

# POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



## ESPANSI POLIURETANICI FUNZIONALIZZATI CON PIME PER *WOUND-DRESSING*

**Relatore:** Prof.ssa Maria Cristina Tanzi

**Correlatori:** Prof.ssa Silvia Farè

Dott. Paolo Tarsini

Tesi di laurea di:

Alice Girelli

Matricola 921025

Anno Accademico 2020-2021



# INDICE DI CONTENUTO

---

SOMMARIO	XIII
ABSTRACT	XXI
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	1
1.1    I Poliuretani	1
1.1.1    I Poliuretani lineari a blocchi	1
1.1.2    Le schiume poliuretatiche	5
1.1.2.1    Reagenti per la preparazione degli espansi	6
1.1.2.1.1    Diisocianati	6
1.1.2.1.2    Polioli	8
1.1.2.1.3    Estensori di catena e <i>cross-linker</i>	10
1.1.2.1.4    Agenti espandenti	11
1.1.2.1.5    Catalizzatori	12
1.1.2.1.6    Surfattanti (Tensioattivi)	13
1.1.2.1.7    L'indice di ossidrilico e funzionalità	14
1.1.2.2    Schiume poliuretatiche flessibili e rigide	15
1.1.2.3    Applicazioni nell'ambito dell'Ingegneria Tissutale	17
1.1.3    PIME	10
1.1.4    Schiume poliuretatiche impiegate	11
1.1.4.1    Sintesi delle schiume poliuretatiche	11
1.1.4.1.1    Schiuma PUF-base	11
1.1.4.1.2    Schiume PUF-2kP e PUF-3kP	12
1.1.4.1.3    Schiuma PUF-T80	13
1.1.4.1.4    Schiuma PUF-TP80	13
	I

1.1.4.2	Preparazione dei film poliuretanicici impiegati	14
1.1.4.3	Caratterizzazione delle schiume	16
1.1.4.3.1	Valutazione della densità apparente	16
1.1.4.3.2	Analisi tramite Microscopio Elettrico a Scansione (SEM)	17
1.1.4.3.3	Analisi tramite Microtomografia Computerizzata ( $\mu$ -CT)	21
1.1.4.3.4	Spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier (FT-IR)	23
1.1.4.3.5	Rigonfiamento in acqua a 37°C	25
1.1.4.3.6	Prove meccaniche a compressione	26
1.1.4.3.6.1	Prove meccaniche a compressione fino al 95% di deformazione	26
1.1.4.3.6.2	Prove meccaniche cicliche a compressione	27
1.2	<i>Wound healing e Wound dressing</i>	30
1.2.1	Lesioni della cute	30
1.2.2	Sistemi di medicazione ( <i>wound dressing</i> )	33
1.2.3	Ruolo dell'eparina nel <i>wound healing</i>	35
	SCOPO DELLA TESI	37
	CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI	39
2.1	Materiali	39
2.1.1	Simulated Wound Fluid (SWF)	39
2.1.2	Soluzione di eparina	41
2.2	Metodi	42
2.2.1	Prova di assorbimento in SWF	42
2.2.2	Prova di ritenzione dei fluidi	43
2.2.3	Spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier	44

2.2.4	Prove di adesione batterica	50
2.2.4.1	Realizzazione della coltura batterica	50
2.2.4.2	Trattamento con soluzione di eparina	53
2.2.4.3	Incubazione con coltura batterica	54
2.2.4.4	Saggio Alamar Blue	57
2.2.5	Analisi Statistica	59
CAPITOLO 3: RISULTATI		60
3.1	Prove di assorbimento in SWF	60
3.1.1	Espansi PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-base	61
3.1.2	Espansi PUf-TP80 e PUf-T80	64
3.2	Prove ritenzione dei fluidi	67
3.2.1	Espansi PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-base	68
3.2.2	Espansi PUf-TP80 e PUf-T80	78
3.3	Spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier	86
3.3.1	FT-IT in ATR	90
3.3.1.1	Spettri IR in ATR dei film base e film PIME trattati con PBS	91
3.3.1.2	Spettri IR in ATR dei film PIME a confronto	93
3.3.1.3	Spettri IR in ATR dei film base a confronto	95
3.3.2	FT-IR in trasmissione	97
3.3.2.1	Spettri IR in trasmissione dei film base e film PIME trattati con PBS	97
3.3.2.2	Spettri IR in trasmissione dei film PIME a confronto	99
3.3.2.3	Spettri IR in trasmissione dei film base a confronto	101
3.4	Prove di adesione batterica	103

CAPITOLO 4: DISCUSSIONE	108
4.1 Prove di assorbimento in SWF	108
4.2 Prove di ritenzione dei fluidi	114
4.3 Spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier	123
4.4 Prove di adesione batterica	127
CAPITOLO 5: CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI	131
BIBLIOGRAFIA	133

## Indice delle figure

---

Figura I struttura chimica del PIME [8].....	XIV
Figura II valore di assorbimento in SWF alle 24h.....	XVII
Figura III valore di assorbimento in SWF a plateau.....	XVII
Figura IV deformazione massima a 24h e a plateau dei campioni di schiume PU.....	XVIII
Figura V risultati saggio Alamar Blue 24h delle prove di adesione batterica.....	XX
Figure VI Chemical structure of PIME [8].....	XXI
Figure VII Absorption value in SWF at 24h.....	XXIV
Figure VIII Absorption value in SWF at plateau.....	XXV
Figure IX Maximum deformation at 24h and at plateau for all PU foams samples.....	XXVI
Figure X Alamar Blue assay at 24h for bacterial adhesion test.....	XXVII
Figura 1.1.1 Legame uretanico [1].....	1
Figura 1.1.2 Struttura a blocchi di un generico polimero poliuretano a blocchi dove si può apprezzare l'alternanza tra segmenti hard e segmenti soft (riadattato da [1]).....	2
Figura 1.1.3 Principali applicazioni biomedicali dei poliuretani [1].....	4
Figura 1.1.4 Esempio di ROP per ottenere un poliesteri alifatico quale $\epsilon$ - caprolattone [19].....	9
Figura 1.1.5 Formula generale dei policarbonatodioli [3].....	10
Figura 1.1.6 Grafico sforzo-deformazione indicativo di schiume poliuretane flessibili, semiflessibili e rigide [2].....	16
Figura 1.1.7 Struttura chimica del PIME [8].....	10
Figura 1.1.8 Immagini al SEM dell'espanso PUf-3KP: a) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 40x; b) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 100x; c) sezione ad un ingrandimento 40x; d) sezione ad un ingrandimento 100x [8].....	18
Figura 1.1.9 Immagini al SEM dell'espanso PUf-2KP: a) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 40x; b) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 100x; c) sezione ad un ingrandimento 40x; d) sezione ad un ingrandimento 100x [8].....	18
Figura 1.1.10 Immagini al SEM dell'espanso PUf-base: a) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 40x; b) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 100x; c) sezione ad un ingrandimento 40x; d) sezione ad un ingrandimento 100x [8].....	19
Figura 1.1.11 Immagini al SEM dell'espanso PUf-TP80: a) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 40x; b) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 100x; c) sezione ad un ingrandimento 40x; d) sezione ad un ingrandimento 100x [8].....	20

Figura 1.1.12 Immagini al SEM dell'espanso PUf-T80: a) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 40x; b) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 100x; c) sezione ad un ingrandimento 40x; d) sezione ad un ingrandimento 100x [8] .....	20
Figura 1.1.13 modello tridimensionale ricostruito tramite $\mu$ -CT di un campione di espanso PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-base [8] .....	23
Figura 1.1.14 modello tridimensionale ricostruito tramite $\mu$ -CT di un campione di espanso PUf-TP80 e PUf-T80 [8] .....	23
Figura 1.1.15 Ingrandimento dello spettro IR tra $1800\text{cm}^{-1}$ e $1000\text{cm}^{-1}$ dei film in quattro zone differenti di un singolo campione: le frecce indicano le bande comprese tra $1350\text{cm}^{-1}$ e $1100\text{cm}^{-1}$ [8] .....	24
Figura 1.1.16 Grafici relativi al modulo elastico, modulo di collasso, Area di isteresi, sforzo di snervamento per ogni tipologia di schiuma in funzione dei cicli di carico [8] .....	29
Figura 1.2.1 a) fase infiammatoria; b) fase proliferativa; c) fase di rimodellamento [25].....	32
Figura 1.2.2 Generica rappresentazione della struttura chimica dell'eparina [7] .....	36
Figura 2.1.1 A sinistra sono riportati i tre reagenti principali per la realizzazione del Simulated Wound Fluid: cloruro di calcio, cloruro di sodio, TRIZMA. A destra è riportata la soluzione SWF finale realizzata a $\text{pH}=7,5$ .....	40
Figura 2.1.2 pH-metro (Conductivity Meter 4510, Jenway) impiegato per controllare il pH della soluzione .....	41
Figura 2.1.3 Complesso formato da siringa e filtro adoperati per filtrare la soluzione di eparina ....	41
Figura 2.2.1 Stufa impiegata sia per scaldare la soluzione SWF a $37^{\circ}\text{C}$ sia per riporre i campioni durante la prova di assorbimento (a sinistra); bilancia impiegata per eseguire le pesate a differenti <i>time point</i> per le prove di assorbimento e per le prove di ritenzione dei fluidi (a destra) .....	43
Figura 2.2.2 Strumento DMA (Q800 DMA, Waters <sup>TM</sup> , TAs Instruments) impiegato per esercitare una compressione di $0,419\text{N}$ sui campioni nelle prove di ritenzione dei fluidi.....	44
Figura 2.2.3 Schemi rappresentativi dei movimenti di <i>stretching</i> simmetrico e asimmetrico e di <i>bending</i> nel piano di <i>scissoring</i> e <i>rocking</i> e fuori dal piano di <i>wagging</i> e <i>twisting</i> .....	46
Figura 2.2.4 Soluzione PBS a $\text{pH}=7,4$ .....	47
Figura 2.2.5 a): campioni dei film PIME e film base immersi in 2 ml di soluzione PBS; b): campioni dei film PIME (A1P) e film base (B1P) immersi in 2ml di PBS; campioni dei film PIME (A2EF) e film base (B2EF) e in soluzione di eparina 0,5% w/v in PBS filtrata; campioni dei film PIME (A3E e A4E) e film base (B3E e B4E) in soluzione di eparina 0,5% w/v in PBS non filtrata .....	49
Figura 2.2.6 Cappa biologica a flusso laminare impiegata per le prove di adesione batterica.....	50



Figura 2.2.7 Provetta contenente esclusivamente il terreno di coltura LB (campione negativo a sinistra) provetta contenete la coltura batterica (campione effettivo, a destra). È possibile notare che la soluzione contenuta nella seconda provetta, rappresentante il campione di prova, presenta una torbidità maggiore della prima a conferma del fatto che sia avvenuta con successo la proliferazione delle cellule batteriche .....	51
Figura 2.2.8 a) incubatore con agitatore impiegato per lasciare in agitazione le due provette rappresentanti il campione di prova (terreno di coltura LB e batteri) e il campione negativo (terreno di coltura LB) per una notte a 160 rpm; b) spettrofotometro NanoDrop a 600 nm impiegato per valutare quantitativamente la torbidità delle soluzioni del campione di prova e campione negativo; c) vortex impiegato per agitare per 5 secondi le soluzioni contenute nelle provette D1, D2, e D3.....	52
Figura 2.2.9 a) campioni PUF-base posti in provette da 1 a 10 e PUF-3KP posti in provette da 11 a 20 a seguito del trattamento di pulizia e disinfezione e, pertanto, prima del trattamento di eparinizzazione; b) immagine rappresentativa di un campione (B1) in provetta al medesimo stadio .....	54
Figura 2.2.10 a) rappresentazione schematica del riempimento dei pozzetti della multiwell da 96 pozzetti dove: PBS indica la soluzione di PBS sterile (200 µl); LB indica il terreno di coltura LB e i numeri indicano i relativi volumi espressi in microlitri; BAT indica la coltura batterica; infine, sono riportate le sigle dei campioni dove B indica i campioni PUF-base trattati con solo PBS, Be indica i campioni PUF-base trattati con eparina, K indica i campioni PUF-3KP trattati con solo PBS e Ke indica i campioni PUF-3KP trattati con eparina; b) immagine effettiva della multiwell da 96 pozzetti prima di essere posta nella camera di umidificazione.....	56
Figura 2.2.11 Rappresentazione schematica della multiwell da 96 pozzetti in cui le prime due righe rappresentano i pozzetti dedicati alla realizzazione della curva standard; la terza e quarta riga rappresentano la curva standard per il controllo a partire dal terreno di coltura LB; i pozzetti riempiti con gli eluati dei campioni sono rappresentati dal numero corrispondente al volume di eluato e la sigla relativa al campione dove B indica i campioni PUF-base trattati con solo PBS, Be indica i campioni PUF-base trattati con eparina, K indica i campioni PUF-3KP trattati con solo PBS e Ke indica i campioni PUF-3KP trattati con eparina; infine, i pozzetti contrassegnati con il simbolo “+” indicano il controllo positivo e quelli con il simbolo “-” il controllo negativo .....	59
Figura 3.1.1 Assorbimento percentuale delle schiume PUF-3KP, PUF-2KP e PUF-base in liquido SWF valutato nelle 24h.....	61
Figura 3.1.2 Assorbimento percentuale delle schiume PUF-3KP, PUF-2KP e PUF-base in liquido SWF valutato in 30 giorni .....	63

Figura 3.1.3 Assorbimento percentuale delle schiume PUf-TP80 e PUf-T80 in liquido SWF valutato nelle 24h.....	64
Figura 3.1.4 Assorbimento percentuale delle schiume PUf-TP80 e PUf-T80 in liquido SWF valutato in 30 giorni.....	66
Figura 3.2.1 Valori di assorbimento percentuale e di deviazioni standard degli espansi PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-base trascorse 24h prima (ass) e dopo (rit) l'applicazione di una forza pari a 0,419 N per 20 secondi .....	69
Figura 3.2.2 Valori di assorbimento percentuale e di deviazione standard degli espansi PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-base al raggiungimento del plateau prima (ass) e dopo (rit) l'applicazione di una forza costante pari a 0,419 N per 20 secondi .....	71
<b>Figura 3.2.3</b> Deformazione a seguito della compressione dell'espanso PUf-3KP a 24h (in alto) e a plateau (in basso) .....	73
Figura 3.2.4 Deformazione a seguito della compressione dell'espanso PUf-2KP a 24h (in alto) e a plateau (in basso) .....	75
Figura 3.2.5 Deformazione a seguito della compressione dell'espanso PUf-base a 24h (in alto) e a plateau (in basso) .....	77
Figura 3.2.6 Valori di assorbimento percentuale e di deviazione standard degli espansi PUf-TP80 e PUf-T80 trascorse 24h prima (ass) e dopo (rit) l'applicazione di una forza costante pari a 0,419 N per 20 secondi .....	79
Figura 3.2.7 Valori di assorbimento percentuale e di deviazione standard degli espansi PUf-TP80 e PUf-T80 al raggiungimento del plateau prima (ass) e dopo (rit) l'applicazione di una forza costante pari a 0,419 N per 20 secondi .....	81
Figura 3.2.8 Deformazione a seguito della compressione dell'espanso PUf-TP80 a 24h (in alto) e a plateau (in basso) .....	83
Figura 3.2.9 Deformazione a seguito della compressione dell'espanso PUf-T80 a 24h (in alto) e a plateau (in basso) .....	85
Figura 3.3.1 Spettri IR in ATR a diversi ingrandimenti del film PIME e film base trattati con PBS92	
Figura 3.3.2 Spettri IR in ATR a diversi ingrandimenti dei film PIME trattati con PBS, eparina filtrata ed eparina non filtrata a confronto .....	94
Figura 3.3.3 Spettri IR in ATR a diversi ingrandimenti dei film base trattati con PBS, eparina filtrata ed eparina non filtrata a confronto .....	96
Figura 3.3.4 Spettri IR in trasmissione a diversi ingrandimenti del film PIME e film base trattati con PBS .....	98

Figura 3.3.5 Spettri IR in trasmissione a diversi ingrandimenti dei film PIME trattati con PBS, eparina filtrata ed eparina non filtrata a confronto .....	100
Figura 3.3.6 Spettri IR in trasmissione a diversi ingrandimenti dei film base trattati con PBS, eparina filtrata ed eparina non filtrata a confronto .....	102
Figura 3.4.1 Valore medio e di deviazione standard della attività metabolica dei batteri (espressa in RFU 100 $\mu$ L/500) dei campioni PUF-base e PUF-3KP trattati con eparina a confronto con quelli non trattati (controlli).....	104
Figura 3.4.2 Valore percentuale di attività metabolica dei batteri dei campioni PUF-base e PUF-3KP eparinizzati a confronto con i campioni non eparinizzati .....	105
Figura 3.4.3 Valore percentuale di attività metabolica dei batteri dei campioni Puf-base non trattato a confronto con quello dei campioni PUF-base trattati con eparina (PUF-base ep), PUF-3KP trattati con eparina (PUF-3KP ep) e PUF-3KP non trattati (PUF-3KP).....	106
Figura 4.1.1 Assorbimento percentuale di tutti gli espansi a confronto in liquido SWF valutato in 24h .....	109
Figura 4.1.2 Valore di assorbimento percentuale (media e deviazione standard) del fluido SWF per tutti gli espansi alle 24h. Il simbolo * indica i valori per cui è stata rilevata una differenza statistica significativa ( $p < 0.05$ ).....	110
Figura 4.1.3 Assorbimento percentuale di tutti gli espansi in fluido SWF fino a 30 giorni di immersione.....	111
Figura 4.1.4 Valori di assorbimento percentuale (media e deviazione standard) del fluido SWF per ogni espanso a plateau. Il simbolo * indica i valori per cui è stata rilevata una differenza significativa da un punto di vista statistico ( $p < 0.05$ ).....	112
Figura 4.1.5 Valori di assorbimento percentuale (media e deviazione standard) per tutti gli espansi dopo 30 giorni di immersione in fluido SWF .....	112
Figura 4.1.6 Valore di assorbimento percentuale medio di tutti gli espansi in acqua deionizzata [8] .....	113
Figura 4.2.1 Valore di assorbimento percentuale (media e deviazione standard) per tutti gli espansi dopo la compressione a 24h. Il simbolo * indica i valori per cui è stata riscontrata una differenza significa statisticamente ( $p < 0.05$ ) .....	114
Figura 4.2.2 Differenza percentuale (media e deviazione standard) tra i valori di assorbimento percentuale degli espansi prima e dopo la compressione a 24h.....	115
Figura 4.2.3 Valore di assorbimento percentuale (media e deviazione standard) per tutti gli espansi dopo la compressione a plateau di assorbimento .....	116

Figura 4.2.4 Differenza percentuale (media e deviazione standard) tra i valori di assorbimento percentuale degli espansi prima e dopo la compressione a plateau. Il simbolo * indica i valori per cui è stata riscontrata una differenza statistica significativa ( $p < 0.05$ ) .....	117
Figura 4.2.5 Valori di deformazione massima (media e deviazione standard) a 24h e a plateau a confronto di tutti gli espansi. Per l'espanso PUF-3KP sono stati considerati tutti e tre i campioni valutati.....	118
Figura 4.2.6 Valori di deformazione massima (media e deviazione standard) a 24h e a plateau a confronto di tutti gli espansi. Per l'espanso PUF-3KP sono stati considerati solo due campioni ....	118
Figura 4.2.7 Valore medio e di deviazione standard di deformazione massima degli espansi alle 24h. Il simbolo * indica i valori per cui è stata determinata una differenza statistica significativa ( $p < 0.05$ ) .....	121
Figura 4.2.8 Valore medio e di deviazione standard di deformazione massima degli espansi a plateau. Il simbolo * indica i valori per cui è stata determinata una differenza statistica significativa ( $p < 0.05$ ) .....	121
Figura 4.3.1 Spettri IR in ATR e in trasmissione a confronto tra film PIME e film base trattati con PBS .....	125
Figura 4.3.2 Spettro IR in trasmissione del film PIME e film base [8] .....	126
Figura 4.4.1 Risultati del saggio Alamar Blue a 24h di Escherichia Coli sugli espansi PUF-base e PUF-3KP: A) scala lineare B) scala logaritmica .....	128
Figura 4.4.2 Risultati del saggio MTT dopo 24h sui policarbonato uretani Carbothane®, Bionate® e Bionate®PIME: A) <i>S. aureus</i> Cowan, B) <i>S. aureus</i> 8325-4 C) <i>S. epidermidis</i> RP62A D) <i>S. epidermidis</i> HB. * indica un numero di batteri inferiore al valore limite della curva di calibrazione ( $< 10^4$ cell) [10] .....	129

## Indice delle tabelle

---

Tabella 1.1.1 Struttura chimica degli isomeri di TDI e MDI (adattamento da [2]) .....	6
Tabella 1.1.2 Formula chimica di diisocianati impiegati per la realizzazione di PU biodegradabili (adattamento da [2]) .....	7
Tabella 1.1.3 Unità ripetitiva di alcuni poliesteredioli (adattamento da [2]) .....	8
Tabella 1.1.4 Esempi di polieteredioli (riadattata da [2]) .....	9
Tabella 1.1.5 Estensori di catena più comunemente impiegati .....	11
Tabella 1.1.6 Esempi di espansi poliuretanicici impiegati per la rigenerazione dei tessuti .....	9
Tabella 1.1.7 Componenti miscela e catalizzatore con relative percentuali impiegati per ciascuna tipologia di schiuma impiegata [8] .....	15
Tabella 1.1.8 Valore di densità media per le differenti tipologie di espanso [8] .....	16
Tabella 1.1.9 Diametri medio dei pori, spessore medio dei pori e porosità aperta e chiusa di ciascuna tipologia di espanso [8] .....	21
Tabella 1.1.10 Valore di <i>Water Uptake</i> dopo 24h e al plateau per ciascuna tipologia di espanso [8] .....	25
Tabella 1.1.11 Valori del modulo elastico (E), modulo di collasso (m), sforzo relativo al 10% di deformazione ( $\sigma_{10\%}$ ), sforzo di snervamento $\sigma_{sn}$ , deformazione di snervamento $\varepsilon_{sn}$ e, infine, lo sforzo massimo $\sigma_{max}$ corrispondente al 95% di deformazione per tutte le tipologie di espanso [8] .....	27
Tabella 3.1.1 Media e deviazione standard dell'assorbimento in SWF raggiunto alle 24h degli espansi PUF-3KP, PUF-2KP e PUF-base .....	62
Tabella 3.1.2 Media e deviazione standard dell'assorbimento raggiunto a plateau in SWF da parte degli espansi PUF-3KP, PUF-2KP e PUF-base .....	63
Tabella 3.1.3 Media e deviazione standard dell'assorbimento raggiunto alle 24h in SWF da parte degli espansi PUF-TP80 e PUF-T80 .....	65
Tabella 3.1.4 Media e deviazione standard dell'assorbimento in SWF raggiunto a plateau dagli espansi PUF-TP80 e PUF-T80 .....	66
Tabella 3.2.1 Media e deviazione standard degli espansi PUF-3KP, PUF-2KP, PUF-base dell'assorbimento in SWF a 24h prima e dopo l'applicazione di una forza pari a 0,419 N per 20 sec. Nella terza colonna, è riportata la differenza percentuale tra i due stati rigonfiati .....	69
Tabella 3.2.2 Media e deviazione standard degli espansi PUF-3KP, PUF-2KP, PUF-base dell'assorbimento in SWF a plateau prima e dopo la compressione. Nell'ultima colonna è riportata la differenza percentuale tra i due stati rigonfiati .....	71

Tabella 3.2.3 Media e deviazione standard degli espansi PUf-TP80 e PUf-T80 dell'assorbimento in SWF a 24h prima e dopo la compressione. Nella terza colonna è riportata la differenza percentuale tra i due stati rigonfiati .....	79
Tabella 3.2.4 Media e deviazione standard degli espansi PUf-TP80 e PUf-T80 dell'assorbimento in SWF al raggiungimento del plateau prima e dopo la compressione. Nella terza colonna è riportata la differenza percentuale tra i due stati rigonfiati .....	81
Tabella 3.3.1 Attribuzioni delle bande relative ai moti vibrazionali del PIME [9] .....	87
Tabella 3.3.2 Attribuzioni delle bande ai moti vibrazionali di schiume PU che presentano la composizione chimica degli espansi realizzati senza PIME [8] .....	87
Tabella 3.3.3 Attribuzione delle bande IR dell'eparina [31] .....	88
Tabella 3.4.1 Valori di RFU medi e deviazione standard per ogni tipologia di espanso trattato o meno con eparina; valore percentuale considerando come controllo il valore di PUf-base non trattato; valore percentuale considerando come controllo i corrispettivi campioni di espanso non trattati con eparina .....	107
Tabella 4.2.1 Valori di differenza percentuale e di deformazione massima alle 24h, valori di differenza percentuale e valore di deformazione massima a plateau per tutti i campioni di PUf-3KP .....	120
Tabella 4.4.1 Composizione chimica dei policarbonato uretani [10] .....	129

## SOMMARIO

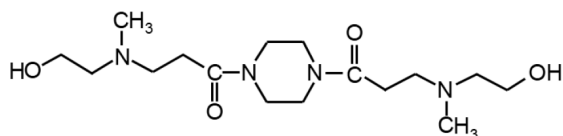
### Introduzione

Gli espansi poliuretani (PU) si ottengono dal bilanciamento di una reazione di polimerizzazione (*gelling*) e di una reazione di espansione (*blowing*); come reagenti vengono impiegati diisocianati, polioli, estensori di catena e *cross-linkers*, agenti espandenti, catalizzatori e, se necessario, anche surfattanti. L'aspetto peculiare delle schiume PU è la possibilità di ottenere caratteristiche morfologiche e meccaniche differenti semplicemente modificando la tipologia di reagenti impiegati durante la reazione di sintesi. Ciò consente di realizzare scaffold in grado di soddisfare i requisiti di diverse tipologie di tessuti come, ad esempio, il tessuto osseo, il tessuto cartilagineo, fibre nervose e tessuti molli [1] [2] [3]. In particolare, gli espansi PU vengono impiegati nell'ambito del *wound healing* per la realizzazione di sistemi di medicazione (*wound dressing*) primari e secondari [4] [5].

Ad oggi, uno degli aspetti più critici per la guarigione delle lesioni croniche della

cute è la presenza di batteri; per cui sono stati studiati diversi sistemi di *dressing* che permettessero una riduzione di adesione e proliferazione batterica, tra cui la funzionalizzazione con eparina [6] [7].

In un precedente lavoro di tesi [8] sono stati realizzati e caratterizzati espansi PU funzionalizzati con la molecola PIME (PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-TP80) a confronto con i relativi controlli (PUf-base e PUf-T80). Il PIME è un diammino-diammide-diolo progettato opportunamente come estensore di catena per la sintesi di poliuretani ed è in grado di interagire l'eparina (Figura I). Nella struttura chimica del PIME sono presenti due gruppi ossidrilici (-OH) alle estremità, che permettono il legame covalente con le catene poliuretatiche, e gruppi ammidici alternati a gruppi amminici terziari alifatici che, una volta protonati a pH fisiologico, permettono di creare interazioni ioniche ed elettrostatiche con i gruppi solfonici e carbossilici dell'eparina (carichi negativamente a pH fisiologico) [9] [10] [11].



**Figura I** struttura chimica del PIME [8]

In letteratura è stata ampiamente dimostrata l'abilità del PIME, presente sulla superficie del materiale, di complessare in modo stabile l'eparina mantenendone la bioattività [10] [12]. Test di citotossicità indiretta e citocompatibilità diretta hanno dimostrato la biocompatibilità del PIME con un incremento dell'adesione e della proliferazione cellulare [13] [14] [15]. Policarbonato uretani contenenti PIME (Bionate®PIME) e funzionalizzati con eparina hanno dimostrato una effettiva diminuzione dell'adesione e proliferazione batterica [10].

Lo scopo del presente lavoro di tesi è consistito nel valutare se gli espansi PU contenenti PIME realizzati nel precedente lavoro di tesi e funzionalizzati con eparina possano essere impiegati favorevolmente per la realizzazione di *dressing* primari per la cura di ulcere e ustioni.

## Materiali e Metodi

### Simulated Wound Fluid (SWF)

Per condurre le prove di assorbimento degli espansi è stata realizzata una soluzione che mimasse la composizione chimica dell'essudato, definita *Simulated Wound Fluid* (SWF). Tale soluzione è stata composta da una soluzione in acqua deionizzata contenente cloruro di calcio 0,02 M, cloruro di sodio 0,4 M, tris (idrossimetil) amminometano 0,08 M e portata a pH fisiologico (pH=7.5) impiegando una soluzione di HCl 2M.

### Soluzione di eparina

Per condurre l'analisi di spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier in ATR (Attenuated Total Reflectance) e in trasmissione e le prove di adesione batterica, è stata realizzata una soluzione di eparina 0,5% w/v in PBS sterile impiegando eparina sodica da mucosa intestinale porcina (H3393, Sigma Aldrich). Per garantire la sterilità della soluzione richiesta per le prove di adesione, tutti i passaggi sono stati eseguiti sotto cappa biologica (classe II)



a flusso laminare e la soluzione è stata filtrata tramite l'impiego di un filtro (Primo® Syringe Filter, Euroclone) e di una siringa (10 ml SOFT-JECT®, HSW®).

### Caratterizzazione degli espansi

Le prove di assorbimento in SWF sono state condotte su tre campioni cilindrici ( $\phi=10\text{mm}$ ,  $h=4\text{mm}$ ) per ogni tipologia di schiuma. Come protocollo di pulizia e disinfezione i campioni sono stati immersi in etanolo puro per 48h e poi lasciati essiccare all'aria. Ciascun campione è stato pesato allo stato anidro ( $W_0$ ) e, poi, immerso in 2ml di soluzione SWF riscaldata a  $37^\circ\text{C}$ . In seguito, i campioni sono stati posti all'interno di una stufa a  $37^\circ\text{C}$  e pesati ( $W_1$ ) a differenti *time point* (15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 24, 72h, 8gg, 10gg, 15gg e 30gg). L'assorbimento è stato valutato per mezzo della seguente equazione:

$$\text{assorbimento} = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100$$

A 24h e a plateau (192h) sono stati condotti dei test di ritenzione dei fluidi sottoponendo i campioni ad una forza di

compressione pari a 0,419 N per 20 sec tramite analizzatore dinamico meccanico (Q800 DMA, Waters<sup>TM</sup>, TA<sub>s</sub> Instruments). Successivamente, ciascun campione è stato pesato ( $W_2$ ) e la ritenzione è stata valutata per mezzo della seguente equazione:

$$\text{ritenzione} = \frac{W_2 - W_0}{W_0} \times 100$$

I valori ottenuti sono stati poi confrontati con i rispettivi valori di assorbimento raggiunti alle 24h e a plateau (192h) ed è stata valutata la differenza percentuale. Sono stati ricavati anche i grafici dell'andamento della deformazione tramite l'impiego del software Advantage/Universal Analysis (UA) (Waters<sup>TM</sup>, TA<sub>s</sub> Instruments).

Per valutare l'effettiva presenza dell'eparina, è stata condotta un'analisi di spettroscopia ad infrarossi in trasformata di Fourier (FT-IR) in ATR e in trasmissione. Sono stati realizzati quattro campioni ( $\phi=12\text{mm}$ ) per tipologia di film (film PIME e film base) di cui uno è stato trattato solo con PBS, uno con una soluzione di eparina filtrata

e due con soluzione di eparina non filtrata. Il trattamento di pulizia e disinfezione adottato per i campioni è uguale al precedente, ossia immersione in etanolo puro per 48h e asciugatura all'aria.

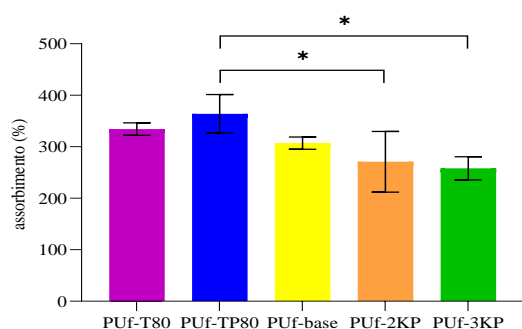
Infine, sono state condotte delle prove di adesione batterica esclusivamente sull'espanso PUf-3KP e sul relativo controllo (PUf-base), in quanto nel precedente lavoro di tesi tale schiuma si era distinta in termini di proprietà meccaniche e di vitalità cellulare. Per ogni espanso sono stati realizzati 10 campioni ( $\phi=5\text{mm}$ ,  $h=1\text{mm}$ ) che sono stati trattati con etanolo puro per 48h e lasciati essiccare all'aria, sempre come trattamento di pulizia e disinfezione. Successivamente, metà dei campioni per tipologia di schiuma è stata immersa per una notte in PBS sterile ( $500\mu\text{l}$ ) mentre l'altra metà in  $500\mu\text{l}$  di soluzione di eparina 0,5% w/v sterile. Infine, tutti i campioni sono stati incubati con la sospensione batterica realizzata impiegando il ceppo batterico *Escherichia Coli* (JM109) e il terreno di coltura LB ottenendo una concentrazione batterica pari a  $2,5 \times 10^4$

CFU/ml. Dopo 24h è stato valutato il metabolismo delle cellule batteriche tramite saggio Alamar Blue impiegando lo spettrofotometro (GENios Plus®, Tecan).

## Risultati e Discussioni

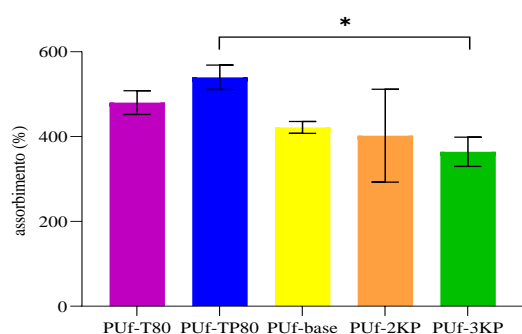
### Prove di assorbimento

Da 0h a 24h di immersione in SWF l'espanso PUf-TP80 ha mostrato un valore medio di assorbimento maggiore rispetto a tutti gli altri espansi, seguito, nell'ordine, dall'espanso PUf-T80, dall'espanso PUf-base e, infine, dagli espansi PUf-2KP e PUf-3KP. Nello specifico, l'espanso PUf-3KP ha presentato il valore medio di assorbimento più basso. Allo stato di rigonfiamento alle 24h è stata evidenziata una differenza significativa ( $p<0.05$ ) tra l'espanso PUf-TP80 e l'espanso PUf-2KP e tra l'espanso PUf-TP80 e PUf-3KP (Figura II).



**Figura II** valore di assorbimento in SWF alle 24h

Al plateau (192h), tra gli espansi caratterizzati dalla presenza del PIME, unicamente la schiuma PUF-TP80 ha raggiunto un valore medio superiore rispetto al controllo (PUF-T80). Statisticamente è stata rilevata una differenza significativa ( $p < 0.05$ ) esclusivamente tra l'espanso PUF-TP80 e l'espanso PUF-3KP (Figura III).



**Figura III** valore di assorbimento in SWF a plateau

È bene evidenziare che a plateau in SWF non è stata rilevata alcuna differenza significativa ( $p > 0.05$ ) tra gli

espansi caratterizzati dalla presenza del PIME rispetto ai relativi controlli. Anche in acqua deionizzata [8] si erano ottenuti risultati analoghi, con una elevata variabilità dei valori, in cui gli espansi caratterizzati dalla presenza di PIME avevano mostrato dei valori medi di rigonfiamento superiori rispetto ai rispettivi controlli. Il differente comportamento in acqua deionizzata e in SWF potrebbe essere attribuito alla forza ionica della soluzione SWF.

### Prove di ritenzione dei fluidi

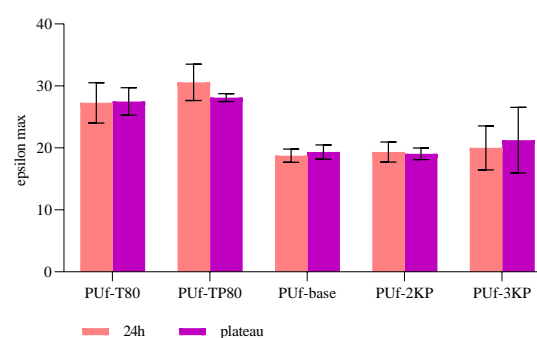
A seguito delle prove di compressione dopo 24h di assorbimento tutti gli espansi hanno mantenuto il medesimo andamento mostrato prima della compressione per cui l'espanso PUF-TP80 è stato l'unico a riportare un valore di assorbimento maggiore rispetto al relativo controllo. Per quanto riguarda la differenza percentuale tra prima e dopo la compressione a 24h, non è stata rilevata alcuna differenza significativa ( $p > 0.05$ ) da un punto di vista statistico tra tutti gli espansi.

