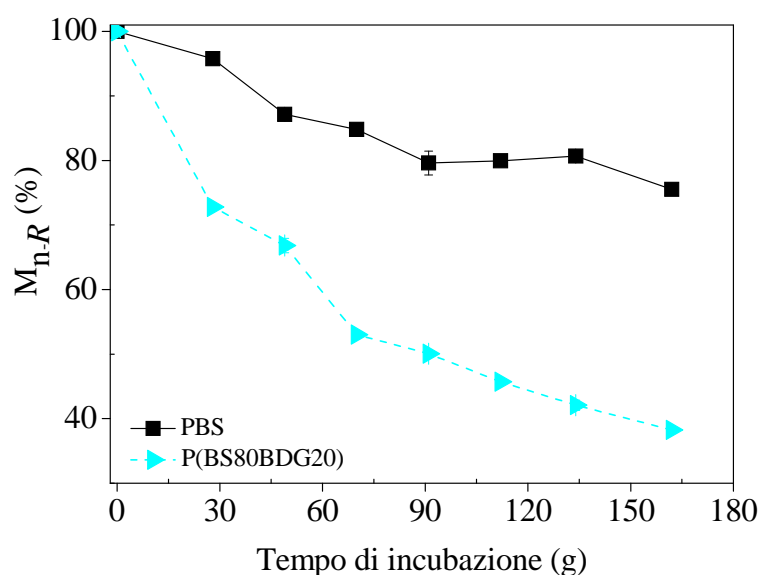
La Figura 4.6 confronta il calo di peso molecolare subito dai diversi campioni a seguito della degradazione mettendo in relazione il peso molecolare medio numerico residuo percentuale ( $M_n$ - $R\%$ ) con i giorni di permanenza in tampone. Il grafico mostra che entrambi i materiali subiscono un calo di peso molecolare apprezzabile già dopo tempi brevi di permanenza in tampone e che tale calo continua in maniera progressiva con l'aumentare dei giorni trascorsi in soluzione acquosa. Inoltre, come evidenziato dalle perdite di peso, tale variazione è più evidente nel caso del P(BS80BDG20) rispetto all'omopolimero PBS.

I risultati ottenuti non sono sorprendenti se si tiene conto che il processo di degradazione idrolitica avviene in *bulk*: tale processo prevede la scissione statistica da parte dell'acqua dei legami esterei delle macromolecole, con formazione di spezzoni di catena via via più corti. Perciò, nelle prime fasi del processo, le perdite di peso non sono apprezzabili in quanto le sequenze formatesi non sono sufficientemente corte da diffondere attraverso la matrice polimerica e passare in soluzione; il processo può essere dunque osservato solo attraverso misure di peso molecolare. Con l'avanzare del processo di idrolisi, si generano sequenze solubili in acqua e anche le variazioni di peso diventano significative.

Complessivamente, invece, l'andamento osservato può essere spiegato sulla base di diversi fattori che, come noto, influenzano la velocità di degradazione di un materiale polimerico:

- temperatura di fusione
- grado di perfezione dei cristalli
- grado di cristallinità
- idrofilicità

Il P(BS80BDG20) presenta un punto di fusione più basso, un minor grado di perfezione dei cristalli, un grado di cristallinità inferiore ed una maggiore idrofilicità rispetto all'omopolimero PBS e dunque una velocità di degradazione maggiore.



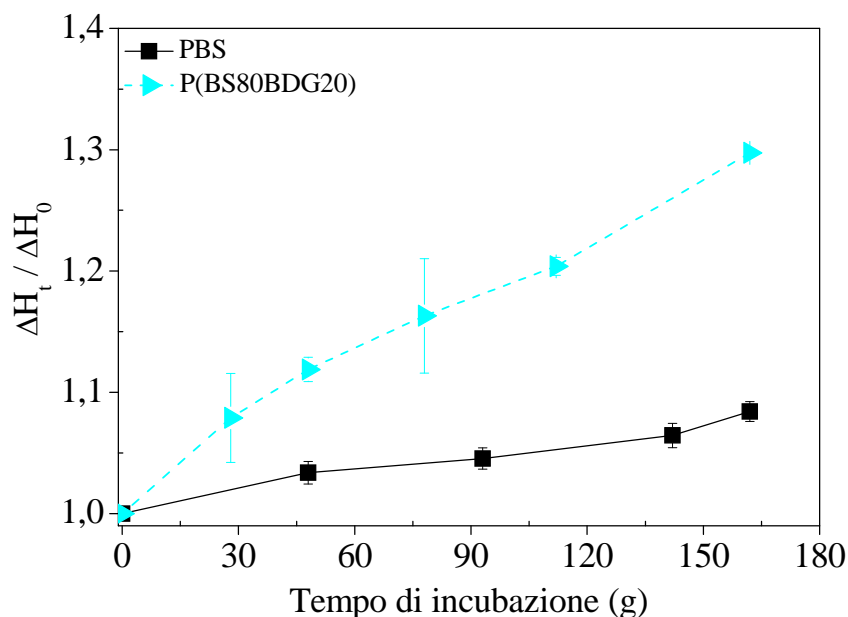
**Figura 4.6** Peso molecolare medio numerico residuo percentuale di PBS e P(BS80BDG20) in funzione dei giorni di permanenza in tampone.