A plateau (192h) i risultati si sono mostrati coerenti con quanto emerso alle

24h. In questo caso non è stata rilevata alcuna differenza significativa ( $p>0.05$ ) per i valori di ritenzione (assorbimento percentuale a seguito della compressione), mentre per i valori di differenza percentuale tra prima e dopo la compressione a plateau (192h) esclusivamente l'espanso PUF-3KP ha riportato un valore di differenza percentuale significativamente inferiore ( $p<0.05$ ) all'espanso PUF-T80.

A sostegno dei dati ottenuti, sono stati considerati anche i valori di deformazione massima raggiunti dagli espansi durante la compressione a 24h e a plateau (192h). Da quanto emerge dalla Figura IV, è possibile constatare che tutti gli espansi presentano la medesima risposta alla compressione negli stati di rigonfiamento considerati. L'unica eccezione è stata rilevata per un campione PUF-3KP che ha riportato un valore anomalo a causa di un probabile collasso della struttura. Ad ogni modo, analizzando i dati non è stata rilevata alcuna differenza significativa ( $p>0.05$ ) tra i valori di deformazione massima raggiunti sia a 24h sia a plateau (192h)

degli espansi caratterizzati da PIME rispetto ai relativi controlli.



**Figura IV** deformazione massima a 24h e a plateau dei campioni di schiume PU

Ciò è incoerente con i risultati della caratterizzazione meccanica svolta nel precedente lavoro di tesi [8]. È possibile supporre che gli espansi caratterizzati dalla presenza del PIME (PUF-3KP, PUF-2KP e PUF-TP80) abbiano subito un riarrangiamento strutturale tale per cui non presentano particolari distinzioni a confronto con i rispettivi controlli.

### FT-IR in ATR e in trasmissione

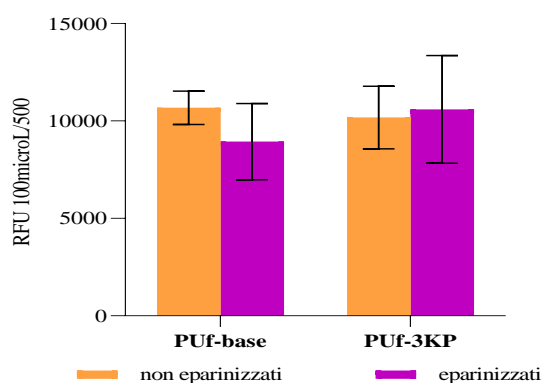
Confrontando gli spettri IR dei film PIME e film base unicamente trattati con PBS è emerso che non è presente alcuna differenza significativa sia in ATR sia in trasmissione. Il fatto che il PIME non sia visibile nello spettro IR del film PIME né in ATR né in

trasmissione consente di ipotizzare che: o lo strumento utilizzato in questo lavoro di tesi abbia una sensibilità analitica inferiore a quello utilizzato nel precedente; o il PIME fosse presente in un quantitativo eccessivamente basso (pari a 0.5% p/p<sub>miscela</sub>); o il PIME non fosse omogeneamente distribuito nella struttura chimica; o il film PIME abbia subito un'alterazione della struttura chimica a causa di fenomeni degradativi; o effettivamente il PIME non sia presente all'interno della struttura chimica del campione. Tra le ipotesi elencate, quest'ultima risulta essere la più probabile. È possibile che il PIME fosse legato alle catene poliuretatiche tramite interazioni intermolecolari deboli e che possa essere stato rilasciato nell'ambiente esterno considerando il tempo trascorso e i numerosi lavaggi a cui sono stati sottoposti i campioni. Tale ipotesi sarebbe in accordo con i dati ottenuti dalle prove di assorbimento e di ritenzione dei fluidi.

## Prove di adesione batterica

Dalle prove di adesione batterica (Figura V) non è emersa alcuna significativa differenza ( $p > 0.05$ ) tra i campioni PUF-3KP eparinizzati o meno. In particolare i campioni PUF-3KP eparinizzati hanno riportato un valore medio superiore rispetto al controllo.

Tali risultati potrebbero essere giustificati o dalla presenza di un quantitativo troppo basso di PIME (pari a 0.5% p/p<sub>miscela</sub>) tale per cui il quantitativo di eparina presente non sia stata sufficiente a determinare una diminuzione della proliferazione batterica, oppure dalla mancata funzionalizzazione con eparina della superficie dell'espanso PUF-3KP a causa dell'assenza del PIME nella struttura chimica. La seconda ipotesi risulta essere più probabile e coerente con quanto osservato nelle altre prove.



**Figura V** risultati saggio Alamar Blue 24h delle prove di adesione batterica

## Conclusioni e Sviluppi futuri

I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi porterebbero a concludere che il PIME non sia più presente all'interno della struttura chimica degli espansi PUF-3KP, PUF-2KP e PUF-TP80. Ciò potrebbe essere attribuito al fatto che il PIME non fosse legato covalentemente alle catene poliuretaniche ma semplicemente trattenuto tramite interazioni intermolecolari deboli; come conseguenza del tempo trascorso e dei numerosi lavaggi a cui sono stati sottoposti i vari campioni, il PIME potrebbe essere stato rilasciato all'esterno.

In futuro, potrebbe essere utile considerare un alternativo metodo di sintesi, possibilmente mettendo a punto

un metodo che preveda l'introduzione del PIME in soluzione anziché in forma solida in modo da verificare l'ottenimento di un legame di tipo covalente con le catene poliuretaniche, più stabile e duraturo nel tempo.

## ABSTRACT

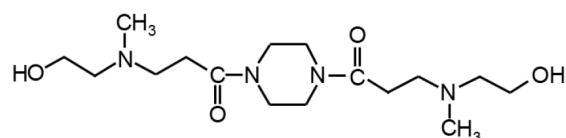
### Introduction

Polyurethane (PU) foams are obtained by balancing a gelling reaction and a blowing reaction using diisocyanates, polyols, chain extenders and cross-linkers, blowing agents, catalysts and, if necessary, also surfactants as reagents. The special feature of PU foams is the possibility of obtaining different morphological and mechanical characteristics simply by changing the type of reagents used during the synthesis reaction. So, PU foams can be used to realize scaffold able to meet the requirements of different types of tissues such as bone tissue, cartilage tissue, nerve fibres and soft tissues [1] [2] [3]. In particular, PU foams are used in wound healing for primary and secondary wound dressing systems [4] [5].

One of the most critical aspects for the healing of chronic wounds is the presence of bacteria; therefore, different dressings have been studied to reduce the bacterial adhesion and proliferation,

including functionalization with heparin.

In a previous thesis [8], PU foams functionalized with the PIME molecule (PUf-3KP, PUf-2KP and PUf-TP80) were realized and characterized in comparison to their controls (PUf-base and PUf-T80). PIME is a diamino-diamide-diol appropriately designed as a chain extender for the synthesis of polyurethanes and can interact with heparin (Figure VI). In the chemical structure of PIME, there are two hydroxyl groups (-OH) at the end of the molecule which allow covalent bonding with polyurethane chains, and alternate amide groups and tertiary aliphatic amino groups. As these groups become protonated at physiological pH, they allow ionic and electrostatic interaction with the sulphonic and carboxy groups of heparin which become negatively charged at physiological pH [9] [10] [11].



**Figure VI** Chemical structure of PIME [8]

The capability of PIME located on the surface of the material to stably bind heparin maintaining its bioactivity has been widely demonstrated in the literature [10] [12]. Indirect cytotoxicity and direct cytocompatibility tests have demonstrated the biocompatibility of PIME and an increase cell adhesion and proliferation [13] [14] [15]. Polycarbonate urethanes containing PIME (Bionate®PIME) and functionalized with heparin have demonstrated an effective decrease in bacterial adhesion and proliferation [10].

The aim of this thesis was to evaluate whether the PU foams containing PIME realized in the previous work and functionalized with heparin can be successfully used for creation of primary ulcer and burn dressing [6] [7].

## **Materials and Method**

### **Simulated Wound Fluid (SWF)**

For the foam absorption tests, a solution mimicking the chemical composition of the exudate, called Simulated Wound Fluid (SWF), was prepared. This

solution was composed by deionized water, calcium chloride 0.02 M, sodium chloride 0.4 M, tris (hydroxymethyl) aminomethane 0.08 M, and brought to physiological value (pH = 7.5) using a 2M HCl solution.

### **Heparin solution**

To conduct Fourier Transform Infrared Spectroscopy analysis in ATR (Attenuated Total Reflectance) and in transmission and bacterial adhesion tests, a solution 0.5% w/v heparin in sterile PBS was made using sodium heparin from porcine intestinal mucosa (H3393, Sigma Aldrich). To ensure the sterility of the solution required for the adhesion tests, all steps were carried out under a biological hood (class II) with laminar flow and the solution was filtered using a filter (Primo® Syringe Filter, Euroclone) and a syringe (10 ml SOFT-JECT®, HSW®).

### **Characterization of foams**

Absorption tests in SWF were carried out on three cylindrical samples ( $\phi = 10\text{mm}$ ,  $h = 4\text{mm}$ ) for each type of foam. As a cleaning and disinfection protocol,



the samples were immersed in pure ethanol for 48 hours and then left to air dry. Each sample was weighed in the anhydrous state ( $W_0$ ) and then immersed in 2ml of SWF solution heated to 37°C. Then, the samples were placed inside in an oven at 37°C and weighed ( $W_1$ ) at different time points (15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 24, 72h, 8 days, 10 days, 15 days, and 30 days.). Absorption was evaluated through the following equation:

$$absorption = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100$$

At 24h and plateau (192h) fluid retention tests were carried out by applying a compressive force of 0.419 N for 20 sec to the samples using a dynamic mechanical analyser (Q800 DMA, WatersTM, TAs Instruments). Then, each sample was weighed ( $W_2$ ) and the retention was evaluated through the following equation:

$$ritention = \frac{W_2 - W_0}{W_0} \times 100$$

The values obtained were then compared with the respective absorption values at 24h and at plateau

(192h) and the percentage difference was evaluated. Graphs of the deformation trend were also obtained using Advantage/ Universal Analysis (UA) Software (WatersTM, TAs Instruments).

To evaluate the effective presence of heparin, a Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) analysis was carried out in ATR and in transmission. Four samples ( $\phi = 12\text{mm}$ ) were realized from each type of films (PIME film and base film): one was treated with PBS only, one with a filtered heparin solution and two with an unfiltered heparin solution. The cleaning and disinfection treatment adopted for the samples is the same as the previous one, i.e., immersion in pure ethanol for 48 hours and air drying.

Finally, bacterial adhesion tests were carried out exclusively on the PUf-3KP foam and its control (PUf-base), as in the previous thesis this foam had distinguished itself in terms of mechanical properties and cell viability. Ten samples ( $\phi = 5\text{mm}$ ,  $h = 1\text{mm}$ ) were realized for each foam and they were

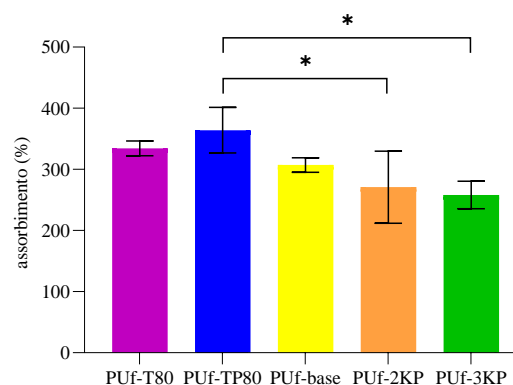
immersed in pure ethanol for 48h and left to air dry, again as a cleaning and disinfection treatment. Then, half of the samples per foam type were immersed overnight in sterile PBS (500 $\mu$ l) while the other half in 500 $\mu$ l of sterile 0.5% w/v heparin solution. Finally, all samples were incubated with the bacterial suspension made from the bacterial strain *Escherichia Coli* (JM109) and LB culture medium, resulting in a bacterial concentration equal to  $2.5 \times 10^4$  CFU / ml. After 24h, the metabolism of bacterial cells was evaluated by the Alamar Blue assay using the spectrophotometer (GENios Plus®, Tecan).

## Results and Discussion

### Absorption tests

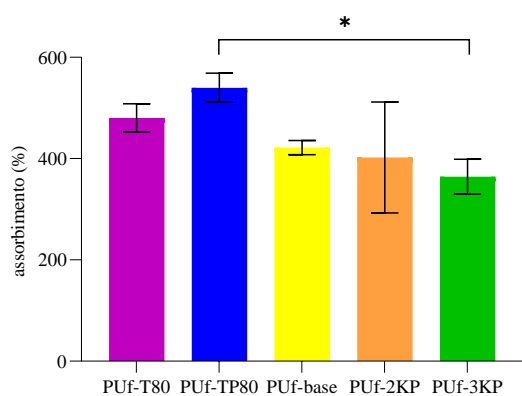
From 0h to 24h of immersion in SWF, the PUf-TP80 foam showed a higher mean absorption value than all other foams, followed in order by the PUf-T80 foam, PUf-base foam and, finally, PUf-2KP and PUf-3KP foams. Specifically, PUf-3KP foam showed the lowest mean absorption value. In the

swollen state at 24h, a significant difference ( $p < 0.05$ ) was found between PUf-TP80 and PUf-2KP foam and between the PUf-TP80 and PUf-3KP foam (Figure VII).



**Figure VII** Absorption value in SWF at 24h

At the plateau (192 h), among the foams characterized by the presence of PIME, only PUf-TP80 foam reached a higher mean value than the control (PUf-T80). Statistically, a significant difference ( $p < 0.05$ ) was found only between the PUf-TP80 foam and the PUf-3KP foam (Figure VIII).



**Figure VIII** Absorption value in SWF at plateau

At plateau in SWF no significant difference ( $p > 0.05$ ) was found between the foams characterized by the presence of PIME compared to their controls. In deionized water [8] the same results were obtained: foams characterized by the presence of PIME showed higher mean swelling values than the respective controls with a high variability of the values. The different behaviour in deionized water and in SWF could be attributed to the ionic strength of the SWF solution.

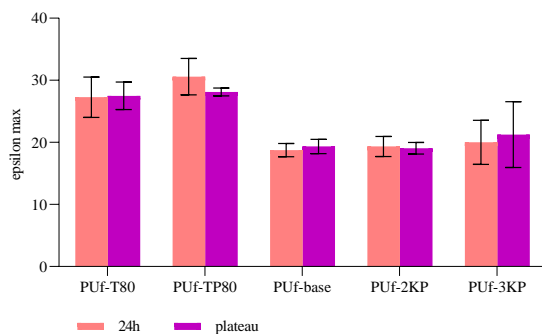
### Fluid retention tests

Following compression test after 24h of absorption, all foams maintained the same trend shown before compression, whereby PUf-TP80 was the only foam

with a higher absorption value than the control. Regarding the percentage difference between before and after compression at 24h, no statistically significant difference ( $p > 0.05$ ) was found between all the foams.

At plateau (192h), the results were consistent with the results at 24h. In this case, no significant difference ( $p > 0.05$ ) was found for the retention values (percentage absorption following compression), while for the percentage difference between before and after compression at plateau only the PUf-3KP foam showed a significantly lower percentage difference ( $p < 0.05$ ) than the PUf-T80 foam.

In support of the data obtained, the maximum deformation values reached by the foams during 24h and plateau compression were also considered. In Figure IX all the foams show the same compression response in the swelling states considered.



**Figure IX** Maximum deformation at 24h and at plateau for all PU foams samples

The only exception was PUF-3KP sample which showed an anomalous value due to a probable collapse of the structure.

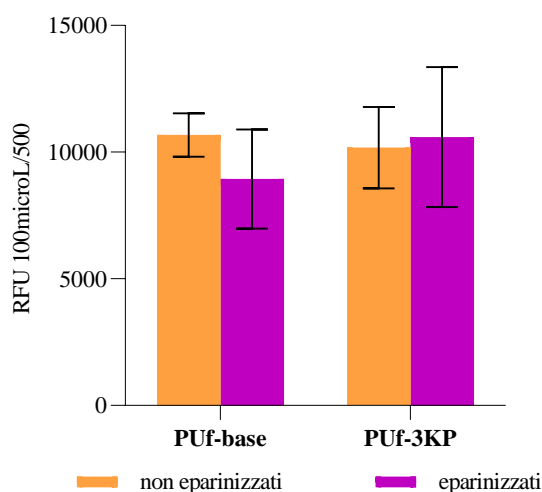
In any case, analysing the data no significant difference ( $p > 0.05$ ) was founded between the maximum deformation values reached both at 24h and at plateau of the foams characterized by PIME compared to the relative controls. This is inconsistent with the results of the mechanical characterization carried out in the previous thesis work [8]. It is possible to assume that foams characterized by the presence of PIME (PUF-3KP, PUF-2KP and PUF-TP80) have undergone a structural rearrangement such that they do not present differences in comparison with the respective controls.

FT-IR in ATR and in transmission

IR spectra of film PIME and film base treated only with PBS showed that there is no significant difference in both ATR and transmission. The reason why PIME is not visible in the spectrum of the PIME film in either ATR or transmission can be given by: a lower analytical sensitivity of the instrument used in this thesis work than the one used in the previous one; a low concentration of PIME (0.5% p/p<sub>blend</sub>); a non-homogeneous distribution of PIME in the chemical structure; an alteration of the chemical structure because of degradation phenomena; an actually absence of PIME in the chemical structure. It is possible that the PIME was only bound to the polyurethane chains through weak intermolecular interactions and may have been released into the external environment because of the time elapsed and the several washings of the samples. This hypothesis would agree with the results obtained from the absorption and fluid retention tests.

## Bacterial adhesion test

Bacterial adhesion test (Figure X) showed no significant difference ( $p > 0.05$ ) between the heparinized and non-heparinized PUF-3KP samples. In particular, heparinized PUF-3KP samples showed a higher mean value than the control.



**Figure X** Alamar Blue assay at 24h for bacterial adhesion test

These results could be justified either by the presence of a low quantity of PIME (0.5% p/p<sub>blend</sub>) such that the quantity of heparin present was not sufficient to determine a decrease in bacterial adhesion and proliferation, or by the absence of PIME in the chemical structure that determine an unsuccessful heparin functionalisation of the PUF-

3KP foam surface. The second hypothesis is more probable and consistent with what was observed in the other tests.

## Conclusions and future developments

The results obtained in this thesis work would suggest that PIME is no longer present within the chemical structure of PUF-3KP, PUF-2KP and PUF-TP80 foams. Probably, PIME was not covalently bound to the polyurethane chains but simply trapped through weak intermolecular interactions; because of the time elapsed and the several washings of the samples, PIME could have been released in the external environment.

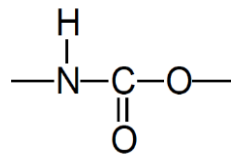
In the future, it might be useful to consider an alternative method of synthesis, possibly by developing a method involving the introduction of PIME in solution rather than in solid form to verify the formation of a more stable and long-lasting covalent bond with the polyurethane chains.

# CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

## 1.1 I Poliuretani

### 1.1.1 I Poliuretani lineari a blocchi

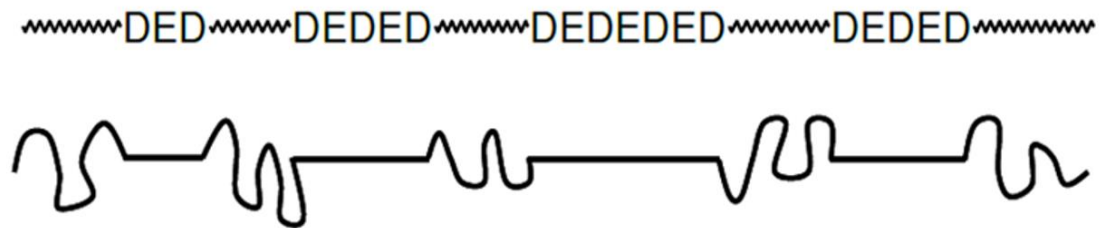
I Poliuretani lineari sono una vasta classe di copolimeri a blocchi di natura sintetica, caratterizzati dalla presenza di un gruppo uretano (Figura 1.1.1), sintetizzato per la prima volta da Wurtz nel 1849 [16].



**Figura 1.1.1** Legame uretanico [1]

La reazione di sintesi consiste in una reazione di poliaddizione di diisocianato, macrodiolo ed estensore di catena: i diisocianati sono molecole organiche caratterizzati da due gruppi isocianato ( $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ ); i macrodioli sono dei polimeri caratterizzate dalla presenza di due gruppi ossidrilici ( $-\text{OH}$ ); infine, gli estensori di catena sono molecole organiche a basso peso molecolare. Tale reazione fu determinata per la prima volta nel 1973 grazie al lavoro di O. Bayer e i suoi collaboratori del IG Farbenindustrie A.G in Germania [16].

La catena poliuretanicca è caratterizzata da un'alternanza di segmenti *hard* e segmenti *soft* uniti tra loro tramite legami covalenti (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**). I segmenti *soft* sono costituiti dal macrodiolo impiegato e conferiscono flessibilità alla catena, mentre quelli *hard*, costituiti da diisocianato ed estensore di catena, conferiscono proprietà meccaniche come elevata resistenza, maggiore modulo di Young, diminuzione dell'allungamento a rottura e, inoltre, stabilità termica e idrolitica [1] [17] [2].



**D:** Diisocianato; **E:** Estensore di catena; ~~~ Macrodiolo

— segmento *hard*;  $\cap$  segmento *soft*

**Figura 1.1.2** Struttura a blocchi di un generico polimero poliuretano a blocchi dove si può apprezzare l'alternanza tra segmenti *hard* e segmenti *soft* (riadattato da [1])

Moderando il quantitativo di reagenti è possibile controllare la percentuale di segmenti *soft* e *hard* e, conseguentemente, le proprietà meccaniche del polimero stesso.

È bene specificare inoltre che a seconda del tipo di macrodiolo impiegato è possibile ottenere diverse tipologie di poliuretani. Tali considerazioni verranno approfondite nel paragrafo relativo ai macrodioli. Inoltre, scegliendo gli opportuni tipi di reagenti (macrodiolo, isocianato ed estensore di catena) è possibile ottenere poliuretani con diverse proprietà. Pertanto, una delle peculiarità più significative di questa classe di polimeri è l'alta progettabilità e variabilità.

Per la sintesi dei poliuretani lineari a segmenti vengono impiegati prevalentemente due metodi:

- **metodo a due stadi:** consiste nel far reagire inizialmente il macrodiolo, il diisocianato in un solvente e determinando la formazione di un prepolimero (OCN-R-NCO). I rapporti stechiometrici tra macrodiolo e diisocianato devono essere tali da non lasciare diisocianato non reagito in soluzione. Successivamente si aggiunge l'estensore di catena. Con questo metodo è possibile ottenere poliuretani caratterizzati da una specifica alternanza tra i segmenti *hard* e *soft* controllando il quantitativo dei reagenti impiegati.
- **metodo a uno stadio:** consiste nel porre i reagenti, quali macrodiolo, diisocianato ed estensore di catena, tutti insieme e, generalmente, si opera in

massa (senza impiego di solvente). Si ottengono poliuretani con un'alternanza casuale dei segmenti *soft* e *hard*. Pertanto, risulta essere un metodo meno controllabile seppur meno costoso.

I vantaggi dei poliuretani per cui vengono impiegati specialmente in ambito biomedico sono i seguenti:

- alta progettabilità;
- alta riproducibilità;
- buon controllo sulla velocità di degradazione;
- ottima resistenza a fatica in flessione;
- buona biocompatibilità ed emocompatibilità;
- inerzia chimica a diverse sostanze organiche e inorganiche;
- bassa adesione batterica.

Ad oggi, in medicina poliuretani vengono impiegati per la realizzazione di numerosi e diversificati prodotti da adoperare in diversi contesti tra cui, ad esempio [1]:

- cateteri, peacemaker, ossigenatori e valvole cardiache in ambito cardiovascolare;
- protesi al seno e membrane per il *wound dressing* in chirurgia plastica;
- scaffold per la rigenerazione dei tessuti (ad esempio del tessuto osseo) e sistemi di *drug delivery* in medicina rigenerativa.

Ulteriori esempi, sono riportati in **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata..**



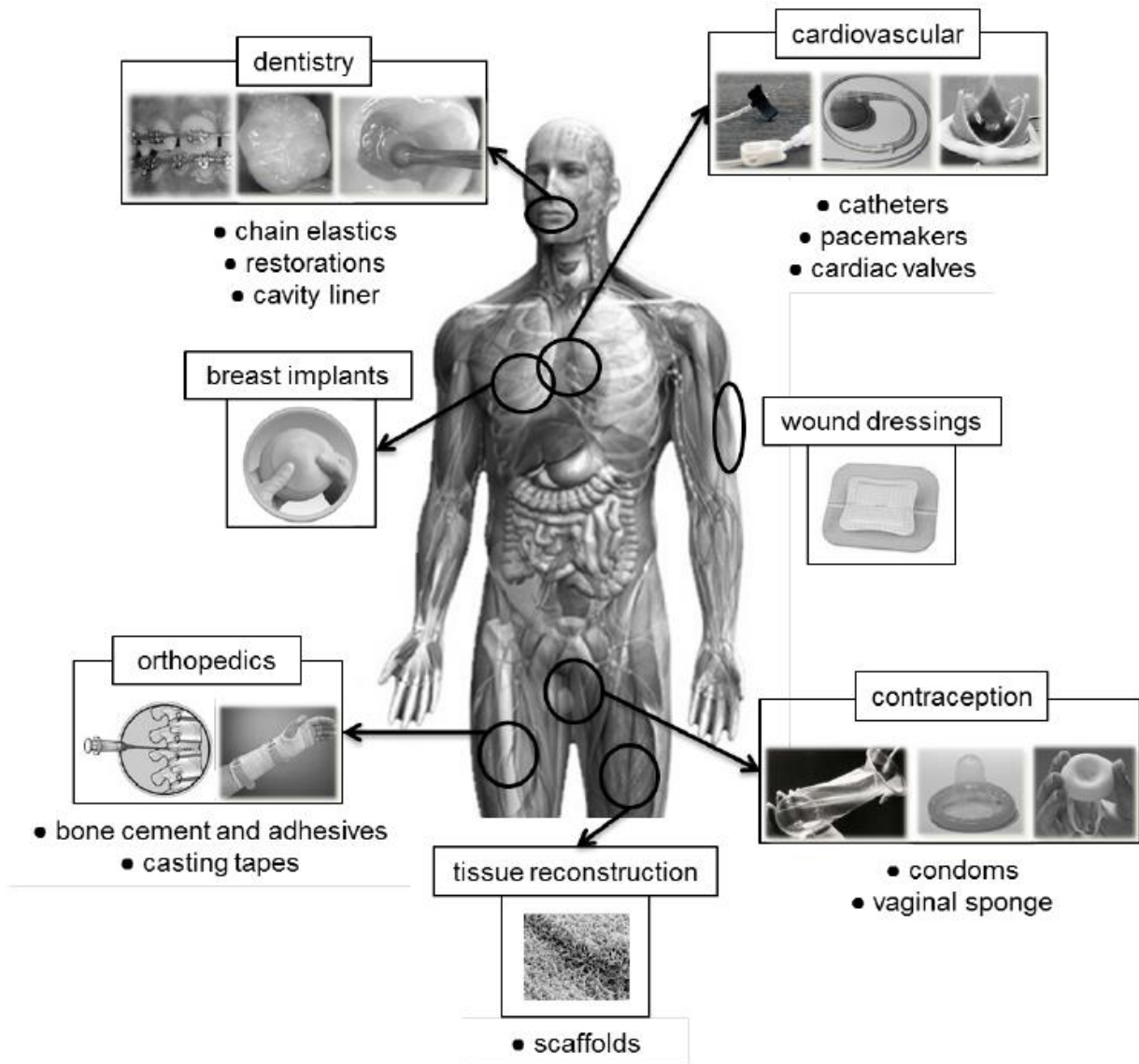


Figura 1.1.3 Principali applicazioni biomedicali dei poliuretani [1]

## 1.1.2 Le schiume poliuretaniche

Le schiume poliuretaniche sono dei materiali caratterizzati da una fase solida porosa polimerica ed una fase gassosa e presentano un buon bilanciamento tra resistenza e leggerezza. Il primo brevetto relativo alla realizzazione di una schiuma PU fu depositato da Zaunbrecher e Barth nel 1942 [3]. La sintesi di un espanso PU risulta essere più complessa di un semplice polimero poliuretanicico in quanto non solo prevede una reazione di polimerizzazione, nota anche come reazione di gelificazione o *gelling*, ma anche una reazione di espansione, nota come reazione di *blowing*. I reagenti impiegati sono i medesimi necessari per la generazione dei PU lineari a blocchi con l'aggiunta di agenti espandenti, catalizzatori e surfattanti; tuttavia, è bene specificare che al posto del macrodiolo nel caso di espansi poliuretanicici vengono utilizzati polioli, ossia catene polimeriche caratterizzate da più di due gruppi ossidrilici (-OH).

L'agente espandente viene impiegato per la generazione di molecole gassose necessarie per la formazione di bolle durante il processo di polimerizzazione; quello più comunemente impiegato è l'acqua che, reagendo con il diisocianato determina la formazione di anidride carbonica allo stato gassoso [3].

I catalizzatori vengono impiegati per controllare la velocità di reazione sia di *gelling*, promuovendo l'interazione tra diisocianato e macrodiolo, sia di *blowing*, favorendo la reazione tra diisocianato e acqua. Nel relativo paragrafo saranno approfondite le specifiche classi di catalizzatori responsabili di una o dell'altra reazione [2].

I surfattanti possono essere impiegati per stabilizzare la schiuma durante tutto il processo di sintesi e prevenirne il collasso [2] [18]. All'azione dei tensioattivi sono strettamente correlate specifiche caratteristiche della schiuma come la rigidità, la porosità e l'interconnessione dei pori [2].

La scelta dei corretti reagenti e lo studio delle adeguate proporzioni tra di essi è, forse, l'aspetto più critico per la realizzazione di un espanso poliuretanicico in quanto non bisogna tener conto esclusivamente delle caratteristiche desiderate relative alla

schiuma PU ma anche delle condizioni del processo di reazione, della tossicità e, infine, dei costi. [2].

Le schiume PU vengono generalmente classificate in schiume flessibili e schiume rigide e vengono ampiamente impiegate in diversi settori come quello industriale, automobilistico, edile e biomedicale.

### 1.1.2.1 Reagenti per la preparazione degli espansi

#### 1.1.2.1.1 Diisocianati

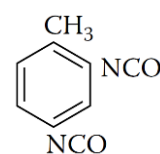
Gli isocianati sono delle molecole organiche particolarmente reattive derivanti dall'acido isocianico ( $\text{H-N=C=O}$ ) dove l'atomo di idrogeno viene sostituito da un gruppo alchilico o arilico (gruppo contenente almeno un anello aromatico). I diisocianati sono un particolare sottogruppo caratterizzato dalla presenza di due gruppi isocianato come terminali ( $\text{OCN-R-NCO}$ ). Come anticipato precedentemente, i diisocianati reagiscono con i macrodioli generando il legame uretano tramite interazione dei gruppi terminali e costituiranno, insieme all'estensore di catena, i segmenti *hard* della catena polimerica dei polimeri lineari a blocchi.

Più comunemente gli isocianati vengono classificati in aromatici e alifatici. I primi tendenzialmente risultano essere più reattivi grazie alla presenza degli anelli aromatici. Tuttavia, un altro elemento che influenza la reattività è l'ingombro sterico causato dagli altri gruppi sostituenti presenti all'interno della molecola [2].

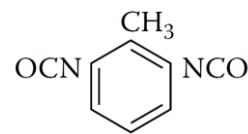
I principali poliisocianati impiegati sono il 2,4- e 2,6-toluene diisocianato (TDI), il difenilmetano-2,4- e -4,4'-diisocianato (MDI) e derivati. La loro struttura è riportata come segue in Tabella 1.1.1 [2] [3].

**Tabella 1.1.1** Struttura chimica degli isomeri di TDI e MDI (adattamento da [2])

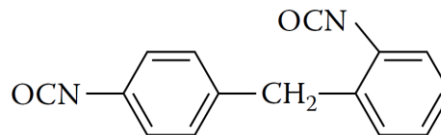
2,4-toluene diisocianato (TDI)



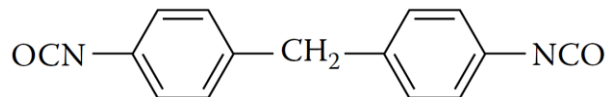
2,6-toluene diisocianato (TDI)



Difenilmetano-2,4'-diisocianato (MDI)



Difenilmetano-4,4'-diisocianato (MDI)

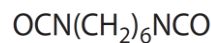


Gli isomeri TDI vengono usati principalmente per schiume PU rigide e, in alcuni casi, per semirigide; tuttavia, non possono essere impiegati nelle applicazioni biomedicali per problemi legati alla tossicità del TDI e delle ammine aromatiche che possono formarsi in seguito a biodegradazione. L'MDI viene utilizzato per schiume PU rigide, semirigide nonché per schiume poliisocianurate.

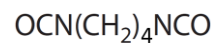
In ambito biomedicale, per la realizzazione di PU biodegradabili possono essere impiegati il 1,6-diisocianatoesano (HDI) oppure il 1,4-diisocianatobutano (BDI) come diisocianati alifatici, invece come aromatici può essere adoperato il 4,4-MDI (Tabella 1.1.2) [17].

**Tabella 1.1.2** Formula chimica di diisocianati impiegati per la realizzazione di PU biodegradabili (adattamento da [2])

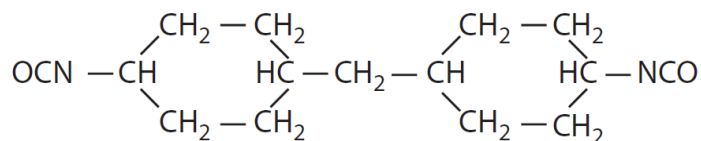
*HDI*



*BDI*



*H<sub>12</sub>MDI*



### 1.1.2.1.2 Polioli

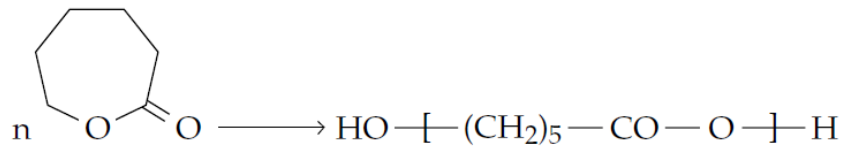
I polioli impiegati per la realizzazione di schiume PU sono composti polimerici caratterizzati dalla presenza di almeno due gruppi idrossilici (-OH) come ad esempio i poliesteri, polieteri, policarbonati, poliolefine con terminali idrossilici e oli vegetali contenenti gruppi idrossilici [3]. Tra le diverse tipologie elencate, primi tre risultano essere quelli più comunemente impiegati e determinano specifiche proprietà meccaniche e fisiche al poliuretano formato.

I poliesteridioli sono caratterizzati dalla presenza gruppo estere (R-CO-O-R) e presentano un'eccellente tenacità, un'eccellente flessibilità e resistenza meccanica. Alcuni dei più comuni impiegati sono riportati in Tabella 1.1.3. Tuttavia, il gruppo estere è sensibile a fenomeni degradativi, in particolar modo idrolitici. Per tale motivo possono essere impiegati per la realizzazione di poliuretani biodegradabili [17].

I poliesteredioli sono suddivisi principalmente in aromatici e alifatici: quelli aromatici si ottengono dalla transesterificazione del polietilene tereftalato (PET) mentre gli alifatici si ottengono da policondensazione o *ring-opening polymerization* (ROP) (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**). Generalmente quest'ultimi risultano essere più flessibili [3]. Inoltre, un aumento della concentrazione di gruppi esteri all'interno della catena comporta una riduzione della flessibilità e un modulo di Young più elevato [2].

**Tabella 1.1.3** Unità ripetitiva di alcuni poliesteredioli (adattamento da [2])

<i>Polietilene glutarato</i>	$-\left[ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_3\text{COO} \right]-$
<i>Polietilene azelato</i>	$-\left[ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_7\text{COO} \right]-$
<i>Poli-1,2-propilene adipato</i>	$-\left[ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{OOC}(\text{CH}_2)_4\text{COO} \right]-$

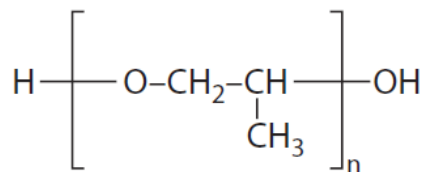


**Figura 1.1.4** Esempio di ROP per ottenere un poliesteri alifatico quale  $\epsilon$ - caprolactone [19]

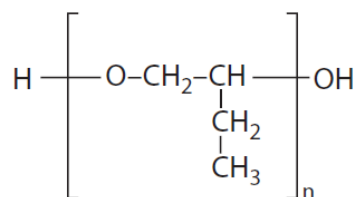
I polietereoli sono caratterizzati dalla presenza del gruppo etere in catena (R-O-R) il quale è stabile all'idrolisi. Infatti, polietereuretani risultano essere stabili a fenomeni idrolitici; tuttavia, si sono dimostrati sensibili alla degradazione ossidativa per *surface craking*, *enviromental stress craking* (ESC) e *metal ion oxidation* (MIO) [17]. I polietereoli più comunemente impiegati sono il polipropilenoossido glicole (PPO), polibutilenoossido glicole (PBO) e, infine, politetrametilene etere glicole (PTMEG) (Tabella 1.1.4) [3].

**Tabella 1.1.4** Esempi di polietereoli (riadattata da [2])

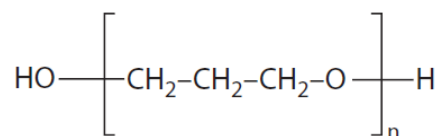
*PPO*



*PBO*

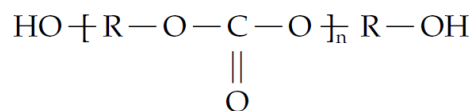


*PTMEG*



I policarbonatodioli sono caratterizzati dal gruppo (R-O-CO-O-R) e risultano essere stabili all'idrolisi e più stabili all'ossidazione dei poliuretani anche se alcuni studi hanno rilevato una certa sensibilità ad attacchi enzimatici [17].

Un esempio generale di policarbonatodiolo è riportato in Figura 1.1.5.



**Figura 1.1.5** Formula generale dei policarbonatodioli [3]

### 1.1.2.1.3 Estensori di catena e *cross-linker*

Gli estensori di catena e i *cross-linker* sono delle molecole a basso peso molecolare (40-300 Da) che differiscono tra loro nella funzionalità, per cui molecole ad alta funzionalità sono considerate *cross-linker* e molecole a bassa funzionalità sono considerati estensori di catena, e nello scopo per cui vengono impiegati durante la sintesi. Difatti, l'estensore di catena, reagendo con il diisocianato, costituisce i segmenti *hard* della catena poliuretanicica mentre i *cross-linker* permettono l'interazione tra catene poliuretanicche differenti. Tuttavia, in letteratura vengono generalmente raggruppati all'interno della medesima categoria in quanto da un punto di vista chimico presentano una struttura simile.

Gli estensori di catena e i *cross-linker* sono caratterizzati dalla presenza di gruppi terminali ossidrilici (-OH) come, ad esempio, il glicole etilenico e 1,4-butandiolo, oppure da gruppi terminali amminici (-NH<sub>2</sub>) come, ad esempio, la etilendiammina (Tabella 1.1.5); nel primo caso si ottengono poliuretani mentre nell'ultimo poliuretano-urea.

Gli estensori di catena caratterizzati da gruppi terminali ossidrilici (-OH) presentano generalmente una velocità di reazione lenta tale per cui è richiesto l'uso di catalizzatori. Un altro aspetto limitante di questa classe di estensori è la relativa solubilità che possono presentare nel poliolo impiegato; ciò condiziona conseguentemente il

quantitativo di estensore che può essere aggiunto alla miscela di polioli durante il processo di sintesi.

Gli estensori di catena con gruppi terminali amminici, invece, reagiscono più velocemente, talvolta eccessivamente compromettendo il successo della fase di sintesi [2]. Pertanto, anche in questo caso è bene controllare accuratamente i rapporti stechiometrici tra i reagenti.

Come anticipato precedentemente, gli estensori, insieme all'isocianato, costituiscono i segmenti *hard* della catena polimerica per cui concorrono nel determinare le prestazioni e le proprietà meccaniche finali del poliuretano, come ad esempio il modulo di Young, la resistenza e la stabilità termica e idrolitica [2].

**Tabella 1.1.5** Estensori di catena più comunemente impiegati

---

<i>Glicole etilenico</i>	OH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH
<i>1,4-butandiolo</i>	OH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH
<i>Etilendiammina</i>	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>

---

#### 1.1.2.1.4 Agenti espandenti

Gli agenti espandenti impiegati vengono classificati in:

- Agenti espandenti fisici: principalmente presenti allo stato liquido con una bassa temperatura di ebollizione ( $T_{eb}$ ), per cui tendono a vaporizzare durante la reazione esoterma di espansione, e risultano inerti chimicamente nei confronti dei gruppi isocianato. Esempi possono esserne il clorofluorocarburi (CFC), l'idrofluorocarburi (HCFC) anidride carbonica liquida e C5-idrocarburi;



- Agenti espandenti chimici: molecole in grado di reagire con i gruppi isocianato andando a formare anidride carbonica gassosa. Un esempio è l'acqua che, a differenza di altri agenti espandenti chimici come gli acidi organici, presenta notevoli vantaggi in termini di costi, reperibilità e tossicità.

Per la realizzazione di schiume PU possono essere usati o agenti fisici o chimici o una combinazione dei due; ad ogni modo quello più comunemente impiegato è l'acqua specialmente per ottenere schiume flessibili. Tuttavia l'utilizzo di tale agente espandente comporta alcuni rischi quali un aumento della reazione esotermica, un aumento della viscosità del composto e un maggior consumo di isocianato [3].

#### 1.1.2.1.5 Catalizzatori

I catalizzatori vengono impiegati per la sintesi di schiume PU al fine di controllare la velocità di reazione e ottenere il profilo di reazione desiderato. Esistono diverse categorie di catalizzatori: quelli di maggior interesse risultano essere i catalizzatori gelificanti e di espansione, responsabili rispettivamente della reazione di *gelling* e di *blowing* dell'espanso. I principali composti impiegati sono le ammine terziarie e i sali organometallici, prevalentemente a base di stagno; generalmente i primi appartengono alla famiglia di catalizzatori di espansione mentre i secondi a quelli gelificanti.

I catalizzatori differiscono tra loro non solo in termini di reattività e di attività catalitica con specifiche specie chimiche ma anche in termini di proprietà fisiche, come ad esempio la temperatura di ebollizione ( $T_{eb}$ ).

Ad esempio, nel caso di ammine terziarie l'attività catalitica, dettata dalla presenza di un doppietto elettronico sull'atomo di azoto, è influenzata dall'ingombro sterico e dagli effetti elettronici esercitati sul doppietto medesimo. Inoltre, a seconda delle dimensioni e della conformazione della molecola, le ammine presentano una specifica temperatura di ebollizione ( $T_{eb}$ ) che deve essere assolutamente presa in considerazione in fase di studio e di progettazione della reazione di sintesi, essendo esotermica. Infatti, è possibile che durante la reazione sia raggiunta la  $T_{eb}$  del catalizzatore amminico prima

che abbia assolto la sua funzione; oppure tale aspetto potrebbe essere sfruttato al fine di eliminare il contenuto residuo del catalizzatore amminico all'interno della miscela una volta assolto il suo scopo.

I sali organometallici, invece, non sono specie volatili tale per cui è possibile che rimangano all'interno della schiuma e che subiscano alterazioni chimiche.

Un altro esempio possono essere i catalizzatori contenenti gruppi idrossilici (-OH) che risultano essere meno reattivi dei corrispondenti derivati alchilici in quanto, legandosi alla catena polimerica tramite il gruppo ossidrilico, non risultano più in grado di svolgere la loro funzione originaria.

È importante sottolineare nuovamente che ciascun catalizzatore reagisce con determinate specie chimiche e la reazione di *gelling* piuttosto che quella di *blowing*. Per tali ragioni, è solito impiegare combinazioni di diversi catalizzatori amminici e sali organometallici al fine di ottenere il corretto bilanciamento della reazione e sviluppo dell'espanso [2].

#### 1.1.2.1.6 Surfattanti (Tensioattivi)

I surfattanti possono essere impiegati per stabilizzare la fase solida durante la reazione di espansione. Nel caso di schiume poliesteretraniche sono considerati dei buoni surfattanti gli agenti contenenti acido solfonico come, ad esempio, il sale sodico dell'acido solforicinoleico o dell'olio rosso turco. Invece nel caso di schiume poliesteretraniche dei buoni tensioattivi sono quelli idrosolubili come, ad esempio, il polieteresilossano.

Durante la reazione, i tensioattivi devono svolgere principalmente due funzioni:

- i. diminuire la tensione superficiale della miscela dei reagenti per la nucleazione e stabilizzazione delle celle;
- ii. fungere da emulsionanti per l'intero sistema.

La capacità emulsionante nei surfattanti aumenta in modo proporzionale alla presenza di specifici segmenti all'interno della catena che, contrariamente, riducono l'attività

superficiale. Per questo motivo il tensioattivo deve essere progettato in modo tale da realizzare il migliore bilanciamento tra questi due aspetti. Inoltre, bisogna valutare il tipo di schiuma che si vuole realizzare (ad esempio flessibile o rigida), il tipo di reagenti, i loro rapporti quantitativi, la reattività ed altre specifiche della reazione.

Uno dei requisiti più importanti richiesti ai tensioattivi è che stabilizzino il sistema in modo tale da prevenire il collasso. Ovviamente la tendenza al collasso diminuisce nel caso in cui si voglia realizzare una schiuma rigida.

Infine, altre proprietà della schiuma che sono dipendenti dai tensioattivi impiegati sono l'altezza di espansione, la porosità della schiuma e il grado di interconnessione dei pori. Storicamente questi aspetti sono inversamente proporzionali tra loro per cui è necessario bilanciarli adeguatamente al fine di ottenere una schiuma più simile possibile a quella desiderata. Idealmente la schiuma dovrebbe crescere durante la reazione con celle stabili fino al raggiungimento del valore massimo e a tal punto si dovrebbe verificare la rottura delle pareti delle celle al fine di garantire una alta interconnessione dei pori senza comprometterne la stabilità. Oltretutto, è importante che la crescita dell'espanso risulti essere omogenea e che non si verifichi una densificazione lungo le pareti di contatto con il contenitore all'interno del quale avviene la reazione di sintesi [2].

#### 1.1.2.1.7 L'indice di ossidrilico e funzionalità

Per la realizzazione degli espansi poliuretani è necessario considerare due caratteristiche dei macrodioli: l'indice di ossidrilico (anche noto come *OH number*) e la funzionalità. L'indice di ossidrilico indica il quantitativo di gruppi ossidrilici terminali presenti nel macrodiolo disponibili a reagire con l'isocianato ed è definito come milligrammi di idrossido di potassio (KOH) equivalenti per grammo (mg KOH/g). Il metodo analitico che viene principalmente impiegato per determinarlo consiste nella reazione dei gruppi ossidrilici terminali del macrodiolo con anidridi organiche, come anidride acetica o anidride ftalica, per ottenere i gruppi carbossilici e nella seguente neutralizzazione di questi da parte di una quantità equimolare di KOH.

La funzionalità è definita come il numero di gruppi idrossilici per molecola di macrodiolo (gruppi OH/mol). Per valutarla ci si può avvalere di un metodo che prevede la determinazione della conversione al punto di gelificazione di una reazione tra macrodiolo e diisocianato. In questo caso, la funzionalità viene valutata impiegando l'equazione di Flory:

$$p = 2/f$$

dove  $p$  è la conversione al punto di gel e  $f$  è la funzionalità media del sistema di reazione.

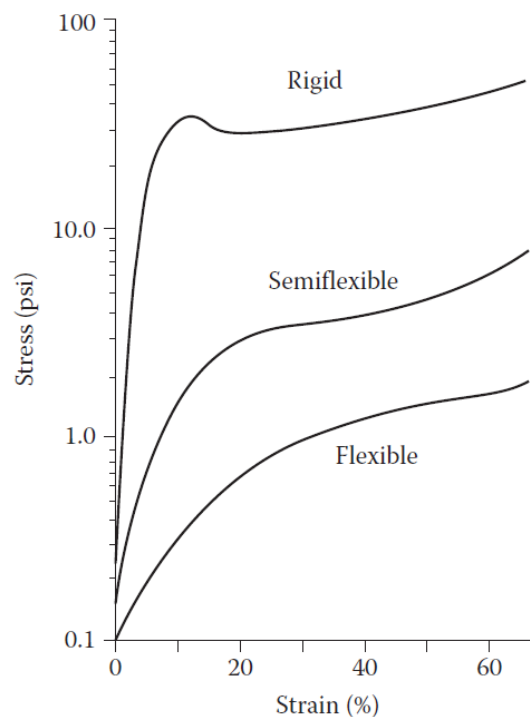
Per determinare la funzionalità dei polieteredioli si può impiegare la risonanza magnetica nucleare (NMR) oppure un metodo più diffuso e pratico basato sulla valutazione del peso molecolare medio  $M_n$  [16].

### 1.1.2.2 Schiume poliuretatiche flessibili e rigide

Le schiume PU flessibili vengono prevalentemente impiegate per la realizzazione di imbottiture o materassi, mobili, tappeti e automobili mentre quelle rigide vengono impiegate per lo più come isolanti termici nel settore edile e industriale. Entrambe le tipologie di schiume possono essere classificate in base al tipo di macrodioli e polioli impiegati (es.: poliuretano, poliestere, policarbonato) [2].

In Figura 1.1.6 è riportato un grafico indicativo dell'andamento sforzo-deformazione di schiume flessibili, semiflessibili e rigide a confronto che permette di mettere in luce le principali differenze da un punto di vista meccanico. Nello specifico, si evince che gli espansi flessibili presentano un rapporto non lineare tra sforzo e deformazione con la mancanza di un punto di snervamento definito; lo sforzo massimo raggiunto risulta essere relativamente basso e inferiore rispetto a quelli delle altre tipologie. Gli espansi rigidi presentano un andamento lineare fino al raggiungimento dello sforzo di snervamento e, una volta superato, vanno incontro a collasso e a deformazione plastica; si può notare che nella fase di linearità la pendenza è elevata (seppure rimanga un dato indicativo) e maggiore rispetto all'inclinazione indicativa delle altre due tipologie.

Infine, gli espansi semiflessibili presentano un andamento sforzo-deformazione non lineare con un cambio di concavità e l'assenza di uno sforzo di snervamento definito; tuttavia, i valori di sforzo raggiunti, in particolare lo sforzo massimo, risultano essere superiori a quelli delle schiume flessibili [2]. È bene ricordare che gli andamenti riportati in Figura 1.1.6 sono indicativi delle tipologie di schiume presentate, in particolar modo per le schiume semiflessibili il cui andamento varia particolarmente a seconda della progettazione dell'espanso.



**Figura 1.1.6** Grafico sforzo-deformazione indicativo di schiume poliuretaniche flessibili, semiflessibili e rigide [2]

Le schiume flessibili sono caratterizzate da celle aperte (alta interconnessione dei pori) che permette la libera circolazione del flusso di aria durante la compressione o l'applicazione di una deformazione. Per tali ragioni, generalmente presentano una bassa capacità di carico e buone capacità di recupero.

Le schiume PU rigide presentano ottime proprietà meccaniche come alta resistenza a compressione, a trazione, a flessione e al taglio; quelle a bassa densità mostrano anche ottime proprietà come isolante termico [2] [3]. È preferibile la realizzazione di espansi rigidi a celle altamente chiuse per diverse tipologie di applicazioni. La percentuale di

celle chiuse dipende dal grado di reticolazione, dal tipo di surfattante impiegato nonché dal quantitativo di poliolo.

Infine, le schiume PU semiflessibili presentano delle proprietà intermedie tra le due tipologie; a seconda della progettazione possono assumere un comportamento più simile agli espansi rigidi o flessibili [2].

Indipendentemente dalla tipologia di espanso che si vuole realizzare il corretto bilanciamento e l'individuazione di quali reagenti impiegare è fondamentale per ottenere la corretta modulazione delle caratteristiche e proprietà desiderate.

Ad esempio, l'impiego di polieteri permette di ottenere schiume più resilienti con una migliore resistenza all'idrolisi rispetto agli espansi poliuretano, mentre questi presentano una maggiore resistenza alla trazione e una migliore resistenza all'impiego di oli, solventi e a fenomeni ossidativi.

Un altro esempio è il caso di espansi rigidi a bassa densità, i quali presentano una forte anisotropia nella direzione di crescita libera dell'espanso medesimo. Questo perché durante la nucleazione si ha la formazione inizialmente di bolle sferiche che durante l'espansione tendono ad allungarsi nella direzione di risalita della schiuma in modo proporzionale alla dimensione della bolla e al quantitativo presente; per tale motivo è possibile che venga raggiunta una resistenza quasi doppia nella direzione parallela rispetto a quella perpendicolare. Anche le schiume flessibili a bassa densità presentano un'anisotropia ma molto minore rispetto alle schiume rigide tale per cui in alcuni casi risulta quasi trascurabile [3] [2].

### 1.1.2.3 Applicazioni nell'ambito dell'Ingegneria Tissutale

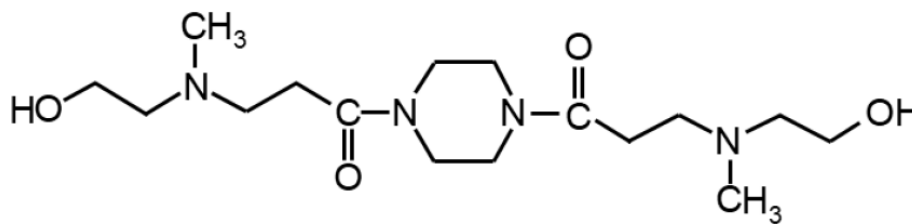
Nell'ambito dell'Ingegneria Tissutale gli espansi poliuretano sono stati studiati principalmente per la realizzazione di scaffold di diverse tipologie di tessuti come, ad esempio, il tessuto osseo, cartilagineo, epidermide e vasi ematici. La peculiarità di questa classe di materiali risulta essere l'alta progettabilità che permette di adattare le caratteristiche morfologiche, fisiche e chimiche dell'espanso alla tipologia di tessuto. In Tabella 1.1.6 sono stati riassunti esempi di scaffold realizzati con schiume PU.

**Tabella 1.1.6** Esempi di espansi poliuretanicici impiegati per la rigenerazione dei tessuti

Applicazione	Processo	Reagenti	Caratteristiche	Articolo
Modello <i>in vitro</i> di metastasi ossea in tumori al seno	One-step bulk polymerization	Miscela polietere-polioli MDI Catalizzatore: FeAA Agente espandente: acqua	Densità: $0.121 \pm 0.011$ (g/cm <sup>3</sup> ) Porosità aperta: $75.46 \pm 1.06$ (%) E (umido): $62.65 \pm 20.20$ (KPa)	[20]
Tessuto osseo	One-step bulk polymerization	Miscela polietere-polioli (EF, ElastoFlex® LF2946) MDI Catalizzatore: FeAA Agente espandente: acqua	Densità: $0.127 \pm 0.03$ (g/cm <sup>3</sup> ) Porosità aperta: 89.67(%) $\phi$ pori: 268.46 ( $\mu$ m)	[21]
Guide Bone Regeneration (GBR)	One- step foaming reaction	Poli- $\epsilon$ -caprolattone diolo PMDI DBACO Albumin aq. solution	Porosità aperta: 56-65 (%) $\phi$ pori: 175-306 ( $\mu$ m) E (anidro): 0.47-19.54 (KPa)	[22]
Tessuto cartilagineo	One- step foaming reaction	Poli- $\epsilon$ -caprolattone diolo Isosorbide diolo HDMI	Porosità aperta: 85 (%) $\phi$ pori: 200-400 ( $\mu$ m)	[23]

### 1.1.3 PIME

Il PIME (Figura 1.1.7) è un diammino-diammide-diolo opportunamente progettato come estensore di catena per la sintesi dei poliuretani e derivante dalle poli-ammido-ammine (PAAs), ossia polimeri lineari caratterizzati dall'alternanza di gruppi amminici terziari e ammidici (TAG-AG). Difatti, è caratterizzato alle estremità dalla presenza di due gruppi ossidrilici (-OH) che gli permettono di interagire con la catena principale andando a costituire i segmenti *hard* dei poliuretani lineari a blocchi. I gruppi amminici terziari alifatici e i gruppi ammidici, carichi positivamente a pH fisiologico, possono interagire con gruppi carbossilici e solfonici dell'eparina, carichi negativamente a pH fisiologico, per mezzo di interazioni prevalentemente ioniche ma anche elettrostatiche e idrofobiche [9] [10] [11].



**Figura 1.1.7** Struttura chimica del PIME [8]

In letteratura è stata dimostrata la possibilità di inserire con successo il PIME all'interno delle catene dei poliuretani, nominati successivamente poliuretani-amino-ammidi (Hepitan), e di policarbonato uretani (Bionate®PIME) e la migrazione del PIME sulla superficie del materiale grazie all'idrofilicità delle ammine terziarie alifatiche [10] [12]. Inoltre, è stata ampiamente dimostrata l'effettiva abilità del PIME di formare complessi stabili con l'eparina e di mantenerne la bioattività, di non avere effetti citotossici e di favorire adesione e proliferazione cellulare [13] [14] [15]. Infine, per mezzo di test di adesione batterica è stato dimostrato che il PIME funzionalizzato con eparina ha comportato una inferiore adesione e proliferazione batterica rispetto ai controlli [10].



## 1.1.4 Schiume poliuretaniche impiegate

### 1.1.4.1 Sintesi delle schiume poliuretaniche

Le schiume adoperate nella fase sperimentale sono state realizzate nell'antecedente lavoro di tesi [8]. In breve, si è partiti da miscele di polioli, estensori di catena e catalizzatori messe a punto precedentemente e opportunamente modificate per inserire il PIME all'interno della struttura chimica dell'espanso; i reagenti impiegati con annessi quantitativi per ciascuna schiuma sono stati riassunti nella Tabella 1.1.7. **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** Tra le diverse tecniche di sintesi studiate, quelle che si sono dimostrate efficaci sono state:

- aggiunta di PIME alla miscela di polioli, prima dell'aggiunta di diisocianato e successiva agitazione meccanica a 2000 o 3000 rpm;
- aggiunta di PIME alla miscela di polioli e successivo riscaldamento a 80°C.

È bene specificare che in entrambi i metodi sono stati introdotti delle quantità di PIME pari a 0.5% p/p<sub>miscela</sub> in sostituzione di 0.5% del butandiolo della miscela di partenza. Si è voluto introdurre un quantitativo moderato di PIME al fine di modificare limitatamente le caratteristiche degli espansi e la stabilità della sintesi.

Inoltre, tutte le schiume sono state realizzate tramite reazione di sintesi a singolo stadio le cui fasi verranno approfondite nei successivi paragrafi per ogni tipologia di schiuma [8].

#### 1.1.4.1.1 Schiuma PUf-base

La schiuma PUf-base è stata ottenuta tramite il processo di sintesi a singolo stadio originario le cui componenti di miscela e relative percentuali sono indicate in Tabella 1.1.7. Tale schiuma è stata realizzata come controllo rispetto a quelle ottenute tramite sintesi con PIME aggiunto alla miscela di polioli, ossia le schiume PUf-2kP e PUf-3kP. Il processo di sintesi a singolo stadio consta delle seguenti fasi:

- i. preparazione della miscela di polioli;

- ii. titolazione della miscela per misurare il contenuto d'acqua;
- iii. calcolo della massa dei reagenti da impiegare;
- iv. aggiunta, nel seguente ordine, delle adeguate quantità di catalizzatore, acqua distillata e miscela di polioli;
- v. miscelazione tramite agitatore meccanico a 2000 rpm per 40 secondi;
- vi. aggiunta adeguata quantità di isocianato;
- vii. miscelazione tramite agitatore meccanico a 2000 rpm per 30 secondi fino allo sviluppo di esotermicità da parte della miscela (indice dell'inizio di polimerizzazione).

#### 1.1.4.1.2 Schiume PUf-2kP e PUf-3kP

Le schiume PUf-2kP e PUf-3kP sono state realizzate modificando la miscela di partenza sostituendo 0.5% di butandiolo con 0.5% p/p<sub>miscela</sub> di PIME (Tabella 1.1.7) e, conseguentemente, imponendo un'agitazione pari a 2000 rpm nel primo caso e 3000 rpm nel secondo. Il processo di sintesi impiegato è stato il seguente:

- i. preparazione della miscela di polioli;
- ii. titolazione della miscela per misurare il contenuto di acqua;
- iii. valutazione della massa dei reagenti da impiegare;
- iv. aggiunta nel seguente ordine delle adeguate quantità di catalizzatore, acqua distillata e miscela di polioli;
- v. aggiunta di PIME e miscelazione tramite agitatore meccanico per 40 secondi a 2000 rpm, nel caso di PUf-2kP, e 3000 rpm, nel caso di PUf-3kP;
- vi. aggiunta adeguata quantità di isocianato;
- vii. miscelazione tramite agitatore meccanico a 2000 rpm per 30 fino allo sviluppo di esotermicità da parte della miscela.

Si è scelto di studiare la sintesi con due velocità di agitazione differenti al fine di verificare se l'agitazione meccanica possa influire positivamente sulla struttura, la morfologia e le caratteristiche delle schiume.

#### 1.1.4.1.3 Schiuma PUf-T80

La schiuma PUf-T80 è stata realizzata impiegando le componenti di miscela e relative percentuali indicate in Tabella 1.1.7. Tale espanso è stato realizzato come controllo della schiuma realizzata tramite un processo sintesi a 80°C con PIME aggiunto alla miscela di polioli, ossia la schiuma PUf-TP80. Tale processo consta delle seguenti fasi:

- i. preparazione della miscela di polioli;
- ii. titolazione della miscela per misurare il contenuto di acqua;
- iii. valutazione della massa dei reagenti da impiegare;
- iv. aggiunta in un contenitore a chiusura ermetica dell'adeguata quantità di miscela di polioli, acqua e miscelazione tramite agitatore meccanico a 2000 rpm per 40 secondi;
- v. posizionamento del contenitore in stufa a 80°C per 15 minuti;
- vi. aggiunta adeguata quantità di isocianato;
- vii. miscelazione tramite agitatore meccanico a 2000 rpm per 30 secondi fino allo sviluppo di esotermicità da parte della miscela;
- viii. posizionamento del contenitore in stufa a 80°C per 72 ore fino al completamento della reazione di polimerizzazione.

È bene specificare che in questo caso non è stato necessario impiegare il ferro-acetil-acetonato (FeAA) come catalizzatore in quanto la cinetica di reazione è stata favorita dalla temperatura.

#### 1.1.4.1.4 Schiuma PUf-TP80

La schiuma PUf-TP80 è stata realizzata sostituendo 0.5% di butandiolo con 0.5% di PIME rispetto alla miscela di partenza (Tabella 1.1.7) e la sintesi è stata effettuata in stufa ad una temperatura pari a 80°C. Pertanto, le fasi del processo di sintesi risultano:

- i. preparazione della miscela di polioli;
- ii. titolazione della miscela per misurare il contenuto di acqua;
- iii. valutazione della massa dei reagenti da impiegare;
- iv. aggiunta in un contenitore a chiusura ermetica dell'adeguata quantità di miscela di polioli, acqua, PIME e miscelazione tramite agitatore meccanico a 2000 rpm per 40 secondi;
- v. posizionamento del contenitore in stufa a 80°C per 15 minuti;
- vi. aggiunta adeguata quantità di isocianato;
- vii. miscelazione tramite agitatore meccanico a 2000 rpm per 30 secondi fino al surriscaldamento della miscela;
- viii. posizionamento del contenitore in stufa a 80°C per 72 ore fino al completamento della reazione di polimerizzazione.

Come per la schiuma PUF-T80, anche in questo caso non è stato necessario impiegare il catalizzatore ferro-acetil-acetonato (FeAA) in quanto la cinetica di reazione è stata favorita dalla temperatura.

#### 1.1.4.2 Preparazione dei film poliuretanicici impiegati

Nella fase sperimentale sono stati impiegati anche i film realizzati nel precedente lavoro di tesi [8], quali:

- Film PIME caratterizzato dalla medesima composizione degli espansi contenuti PIME (PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-TP80) come riportato in Tabella 1.1.7;
- Film base caratterizzato dalla medesima composizione degli espansi senza PIME (PUf-base e PUf-T80) come riportato in Tabella 1.1.77.

Tali film sono stati realizzati prelevando una massa nota di miscela di reazione e distendendola su una lastra di vetro fino al raggiungimento di un composto omogeneo. La caratterizzazione dei film è stata effettuata tramite la spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier (FT-IR) in trasmissione come indicato nel paragrafo 1.1.4.3.4.

**Tabella 1.1.7** Componenti miscela e catalizzatore con relative percentuali impiegati per ciascuna tipologia di schiuma impiegata [8]

	<b>Componente</b>	<b>Puf-base</b>	<b>Puf-2kP</b>	<b>Puf-3kP</b>	<b>PUf-T80</b>	<b>PUf-TP80</b>
<b>Componenti miscela</b>	10WF18	85.73%	85.30%	85.30%	85.73%	85.30%
	7619W	10.05%	10.00%	10.00%	10.05%	10.00%
	4051B	2.01%	2.00%	2.00%	2.01%	2.00%
	Butandiolo	1.01%	1.00%	1.00%	1.01%	1.00%
	Etilen Glicole	1.01%	1.00%	1.00%	1.01%	1.00%
	Acetato di potassio in EG	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%
	Dabco 33-LV	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%
	Etanolo	-	-	-	-	-
	PIME	-	0.5%	0.5%	-	0.5%
<b>Catalizzatore</b>		FeAA	FeAA	FeAA	-	-

### 1.1.4.3 Caratterizzazione delle schiume

Le caratteristiche morfologiche e strutturali nonché meccaniche sono state studiate nel precedente lavoro di tesi [8]. Segue un breve riassunto dei risultati ottenuti al fine di fornire una descrizione più dettagliata degli espansi impiegati.

#### 1.1.4.3.1 Valutazione della densità apparente

Come primo aspetto è stata analizzata la densità apparente delle schiume facendo riferimento alla normativa UNI EN ISO 845 ed è stata calcolata per mezzo della seguente equazione:

$$\delta = \frac{m_p \cdot 4}{\pi \cdot \varnothing^2 \cdot h}$$

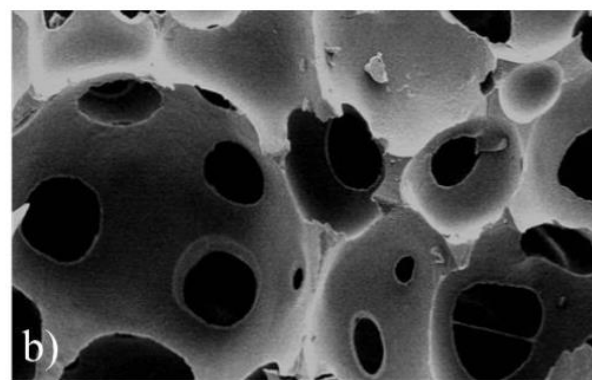
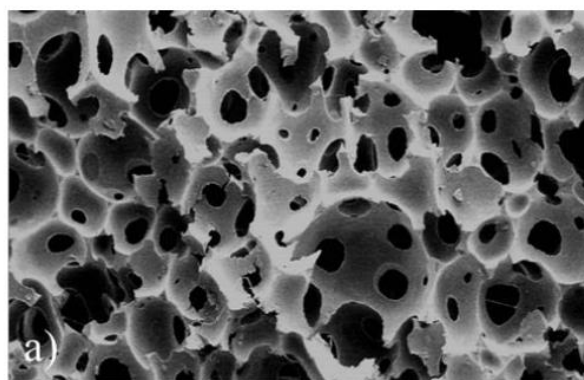
Dove  $m_p$  indica la massa del campione,  $\varnothing$  indica il suo diametro e, infine,  $h$  l'altezza. È bene specificare che i dati sono stati ottenuti realizzando 6 campioni di forma cilindrica ( $\varnothing=15\text{mm}$ ,  $h=10\text{mm}$ ) per schiuma e sono riportati come media e deviazione standard. Dai risultati ottenuti (Tabella 1.1.8) è stato possibile determinare che non vi sia differenza statistica in termini di densità ( $p>0,05$ ) tra le differenti tipologie di espanso. Per tale motivo si è convenuto che l'impiego del PIME come catalizzatore non influisce sulla densità degli espansi [8].

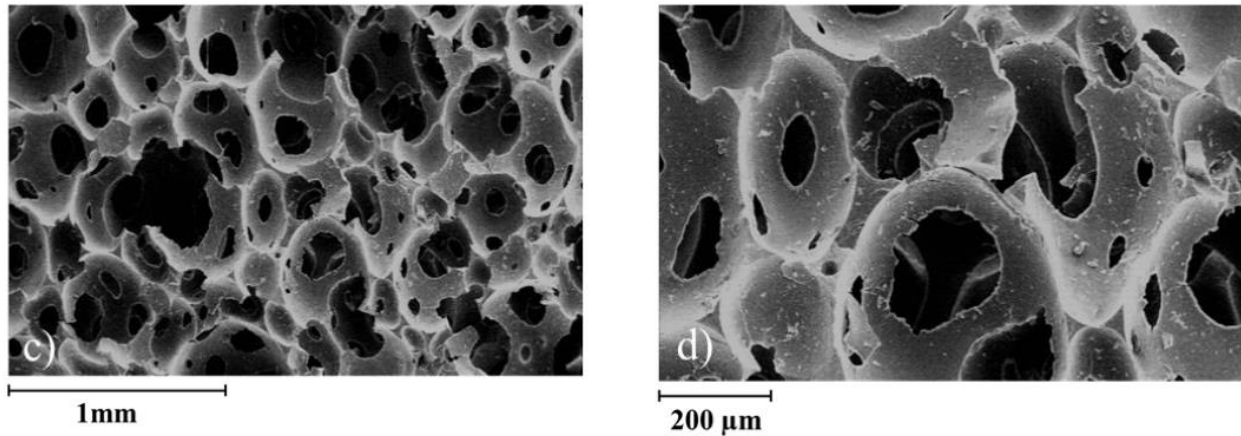
**Tabella 1.1.8** Valore di densità media per le differenti tipologie di espanso [8]

Tipologia di espanso	Densità (g/cm <sup>3</sup> )
PUf-3KP	0,141±0,001
PUf-2KP	0,137±0,002
PUf-base	0,134±0,006
PUf-TP80	0,139±0,005
PUf-T80	0,135±0,007

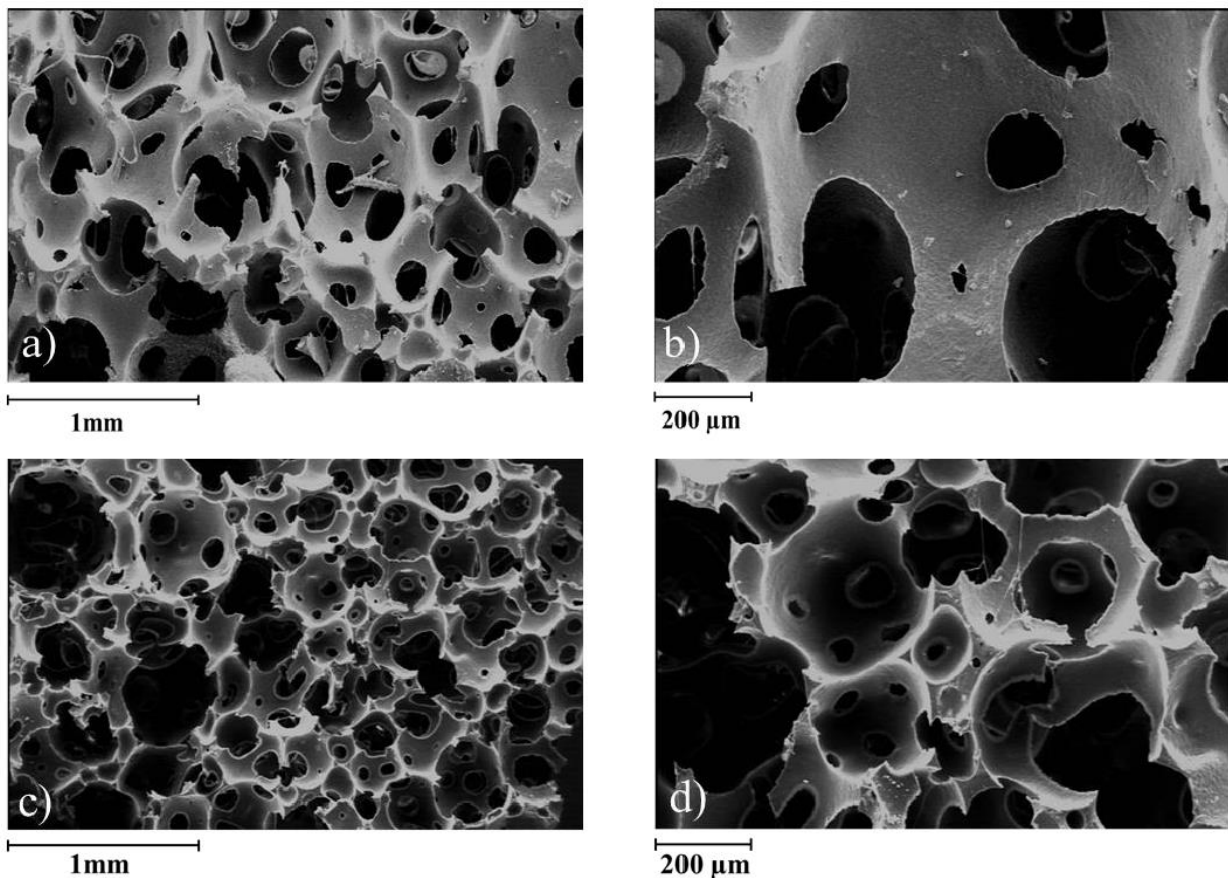
### 1.1.4.3.2 Analisi tramite Microscopio Elettrico a Scansione (SEM)

Tutti gli espansi sono stati osservati per mezzo di un SEM Stereo Scan 360 (Cambridge®) per effettuare un'analisi qualitativa della morfologia e della porosità dei campioni. Nello specifico, questo tipo di analisi ha permesso di ottenere una descrizione qualitativa della porosità aperta o chiusa, dell'interconnessione, dell'orientamento preferenziale nonché della forma dei pori. A tale scopo, sono stati realizzati sia campioni cilindrici ( $\varnothing=6\text{mm}$ ,  $h=4\text{mm}$ ) sia bidimensionali ( $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ ). Dalle immagini al SEM ottenute (Figura 1.1.8, Figura 1.1.9, Figura 1.1.10, Figura 1.1.11, Figura 1.1.12) è possibile osservare che tutti gli espansi presentano qualitativamente un'alta e omogenea porosità, un alto grado di interconnessione, dettato dalla presenza di piccoli pori sulle pareti, senza mostrare un orientamento preferenziale. I pori degli espansi caratterizzati dalla presenza del PIME, ossia PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-TP80, presentano una forma sferica a differenza degli espansi di confronto PUf-base e PUf-T80, che presentano una forma leggermente più allungata. Per ottenere un'analisi quantitativa sulla porosità, sul grado di interconnessione e sul diametro dei pori bisogna fare riferimento ai risultati ottenuti tramite la microtomografia computerizzata [8].