Dopo il prelievo dalla soluzione tampone e da quella contenente anche l'enzima, i campioni sono stati analizzati mediante DSC, allo scopo di monitorare eventuali cambiamenti nel contenuto di fase cristallina presente durante la permanenza in tampone fosfato. In Figura 4.7 vengono riportati il calore di fusione normalizzato rispetto al valore iniziale (tempo di incubazione zero) in funzione del tempo di incubazione per i due polimeri in esame.

I dati calorimetrici mostrano che in entrambi i casi, nel corso della degradazione, subiscono delle variazioni morfologiche in termini di rapporto tra fase cristallina e fase amorfa. In particolare è evidente che il  $\Delta H_m$ , proporzionale alla quantità di fase cristallina sviluppata dal PBS, aumenta già dopo 30 giorni di permanenza in tampone e in modo maggiore nel caso del copolimero P(BS80BDG20), che presenta una velocità di degradazione più elevata.



L'aumento della fase cristallina può essere dovuto a due fenomeni: (1) ricottura (*annealing*) (aumento e perfezionamento della fase cristallina) ad una temperatura compresa tra  $T_g$  e  $T_m$  e (2) degradazione preferenziale della fase amorfa con conseguente aumento della fase cristallina. È noto infatti che durante la degradazione idrolitica le molecole di acqua entrano preferenzialmente nella fase amorfa la quale è quindi soggetta ad una velocità di degradazione maggiore, rispetto alla fase cristallina, nella quale le molecole sono maggiormente impaccate.



**Figura 4.7** Calore di fusione normalizzato in funzione del tempo di incubazione per il PBS e il P(BS80BDG20).

Dall'analisi dei dati riportati in Figura 4.7 non si può escludere che tutti i polimeri subiscano anche un processo di *annealing* a 37°C, in quanto tale temperatura risulta essere all'interno della finestra di cristallizzazione di entrambi i campioni.

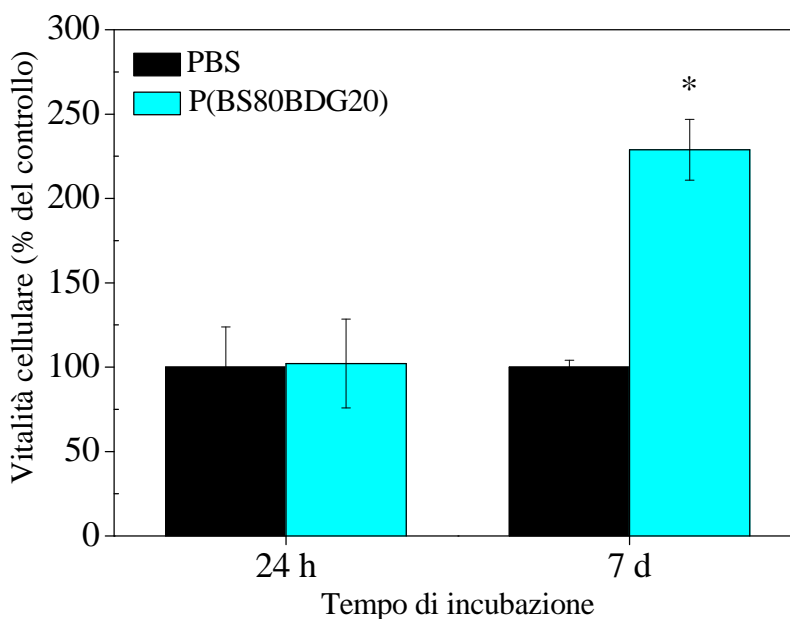
## 4.7 BIOCAMPATIBILITA'

Gli studi di biocompatibilità sono stati condotti nei laboratori di Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università degli Studi di Pavia, grazie alla collaborazione con la Dott.ssa Livia Visai. L'adesione e la proliferazione della linea cellulare C2C12 coltivata su *scaffold* polimerici, dopo 24 ore e 7 giorni di incubazione, è mostrata in Figura 4.8. I dati sono stati espressi come percentuale

di vitalità cellulare ( $\pm$  deviazione standard) sui campioni elettrofilati di P(BS80BDG20) e PBS, definito come controllo (il suo valore a 24 ore è stato impostato pari al 100%).