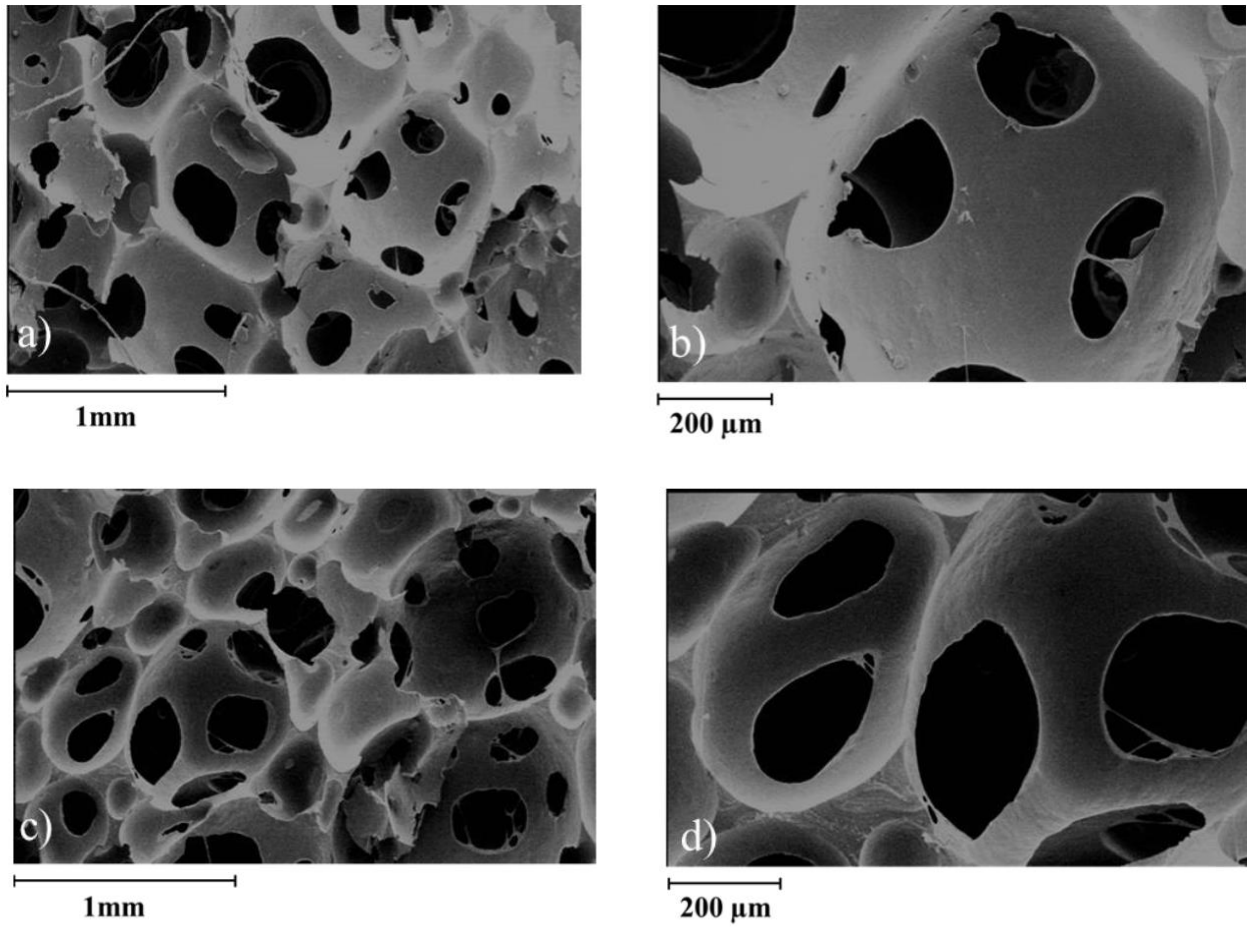


**Figura 1.1.8** Immagini al SEM dell'espanso PUF-3KP: a) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 40x; b) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 100x; c) sezione ad un ingrandimento 40x; d) sezione ad un ingrandimento 100x [8]

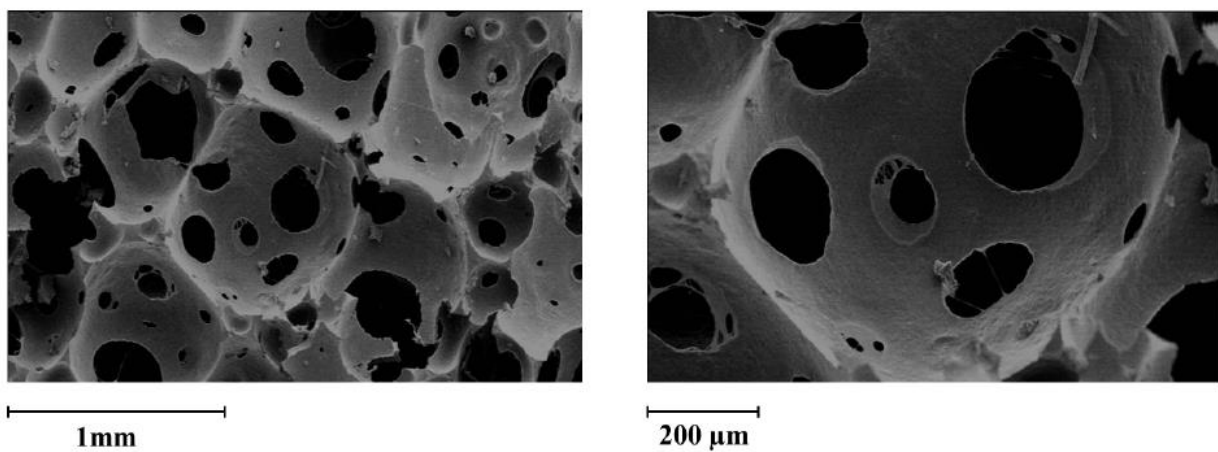


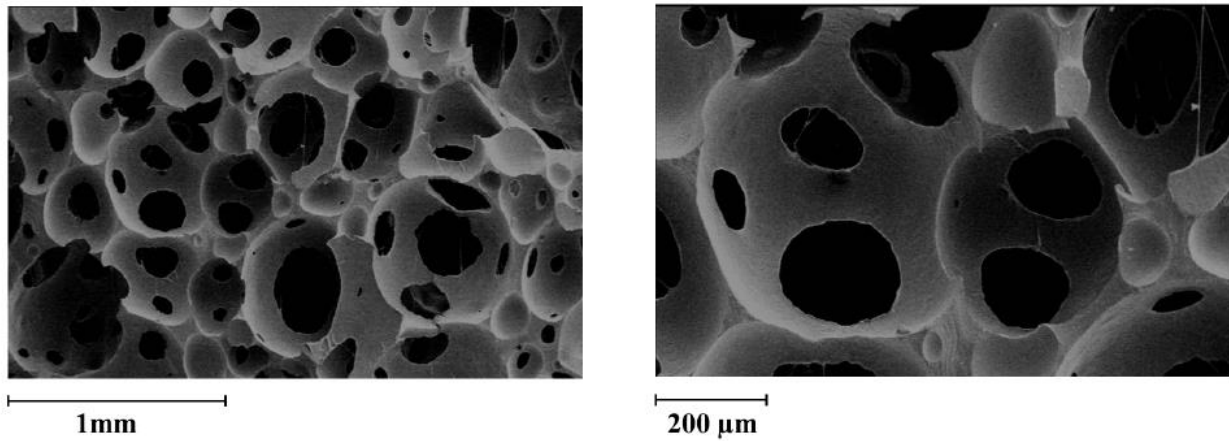
**Figura 1.1.9** Immagini al SEM dell'espanso PUF-2KP: a) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 40x; b) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 100x; c) sezione ad un ingrandimento 40x; d) sezione ad un ingrandimento 100x [8]



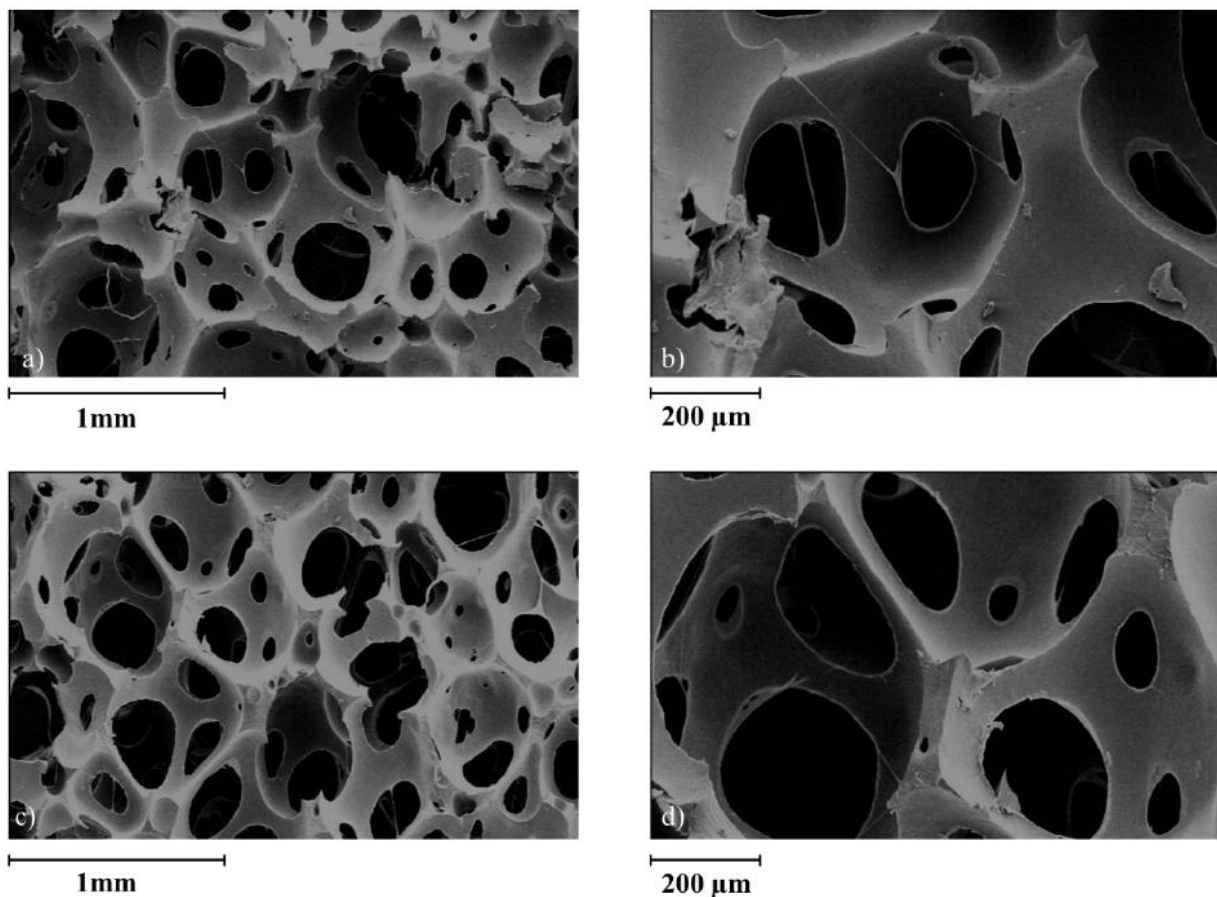


**Figura 1.1.10** Immagini al SEM dell'espanso PUF-base: a) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 40x; b) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 100x; c) sezione ad un ingrandimento 40x; d) sezione ad un ingrandimento 100x [8]





**Figura 1.1.11** Immagini al SEM dell'espanso PUF-TP80: a) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 40x; b) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 100x; c) sezione ad un ingrandimento 40x; d) sezione ad un ingrandimento 100x [8]



**Figura 1.1.12** Immagini al SEM dell'espanso PUF-T80: a) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 40x; b) superficie dell'espanso ad un ingrandimento 100x; c) sezione ad un ingrandimento 40x; d) sezione ad un ingrandimento 100x [8]

### 1.1.4.3.3 Analisi tramite Microtomografia Computerizzata ( $\mu$ -CT)

La microtomografia computerizzata ( $\mu$ -CT) ha permesso di svolgere un'analisi quantitativa della porosità degli espansi. I parametri principali selezionati sono stati il diametro medio dei pori, la distribuzione media dei pori, lo spessore delle pareti e il grado di interconnessione dei pori. L'analisi è stata effettuata tramite lo scanner 1172  $\mu$ -CT imaging system (Bruker microCT<sup>®</sup>, Aartselaar, Belgio) presso l'Institute of Clinical Dentistry dell'Università di Oslo, Norvegia. Per ogni tipologia di espanso sono stati realizzati cinque campioni ( $\varnothing=6\text{mm}$ ,  $h=4\text{mm}$ ).

I relativi dati per ciascuna tipologia di espanso sono stati riportati Tabella 1.1.9.

**Tabella 1.1.9** Diametri medio dei pori, spessore medio dei pori e porosità aperta e chiusa di ciascuna tipologia di espanso [8]

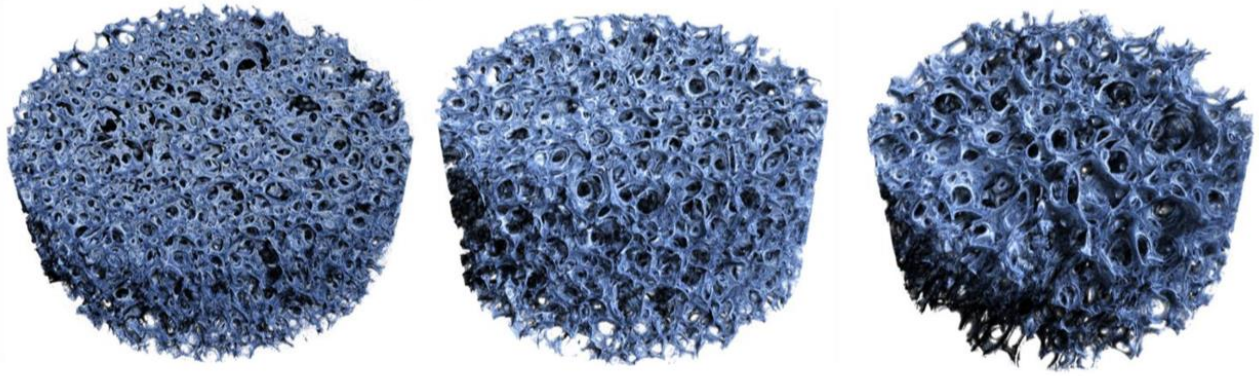
<b>Espanso</b>	<b>PUf-3KP</b>	<b>PUf-2KP</b>	<b>PUf-base</b>	<b>PUf-TP80</b>	<b>PUf-T80</b>
<b><math>\phi</math> pori (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	407,47 $\pm$ 35,18	452,83 $\pm$ 45,07	589,00 $\pm$ 41,71	526,01 $\pm$ 29,18	532,55 $\pm$ 27,76
<b>Spessore pareti (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	38,13 $\pm$ 1,65	40,85 $\pm$ 2,21	50,83 $\pm$ 5,62	45,43 $\pm$ 4,19	44,55 $\pm$ 2,29
<b>Porosità aperta (%)</b>	90,46 $\pm$ 0,35	91,32 $\pm$ 0,78	91,96 $\pm$ 0,14	91,02 $\pm$ 0,39	92,53 $\pm$ 0,23
<b>Porosità chiusa (%)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Distribuzione media <math>\phi</math> pori (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	70% tra 100÷500	60% tra 100÷500	50% tra 300÷700	50% tra 200÷600	50% tra 300÷700
<b>Distribuzione media spessore pareti (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	40% tra 26,15÷49,40	37% tra 26,15÷49,40	50% superiore a 72,65	85% tra 2,9÷72,65	80% tra 2,9÷72,65

Da questi, si evince che il diametro medio dei pori delle schiume PUF-3KP e PUF-2KP non risulta essere statisticamente differente ( $p > 0,05$ ) mentre risulta essere significativamente inferiore ( $p < 0,05$ ) rispetto al diametro medio dei pori di tutti gli altri espansi. Osservando i risultati relativi alla distribuzione del diametro dei pori, si evince che gli espansi PUF-3KP e PUF-2KP presentano una percentuale di pori con diametro compreso tra  $100\mu\text{m}$  e  $500\mu\text{m}$  maggiore rispetto agli altri espansi.

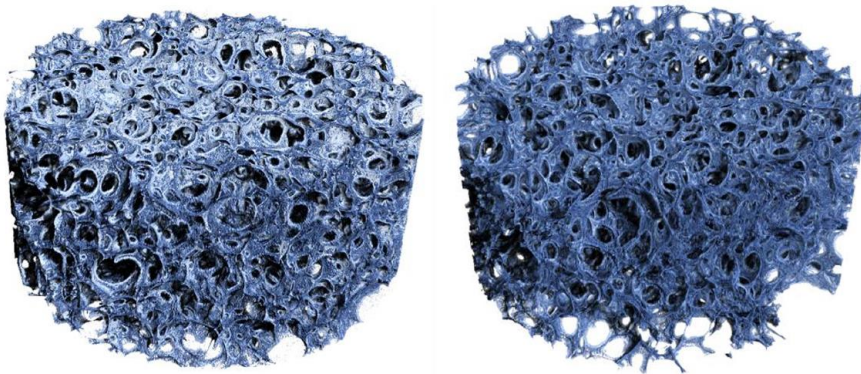
Per quanto riguarda gli spessori delle pareti dei pori si ha una differenza staticamente rilevante ( $p < 0,05$ ) tra l'espanso PUF-3KP rispetto a PUF-base e PUF-TP80 e tra l'espanso PUF-2KP rispetto PUF-base.

Tutte le schiume presentano una porosità aperta molto elevata, superiore al 90% e un alto grado di interconnessione dettato dall'assenza di pori chiusi. Gli espansi caratterizzati dall'assenza di PIME, ossia PUF-base e PUF-TP80, presentano una porosità aperta tra loro non significativamente differente ( $p > 0,05$ ); gli espansi PUF-3KP e PUF-TP80, presentano tra loro differenze statisticamente non significative ( $p > 0,05$ ) e una porosità significativamente inferiore ( $p < 0,05$ ) rispetto ai corrispettivi espansi senza PIME; infine, il PUF-2KP presenta una porosità significativamente superiore ( $p < 0,05$ ) a PUF-3KP, minore ( $p < 0,05$ ) a PUF-TP80 e non statisticamente differente ( $p > 0,05$ ) rispetto a PUF-base e PUF-TP80.

Tramite la  $\mu$ -CT sono state elaborate delle immagini tridimensionali (Figura 1.1.13, Figura 1.1.14) che arricchiscono l'analisi morfologica per ciascun tipo di espanso. Nello specifico, in tali modelli trovano riscontro le considerazioni fatte tramite l'analisi al SEM e i diversi valori (diametro medio dei pori, distribuzione del diametro dei pori, spessore medio delle pareti, distribuzione dello spessore delle pareti, porosità aperta e chiusa) precedentemente riportati della microtomografia computerizzata. Difatti, tutti gli espansi risultano altamente porosi ed omogenei con un alto grado di interconnessione; gli espansi caratterizzati dalla presenza del PIME presentano pori dalla forma più sferica; gli espansi PUF-3KP e PUF-2KP presenta un diametro medio dei pori inferiore agli altri espansi [8].



**Figura 1.1.13** modello tridimensionale ricostruito tramite  $\mu$ -CT di un campione di espanso PUF-3KP, PUF-2KP e PUF-base [8]



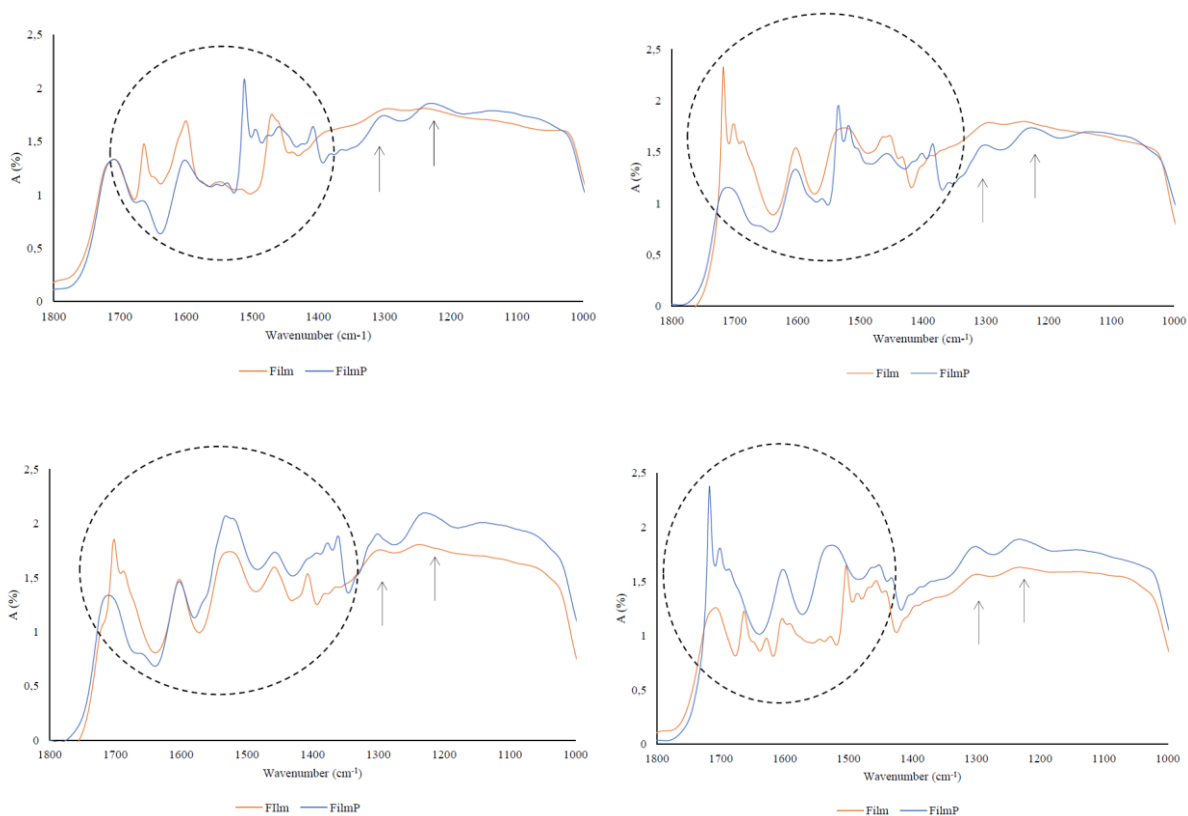
**Figura 1.1.14** modello tridimensionale ricostruito tramite  $\mu$ -CT di un campione di espanso PUF-TP80 e PUF-T80 [8]

#### 1.1.4.3.4 Spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier (FT-IR)

La spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier (FT-IR) è stata impiegata per verificare la differente composizione chimica degli espansi sintetizzati con e senza PIME. A tale fine, sono stati realizzati dei campioni bidimensionali a partire dalla miscela di reazione: i campioni denominati Film PIME presentano la medesima composizione chimica degli espansi caratterizzati dalla presenza di PIME (PUf-3KP, PUf-2KP, PUf-TP80), mentre i campioni denominati Film base hanno la medesima composizione degli espansi di controllo non contenenti PIME (PUf-base e PUf-T80). Tali campioni sono stati poi analizzati tramite lo spettrofotometro Spotlight 400 FT-IR

Imaging System (Perkin Elmer®) presso l'Institute of Clinical Dentistry dell'Università di Oslo, Norvegia.

Dai risultati ottenuti (Figura 1.1.15), si evince che per i film caratterizzati dalla presenza di PIME negli spettri IR siano presenti delle bande tra  $1350\text{cm}^{-1}$  e  $1100\text{cm}^{-1}$  (indicate in figura con delle frecce) assenti nello spettro del film senza PIME: le bande tra  $1370\text{cm}^{-1}$  e  $1310\text{cm}^{-1}$  sono attribuibili allo *stretching* dell'ammina terziaria alifatica ( $> \text{N-CH}_3$ ) del PIME mentre le bande tra  $1300\text{cm}^{-1}$  e  $1150\text{cm}^{-1}$  allo *stretching* dell'ammide terziaria (C-N) del PIME. E' anche possibile notare nette differenze tra gli spettri dei campioni con e senza PIME nella regione compresa tra  $1700\text{cm}^{-1}$  e  $1400\text{cm}^{-1}$  attribuibili ad una modifica dell'arrangiamento strutturale della catena polimerica a causa della presenza del PIME [8].



**Figura 1.1.15** Ingrandimento dello spettro IR tra  $1800\text{cm}^{-1}$  e  $1000\text{cm}^{-1}$  dei film in quattro zone differenti di un singolo campione: le frecce indicano le bande comprese tra  $1350\text{cm}^{-1}$  e  $1100\text{cm}^{-1}$  [8]

### 1.1.4.3.5 Rigonfiamento in acqua a 37°C

Le prove di rigonfiamento sono state condotte al fine di valutare l'idrofilicità degli espansi e per preparare i campioni alle prove meccaniche. Per ogni tipo di schiuma sono stati realizzati 3 campioni ( $\varnothing=15\text{mm}$ ,  $h=10\text{mm}$ ) che sono stati pesati in condizione anidre e successivamente immersi in acqua deionizzata a 37°C. Le pesate sono state realizzate a differenti *time point* (0, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 24 h, 1 volta al giorno fino al raggiungimento del plateau). L'assorbimento è stato calcolato impiegando la seguente equazione:

$$\text{Water Uptake (\%)} = \frac{w_i - w_0}{w_0} \times 100$$

Dove  $w_0$  indica il peso del campione in condizioni anidre e  $w_i$  indica il peso del campione ai differenti *time point*. In Tabella 1.1.10 sono stati riportati i valori di *water uptake* alle 24h e al raggiungimento del plateau. Nonostante i valori medi di *water uptake* a plateau sembrino segnalare una differenza tra i valori ottenuti, da un punto di vista statistico non vi sono differenze significative ( $p>0,05$ ) a causa dell'alta deviazione standard. Sembrerebbe tuttavia che gli espansi caratterizzati dalla presenza di PIME subiscano un rigonfiamento leggermente maggiore: si potrebbe ipotizzare che ciò accada in quanto il PIME riesca ad instaurare un numero maggiore di interazioni elettrostatiche con le molecole d'acqua in seguito alla protonazione a  $\text{pH}=7$  dei gruppi amminici terziari [8].

**Tabella 1.1.10** Valore di *Water Uptake* dopo 24h e al plateau per ciascuna tipologia di espanso [8]

Espanso	Water Uptake 24h (%)	Water Uptake a plateau (%)
<b>PUf-3KP</b>	254,20 ± 36,79	337,03 ± 59,20
<b>PUf-2KP</b>	201,75 ± 21,11	298,97 ± 48,60
<b>PUf-base</b>	186,53 ± 43,95	234,59 ± 45,24
<b>PUf-TP80</b>	305,87 ± 34,67	344,56 ± 22,90
<b>PUf-T80</b>	268,11 ± 36,58	323,72 ± 40,37

### 1.1.4.3.6 Prove meccaniche a compressione

Le prove meccaniche sono state eseguite tramite lo strumento per prove uniassiali MTS® su campioni ( $\varnothing=15\text{mm}$ ,  $h=10\text{mm}$ ) allo stato idratato, ossia al raggiungimento del plateau in acqua distillata a  $37^\circ\text{C}$ . Sono state condotte due tipologie differenti di prove: prove meccaniche a compressione fino al 95% di deformazione e prove meccaniche a compressione cicliche che verranno descritte nel seguito [8].

#### 1.1.4.3.6.1 Prove meccaniche a compressione fino al 95% di deformazione

Tali prove meccaniche sono state condotte fino a una compressione pari al 95% di deformazione dei campioni, operando in controllo di deformazione con una velocità pari a  $1\text{mm}/\text{min}$  e applicando un precarico pari a  $0,5\text{ N}$ . L'obiettivo è stato quello di ottenere l'andamento sforzo/deformazione per ogni tipologia di espanso e, conseguentemente, determinare il modulo elastico ( $E$ ), il modulo di collasso ( $m$ ), lo sforzo relativo al 10% di deformazione ( $\sigma_{10\%}$ ), sforzo e deformazione di snervamento ( $\sigma_{sn}$  e  $\varepsilon_{sn}$ ) e, infine, lo sforzo massimo corrispondente alla deformazione del 95%.

Dai dati ottenuti (Tabella 1.1.11) si evince che l'espanso PUF-3KP presenta un modulo elastico significativamente maggiore ( $p<0,05$ ) rispetto a tutti gli altri espansi; l'espanso PUF-2KP ha un modulo elastico significativamente maggiore ( $p<0,05$ ) rispetto a tutti gli altri espansi con eccezione del PUF-3KP; l'espanso PUF-T80 presenta un modulo elastico significativamente maggiore ( $p<0,05$ ) rispetto a PUF-base; infine, PUF-TP80 e PUF-base presentano un modulo elastico simile da un punto di vista statistico ( $p>0,05$ ). Per quanto riguarda il modulo di collasso, gli espansi PUF-3KP, PUF-2KP e PUF-T80 presentano un valore confrontabile tra loro da un punto di vista statistico ( $p>0,05$ ) ma significativamente differente ( $p<0,05$ ) rispetto a quello degli altri due espansi, ossia PUF-base e PUF-TP80. Nello specifico, quest'ultima tipologia di espanso presenta il modulo di collasso  $m$  più basso. Gli espansi PUF-3KP e PUF-2KP presentano uno sforzo di snervamento non statisticamente differente tra loro ( $p>0,05$ ) e significativamente maggiore ( $p<0,05$ ) rispetto agli altri espansi [8].



**Tabella 1.1.11** Valori del modulo elastico (E), modulo di collasso (m), sforzo relativo al 10% di deformazione ( $\sigma_{10\%}$ ), sforzo di snervamento  $\sigma_{sn}$ , deformazione di snervamento  $\epsilon_{sn}$  e, infine, lo sforzo massimo  $\sigma_{max}$  corrispondente al 95% di deformazione per tutte le tipologie di espanso [8]

<b>Espanso</b>	<b>PUf-3KP</b>	<b>PUf-2KP</b>	<b>PUf-base</b>	<b>PUf-TP80</b>	<b>PUf-T80</b>
<b>E (MPa)</b>	0,17 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,067 ± 0,004	0,058±0,006	0,089±0,002
<b>m (MPa)</b>	0,048±0,0003	0,045±0,006	0,037±0,003	0,027±0,005	0,048±0,003
<b><math>\sigma_{10\%}</math> (MPa)</b>	0,017±0,001	0,0013±0,003	0,007±0,064	0,006±0,001	0,0073±0,0001
<b><math>\sigma_{sn}</math> (MPa)</b>	0,018±0,001	0,014±0,003	0,008±0,001	0,006±0,001	0,003±0,001
<b><math>\epsilon_{sn}</math> (mm/mm)</b>	0,100±0,003	0,098±0,007	0,114±0,002	0,099±0,011	0,032±0,007
<b><math>\sigma_{max}</math> (MPa)</b>	1,63±0,74	1,57±0,02	1,56±0,47	0,62±0,12	1,50±0,81

#### 1.1.4.3.6.2 Prove meccaniche cicliche a compressione

Le prove meccaniche a compressione cicliche (seguendo la norma UNI 6350-68) sono state condotte operando in controllo di deformazione con una velocità pari a 1 mm/min e con un precarico applicato pari a 0,5 N. Tali prove sono state eseguite applicando un carico fino al 50% di deformazione e successivamente rimosso, ed eseguendo 5 cicli per ogni campione. L'obiettivo è stato quello di ottenere l'andamento sforzo/deformazione per ogni tipologia di espanso e, conseguentemente, il modulo elastico E, il modulo di collasso m, sforzo e deformazione di snervamento ( $\sigma_{sn}$  e  $\epsilon_{sn}$ ) e, infine, l'area del ciclo di isteresi ( $A_{ist}$ ).

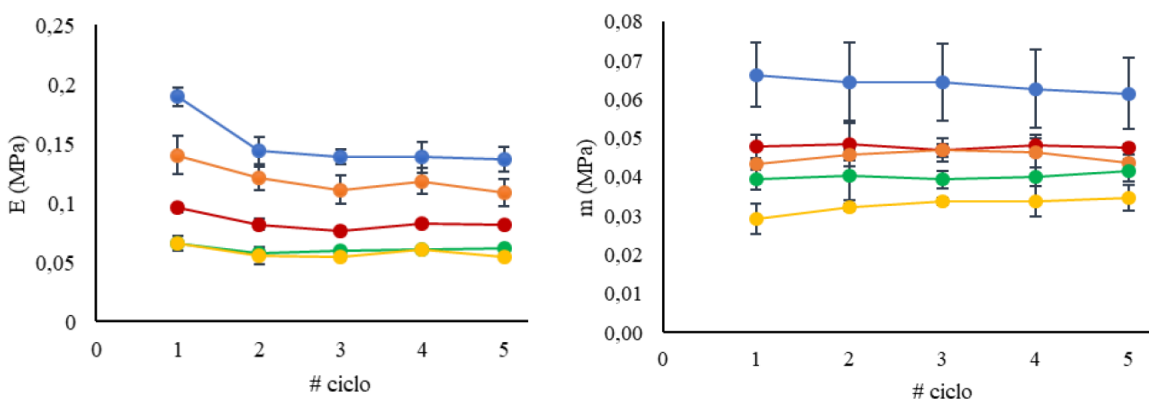
Il primo grafico riportato in Figura 1.1.16 mostra l'andamento del modulo elastico per ciascuna tipologia di schiuma in funzione del ciclo di carico: si può notare che l'espanso PUf-3KP presenti al primo ciclo un modulo elastico maggiore rispetto a quelli degli altri, che diminuisce sensibilmente già al secondo ciclo. In misura minore è possibile riscontrare tale comportamento anche per l'espanso PUf-2KP; ad ogni

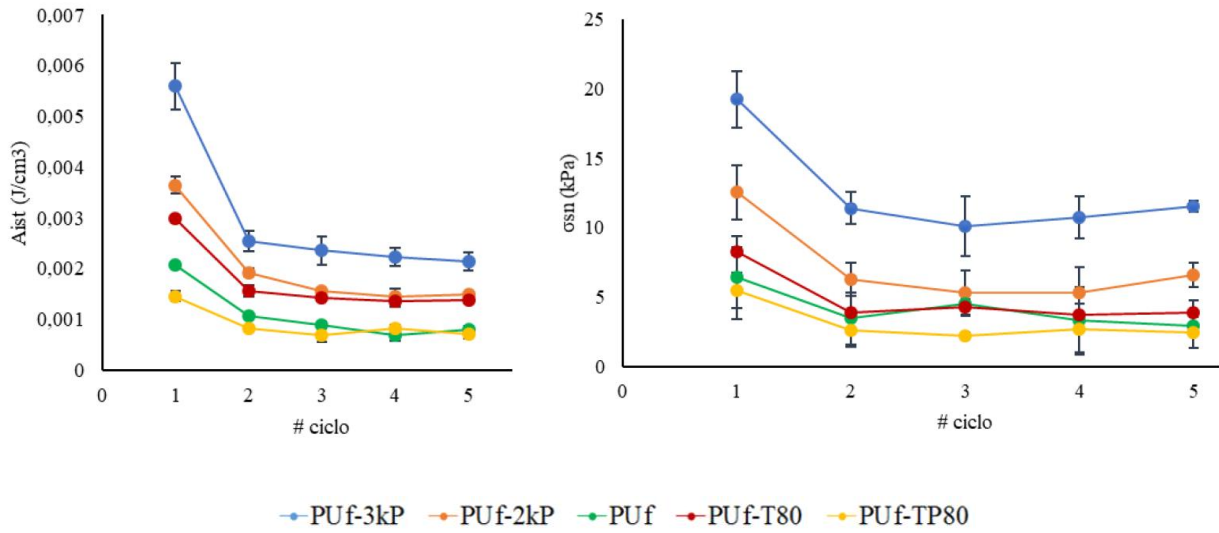
modo il modulo elastico di PUF-2KP non risulta differente da un punto di vista statistico ( $p > 0,05$ ) dal secondo al quinto ciclo a quello dell'espanso PUF-3KP e risulta significativamente maggiore ( $p < 0,05$ ) rispetto a tutti gli altri espansi. I moduli elastici degli espansi PUF-base e PUF-TP80 risultano essere confrontabili tra loro ( $p > 0,05$ ) ma significativamente inferiori rispetto a quello dell'espanso PUF-T80.

Il secondo grafico in Figura 1.1.16 riguarda il modulo di collasso: quello dell'espanso PUF-3KP non presenta differenze da un punto di vista statistico ( $p > 0,05$ ) per ogni ciclo di carico rispetto all'espanso PUF-T80 mentre risulta significativamente superiore ( $p < 0,05$ ) a tutti gli altri espansi per ogni ciclo. L'espanso PUF-T80 invece risulta essere superiore significativamente ( $p < 0,05$ ) a tutti gli espansi ad eccezione del PUF-2KP con cui risulta confrontabile ( $p > 0,05$ ).

L'area di isteresi ad ogni ciclo, riportata nel terzo grafico in Figura 1.1.16, risulta significativamente differente ( $p < 0,05$ ) tra tutti gli espansi a eccezione di PUF-T80 e PUF-TP80. In particolare, l'espanso PUF-3KP presenta un valore ad ogni ciclo superiore agli altri espansi.

Infine, lo sforzo di snervamento è mostrato nell'ultimo grafico in Figura 1.1.16 dove si può osservare che l'espanso PUF-3KP presenta un valore superiore agli altri espansi ad ogni ciclo di carico. Inoltre, sia per l'espanso PUF-3KP sia per PUF-2KP si verifica una diminuzione dello sforzo di snervamento a seguito del primo ciclo [8].





**Figura 1.1.16** Grafici relativi al modulo elastico, modulo di collasso, Area di isteresi, sforzo di snervamento per ogni tipologia di schiuma in funzione dei cicli di carico [8]

## 1.2 *Wound healing e Wound dressing*

### 1.2.1 Lesioni della cute

La cute svolge funzioni fondamentali per il nostro organismo, quali:

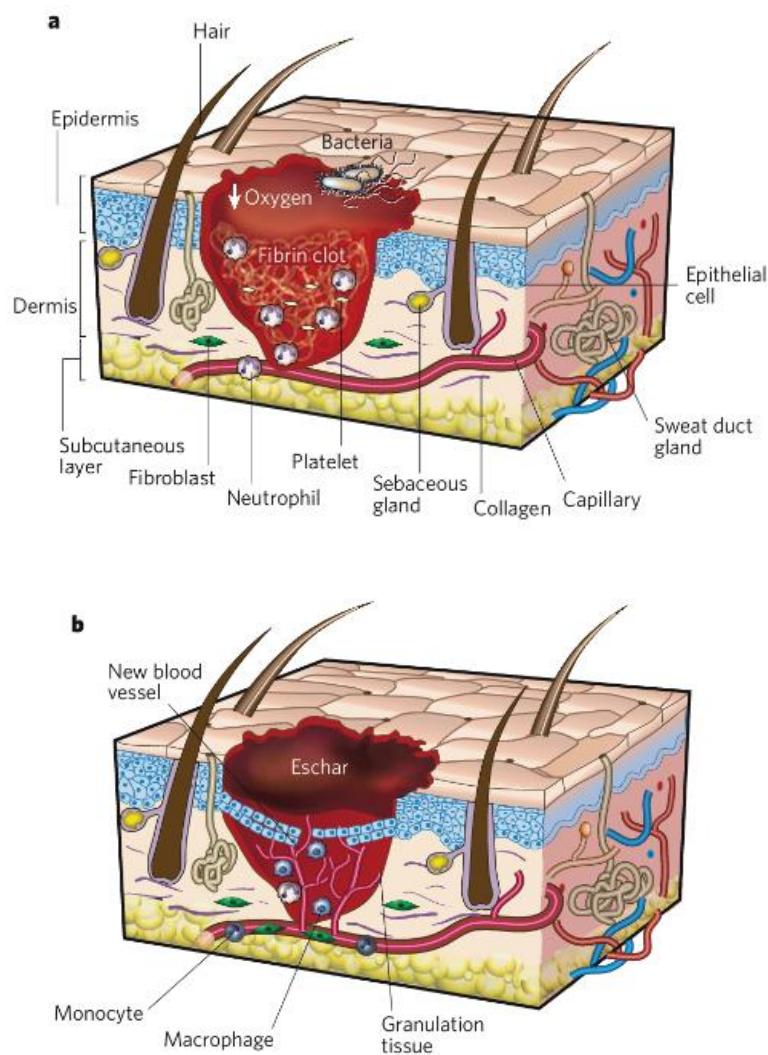
- barriera da: agenti fisici, chimici e biologici;
- omeostatica: prevenendo la disidratazione e regolando la temperatura corporea;
- sensoriale: tatto, dolore e piacere;
- metabolica: convertendo le molecole precursori in vitamina D grazie al metabolismo del calcio;
- secretiva: ferormoni e sudore.

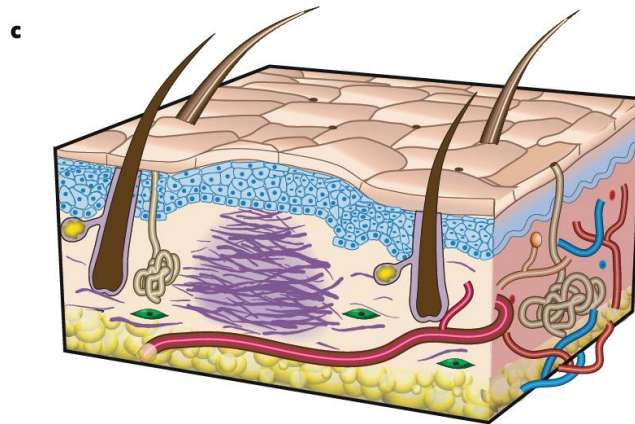
Nel momento in cui subisce un trauma o una lacerazione vengono principalmente meno il mantenimento dell'omeostasi e la funzione di barriera, lasciando l'organismo esposto agli agenti patogeni. Nello specifico, con il termine "lesione" si intende una perdita di integrità della cute che può compromettere non solo lo stato più superficiale del tessuto (epidermide) ma anche gli strati più interni e profondi (derma e ipoderma) fino a coinvolgere muscoli, tendini, vasi sanguigni e, nei casi più gravi, anche il tessuto osseo. Il fisiologico processo di guarigione (*wound healing*) è dinamico e particolarmente complesso, e coinvolge la cascata della coagulazione del sangue, le vie infiammatorie e il sistema immunitario. Pertanto, le tipologie di cellule coinvolte sono le cellule del sistema immunitario, come neutrofili, monociti, linfociti e cellule dendritiche, e quelle che costituiscono il tessuto epiteliale quali fibroblasti, cheratinociti e cellule epiteliali. Tramite i processi di migrazione, proliferazione e differenziazione è possibile ripristinare l'integrità e l'omeostasi della cute. La rigenerazione della cute consta di tre principali fasi quali:

- i. Fase infiammatoria (0-3 giorni): occorre subito dopo la lesione ed è caratterizzata dall'attivazione della cascata di coagulazione, per limitare la

fuoriuscita di sangue, e del sistema immunitario, per limitare l'ingrasso di agenti esterni e agenti patogeni (Figura 1.2.1 a);

- ii. Fase proliferativa (3-24 giorni): è caratterizzata dalla migrazione dei fibroblasti e dalla deposizione della matrice extracellulare (ECM) determinando la formazione del tessuto di granulazione. All'interno di tale tessuto si ha la formazione di una rete vascolare grazie al processo di angiogenesi. Infine, in questa fase si verifica la migrazione dei cheratinociti verso il centro della ferita (Figura 1.2.1 b);
- iii. Fase di rimodellamento (da 6-10 giorni a 12-24 mesi): è caratterizzata da un lento cambiamento della composizione della ECM (ad esempio, il collagene di tipo III viene sostituito dal collagene di tipo I) e da una diminuzione della rete vascolare (Figura 1.2.1 c).





**Figura 1.2.1** a) fase infiammatoria; b) fase proliferativa; c) fase di rimodellamento [25]

Nel momento in cui il tessuto rimane bloccato in una delle fasi precedentemente descritte non terminando il processo fisiologico di guarigione, si ha la generazione di una lesione cronica; nello specifico, una lesione viene considerata tale se non viene riscontrato un miglioramento per più di 4 settimane. Diversi sono i fattori che concorrono alla generazione di lesioni croniche, come:

- Fattori locali: come, ad esempio, la disidratazione, il verificarsi di traumi ricorrenti, la formazione di tessuto necrotico, un insufficiente apporto di sangue e l'insorgenza di infezioni;
- Fattori sistemici: come l'età, lo stato di nutrizione, lo stato del sistema immunitario, lo stato di malattia e l'assunzione di farmaci.

Inoltre, una volta avvenuta la lesione, possono verificarsi degli eventi che alterano il fisiologico processo di guarigione come la comparsa di sierosi, ematomi o cheloidi [24] [25] [26].

## 1.2.2 Sistemi di medicazione (*wound dressing*)

Con il termine *wound dressing* si fa riferimento a tutti quei sistemi di medicazione volti a mantenere o ricreare un ambiente favorevole alla guarigione della cute lesionata. Tali sistemi si distinguono principalmente in due macrocategorie, quali:

- *Wound dressing* primario: elemento del sistema di medicazione volto a diretto contatto con la superficie del tessuto lesso;
- *Wound dressing* secondario: elemento del sistema di medicazione volto a stabilizzare il *dressing* primario e può svolgere alcune funzioni come quella di assorbimento o di barriera.

Un tempo il sistema di medicazione più comune erano le garze sterili la cui funzione era esclusivamente di protezione della lesione da agenti esterni o batteri (azione di tipo meccanica). Ad oggi, le specifiche richieste dal *dressing* sono più complesse per creare e/o mantenere un ambiente più favorevole possibile per la rigenerazione del tessuto lesionato, e sono:

- permeabilità ai gas, in particolar modo al vapore acqueo, all'ossigeno e all'anidride carbonica;
- capacità di mantenere un adeguato tasso di umidità della lesione prevenendo la disidratazione e assorbendo l'eccesso di essudato;
- capacità di sfavorire o prevenire l'adesione e la proliferazione batterica;
- capacità di proteggere da particelle esterne;
- capacità di non rilasciare eventuali residui considerati non favorevoli alla fisiologica rigenerazione del tessuto;
- isolante termico;
- non tossico e non allergenico;
- non adesivo in modo che possa essere rimosso senza indurre ulteriori traumi o lesioni al tessuto sottostante;
- capacità di proteggere il tessuto da ulteriori traumi;

- confortevole e adattabile alla forma della lesione;
- basso costo;
- lunga *shelf life*.

Le tipologie di *dressing* commerciali più diffuse sono *dressing* a bassa aderenza, film semipermeabili, idrocolloidi, idrogeli, alginati, espansi poliuretanicici ed espansi siliconici.

I *dressing* a bassa aderenza sono generalmente tessuti a trama imbevuti in paraffina morbida o clorexidina oppure film perforati o a multistrato. Il fatto che presentano una bassa aderenza alla superficie della lesione permette loro di essere impiegati su cute particolarmente sensibile o delicata.

I film semipermeabili sono sottili strati, generalmente trasparenti, di materiale poliuretanicico rivestiti con una pellicola acrilica ipoallergenica adesiva. Risultano permeabili al vapore acqueo, ossigeno, anidride carbonica e impermeabili ai batteri e all'acqua; per tale motivo non sono in grado di assorbire grandi quantitativi di essudato. Vengono prevalentemente impiegati su lesioni superficiali e non troppo umide.

Gli idrocolloidi sono medicazioni sottoforma di film o pellicola semipermeabile costituite da materiali colloidali (agenti gelificanti), come carbosimetilcellulosa (CMC), pectina, gelatina, in combinazione con materiali elastomerici e adesivi. Il materiale colloidale a contatto con l'essudato rigonfia raggiungendo uno stato fisico *gel-like*; in questo stato risulta permeabile al vapore acqueo e all'aria. Inoltre, questi sistemi di medicazione sono caratterizzati da uno strato più esterno, generalmente poliuretanicico, che funge da barriera contro i batteri e da isolante termico. Possono essere impiegati sia su lesioni secche sia su lesioni bagnate e non necessitano di un *dressing* secondario.

Gli idrogeli sono matrici di polimeri insolubili (cross-linked) che racchiudono un volume d'acqua pari fino a 80-90%. In commercio sono presenti sottoforma di gel amorfi o fogli sottili extra flessibili. Risultano permeabili ai gas ma non sono in grado di assorbire grandi volumi di essudato e non hanno un'azione preventiva rispetto all'adesione batterica. Ad ogni modo, promuovono la granulazione (formazione del



tessuto di granulazione) e la epitelizzazione. Vengono impiegati per idratare le lesioni secche e generalmente richiedono un dressing secondario.

Gli alginati più diffusi in commercio possono essere costituiti al 100% da alginato di calcio oppure al 80% da alginato di calcio e al 20% da alginato di sodio. Le diverse composizioni incidono sulle proprietà di *dressing* come, ad esempio, il quantitativo di essudato che sono in grado di assorbire oppure la capacità di mantenimento della forma originaria. In generale, gli alginati risultano essere altamente assorbenti, non adesivi, e biodegradabili; se adeguatamente funzionalizzati possono rilasciare in modo controllato particelle di argento al fine di prevenire o limitare l'adesione batterica. Per tali motivi possono essere impiegati sia su lesioni secche che umide.

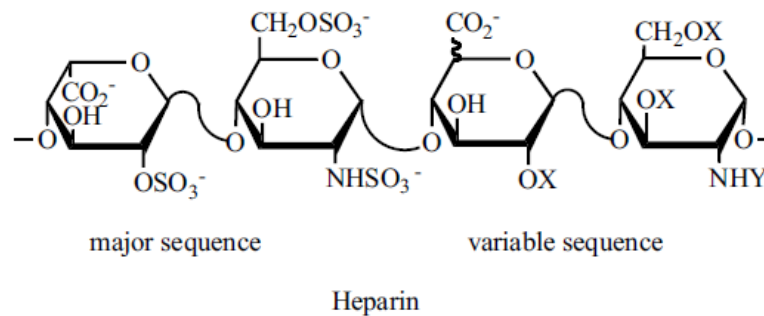
Gli espansi poliuretanic (PU) e siliconici (Si) sono strutture porose permeabili ai gas (vapore acqueo, ossigeno e anidride carbonica) e in grado di assorbire grandi volumi di essudato; sono anche ottimi isolanti termici. I sistemi di medicazione a base di espansi PU o Si risultano essere altamente versatili e progettabili, per cui possono essere caratterizzati da più strati idrofilici o idrofobici e possono essere posti a diretto contatto o meno con la superficie della lesione. Ad ogni modo, è preferibile impiegare tale tipologia di *dressing* su lesioni profonde e particolarmente umide.

Un'altra classe di sistemi di medicazione sempre più diffusa sono i *dressing* antimicrobici. In tale classe rientrano tutti quei sistemi funzionalizzati, ad esempio con particelle di argento, in modo tale da sfavorire o limitare l'adesione e la proliferazione batterica [4] [5].

### 1.2.3 Ruolo dell'eparina nel *wound healing*

L'eparina, scoperta nel 1916 da Jay McLean e William Henry Howell, è un GAG largamente impiegato in medicina grazie alle sue ben note proprietà anticoagulanti. È costituita da una miscela di polisaccaridi anionici lineari caratterizzati da unità saccaridiche le cui principali sono l'acido 2-O-sulfo- $\alpha$ -L-iduronico, 2-deossi-2-sulfammino-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glucosio, acido  $\beta$ -D-glucuronico, 2-acetammido-2-deossi-

$\alpha$ -D-glucosio e acido  $\alpha$ -L-iduronico (Figura 1.2.2). In commercio esistono diverse tipologie di eparina le cui caratteristiche derivano dal tipo di tessuto da cui è estratta.



**Figura 1.2.2** Generica rappresentazione della struttura chimica dell'eparina [7]

Nell'Ingegneria Tissutale l'eparina viene impiegata per:

- favorire la biocompatibilità ed emocompatibilità della superficie del materiale;
- favorire l'angiogenesi grazie alla funzionalizzazione con specifici fattori di crescita;
- favorire l'adesione e la proliferazione cellulare grazie alla funzionalizzazione con specifici fattori di crescita;
- diminuire la proliferazione e adesione batterica.

Grazie alle sue proprietà è stata studiata nell'ambito del *wound healing* per essere integrata in sistemi di medicazione al fine limitare l'adesione e la proliferazione batterica o per favorire l'adesione e la proliferazione cellulare.

L'eparina può essere integrata all'interno degli scaffold tramite legami covalenti oppure tramite interazioni intermolecolari grazie alla presenza di cariche negative sui gruppi solfonici e carbossilici a pH fisiologico. Nel primo caso, si ha una interazione duratura nel tempo che, teoricamente, non consente un rilascio di eparina nell'ambiente circostante; ad ogni modo, tale tipologia di legame può comprometterne fortemente la bioattività. Contrariamente, nel secondo caso si può verificare un lento rilascio di molecole di eparina nel tempo ma la sua bioattività non rischia di essere compromessa. Inoltre, in questo caso la funzionalizzazione del materiale con l'eparina risulta meno complessa [6] [7].

## SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare se gli espansi contenenti PIME (PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-TP80), realizzati nel precedente lavoro di tesi, potessero essere impiegati favorevolmente come *wound dressing* primario per la cura di ulcere e ustioni. Nello specifico, il sistema di medicazione progettato prevede la funzionalizzazione con eparina, volta a diminuire l'adesione e la proliferazione batterica che, ancora oggi, risulta essere uno degli aspetti più critici per la guarigione delle lesioni croniche della cute.

In letteratura è stata ampiamente dimostrata la capacità da parte del PIME di formare complessi stabili con l'eparina grazie a interazioni prevalentemente ioniche ed elettrostatiche tra i gruppi amminici terziari (carichi positivamente a pH fisiologico) del PIME e i gruppi carbossilici e solfonici (carichi negativamente a pH fisiologico) dell'eparina.

Allo scopo di verificare l'idoneità e, possibilmente, anche un miglioramento delle prestazioni per applicazioni nel *wound healing* è stato preso in considerazione un idoneo protocollo di caratterizzazione, tramite prove funzionali alla specifica tipologia applicativa, ossia:

- Prove di assorbimento di fluidi, tramite immersione in un liquido che simulasse la composizione dell'essudato (*Simulated Wound Fluid*, SWF);
- Prove di ritenzione dei fluidi assorbiti, tramite l'applicazione di una forza a compressione pari a 0,419 N per 20 sec dopo 24h e dopo otto giorni (plateau) di immersione in liquido SWF al fine di valutare la capacità degli espansi di trattenere il fluido SWF;
- Analisi in spettroscopia a infrarossi in Trasformata di Fourier (FT-IR) sia in ATR (Attenuated Total Reflectance) sia in trasmissione per verificare la presenza di PIME e l'effettivo adsorbimento dell'eparina da parte del PIME;

- prove di adesione batterica utilizzando il ceppo batterico *Escherichia Coli* (JM109) al fine di verificare l'effettiva capacità di limitare l'adesione e proliferazione batterica grazie alla presenza di eparina chimicamente legata al PIME.

## CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI

### 2.1 Materiali

#### 2.1.1 Simulated Wound Fluid (SWF)

Al fine di eseguire le prove di assorbimento in un ambiente *wound-like* è stata realizzata una soluzione in grado di simulare la composizione chimica dell'essudato: il *simulated wound fluid* (SWF). La composizione dell'SWF è rappresentata da:

- acqua deionizzata;
- Cloruro di calcio (Calcium Chloride, 10043-52-4, Sigma Aldrich) 0,02 M;
- Cloruro di sodio (Sodium Chloride, 7647-14-5, Sigma Aldrich) 0,4 M;
- Tris (idrossimetil) amminometano (Trizma® BASE, 77-86-1, Sigma Aldrich) 0,08 M.

La Figura 2.1.1 mostra le immagini di questi reagenti.

Per portare il pH della soluzione a 7.5 è stata impiegata una soluzione di HCl 2M, la quale è stata realizzata aggiungendo 164 ml di HCl (Hydrochloric Acid, 7647-01-0, Sigma Aldrich) in 1L di acqua deionizzata [27].

Il procedimento seguito al fine di ottenere la soluzione SWF è stato il seguente:

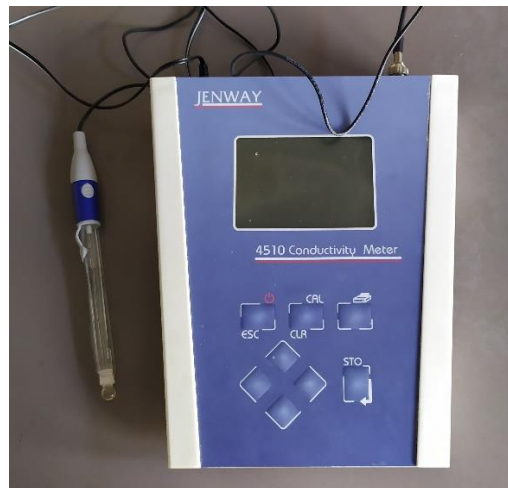
- in un becher munito di barretta magnetica sono stati versati 300 ml di acqua deionizzata ed il becher è stato posto su una piastra magnetica al fine di consentire l'agitazione della soluzione;
- nel becher sono stati aggiunti gradualmente 2,9073 gr di tris (idrossimetil) amminometano e la soluzione è stata agitata a 3000 rpm per facilitare la dissoluzione del reagente in acqua deionizzata;
- alla soluzione sono stati aggiunti gradualmente 7,0128 gr di cloruro di sodio mantenendo un'agitazione pari a 3000 rpm;

- alla soluzione sono stati aggiunti gradualmente 0,6658 gr di cloruro di calcio e mantenendo un'agitazione pari a 3000 rpm al fine di facilitare la dissoluzione dei reagenti;
- il becher è stato trasferito sul bancone per valutare il pH della soluzione tramite un pH-metro (Conductivity Meter 4510, Jenway) (Figura 2.1.2) calibrato precedentemente. Il pH di partenza della soluzione era pari a 10,66;
- gradualmente sono stati aggiunti 200  $\mu$ l di soluzione HCl 2M e ad ogni aggiunta è stato controllato il pH della soluzione sempre tramite il pH-metro;
- giunti in prossimità di un pH pari a 8,5 ad ogni aggiunta di HCl 2M la soluzione SWF è stata agitata a 7000 rpm per 1 minuto al fine di garantire un risultato più omogeneo ed è stato controllato il pH.

A pH=7,8 si è diminuito il quantitativo di soluzione HCl 2M da aggiungere (passando da 100 a 50 e infine 20  $\mu$ l) fino al raggiungimento esatto di un pH=7,5. Ad ogni aggiunta, la soluzione SWF è stata tenuta sotto agitazione a 7000 rpm per 1 minuto ed è stato valutato il pH raggiunto. L'immagine a destra in Figura 2.1.1 rappresenta la soluzione SWF ottenuta.



**Figura 2.1.1** A sinistra sono riportati i tre reagenti principali per la realizzazione del Simulated Wound Fluid: cloruro di calcio, cloruro di sodio, TRIZMA. A destra è riportata la soluzione SWF finale realizzata a pH=7,5



**Figura 2.1.2** pH-metro (Conductivity Meter 4510, Jenway) impiegato per controllare il pH della soluzione

## 2.1.2 Soluzione di eparina

Per condurre l'analisi IR (2.2.3) e le prove di adesione batterica (2.2.4) è stata realizzata una soluzione sterile di eparina 0,5% w/v in PBS [8]. Tale soluzione è stata ottenuta versando l'opportuna quantità di PBS sterile in una provetta contenente il rispettivo quantitativo di eparina sodica da mucosa intestinale porcina (H3393, Sigma Aldrich) precedentemente pesato; la soluzione ottenuta è stata successivamente tenuta sotto agitazione tramite vortex per garantire la totale dissoluzione dell'eparina. Al fine di garantire il mantenimento della sterilità della soluzione i passaggi sono stati eseguiti sotto cappa biologica (classe II) a flusso laminare la soluzione è stata filtrata tramite l'impiego di un filtro (Primo® Syringe Filter, Euroclone) e di una siringa (10 ml SOFT-JECT®, HSW®) assemblati come in Figura 2.1.3.



**Figura 2.1.3** Complesso formato da siringa e filtro adoperati per filtrare la soluzione di eparina

## 2.2 Metodi

### 2.2.1 Prova di assorbimento in SWF

Sono stati realizzati tre campioni cilindrici ( $\phi=10\text{mm}$ ,  $h=4\text{mm}$ ) per ogni tipologia di schiuma e, prima di procedere con le prove di assorbimento in SWF, ciascun campione è stato immerso in etanolo puro per 48h e poi lasciato essiccare all'aria: tale procedura è stata attuata come protocollo di pulizia e disinfezione.

I campioni sono stati pesati al loro stato anidro ( $W_0$ ), quindi posti all'interno di una multiwell da 12 pozzetti e immersi in 2ml di soluzione SWF precedentemente scaldata a  $37^\circ\text{C}$ . In seguito, sono stati posti all'interno della stufa a  $37^\circ\text{C}$  (riportata nella immagine a sinistra in Figura 2.2.1) e a differenti *time point* (15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 24, 72h, 8gg, 10gg, 15gg e 30gg) sono stati nuovamente pesati per mezzo della bilancia riportata in Figura 2.2.1, a destra.

L'assorbimento delle schiume è stato valutato facendo riferimento alla seguente equazione:

$$\text{assorbimento} = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100$$

Dove  $W_1$  indica il peso del campione ad un dato *time point* e  $W_0$  il peso del medesimo campione allo stato anidro.





**Figura 2.2.1** Stufa impiegata sia per scaldare la soluzione SWF a 37°C sia per riporre i campioni durante la prova di assorbimento (a sinistra); bilancia impiegata per eseguire le pesate a differenti *time point* per le prove di assorbimento e per le prove di ritenzione dei fluidi (a destra)

## 2.2.2 Prova di ritenzione dei fluidi

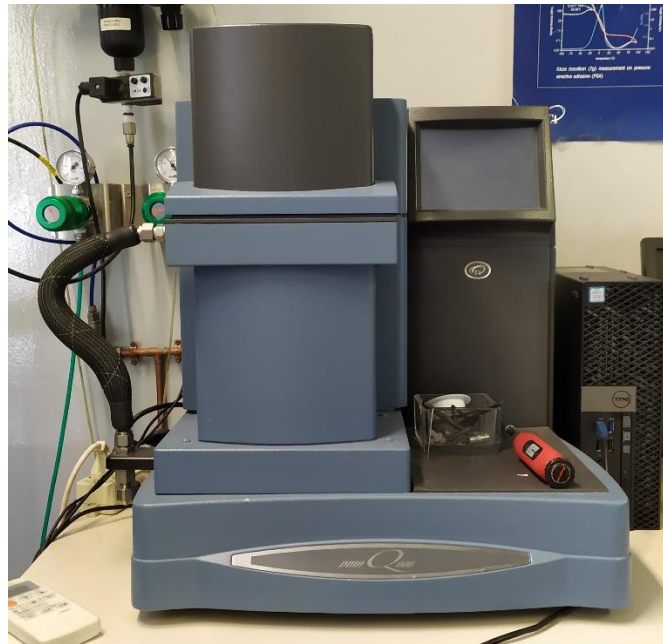
I campioni ottenuti dopo 24h e dopo 192h di assorbimento della soluzione SWF sono stati sottoposti ad una forza pari a 0,419 N per 20 sec tramite analizzatore dinamico meccanico (Q800 DMA, Waters<sup>TM</sup>, TA<sub>s</sub> Instruments) (Figura 2.2.2) Al termine della compressione esercitata, ciascun campione è stato pesato per mezzo della bilancia riportata in Figura 2.2.1.

La ritenzione è stata valutata facendo riferimento alla seguente equazione:

$$ritenzione = \frac{W_2 - W_0}{W_0} \times 100$$

dove  $W_0$  indica il peso allo stato anidro del singolo campione e  $W_2$  indica il peso del campione successivamente alla compressione esercitata.

I valori ottenuti sono stati poi confrontati con i rispettivi valori di assorbimento raggiunti alle 24h e 192h ed è stata valutata la differenza percentuale. Sono stati ricavati anche i grafici di deformazione nel tempo per ogni campione come output meccanico tramite l'impiego di Advantage/Universal Analysis (UA) Software (Waters<sup>TM</sup>, TA<sub>s</sub> Instruments).



**Figura 2.2.2** Strumento DMA (Q800 DMA, Waters<sup>TM</sup>, TAs Instruments) impiegato per esercitare una compressione di 0,419N sui campioni nelle prove di ritenzione dei fluidi

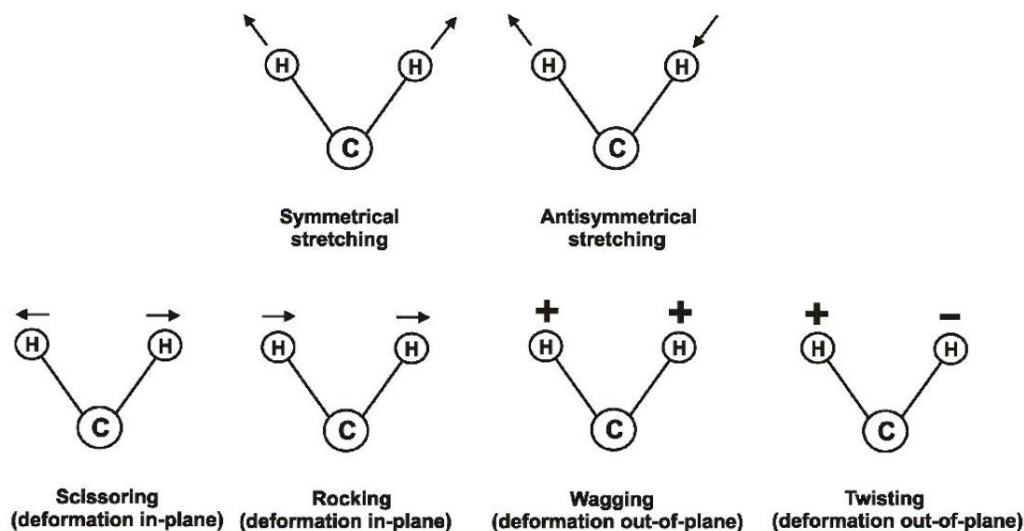
### 2.2.3 Spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier

In generale, la FT-IR si basa sul principio secondo il quale quando una molecola viene incisa da una radiazione IR ad una frequenza specifica ( $\nu$  espressa in  $\text{cm}^{-1}$ ), l'energia ceduta dalla radiazione viene convertita in energia vibrazionale e/o rotazionale dalla molecola; tale vibrazione o rotazione della molecola può avvenire solo se la radiazione incidente presenta un valore specifico che dipende dalle caratteristiche della molecola. Pertanto, secondo tale principio, è possibile associare a determinate bande dello spettro IR la vibrazione o la rotazione di specifiche molecole e specifici gruppi funzionali. Lo spettro IR di interesse è compreso tra  $4000$  e  $200 \text{ cm}^{-1}$  in quanto è in questo intervallo a cui appartengono le bande relative al moto vibrazionale delle molecole. Solitamente è possibile individuare due tipologie di segnali all'interno dello spettro IR di materiali quali:

- Segnali (generalmente compreso tra  $4400\text{ cm}^{-1}$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$  circa) relativi ai singoli gruppi funzionali;
- Segnali (generalmente compreso tra  $1500\text{ cm}^{-1}$  e  $200\text{ cm}^{-1}$  circa) di difficile interpretazione che non corrispondono a uno specifico gruppo funzionale a priori e che identifica nel suo complesso il materiale in esame: per tale motivo vengono definiti *finger-print*.

Una volta incisa da una radiazione IR ad una specifica frequenza  $\nu$ , la molecola può vibrare in due modi principali, quali;

- Vibrazione di *stretching*: consiste in uno stiramento ritmico lungo l'asse del legame tale per cui si ha un accorciamento o un allungamento ritmico della distanza interatomica tra due atomi. Lo stretching può essere simmetrico, nel caso in cui si abbia un allungamento su entrambi i legami di un atomo, oppure asimmetrico, nel caso in cui un legame subisca un allungamento e l'altro un accorciamento, come riportato in Figura 2.2.3.
- Vibrazione di *bending*: consiste nella variazione dell'angolo di legami con un atomo in comune oppure nel movimento di un gruppo di atomi rispetto al resto della molecola. Si possono avere vibrazioni sul piano (*scissoring* e *rocking*) e vibrazioni fuori piano (*wagging* e *twisting*) come riportato in Figura 2.2.3.



**Figura 2.2.3** Schemi rappresentativi dei movimenti di *stretching* simmetrico e asimmetrico e di *bending* nel piano di *scissoring* e *rocking* e fuori dal piano di *wagging* e *twisting*

L'output dell'analisi in spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier risulta essere uno spettro IR caratterizzato dalla presenza di picchi a specifiche frequenze (bande di assorbimento) e risulta necessario attribuire le bande ai moti vibrazionali di specifici gruppi funzionali al fine di riuscire a interpretare al meglio i risultati.

Sono stati impiegati due tipologie di campioni bidimensionali:

- Film PIME: caratterizzati dalla presenza di PIME con la medesima composizione chimica degli espansi PUF-2KP, PUF-3KP, PUF-TP80;
- Film base: non contenenti PIME ed aventi la medesima composizione chimica degli espansi di confronto PUF-base e PUF-T80.

Per ciascuna tipologia di film sono stati preparati 4 campioni di  $\phi=12\text{mm}$  i quali sono stati immersi in etanolo puro per 48h e poi lasciati asciugare come trattamento di pulizia e disinfezione.