Le differenze statistiche tra tutti i campioni sono state valutate mediante il T-test con livello di significatività  $p = 0,05$ ;  $*p < 0.05$  rispetto al PBS a 7 giorni di incubazione.

I risultati hanno dimostrato che, indipendentemente dalla struttura chimica del materiale, le cellule sono in grado di aderire in 24h, e proliferare dopo 7 giorni.



**Figura 4.8** Vitalità cellulare di C2C12 su *scaffold* di PBS e P(BS80BDG20) dopo 24 h e 7 giorni di incubazione.

Dopo 24 ore di incubazione la densità cellulare sul P(BS80BDG20) non differisce significativamente da quella misurata sullo *scaffold* di PBS. Al contrario, dopo una settimana la vitalità cellulare è notevolmente diversa: il copolimero presenta infatti una proliferazione cellulare pari a circa il 230% del controllo, mentre sul PBS non si è registrato alcun incremento.

In conclusione, i risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare come l'adesione e la proliferazione cellulare siano notevolmente migliorate impiegando tappetini elettrofilati di P(BS80BDG20) piuttosto che dell'omopolimero PBS.

## 5-CONCLUSIONI

I biomateriali sono ormai diventati una componente essenziale per il miglioramento della salute e della qualità della vita. In ambito biomedicale i materiali che hanno suscitato il maggiore interesse sono quelli polimerici, grazie alle loro proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità, facile lavorabilità e compatibilità meccanica con il sito di applicazione.

In particolare, per quanto riguarda l'ingegneria tissutale, la classe di polimeri che si è rivelata più idonea è quella dei poliesteri alifatici. Ad oggi l'FDA ha consentito l'uso dei soli PCL, PLA, PGA e loro copolimeri; tali materiali non riescono però a soddisfare completamente l'ampia gamma di richieste. La sintesi di nuovi materiali polimerici con proprietà modulabili con la composizione chimica, biocompatibili, biodegradabili e i cui prodotti di degradazione non risultino tossici per l'organismo, può aprire nuove prospettive future.

In quest'ambito, il lavoro di ricerca svolto nella seguente Tesi ha portato a notevoli risultati applicativi.

Infatti, l'introduzione di atomi di ossigeno etero lungo la catena polimerica del PBS, si è rivelato uno strumento estremamente efficace nel modulare le proprietà finali del materiale; su tutte il grado di cristallinità, la velocità di cristallizzazione e l'idrofilicità e, conseguentemente, la velocità di biodegradazione.

L'ottimizzazione delle condizioni di elettrofilatura ha consentito la realizzazione di costrutti ingegnerizzati tridimensionali con morfologia controllata, i quali hanno mostrato proprietà meccaniche e biocompatibilità interessanti e significativamente diverse per i due polimeri oggetto della presente Tesi.

Gli studi eseguiti hanno inoltre consentito di comprendere come tale effetto non sia semplicemente correlato alle caratteristiche macroscopiche dello *scaffold*, ma sia intimamente dipendente dalle proprietà fisico-chimiche del materiale di partenza.

La strategia adottata si è dunque rivelata vincente: la copolimerizzazione ha infatti consentito di migliorare le proprietà non soddisfacenti del PBS rendendolo più adatto ad applicazioni biomedicali. Inoltre l'elettrofilatura ha dimostrato di essere una tecnica semplice e versatile, che consente di ottenere costrutti ingegnerizzati a morfologia controllata.

I risultati ottenuti rappresentano comunque solo il primo passo verso una reale applicazione di tali polimeri nell'ingegneria tissutale: si rendono infatti necessari innanzitutto studi *in vitro* più

approfonditi per analizzare, ad esempio, l'effetto delle proprietà meccaniche e morfologiche degli *scaffold* sul differenziamento cellulare, e analisi di tossicità dei prodotti di degradazione prima di poter passare a test *in vivo*.