In breve, il protocollo dell'analisi IR può essere riassunto come segue:

- è stata realizzata la soluzione PBS, pH=7,3 (Figura 2.2.4) immergendo una pastiglia (PBS tablets, P4417, Sigma Aldrich) in 200 ml di acqua deionizzata. La soluzione, munita di barretta magnetica, è stata messa sotto agitazione a 5000 rpm su piastra magnetica per favorire la totale dissoluzione della pastiglia;



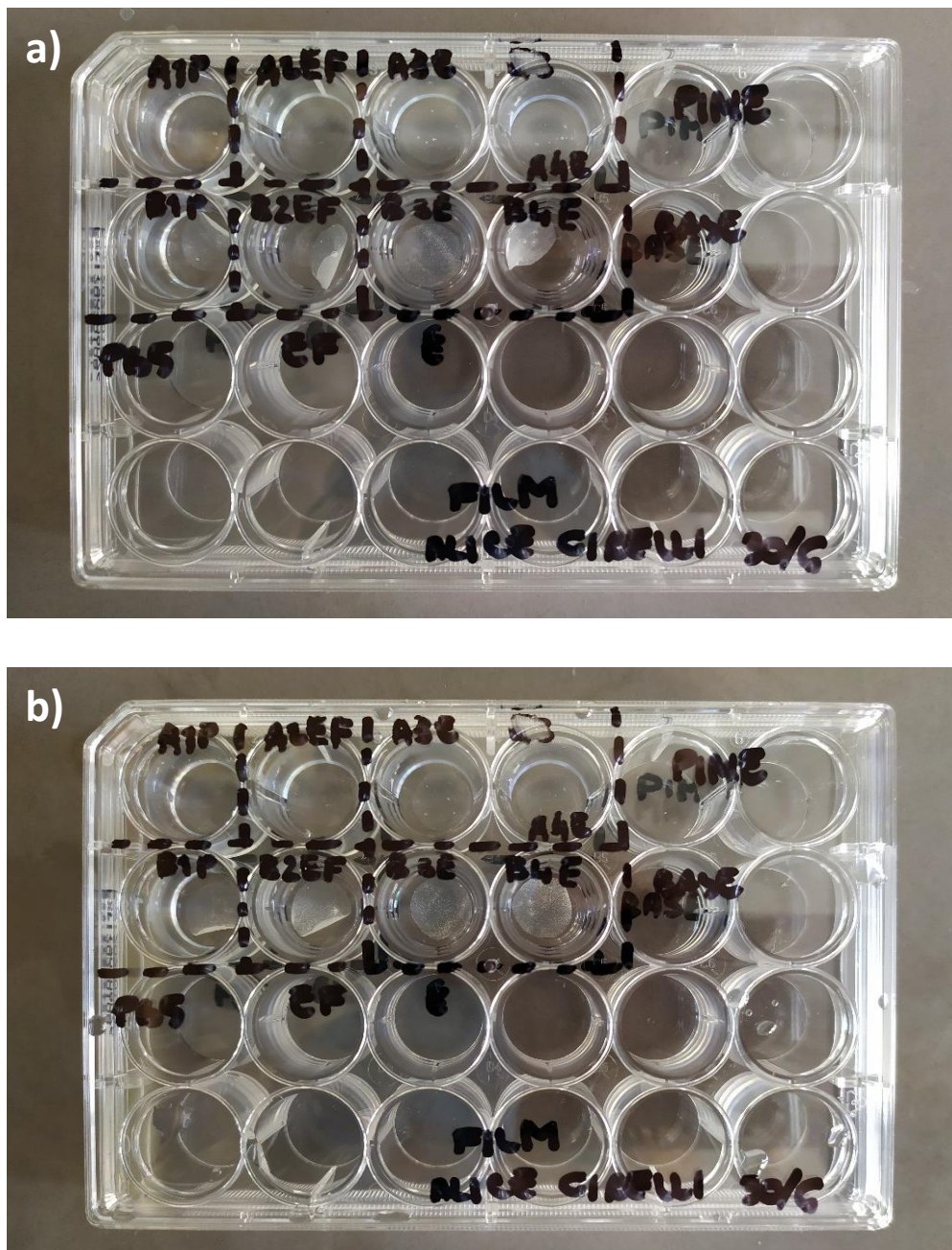
**Figura 2.2.4** Soluzione PBS a pH=7,4

- Ciascun campione è stato posto all'interno di un pozzetto di una piastra multiwell da 24 pozzetti ed è stato immerso in 2ml di soluzione PBS per 1h a temperatura ambiente (Figura 2.2.5 a);
- Successivamente il volume di PBS è stato prelevato;
- Per ciascuna tipologia di film:
  - In un campione sono stati aggiunti 2ml di PBS come controllo (Figura 2.2.5 b);
  - In un campione sono stati aggiunti 2ml di una soluzione di eparina 0,5% w/v in PBS filtrata (Figura 2.2.55 b) realizzata come illustrato nel paragrafo 2.1.2 ;
  - in due campioni sono stati aggiunti 2ml di una soluzione di eparina 0,5% w/v in PBS non filtrata (Figura 2.2.5 b) realizzata come illustrato nel paragrafo 2.1.2 a meno del filtraggio.
- Tutti i campioni sono stati posti nell'incubatore umidificato (Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator, Forma® Series II, Thermo Elecrton Corporation) in condizioni statiche a 37°C per una notte. Al fine di prevenire l'evaporazione delle soluzioni in cui sono immersi i campioni è stata realizzata un'opportuna camera di umidificazione;
- Il mattino seguente, ad eccezione del film PIME trattato con PBS e del film PIME trattato con la soluzione di eparina filtrata, i campioni galleggiavano a causa della formazione di bolle, che è stato necessario eliminare manualmente

grazie all'impiego di una spatolina. I campioni sono stati lasciati in immersione per un'altra ora sotto cappa a temperatura ambiente;

- Successivamente, sono stati eseguiti due risciacqui in PBS, un risciacquo in acqua deionizzata e un ultimo risciacquo in etanolo al 70% v/v;
- I campioni sono stati prelevati e lasciati asciugare sotto cappa per 24h;
- Una volta che i campioni sono risultati completamente asciutti è stato possibile effettuare l'analisi in trasformata di Fourier in ATR e in trasmissione tramite lo spettrofotometro a infrarossi Agilent Cary 640-IR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Nello specifico, per le prove in ATR è stato necessario impiegare l'accessorio ATR a singola riflessione in seleniuro di zinco (ZnSe ATR) MIRacle™ (PIKE TECHNOLOGIES, Madison WI, USA). Le modalità di analisi adottate hanno previsto l'impiego di una temperatura pari a 289 K in atmosfera di azoto e lo spettro IR di interesse compreso tra 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ .

È bene precisare che il protocollo stilato è conforme a quello delle prove di adesione batterica ameno degli ultimi due risciacqui eseguiti in acqua distillata e in etanolo 70% v/v. Tale decisione è stata presa per limitare la presenza di eventuali residui di sali e favorire l'adesione dell'eparina alla superficie del materiale.



**Figura 2.2.5 a):** campioni dei film PIME e film base immersi in 2 ml di soluzione PBS; **b):** campioni dei film PIME (A1P) e film base (B1P) immersi in 2ml di PBS; campioni dei film PIME (A2EF) e film base (B2EF) e in soluzione di eparina 0,5% w/v in PBS filtrata; campioni dei film PIME (A3E e A4E) e film base (B3E e B4E) in soluzione di eparina 0,5% w/v in PBS non filtrata

## 2.2.4 Prove di adesione batterica

Le prove di adesione batterica sono state condotte come, campione effettivo, esclusivamente sull'espanso PUF-3KP in quanto si è distinto tra tutti in termini di proprietà meccaniche e di vitalità cellulare e, come controllo, è stato impiegato l'espanso PUF-base. Il protocollo impiegato nelle prove di adesione batterica è stato stilato facendo riferimento al lavoro di De Nardo, et. Al [10] e riadattato al presente lavoro di tesi.

### 2.2.4.1 Realizzazione della coltura batterica

Il ceppo batterico impiegato per le prove di adesione batterica è stato *Escherichia Coli* JM109 in quanto risulta di facile manipolazione e appartiene alla classe di rischio I. Al fine di garantire la protezione degli operatori, le manipolazioni di tale ceppo sono tutte avvenute sotto cappa biologica (classe rischio II) a flusso laminare a regime (Figura 2.2.6).

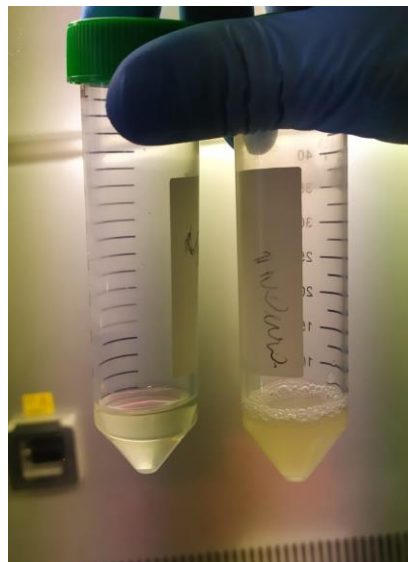


**Figura 2.2.6** Cappa biologica a flusso laminare impiegata per le prove di adesione batterica

Il protocollo impiegato per la realizzazione della coltura è il seguente:

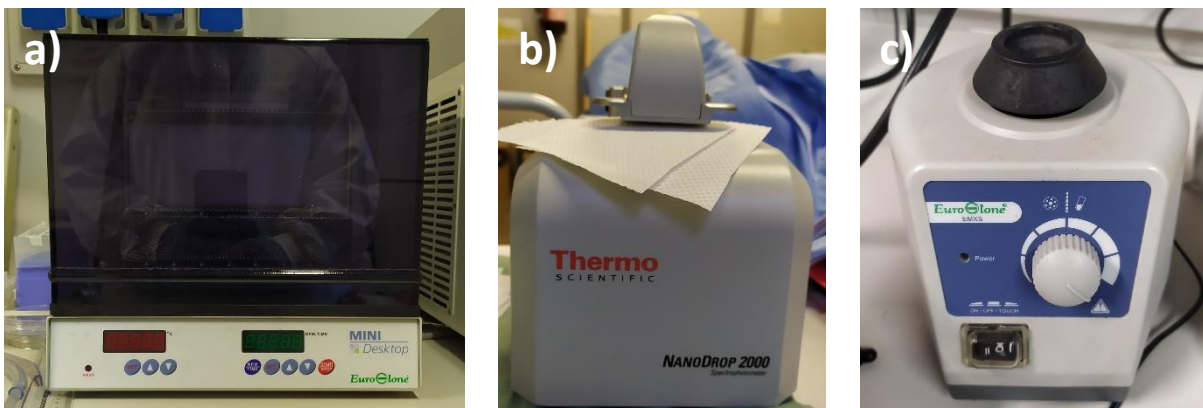


- 5ml del terreno di coltura LB sono stati versati in due distinte provette per ottenere il campione di prova e il campione negativo (controllo);
- Con una ansa è stata raschiata la Petri contenente la colonia di Escherichia Coli JM109. L'ansa è stata successivamente inserita in una delle due provette (campione effettivo) e lasciata per due minuti;
- Il tappo della provetta del campione di prova è stato parzialmente avvitato per consentire il passaggio di ossigeno necessario per mantenere la vitalità delle cellule batteriche;
- Entrambe le provette sono state poste in incubatore con agitazione (Shaking Incubators, Euroclone) (Figura 2.2.88a) a 37°C per una notte con una agitazione pari a 160 rpm per favorire l'ossigenazione e la sospensione dei batteri in soluzione;
- Il mattino seguente, è stata eseguita una prima valutazione qualitativa della torbidità delle due soluzioni visivamente al fine di verificare l'effettiva proliferazione delle cellule batteriche (Figura 2.2.7);



**Figura 2.2.7** Provetta contenente esclusivamente il terreno di coltura LB (campione negativo a sinistra) provetta contenente la coltura batterica (campione effettivo, a destra). È possibile notare che la soluzione contenuta nella seconda provetta, rappresentante il campione di prova, presenta una torbidità maggiore della prima a conferma del fatto che sia avvenuta con successo la proliferazione delle cellule batteriche

- Una valutazione quantitativa della torbidità è stata ottenuta tramite spettrofotometro a 600nm (NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific™) (Figura 2.2.8b) che, come output, fornisce la concentrazione di batteri in soluzione. Innanzitutto, è stata valutata la torbidità della soluzione LB di controllo (campione negativo) per settare tale valore come blank; successivamente sono state eseguite diverse misurazioni per 2µl di coltura batterica al fine di ottenere un valore medio. La concentrazione di batteri è risultata pari a  $4,89 \times 10^8$  CFU/ml;
- Infine, sono state realizzate tre soluzioni di sospensione batterica versando in 3 provette distinte (D1, D2, D3) 5ml di terreno di coltura LB e 193 ml di coltura batterica al fine di ottenere una concentrazione pari a  $2,5 \times 10^4$  CFU/ml; ciascuna soluzione è stata agitata per 5 secondi tramite vortex (Vortex Mixer, EMXS, Euroclone) (Figura 2.2.8c).



**Figura 2.2.8** a) incubatore con agitatore impiegato per lasciare in agitazione le due provette rappresentanti il campione di prova (terreno di coltura LB e batteri) e il campione negativo (terreno di coltura LB) per una notte a 160 rpm; b) spettrofotometro NanoDrop a 600 nm impiegato per valutare quantitativamente la torbidità delle soluzioni del campione di prova e campione negativo; c) vortex impiegato per agitare per 5 secondi le soluzioni contenute nelle provette D1, D2, e D3

### 2.2.4.2 Trattamento con soluzione di eparina

Per ciascuna tipologia di espanso sono stati realizzati 10 campioni ( $\phi=5\text{mm}$ ,  $h=1\text{mm}$ ) che sono stati immersi in etanolo puro per 48h e lasciati essiccare come trattamento di pulizia e disinfezione. Al fine di garantire la sterilità, tali passaggi e tutte le manipolazioni dei campioni sono stati eseguiti sotto cappa biologica (classe II) a flusso laminare a regime (Figura 2.2.6).

Il protocollo impiegato per il trattamento dei campioni ha previsto quanto segue:

- Ciascun campione è stato trasferito in provetta (Figura 2.2.9) e successivamente immerso in 500 $\mu\text{l}$  di PBS sterile;
- Poiché i campioni galleggiavano sono stati centrifugati (Centrifuge 5414 R, Eppendorf) per 2 minuti a 16'000 giri. In questo modo sono state tolte le bolle d'aria presenti all'interno della schiuma e tutti i campioni sono risultati immersi nella soluzione;
- Da tutti i campioni sono stati prelevati i 500 $\mu\text{l}$  di PBS sterile dopo 1h e sono stati aggiunti:
  - in 5 campioni PUF-3KP (K11÷K15) e 5 campioni PUF-base (B1÷B5) nuovamente altri 500 $\mu\text{l}$  di PBS sterile;
  - in 5 campioni PUF-3KP (Ke16÷Ke20) e 5 campioni PUF-base (Be6÷Be10) sono stati aggiunti 500 $\mu\text{l}$  di una soluzione di eparina 0,5% w/v in PBS filtrata realizzata come illustrato nel paragrafo 2.1.2.

Le sigle dei campioni sono riportate per avere un riscontro con lo schema rappresentativo riportato in Figura 2.2.10a, rappresentativo della multiwell da 96 pozzetti impiegata per l'incubazione dei campioni con la coltura batterica;

- Successivamente tutti i campioni sono stati posti in incubatore umidificato (Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator, Forma® Series II, Thermo Electron Corporation) in condizione statiche per una notte a 37°C;

- Il mattino seguente, per tutti i campioni sono state prelevate le soluzioni in cui erano immersi e sono stati eseguiti 3 lavaggi in 500µl PBS sterile;
- Poiché tutti i campioni galleggiavano, sono stati centrifugati (Centrifuge 5414 R, Eppendorf) per 2 minuti a 16.000 giri. In questo modo le bolle d'aria presenti sono migrate e i campioni si sono mostrati completamente immersi in soluzione.



**Figura 2.2.9** a) campioni PUF-base posti in provette da 1 a 10 e PUF-3KP posti in provette da 11 a 20 a seguito del trattamento di pulizia e disinfezione e, pertanto, prima del trattamento di eparinizzazione; b) immagine rappresentativa di un campione (B1) in provetta al medesimo stadio

### 2.2.4.3 Incubazione con coltura batterica

L'incubazione dei campioni con la coltura batterica, realizzata come descritta nel paragrafo 2.2.4.1, è avvenuta immediatamente a seguito del trattamento di eparinizzazione. Nel presente lavoro di tesi tali trattamenti sono stati riportati in due paragrafi distinti meramente a titolo semplificativo. Tutte le manipolazioni della coltura batterica e dei campioni sono avvenute sotto cappa biologica (classe di rischio II) a flusso laminare a regime per garantire la sterilità e la protezione dell'operatore (Figura 2.2.6).

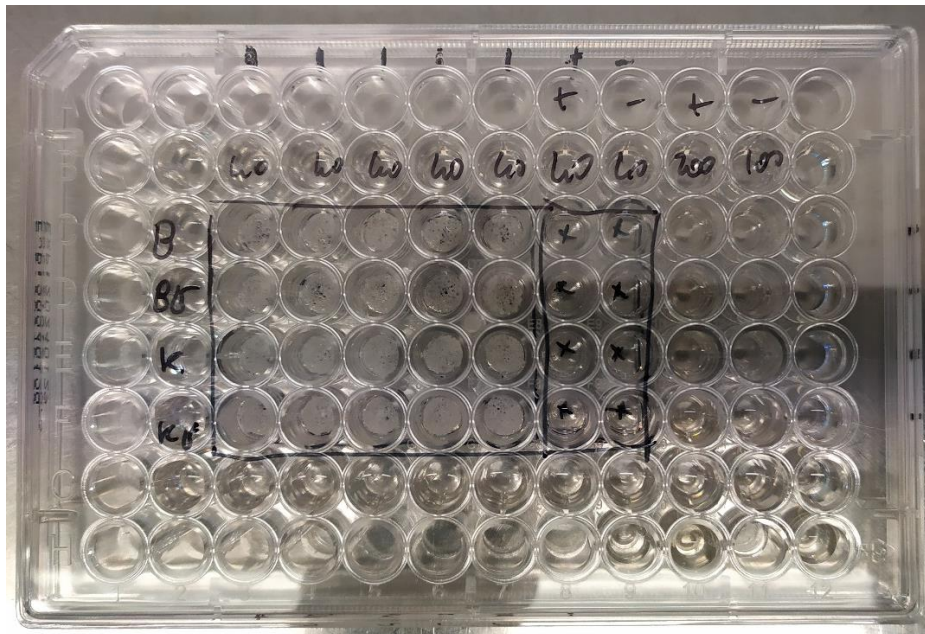
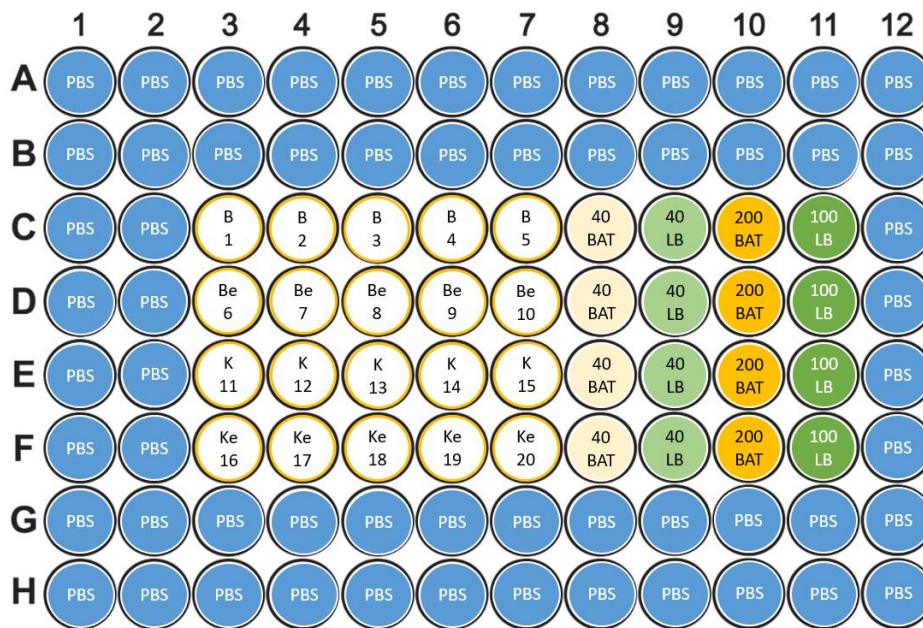
Il protocollo impiegato ha previsto quanto segue:

- Sotto cappa ciascun campione per colonna è stato prelevato e depositato su garza sterile per far assorbire la soluzione e successivamente posto in una multiwell da 96 pozzetti. Il riempimento è stato eseguito verticalmente da sinistra verso destra

al fine di limitare la presenza di eventuali errori sistemici manuali dettati dall'operatore e dalla modalità di trasferimento;

- In ciascun pozzetto contenente un campione è stato deposto un quantitativo di coltura batterica (2.2.4.1) pari a 40µl;
- Terminati i campioni, sono stati riempiti anche i pozzetti di una colonna successiva con 40µl di coltura batterica (prelevati da D3) come controllo positivo e la colonna seguente con 40µl di terreno di coltura LB per pozzetto come controllo negativo;
- In seguito, una colonna successiva è stata riempita con 200µl per pozzetto di coltura di batteri (prelevati da D3) e i pozzetti della colonna seguente con 100µl di terreno di coltura LB;
- tutti i pozzetti restanti facenti parte del perimetro della multiwell sono stati riempiti con 200µl di PBS sterile per contrastare l'evaporazione;
- la multiwell da 96 pozzetti è stata posta in una camera di umidificazione realizzata da un contenitore e da carta umidificata sempre per contrastare l'evaporazione della coltura batterica e del terreno di coltura LB;
- Successivamente la multiwell da 96 pozzetti nella camera di umidificazione è stata posta all'interno dell'incubatore umidificato (Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator, Forma® Series II, Thermo Elecrton Corporation) a 37°C per 24h.

Per facilitare la comprensione del riempimento della multiwell da 96 pozzetti prima di essere posta nella camera di umidificazione in Figura 2.2.10 è stata ottenuta una fotografia rappresentativa della multiwell originale in cui si riesce facilmente a individuare ciascun campione siglato e conseguenti volumi di soluzioni presenti nei pozzetti.



**Figura 2.2.10 a)** rappresentazione schematica del riempimento dei pozzetti della multiwell da 96 pozzetti dove: **PBS** indica la soluzione di PBS sterile (200 µl); **LB** indica il terreno di coltura LB e i numeri indicano i relativi volumi espressi in microlitri; **BAT** indica la coltura batterica; infine, sono riportate le sigle dei campioni dove **B** indica i campioni PUF-base trattati con solo PBS, **Be** indica i campioni PUF-base trattati con eparina, **K** indica i campioni PUF-3KP trattati con solo PBS e **Ke** indica i campioni PUF-3KP trattati con eparina; **b)** immagine effettiva della multiwell da 96 pozzetti prima di essere posta nella camera di umidificazione

#### 2.2.4.4 Saggio Alamar Blue

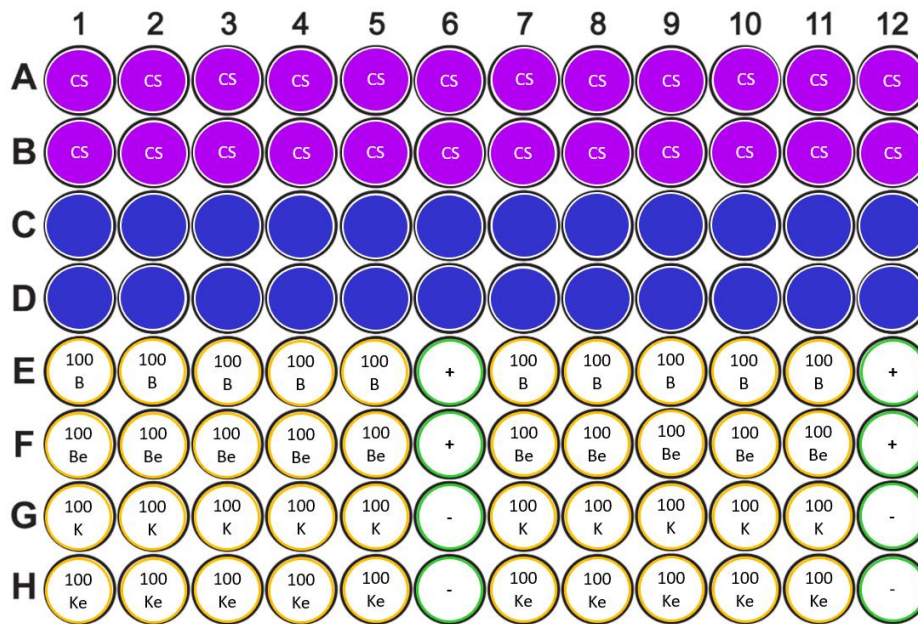
Per valutare il quantitativo di cellule batteriche presenti sui campioni, eparinizzati o meno, a fronte di una incubazione di 24h è stato impiegato il saggio Alamar Blue. Tale saggio è stato realizzato impiegando come rapporto 0,2 mg di resazurina in 1 ml di PBS sterile. Il protocollo adottato per trattare i campioni è stato il seguente:

- Trascorse le 24h per la multiwell da 96 pozzetti all'interno dell'incubatore umidificato (Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator, Forma® Series II, Thermo Elecrton Corporation) a 37°C, ciascun campione è stato trasferito in una provetta all'interno della quale sono stati iniettati precedentemente 700µl di PBS sterile;
- Poiché i campioni galleggiavano sono stati centrifugati (Centrifuge 5414 R, Eppendorf) per 1 minuti a 16'000 giri al fine di eliminare la presenza di eventuali bolle presenti all'interno dell'espanso. Al termine, tutti i campioni si sono depositati sul fondo delle provette;
- Successivamente, sono stati eseguiti due lavaggi in 700µl PBS sterile per tutti i campioni presenti all'interno delle provette;
- Il terzo lavaggio è stato eseguito impiegando 500µl di una soluzione composta dalla soluzione di resazurina (0,2mg/ml<sub>PBS</sub>) e dal terreno di coltura LB in rapporto 10% V/V<sub>terreno</sub>;
- Poiché alcuni campioni galleggiavano, tutti i campioni sono stati posti all'interno della centrifuga (Centrifuge 5414 R, Eppendorf) e questa è stata azionata per 1 minuto a 16'000 giri con lo scopo di eliminare la presenza di eventuali bolle d'aria presenti. Al termine, tutti i campioni sono risultati perfettamente immersi in soluzione;
- Le provette sono state poi poste in incubatore umidificato (Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator, Forma® Series II, Thermo Elecrton Corporation) a 37°C;
- in una multiwell da 96 pozzetti le prime due righe sono state impiegate per realizzare la curva standard a partire dalla coltura batterica. La diluizione è stata eseguita nel seguente modo:

- nel primo pozzetto sono stati aggiunti 200µl di soluzione costituita da 180µl di coltura batterica e 20µ di soluzione di resazurina (0,2mg/ml<sub>PBS</sub>);
  - ciascun pozzetto successivo è stato riempito con 100µl di una soluzione composta dalla soluzione di resazurina (0,2mg/ml<sub>PBS</sub>) e dal terreno di coltura LB in rapporto 10% V/V<sub>terreno</sub>;
  - 100µl di soluzione sono stati poi trasferiti dal primo al secondo pozzetto; successivamente 100µl sono stati trasferiti dal secondo al terzo e così facendo fino al completamento dei pozzetti dedicati alla curva standard.
- la terza e quarta riga della medesima multiwell da 96 pozzetti sono state impiegate per realizzare la curva standard per il controllo a partire dal terreno di coltura LB per settarla come blank. La diluizione è stata eseguita come nel caso precedente considerando però che la soluzione di partenza nel primo pozzetto corrispondeva a 200µl di una soluzione composta dalla soluzione di resazurina (0,2mg/ml<sub>PBS</sub>) e dal terreno di coltura LB in rapporto 10% V/V<sub>terreno</sub>;
  - La multiwell è stata posta in incubatore umidificato per 2h;
  - Trascorse le 2h, sia la multiwell che le provette sono state estratte dall'incubatore umidificato (Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator, Forma® Series II, Thermo Elecrton Corporation) e poste sotto cappa;
  - Per ciascun campione sono stati prelevati due volte 100µl dell'eluato e trasferiti nei pozzetti della multiwell come riportato in Figura 2.2.11. Sono stati realizzati due insiemi per avere un valore medio;
  - La lettura della multiwell è stata eseguita tramite spettrofotometro (GENios Plus®, Tecan).

Tutte le manipolazioni dei campioni sono state eseguite sotto cappa biologica (classe rischio II) a flusso laminare a regime (Figura 2.2.6) al fine di garantire la sterilità e la sicurezza dell'operatore.





**Figura 2.2.11** Rappresentazione schematica della multiwell da 96 pozzetti in cui le prime due righe rappresentano i pozzetti dedicati alla realizzazione della curva standard; la terza e quarta riga rappresentano la curva standard per il controllo a partire dal terreno di coltura LB; i pozzetti riempiti con gli eluati dei campioni sono rappresentati dal numero corrispondente al volume di eluato e la sigla relativa al campione dove **B** indica i campioni PUF-base trattati con solo PBS, **Be** indica i campioni PUF-base trattati con eparina, **K** indica i campioni PUF-3KP trattati con solo PBS e **Ke** indica i campioni PUF-3KP trattati con eparina; infine, i pozzetti contrassegnati con il simbolo “+” indicano il controllo positivo e quelli con il simbolo “-” il controllo negativo

## 2.2.5 Analisi Statistica

Per valutare la validità statistica dei risultati ottenuti è stato impiegato il test statistico ANOVA *one way* tramite il software GraphPad Prism®. Il livello di significatività scelto è pari al 5% tale per cui per valori di  $p > 0.05$  i risultati non risultano statisticamente significativi.

## CAPITOLO 3: RISULTATI

### 3.1 Prove di assorbimento in SWF

Al fine di valutare se le schiume PU realizzate possano essere impiegate nell'ambito del *wound healing*, è buona pratica condurre delle prove di assorbimento in acqua distillata e, successivamente, in un liquido che simuli la composizione dell'essudato (*Simulated Wound Fluid*) per valutare se il materiale in questione si comporti diversamente a causa della differente composizione chimica della soluzione. Poiché le prove di assorbimento in acqua distillata sono state condotte nel precedente lavoro di tesi sulle medesime schiume [8], in quello presente ci si è concentrati sulle prove in un ambiente *wound like*. Nei seguenti paragrafi sono riportati i risultati ottenuti dalle prove di assorbimento in SWF suddivisi per tipologia di espanso:

- Espansi ottenuti tramite aggiunta di PIME alla miscela di polioli, prima dell'aggiunta di diisocianato e successiva agitazione meccanica a 2000 o 3000 rpm (PUf-3KP e PUf-2KP) e relativo controllo (PUf-base);
- Espansi ottenuti tramite aggiunta di PIME alla miscela di polioli e successivo riscaldamento a 80°C (PUf-TP80) e relativo controllo (PUf-T80).

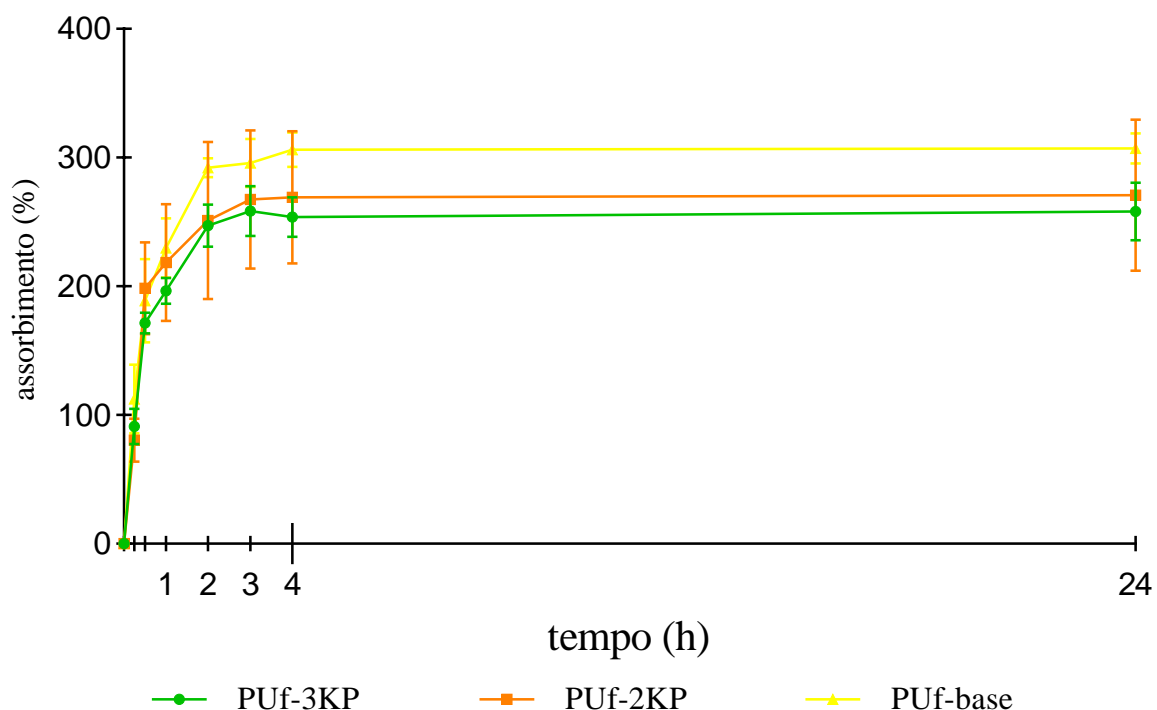
Il confronto tra tutti gli espansi e il confronto tra i risultati ottenuti con le prove di assorbimento in acqua distillata sono approfonditi in seguito nel paragrafo relativo nella discussione (4.1).

Per valutare l'andamento delle schiume a differenti *time point* (15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 24, 72h, 8gg, 10gg, 15gg e 30gg) in ciascun sottoparagrafo sono riportati i grafici relativi all'assorbimento percentuale delle schiume in esame nelle 24h e nei 30 giorni. In particolare, è stato scelto di separare l'andamento delle prime 24h da quello a 30 giorni in quanto in questo intervallo generalmente si registra la maggiore crescita percentuale degli espansi, non facilmente visibile nel grafico relativo ai 30 giorni.

Infine, sono state realizzate delle tabelle in cui sono stati riportati i valori di media e deviazione standard raggiunti nelle 24h e a plateau per ogni tipologia di espanso.

### 3.1.1 Espansi PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-base

In Figura 3.1.1 è riportato l'andamento percentuale delle schiume nelle prime 24h in soluzione SWF. Da tale grafico si evince che tutte le tipologie di espanso riportate presentano un andamento di crescita simile: molto rapido e lineare nella prima ora per poi lentamente stabilizzarsi intorno alle 4h.



**Figura 3.1.1** Assorbimento percentuale delle schiume PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-base in liquido SWF valutato nelle 24h

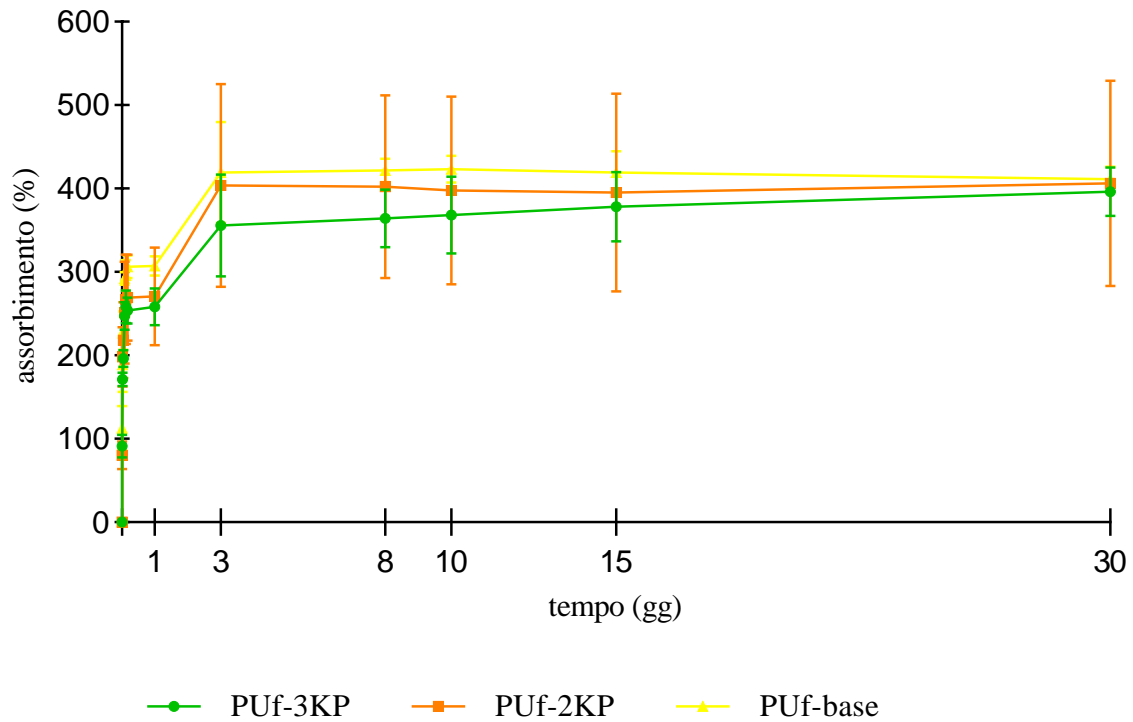
Si può notare, inoltre, che la schiuma PUf-base si distingue per tutte le 24h per il raggiungimento di un valore di assorbimento percentuale superiore; tuttavia, a causa dell'alta deviazione standard, tale differenza non è significativa da un punto di vista statistico ( $p > 0.05$ ). I valori di assorbimento percentuali medi con relativa deviazione standard alle 24h sono stati riportati in Tabella 3.1.1.

**Tabella 3.1.1** Media e deviazione standard dell'assorbimento in SWF raggiunto alle 24h degli espansi PUF-3KP, PUF-2KP e PUF-base

Tipologia di espanso	Assorbimento alle 24h (%)
PUF-3KP	258,07 ± 22,36
PUF-2KP	270,86 ± 58,80
PUF-base	307,11 ± 11,76

In Figura 3.1.2 è riportato l'andamento dell'assorbimento percentuale delle schiume nei 30 giorni considerati, da cui si evince che tutti gli espansi dopo una rapida crescita nelle prime 24h si stabilizzano ad un valore di assorbimento compreso tra i 200 e 300%; tra le 24h e le 72h hanno subito un'altra crescita per poi raggiungere il plateau intorno all'ottavo giorno. Tra i valori di assorbimento percentuali raggiunti da tutte e tre le tipologie di espanso al raggiungimento del plateau non è stata rilevata alcuna differenza statisticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

Anche in questo grafico l'espanso PUF-base presenta valori di assorbimento maggiori, specialmente nei primi 10 giorni; l'espanso PUF-2KP nelle prime 24h presenta un andamento più simile all'espanso PUF-3KP per poi raggiungere valori di assorbimento più simili all'espanso PUF-base già verso le 72h; l'espanso PUF-3KP presenta una crescita più lenta e costante che comunque lo porta al raggiungimento di un valore di assorbimento molto simile agli altri espansi al trentesimo giorno. Tuttavia, anche in questo caso, sono stati registrati valori di deviazione standard elevati, tali per cui tra i valori di assorbimento degli espansi al trentesimo giorno non risulta esservi differenza significativa da un punto di vista statistico ( $p > 0.05$ ). I valori di assorbimento percentuale e di deviazione standard a plateau sono riportati in Tabella 3.1.2.



**Figura 3.1.2** Assorbimento percentuale delle schiume PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-base in liquido SWF valutato in 30 giorni

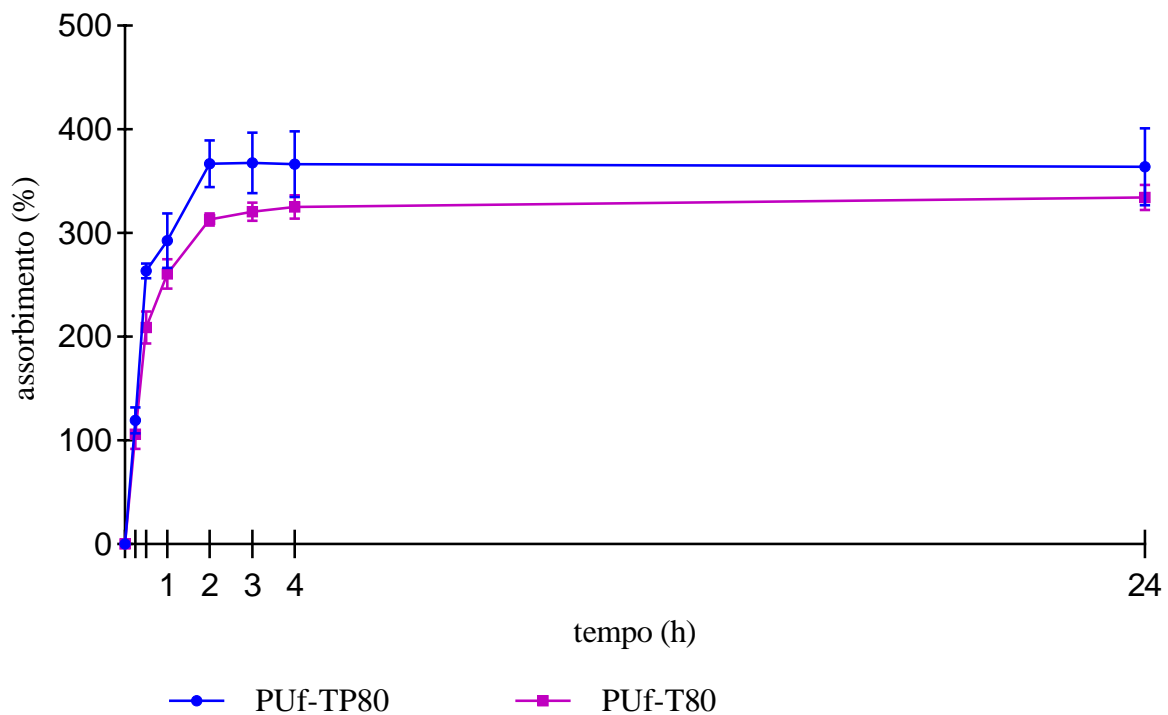
**Tabella 3.1.2** Media e deviazione standard dell'assorbimento raggiunto a plateau in SWF da parte degli espansi PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-base

Tipologia di espanso	Assorbimento a plateau (%)
PUf-3KP	364,22 ± 34,53
PUf-2KP	402,18 ± 109,40
PUf-base	421,78 ± 13,88

### 3.1.2 Espansi PUf-TP80 e PUf-T80

L'assorbimento nelle 24h in SWF per gli espansi PUf-TP80 e PUf-T80 è riportato in Figura 3.1.3: anche in questo caso, entrambe le schiume presentano un andamento simile caratterizzato da una rapida crescita con andamento lineare nella prima ora e da un successivo rallentamento fino al raggiungimento di un valore stabile intorno alle 24h.

L'espanso PUf-TP80 dopo la prima ora raggiunge valori di assorbimento medio maggiori per tutto l'intervallo di tempo considerato, tuttavia, non è stata rilevata una differenza significativa ( $p > 0.05$ ) da un punto di vista statistico al raggiungimento delle 24h. I valori medi di assorbimento nelle 24h e relative deviazioni standard sono riportati in Tabella 3.1.3.



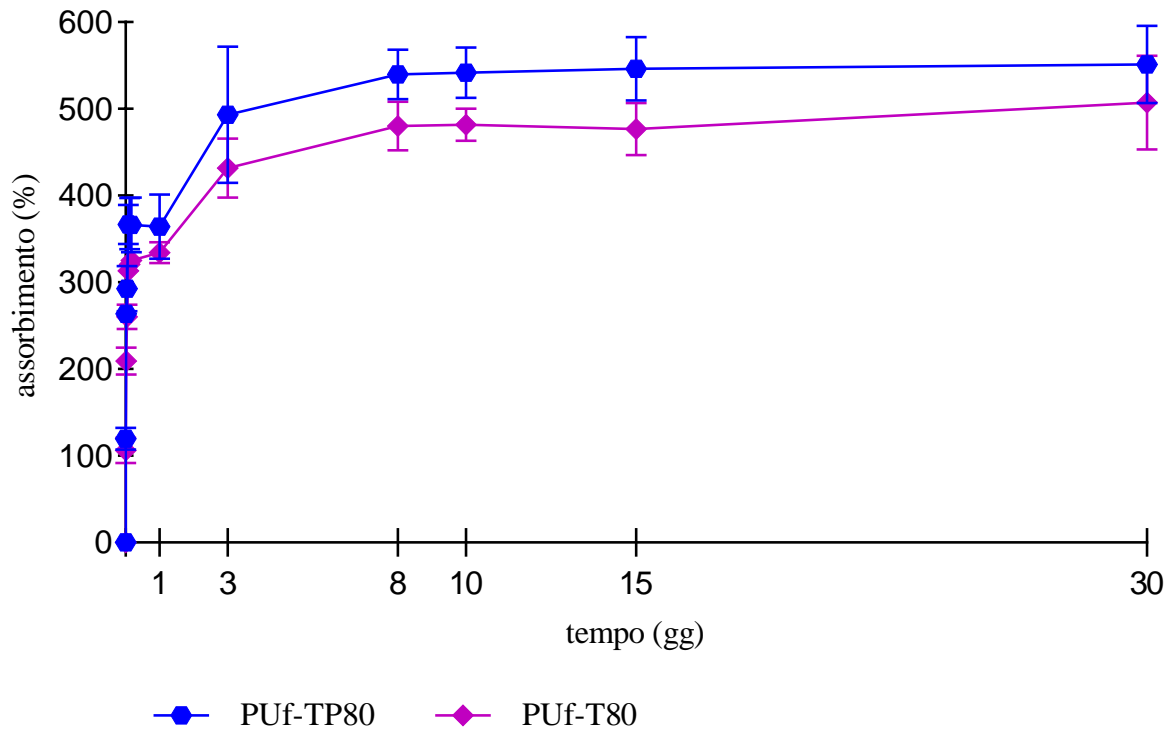
**Figura 3.1.3** Assorbimento percentuale delle schiume PUf-TP80 e PUf-T80 in liquido SWF valutato nelle 24h

**Tabella 3.1.3** Media e deviazione standard dell'assorbimento raggiunto alle 24h in SWF da parte degli espansi PUf-TP80 e PUf-T80

Tipologia di espanso	Assorbimento alle 24h (%)
PUf-TP80	364,10± 37,38
PUf-T80	334,36 ± 12,19

In Figura 3.1.4 è riportato il grafico dell'assorbimento in SWF nei 30 giorni considerati. Anche in questo caso, l'andamento delle curve relative ai due espansi è simile e vede una rapida crescita nella prima ora per stabilizzarsi poi attorno ad un valore compreso tra i 300 e 400% di assorbimento; una successiva crescita significativa tra la prima e la terza ora e una leggera ma significativa ( $p < 0.05$ ) crescita fino all'ottavo giorno, a differenza degli espansi PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-base. Dall'ottavo giorno entrambe le curve sembrano stabilizzarsi intorno ad un valore medio di assorbimento percentuale tale per cui è possibile affermare che all'ottavo giorno le schiume abbiano raggiunto il plateau. Difatti, dall'ottavo giorno in poi non vi è una differenza statistica significativa ( $p > 0.05$ ) tra i valori di assorbimento raggiunti per ciascuna tipologia di espanso. Inoltre, al raggiungimento del plateau non è stata rilevata alcuna differenza significativa ( $p > 0.05$ ) da un punto di vista statistico tra i valori raggiunti dai due espansi.

Dal grafico in Figura 3.1.4 si nota che l'espanso PUf-TP80 raggiunge per tutto l'intervallo di tempo considerato dei valori medi di assorbimento superiori al controllo (PUf-T80). Tuttavia tra i valori raggiunti dai due espansi non è stata rilevata una differenza significativa da un punto di vista statistico ( $p > 0.05$ ) al raggiungimento dei 30 giorni. I valori di assorbimento medi e di deviazione standard a plateau sono stati riportati in Tabella 3.1.4.



**Figura 3.1.4** Assorbimento percentuale delle schiume PUf-TP80 e PUf-T80 in liquido SWF valutato in 30 giorni

**Tabella 3.1.4** Media e deviazione standard dell'assorbimento in SWF raggiunto a plateau dagli espansi PUf-TP80 e PUf-T80

Tipologia di espanso	Assorbimento a plateau (%)
PUf-TP80	539,98 ± 28,72
PUf-T80	480,40 ± 28,04



## 3.2 Prove ritenzione dei fluidi

Nell'ambito del *wound healing* delle ulcere, spesso il sistema di medicazione (*dressing*) vengono associati alla terapia compressiva, la quale consiste nell'applicazione di una pressione media pari a 40 mmHg sull'ulcera tramite l'impiego di bendaggi più o meno elastici. Lo scopo è quello di favorire il microcircolo e il macro-circolo venoso per facilitare il riassorbimento dell'essudato e un miglioramento dell'afflusso sanguigno. Per tale motivo, sui materiali impiegati come *dressing* vengono eseguite prove di ritenzione dei fluidi che risultano funzionali a valutare il quantitativo di essudato che i campioni sono in grado di trattenere sotto pressione [28][29]. Le prove sono state condotte a due tempi differenti, quali 24h e 192h (raggiungimento del plateau), per valutare e se le schiume mostrassero un comportamento differente.

Nei seguenti paragrafi sono riportati i risultati ottenuti dalle prove di ritenzione dei fluidi suddivisi per tipologia di espanso:

- Espansi ottenuti tramite aggiunta di PIME alla miscela di polioli, prima dell'aggiunta di diisocianato e successiva agitazione meccanica a 2000 o 3000 rpm (PUf-3KP e PUf-2KP) e relativo controllo (PUf-base);
- Espansi ottenuti tramite aggiunta di PIME alla miscela di polioli e successivo riscaldamento a 80°C (PUf-TP80) e relativo controllo (PUf-T80).

Un confronto tra tutti gli espansi e con i risultati ottenuti nel precedente lavoro di tesi verrà approfondito in seguito, nel paragrafo 4.2 nella discussione.

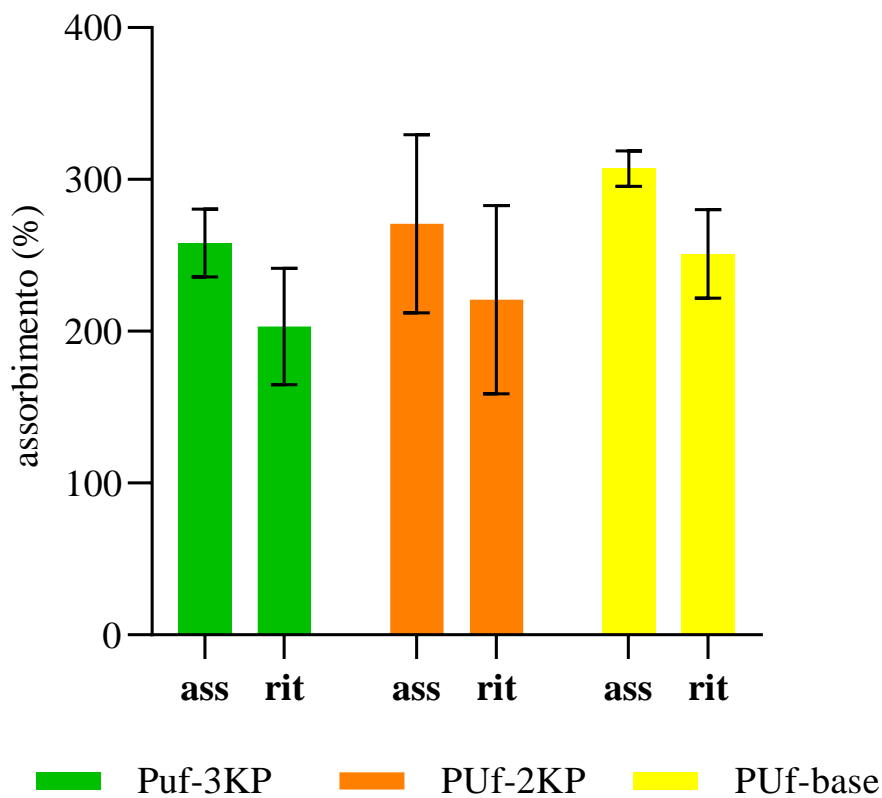
Nei seguenti paragrafi, i risultati delle prove di ritenzione condotte dopo 24h e al raggiungimento del plateau (dopo 8 giorni) sono riportati in grafici a barre in cui è espresso il valore medio dell'assorbimento percentuale con relativa deviazione standard prima e dopo la compressione. Nella Tabella 3.2.1 e nella Tabella 3.2.2 sono riportati, per ogni tipologia di espanso, i valori numerici di media e deviazione standard e la differenza percentuale tra prima e dopo la compressione.

Infine, sono riportati anche i grafici di deformazione a sostegno dei risultati ottenuti.

### 3.2.1 Espansi PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-base

I risultati ottenuti dopo 24h sono riportati in Figura 3.2.1 dove è facilmente individuabile il valore di assorbimento percentuale raggiunto prima e dopo l'applicazione della forza (0.419 N) per 20 sec. Come visto nel paragrafo precedente, trascorse 24h in liquido SWF i valori di assorbimento raggiunti in ordine decrescente sono: 307% circa per l'espanso PUf-base, 271% circa per l'espanso PUf-2KP e, infine, 258% circa per l'espanso PUf-3KP. Nonostante tali valori appaiono differenti tra loro è bene specificare che da un punto di vista statistico non è stato possibile individuare una differenza significativa ( $p > 0.05$ ) tra i valori di assorbimento raggiunti a causa dei valori elevati di deviazione standard.

I valori di assorbimento ottenuti una volta eseguita la compressione presentano un andamento simile: PUf-base presenta il valore di assorbimento medio maggiore di circa 251%, seguito dal PUf-2KP che presenta un valore intermedio prossimo a 221% e, infine, PUf-3KP presenta il valore più basso pari a circa 203%. Tuttavia, anche in questo caso, a causa della alta variabilità dei valori ottenuti, i valori di assorbimento medi a seguito della compressione non hanno mostrato differenze statisticamente significative ( $p > 0.05$ ) tra loro. Tutti i valori medi effettivi di assorbimento prima e dopo la compressione con relativa deviazione standard sono stati riportati in Tabella 3.2.1. Sempre dalla Figura 3.2.1, si può apprezzare che la differenza tra l'assorbimento prima e dopo la compressione risulta simile per tutte le tipologie di espanso esaminate. Dai valori riportati in Tabella 3.2.1 si può osservare che le schiume PUf-base e PUf-2KP presentano valori simili e pari a circa il 18% mentre la schiuma PUf-3KP presenta un valore leggermente più alto, pari a circa al 21%. Per quanto vi sia una leggera differenza nei valori ottenuti, da un punto di vista statistico non risultano rilevanti ( $p > 0.05$ ) per cui è possibile affermare che alle 24h gli espansi PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-base presentano un comportamento di ritenzione simile.



**Figura 3.2.1** Valori di assorbimento percentuale e di deviazioni standard degli espansi PUF-3KP, PUF-2KP e PUF-base trascorse 24h prima (**ass**) e dopo (**rit**) l'applicazione di una forza pari a 0,419 N per 20 secondi

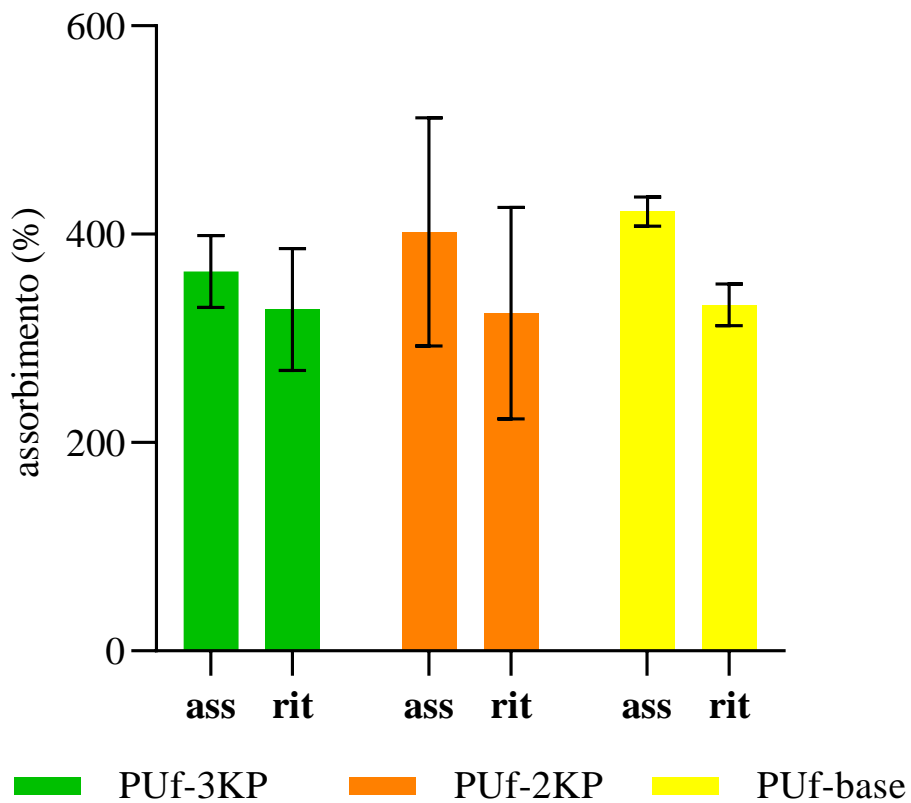
**Tabella 3.2.1** Media e deviazione standard degli espansi PUF-3KP, PUF-2KP, PUF-base dell'assorbimento in SWF a 24h prima e dopo l'applicazione di una forza pari a 0,419 N per 20 sec. Nella terza colonna, è riportata la differenza percentuale tra i due stati rigonfiati

Tipo di espanso	Ass 24h (%)	Rit 24h (%)	Differenza (%)
Puf-3KP	258,07 ± 22,36	203,17 ± 38,25	21,27
PUF-2KP	270,86 ± 58,80	220,76 ± 61,98	18,50
PUF-base	307,11 ± 11,75	251,00 ± 29,16	18,27

Le medesime prove sono state eseguite anche al raggiungimento del plateau, ossia trascorsi 8 giorni in liquido SWF, al fine di valutare la capacità di ritenzione a regime dello stato di rigonfiamento. In Figura 3.2.2 sono riportati a valori di assorbimento percentuali raggiunti a plateau prima e dopo la compressione con relativi valori di deviazione standard. Come illustrato nel paragrafo precedente, a plateau la schiuma PUf-base presenta un valore di assorbimento medio maggiore prossimo a 422%, seguito dalla schiuma PUf-2KP con circa 402% e, infine, dalla schiuma PUf-3KP con circa 364%. Tuttavia, non è stato possibile determinare una differenza significativa ( $p>0.05$ ) da un punto di vista statistico tra le schiume a causa della elevata deviazione standard riportata.

L'assorbimento percentuale riportato a seguito della compressione presenta un andamento differente rispetto a quello registrato dopo 24h. Infatti, dalla Figura 3.2.2 si può apprezzare che tutte le schiume presentano un valore medio di assorbimento (colonne indicate in figura con "rit") molto simile, indipendentemente dal valore di assorbimento raggiunto al plateau (colonne indicate in figura con "ass"): l'espanso PUf-base ha riportato un valore prossimo a 332%; l'espanso PUf-2KP un valore prossimo a 324%; e, infine, l'espanso PUf-3KP un valore prossimo a 328%. A causa dell'alta variabilità dei dati, in particolar modo della schiuma PUf-2KP, non è stata rinvenuta alcuna differenza significativa da un punto di vista statistico ( $p>0.05$ ) tra questi valori riportati. Tutti i valori di assorbimento medi e relativa deviazione standard sono stati riportati in Tabella 3.2.2.

Sempre in Tabella 3.2.2 è stato riportato il valore di differenza percentuale delle schiume tra prima e dopo la compressione: l'espanso PUf-base ha riportato un valore pari al 21%, l'espanso PUf-2KP pari a 19% e, infine, l'espanso PUf-3KP un valore pari al 10%. L'unica differenza significativa ( $p<0.05$ ) da un punto di vista statistico è stata rilevata tra l'espanso PUf-3KP e PUf-base; tutte le altre combinazioni si sono dimostrate non significative ( $p>0.05$ ).



**Figura 3.2.2** Valori di assorbimento percentuale e di deviazione standard degli espansi PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-base al raggiungimento del plateau prima (**ass**) e dopo (**rit**) l'applicazione di una forza costante pari a 0,419 N per 20 secondi

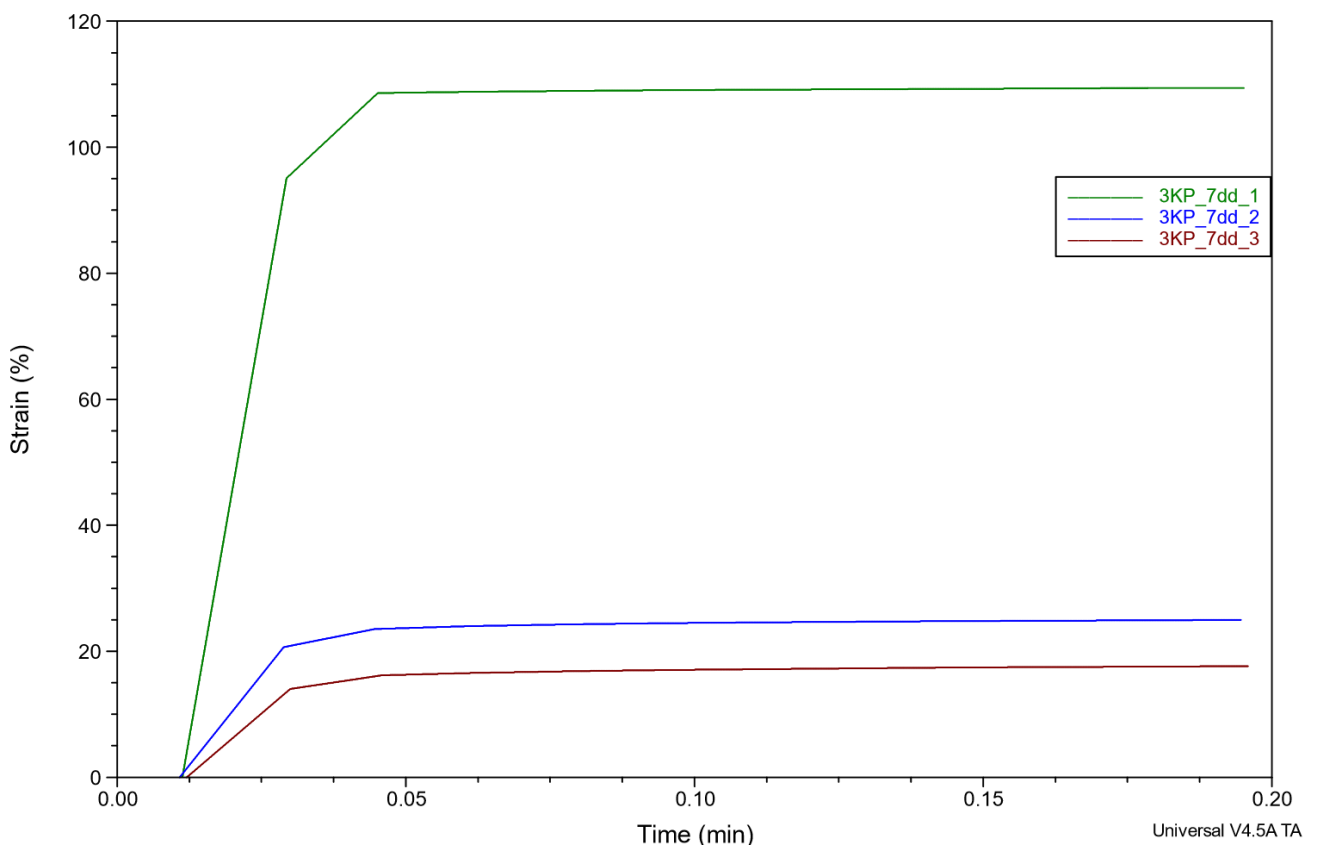
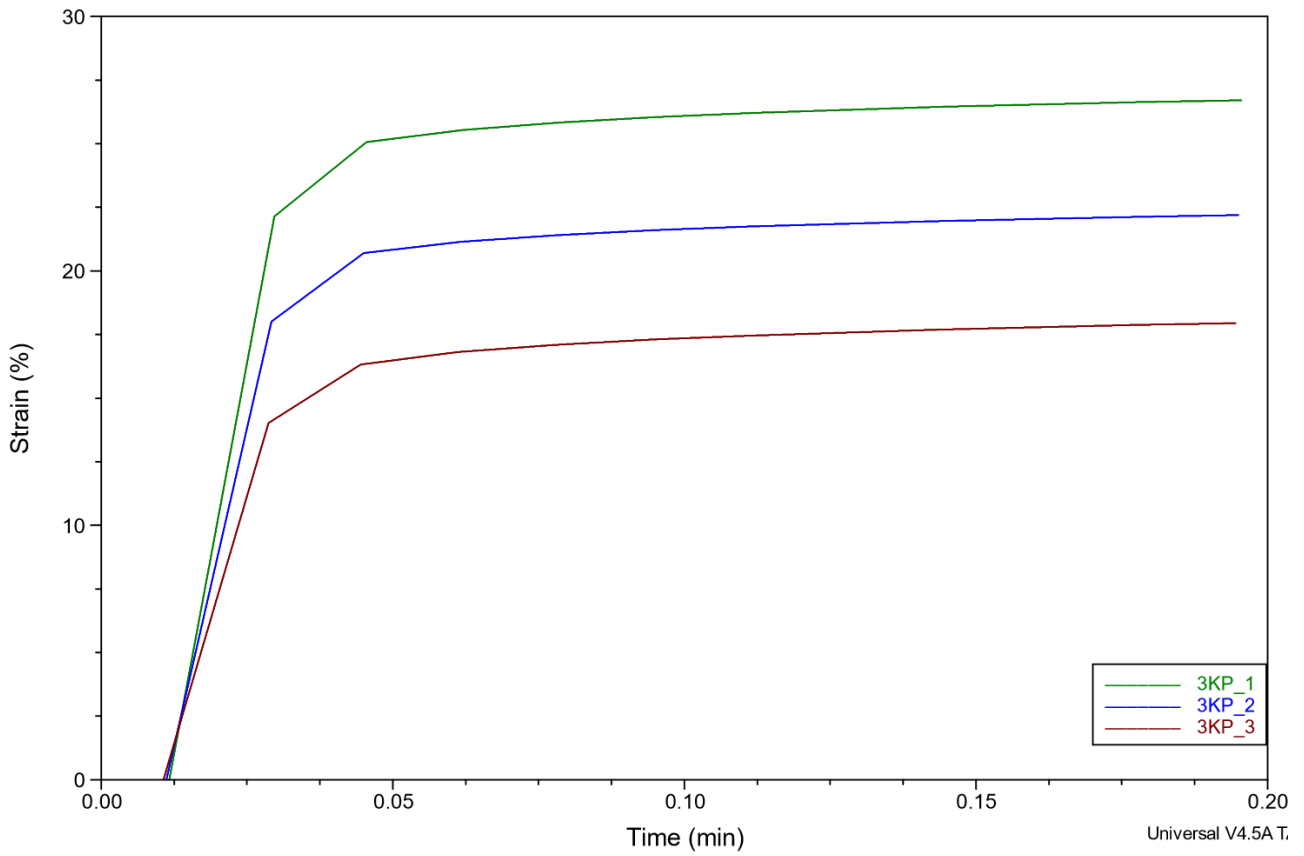
**Tabella 3.2.2** Media e deviazione standard degli espansi PUf-3KP, PUf-2KP, PUf-base dell'assorbimento in SWF a plateau prima e dopo la compressione. Nell'ultima colonna è riportata la differenza percentuale tra i due stati rigonfiati

Tipo di espanso	Ass 8gg (%)	Rit 8gg (%)	Differenza (%)
PUf-3KP	364,22 ± 34,53	327,71 ± 58,62	10,02
PUf-2KP	402,18 ± 109,40	324,16 ± 101,59	19,40
PUf-base	421,77 ± 13,88	332,18 ± 19,93	21,24

A supporto dei risultati ottenuti sono stati ricavati anche i grafici dell'andamento della deformazione a seguito della compressione per ogni campione sia dopo 24h che al raggiungimento del plateau. In generale, è possibile affermare che tutti i campioni presentano un andamento simile: un primo tratto di crescita lineare, dettato dalla rampa di carico del test; un secondo tratto in cui si ha un cambiamento di pendenza in un intervallo di tempo particolarmente ristretto; infine, a partire da 0,05 min circa, la curva cresce lentamente tendendo ad un valore asintotico fino al raggiungimento di un valore massimo di deformazione ( $\epsilon_{\max}$ ).

In Figura 3.2.3 è riportata la variazione della deformazione percentuale nel tempo di prova, pari a 20 secondi, per i tre campioni di espanso PUF-3KP dopo 24h e al raggiungimento del plateau. Nel primo grafico (Figura 3.2.3), relativo al test eseguito dopo 24h, le curve presentano dei cambi di pendenza esattamente negli stessi istanti di tempo con un andamento iniziale molto simile; l'aspetto differente è il valore di deformazione percentuale massimo raggiunto ( $\epsilon_{\max}$ ). Il valore medio di  $\epsilon_{\max}$  è pari al 22% con una deviazione standard pari a 4,33.

Anche nel secondo grafico (Figura 3.2.3), relativo al test eseguito al raggiungimento del plateau, le curve presentano cambi di pendenza negli stessi istanti di tempo ; tuttavia, mentre due campioni presentano valori più simili tra loro (valore medio di deformazione massima pari a 21,25%), il terzo campione raggiunge un valore molto elevato (pari a 110%). È possibile ipotizzare che tale campione, al raggiungimento del plateau e sottoposto a compressione, abbia subito una deformazione maggiore a causa di un possibile cedimento della struttura e di una maggiore fuoriuscita del liquido SWF. Tuttavia, analizzando il valore di assorbimento percentuale del campione e la differenza tra prima e dopo la compressione (Tabella 3.2.2) non è stato possibile identificare alcuna anomalia nei risultati. Probabilmente, una volta eseguita la compressione, parte del liquido SWF fuoriuscito è stato riassorbito dalla schiuma non alterando il peso del campione.