## **BIBLIOGRAFIA**

F. Causa, P.A. Netti, L. Ambrosio, A multi-functional scaffold for tissue regeneration: The need to engineer a tissue analogue. *Biomaterials* 28 (2007) 5093–5099.V

Chiara Gualandi, Michelina Soccio, Enrica Saino, Maria Letizia Focarete, Nadia Lotti, Andrea Munari, Lorenzo Moronig and Livia Visai, Easily synthesized novel biodegradable copolyesters with adjustable properties for biomedical applications, *Soft Matter* (2012), 8, 5466.

Hajar Seyednejad, Amir H. Ghassemi, cornelus F. van Nostrum, Tina Vermonden, Wim E. Hennink, “Functional aliphatic polyesters for biomedical and pharmaceutical applications”, *Journal of Controlled Release* (2011), 152, 168-176.

Seema Agarwal, Joachim H. Wendorff, and Andreas Greiner, Progress in the Field of Electrospinning for Tissue Engineering Applications, *Advanced Materials* (2009), 21, 3343–3351.

M.S. Rizvi, P. Kumar, D.S. Katti, A. Pal, Mathematical model of mechanical behavior of micro/nanofibrous materials designed for extracellular matrix substitutes, *Acta Biomaterialia* (2012), 8, 4111–4122.

Seeram Ramakrishna, Kazutoshi Fujihara, Wee-Eong Teo, Teik-Cheng Lim, Zuwei Ma, An introduction to Electrospinning and Nanofibre, National University of Singapore, Copyright 2005 by *World Scientific Publishing*.

E. Lavik. R. Langer, Tissue engineering: current state and perspectives. *Appl. Microbiol Biotechnol* (2004), 65: 1-8.

Dunlop JWC and Fratzl P., Biological composites. *Annu Rev Mater Res* (2010), 40, 1 -24.

Saltzman W.M., Olbricht W.L., Building drug delivery into tissue engineering. *Nature Reviews Drug Discovery* (2002), 1, 177.

Kretlow J.D., Mikos A.G., From material to tissue: biomaterial development, scaffold fabrication, and tissue engineering. *AIChE Journal* (2008), 54, 3048.

Appelman TP, Mizrahi J, Elisseeff JH, Seliktar D. The differential effect of scaffold composition and architecture on chondrocyte response to mechanical stimulation. *Biomaterials* (2009), 30, 518–25.

Jang J.H., Castano O, Kim HW. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2009), 61, 1065.

Fournier E., Passirani C., Montero-Menei C.N., Benoit J.P. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. *Biomaterials* (2003); 24; 3311-3331.

Karande T.S. and Agrawal C.M., Functions and requirements of synthetic scaffolds in tissue engineering. In: Laurencin CT and Nair LS editors. Nanotechnology and tissue engineering: the scaffold. *CRC Press, Taylor & Francis Group*, (2008), pp. 53-86.

Laurencin C.T., Elgendy H., The biocompatibility and immunotoxicity evaluation of implanted controlled release systems. *J. Controlled Release*, (1994); 57: 107-113.

Northup S.J., Johnson H.J., Seagraves P.A., M. Atallah, P.J., Garvin, L. Lin, T. D. Darby, Biocompatibility test procedures for materials evaluation *in vitro*. II. Objective methods of toxicity assessment, *Journal of Biomedical Materials Research* (2004), Volume 19, Issue 5, pages 489–508.

Siddarth D., Subramony, Booth R., Dargis, Mario Castillo, Evren U., Azeloglu, Michael S. Tracey, Amanda Su, Helen H. Lu., The guidance of stem cell differentiation by substrate alignment and mechanical stimulation, *Biomaterials xxx*, (2012) 1e12.

Ratner B.D., Introduction to Testing of Biomaterials. *Biomaterials Science*, Edition, (2004), cap. 5.

Anderson J.M. and Schoen F.J. In Vivo Assessment of Tissue Compatibility. *Biomaterials Science*, 2<sup>nd</sup> Edition, (2004), cap. 5, pp. 360-366.

H. Fong, I. Chun, D. H. Reneker, *Polymer*, (1999), 40, 4585-4592.

J.S. Choi, S. W. Lee, L. Jeong, S. Bae, B. C. Min, J. H. Youk, W. H. Park, *International Journal of Biological Macromolecules* (2004), 34, 249-256.

S.L. Shenoy, W.D. Bates, H.L. Frisch, G.E. Wnek, *Polymer*, (2005), 46, 3372-3384.

X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B. S. Hsiao, B. Chu, *Polymer* (2002), 43, 4403-4412.

M.S. Rizvi, P. Kumar, D.S. Katti, A. Pal, Mathematical model of mechanical behavior of micro/nanofibrous materials designed for extracellular matrix substitutes, *Acta Biomaterialia* (2012), 8, 4111–4122.