**Figura 3.2.3** Deformazione a seguito della compressione dell'espanso PUF-3KP a 24h (in alto) e a plateau (in basso)

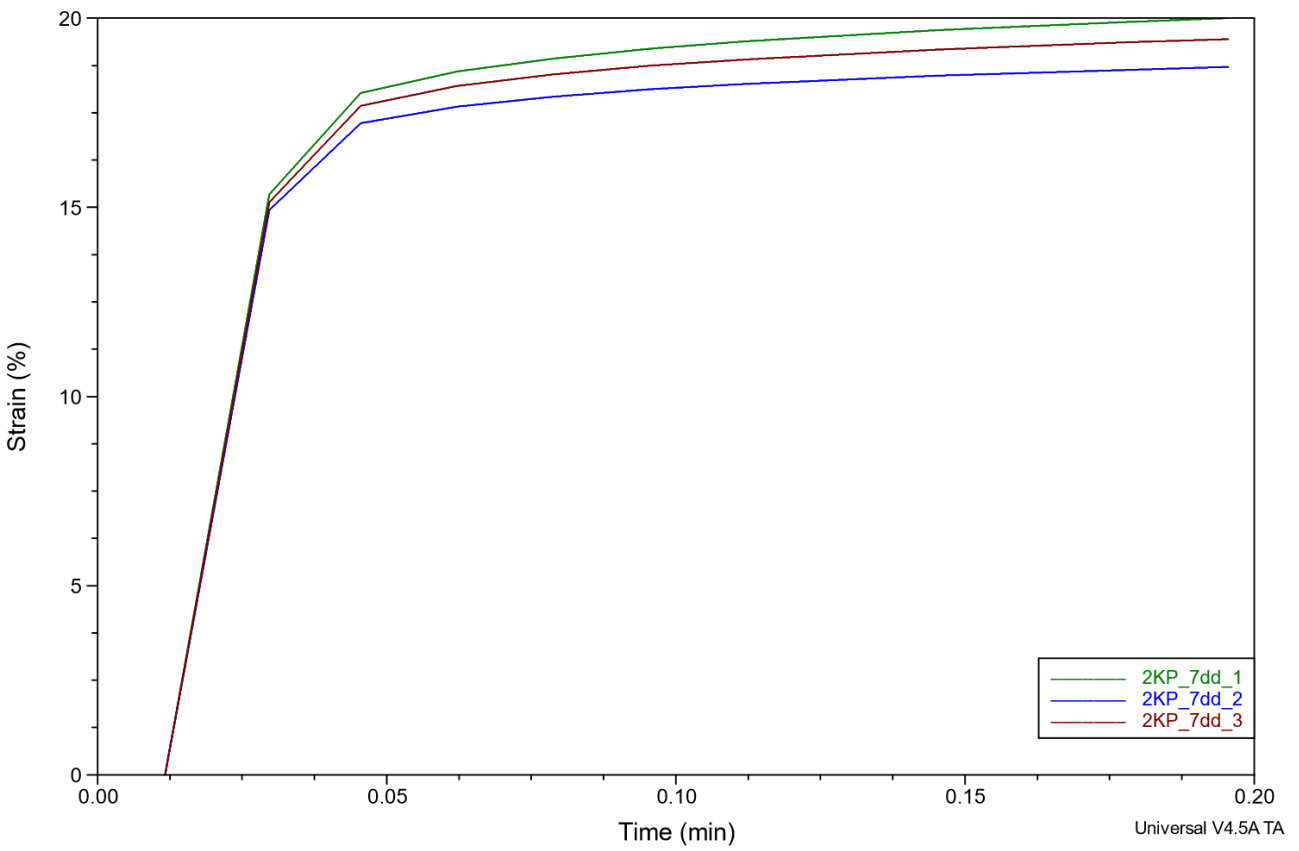
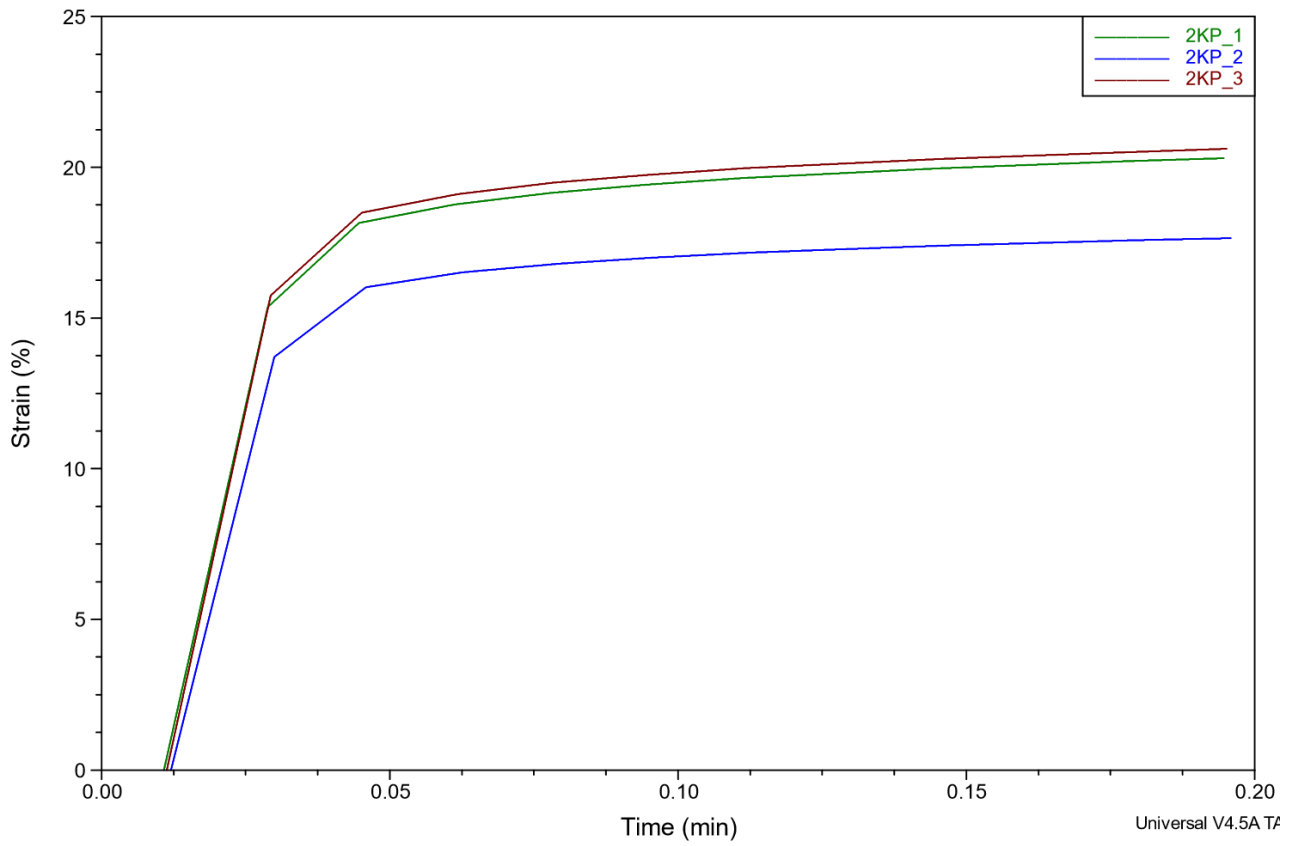
Diversamente, due campioni di PUF-3KP hanno mostrato dei valori medi di deformazione massima alle 24h e al plateau particolarmente simili tale per cui è possibile affermare che i campioni presentino una capacità di ritenzione dei fluidi simile nei due intervalli di tempo considerati.

Nella Figura 3.2.4 sono riportati i grafici di deformazione a seguito della compressione dopo 24h e al plateau dell'espanso PUF-2KP. Nel primo grafico (Figura 3.2.4), relativo alle 24h, si può dedurre che tutte le curve presentano cambi di pendenza ai medesimi istanti di tempo e presentino valori di deformazione particolarmente simili. Infatti il valore medio della deformazione massima raggiunta ( $\epsilon_{\max}$ ) è pari a 19,3% e la deviazione standard assume un valore particolarmente basso pari a 1,6.

Il secondo grafico (Figura 3.2.4) è relativo al test di compressione eseguito al raggiungimento del plateau delle schiume da cui si evince un andamento simile per le schiume con il raggiungimento di valori di deformazione massima molto simili: infatti il valore medio di  $\epsilon_{\max}$  è pari circa a 19% e il valore di deviazione standard è 0,94.

Analizzando i dati ottenuti, è possibile affermare che non vi sia alcuna differenza significativa tra i valori di deformazione massima ottenuti alle 24h e al plateau considerando anche i valori di deviazione standard riportati. Ciò sta ad indicare che l'espanso PUF-2KP presenta il medesimo comportamento meccanico sia alle 24h sia dopo 8 giorni di immersione in liquido SWF. Confrontando tali dati con i valori di differenza percentuale calcolati alle 24h e al raggiungimento del plateau, rispettivamente riportati in Tabella 3.2.1 e in Tabella 3.2.2, è possibile constatare che risultano essere coerenti tra loro. Difatti, la differenza percentuale alle 24h è pari circa a 18,5% mentre al raggiungimento del plateau a circa 19,4%. Per cui l'espanso PUF-2KP presenta la medesima capacità di ritenzione dei fluidi sia alle 24h sia al raggiungimento del plateau.





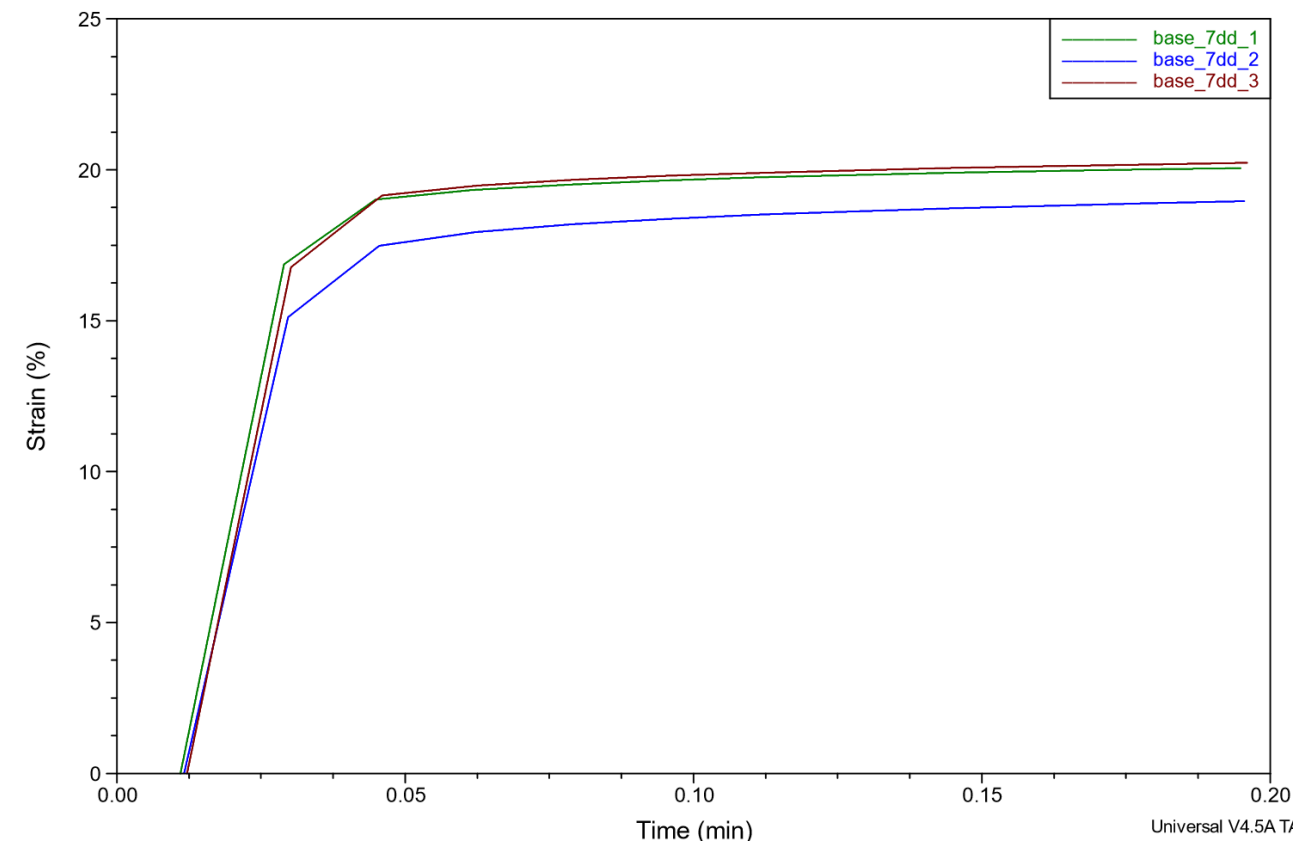
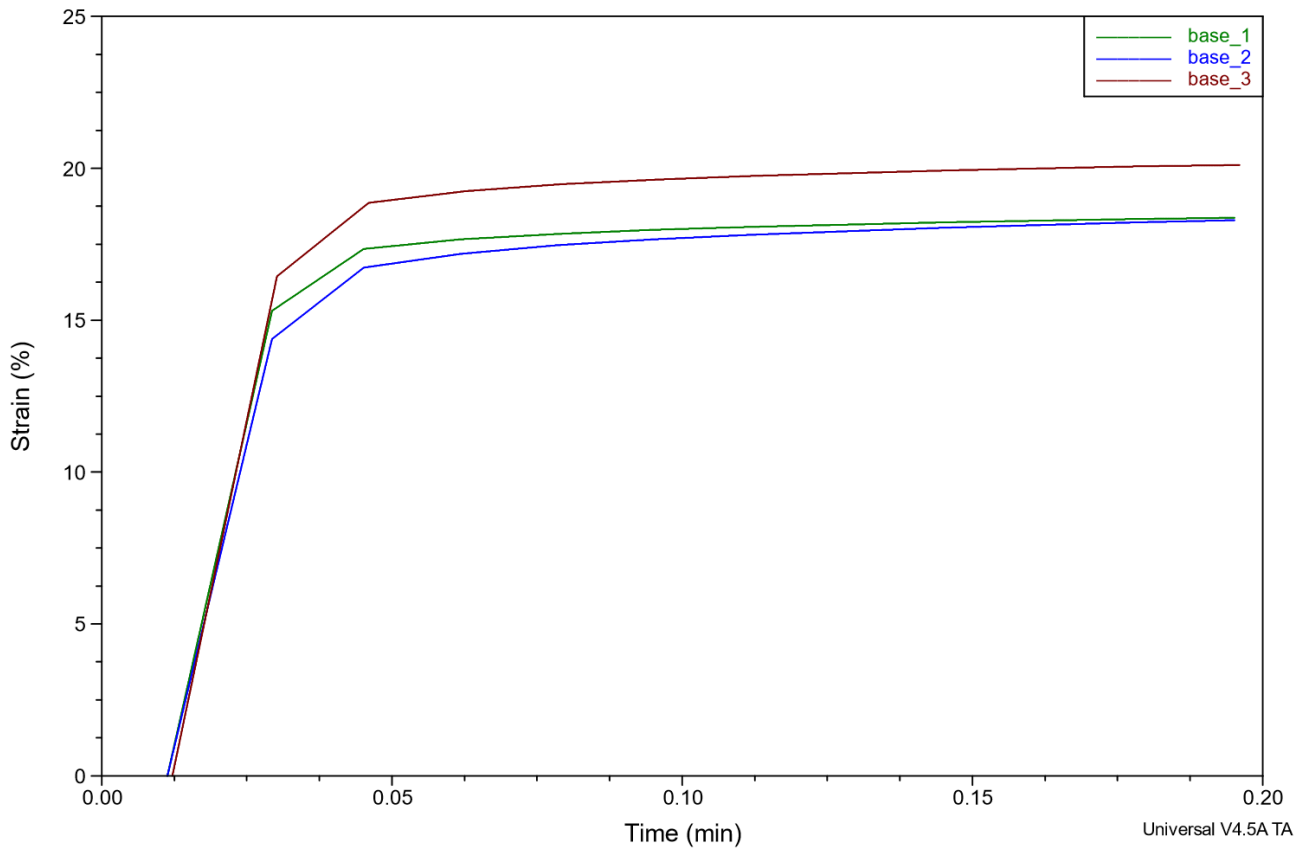
**Figura 3.2.4** Deformazione a seguito della compressione dell'espanso PUF-2KP a 24h (in alto) e a plateau (in basso)

Nella Figura 3.2.5 sono riportati i grafici relativi ai campioni di espanso PUF-base a seguito della compressione a 24h e al raggiungimento del plateau. Nel primo grafico in Figura 3.2.5, relativo alle 24h, si può notare che le curve relative ai singoli provini risultano sovrapposte nel tratto lineare e tendono poi ad un valore asintotico leggermente differente. Il valore medio della deformazione massima ( $\epsilon_{\max}$ ) raggiunto è pari a 18,7% e la deviazione standard è molto bassa e pari a 1,1.

Le medesime considerazione posso essere tratte anche dal secondo grafico (Figura 3.2.5) relativo al test di compressione eseguito al raggiungimento del plateau: infatti, il valore medio della deformazione massima raggiunta ( $\epsilon_{\max}$ ) è pari a 19,3% con una deviazione standard pari a 1,2.

Dai dati riportati, è possibile notare che non vi sia alcuna rilevante differenza tra i valori di deformazione ottenuti alle 24h e a plateau, per cui è possibile affermare che l'espanso PUF-base ha presentato la stessa risposta meccanica alla compressione sia dopo 24h sia dopo 8 giorni di immersione nel liquido SWF.

Confrontando tali dati con i valori di differenza percentuali riportati rispettivamente in Tabella 3.2.1 e in Tabella 3.2.2, si può notare che alle 24 ore l'espanso PUF-base ha riportato un valore pari circa a 18,3% mentre a plateau pari a 21,2%. Tali risultati sono coerenti con quanto emerso dai grafici di deformazione per cui è possibile affermare che l'espanso PUF-base alle 24h e al plateau presenta la medesima risposta meccanica e la medesima capacità di ritenzione dei fluidi.



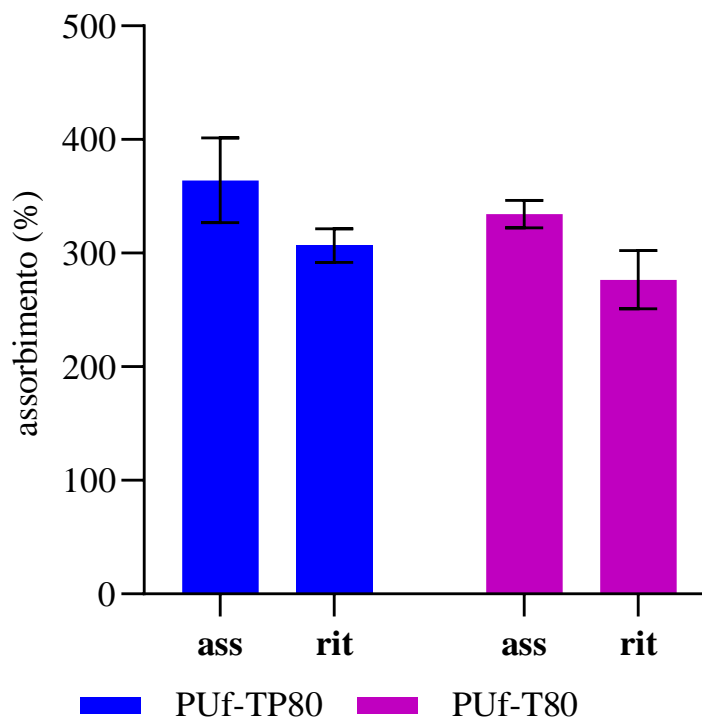
**Figura 3.2.5** Deformazione a seguito della compressione dell'espanso PUF-base a 24h (in alto) e a plateau (in basso)

### 3.2.2 Espansi PUf-TP80 e PUf-T80

In Figura 3.2.6 è possibile osservare l'assorbimento percentuale degli espansi PUf-TP80 e PUf-T80 prima e dopo l'applicazione di una forza pari a 0,419N per 20 sec alle 24h. Come visto nel paragrafo precedente, il valore di assorbimento medio raggiunto dalla schiuma PUf-TP80 trascorse 24h in liquido SWF è prossimo a 364% mentre quello della schiuma PUf-T80 è prossimo a 334%; tuttavia, a causa della elevata deviazione standard non è stata rilevata una differenza statisticamente significativa ( $p>0.05$ ) tra tali valori di assorbimento percentuale.

A seguito della compressione a 24h, l'espanso PUf-TP80 ha riportato un valore di assorbimento medio pari a 307% circa mentre per l'espanso PUf-T80 circa 277%. Anche in questo caso non è stato possibile riscontrare una differenza statisticamente significativa ( $p>0.05$ ) tra i valori di assorbimento percentuali ottenuti. I valori medi effettivi di assorbimento prima e dopo la compressione con relativa deviazione standard sono riportati in Tabella 3.2.3.

Sempre dalla Tabella 3.2.3, si può constatare che l'espanso PUf-TP80 ha riportato un valore di differenza percentuale tra l'assorbimento prima e dopo la compressione pari a 15% circa mentre l'espanso PUf-T80 pari a 17% circa. Per quanto vi sia una leggera differenza nei valori ottenuti, questa non risulta significativa ( $p>0.05$ ) da un punto di vista statistico a causa della alta variabilità dei dati raccolti, per cui è possibile affermare che alle 24h gli espansi PUf-TP80 e PUf-T80 hanno una capacità di ritenzione dei fluidi simile.



**Figura 3.2.6** Valori di assorbimento percentuale e di deviazione standard degli espansi PUf-TP80 e PUf-T80 trascorse 24h prima (**ass**) e dopo (**rit**) l'applicazione di una forza costante pari a 0,419 N per 20 secondi

**Tabella 3.2.3** Media e deviazione standard degli espansi PUf-TP80 e PUf-T80 dell'assorbimento in SWF a 24h prima e dopo la compressione. Nella terza colonna è riportata la differenza percentuale tra i due stati rigonfiati

Tipo di espanso	Ass 24h (%)	Rit 24h (%)	Differenza (%)
PUf-TP80	364,10 ± 37,38	306,80 ± 14,76	15,74
PUf-T80	334,36 ± 12,19	276,60 ± 25,71	17,27

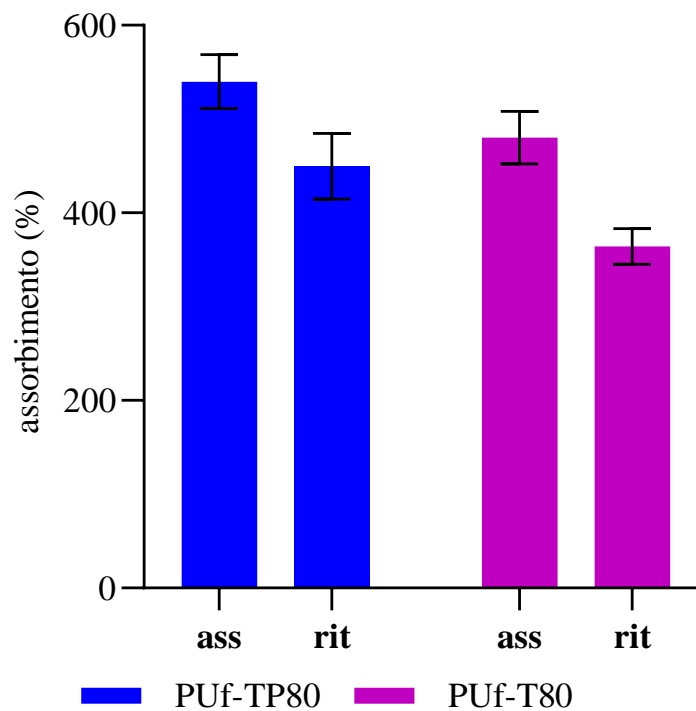
Le due schiume sono state sottoposte a compressione (nelle medesime condizioni precedenti) anche al raggiungimento del plateau, sempre per valutarne la capacità di ritenzione. In Figura 3.2.7 è riportato il valore medio di assorbimento percentuale degli espansi PUf-TP80 e PUf-T80 prima e dopo la compressione con relativa deviazione standard.

Al plateau l'espanso PUf-TP80 ha riportato un valore di assorbimento medio pari a 540% circa mentre l'espanso PUf-T80 pari a 480% circa. Tra i valori riportati non è stata individuata una differenza significativa ( $p > 0.05$ ) da un punto di vista statistico.

A seguito del test di compressione, l'espanso PUf-TP80 ha riportato un valore medio di assorbimento percentuale pari circa a 450% mentre l'espanso PUf-T80 pari a 364% circa. Non è stata rilevata una significatività statistica ( $p > 0.05$ ) tra i valori riportati. Tutti i valori medi dell'assorbimento e di deviazione standard sono riportati in Tabella 3.2.4.

Anche in questo caso è stata valutata la differenza percentuale dello stato di rigonfiamento degli espansi prima e dopo la compressione ed è riportata in Tabella 3.2.4. Già dalla Figura 3.2.7 è possibile riscontrare che gli espansi presentano una differenza tra il valore medio di assorbimento prima (colonne in figura indicate con "ass") e dopo (colonne in figura indicate con "rit") la compressione.

Tale osservazione trova riscontro nei valori riportati in Tabella 3.2.4 dove la differenza percentuale nel caso dell'espanso PUf-TP80 è pari al 17% circa mentre nel caso dell'espanso PUf-T80 è pari a 24%. Tuttavia, tra i due dati non è stato possibile riscontrare una differenza statisticamente significativa ( $p > 0.05$ ). Per tale motivo non è possibile affermare che l'espanso PUf-TP80 a plateau presenti una capacità di ritenzione dei fluidi maggiore dell'espanso PUf-T80.



**Figura 3.2.7** Valori di assorbimento percentuale e di deviazione standard degli espansi PUf-TP80 e PUf-T80 al raggiungimento del plateau prima (**ass**) e dopo (**rit**) l'applicazione di una forza costante pari a 0,419 N per 20 secondi

**Tabella 3.2.4** Media e deviazione standard degli espansi PUf-TP80 e PUf-T80 dell'assorbimento in SWF al raggiungimento del plateau prima e dopo la compressione. Nella terza colonna è riportata la differenza percentuale tra i due stati rigonfiati

Tipo di espanso	Ass 8gg (%)	Rit 8gg (%)	Differenza (%)
PUf-TP80	539,98 ± 28,72	449,85 ± 34,94	16,69
PUf-T80	480,40 ± 28,04	364,25 ± 18,91	24,18

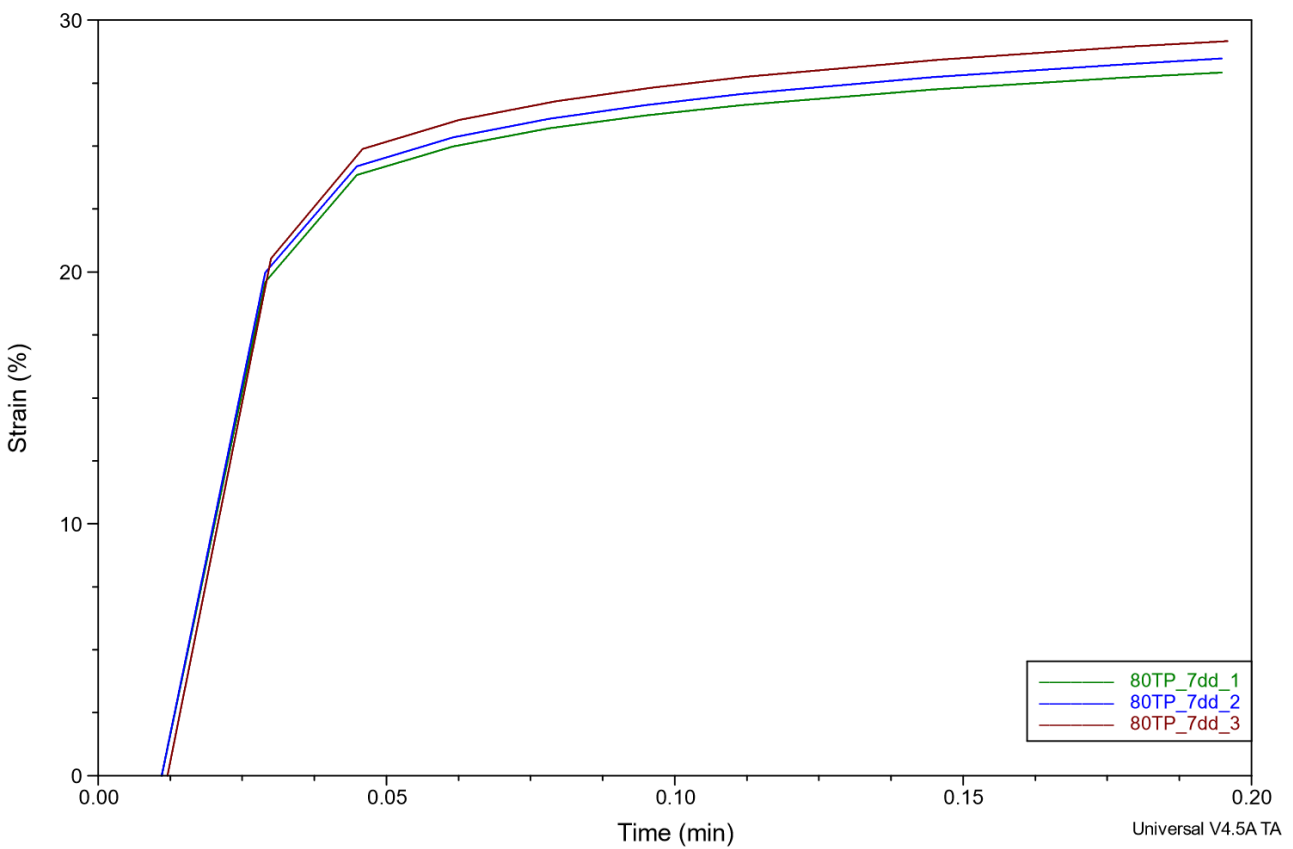
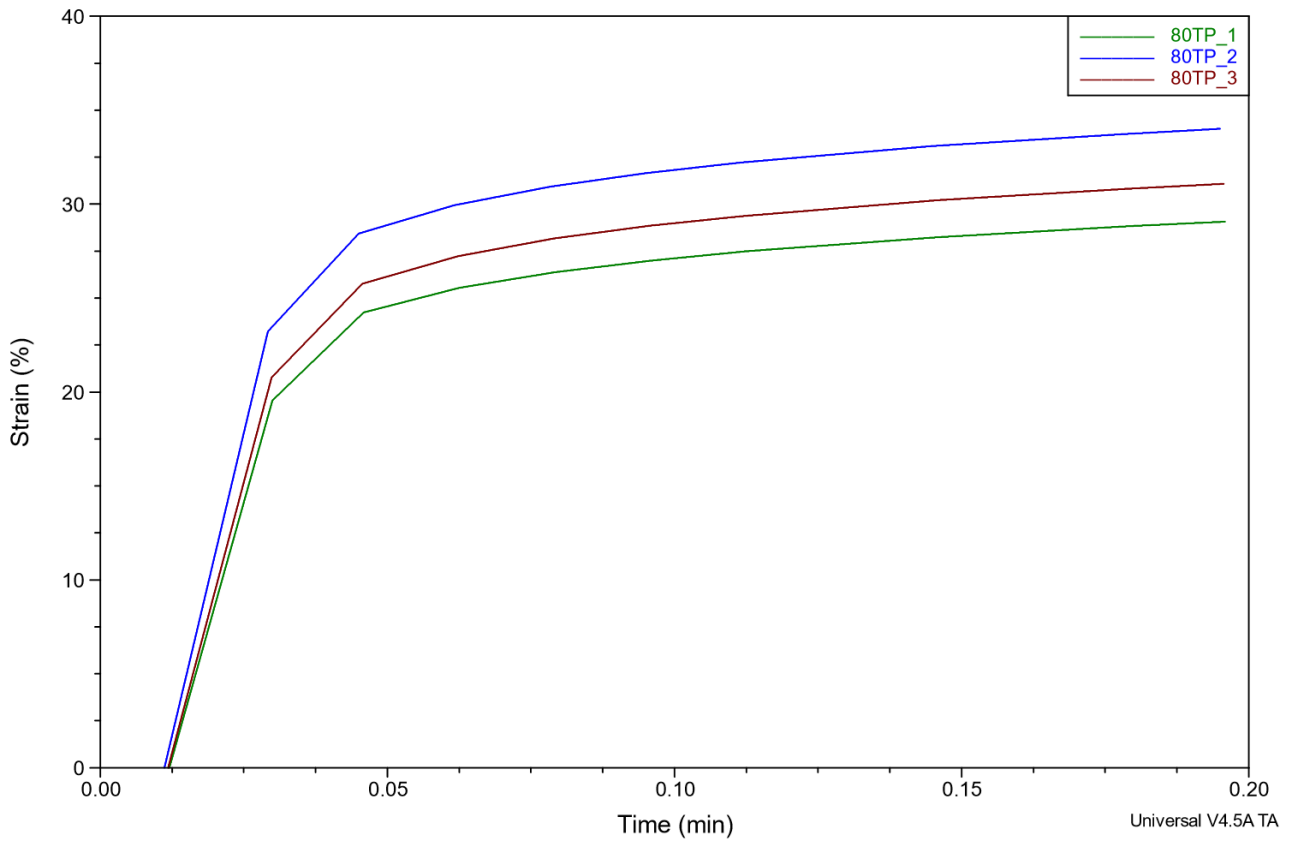
A supporto dei dati di assorbimento percentuali ottenuti a seguito della compressione, sono riportati in seguito i grafici dell'andamento della deformazione trascorse 24h e al raggiungimento del plateau. Anche in questo caso, le curve presentano un andamento caratterizzato da un primo tratto di crescita lineare, causato dalla rampa di carico del test; un cambio di pendenza in un breve intervallo di tempo; e, infine, dopo 0.05 min la curva prosegue crescendo lentamente quasi parallelamente all'asse delle x tendendo ad un valore asintotico fino al raggiungimento di un valore di deformazione ( $\epsilon_{\max}$ ) massimo.

In Figura 3.2.8 sono riportati i grafici di deformazione percentuale dell'espanso PUF-TP80 a seguito della compressione eseguita alle 24h e dopo 8 giorni di immersione nel liquido SWF. Nel primo grafico (Figura 3.2.8), relativo alle 24h, è possibile riscontrare che le tre curve indicative dei tre campioni presentano una pendenza nel tratto lineare particolarmente simile mentre tendono a tre valori asintotici differenti che si discostano leggermente tra loro. Il valore medio della deformazione massima raggiunta ( $\epsilon_{\max}$ ) è pari a 30,6% con un valore di deviazione standard pari a 2,92.

Nel secondo grafico (Figura 3.2.8), relativo al raggiungimento del plateau, le tre curve appaiono sovrapposte nel primo tratto lineare e raggiungono un valore asintotico leggermente differente tale per cui il valore medio della deformazione massima raggiunta ( $\epsilon_{\max}$ ) risulta essere pari a 28,1% con una deviazione standard pari a 0,62.

Analizzando i valori medi e di deviazione standard, è possibile affermare che non vi sia una differenza significativa tra il valore medio della deformazione massima raggiunta alle 24h e al plateau. Per cui, è possibile affermare che l'espanso PUF-TP80 presenta il medesimo comportamento meccanico sia trascorse 24h sia al raggiungimento del plateau. Difatti, la differenza percentuale calcolata alle 24h e al raggiungimento del plateau è simile.



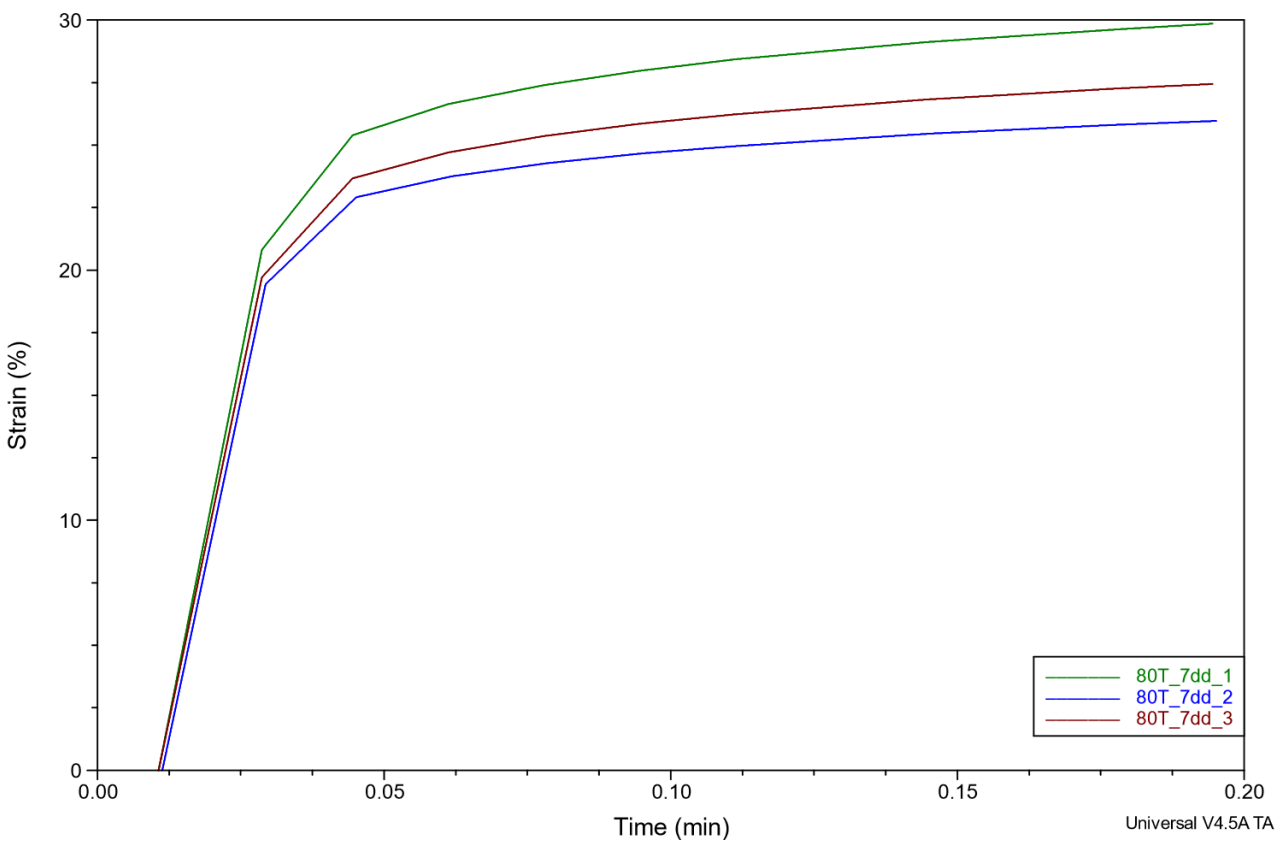
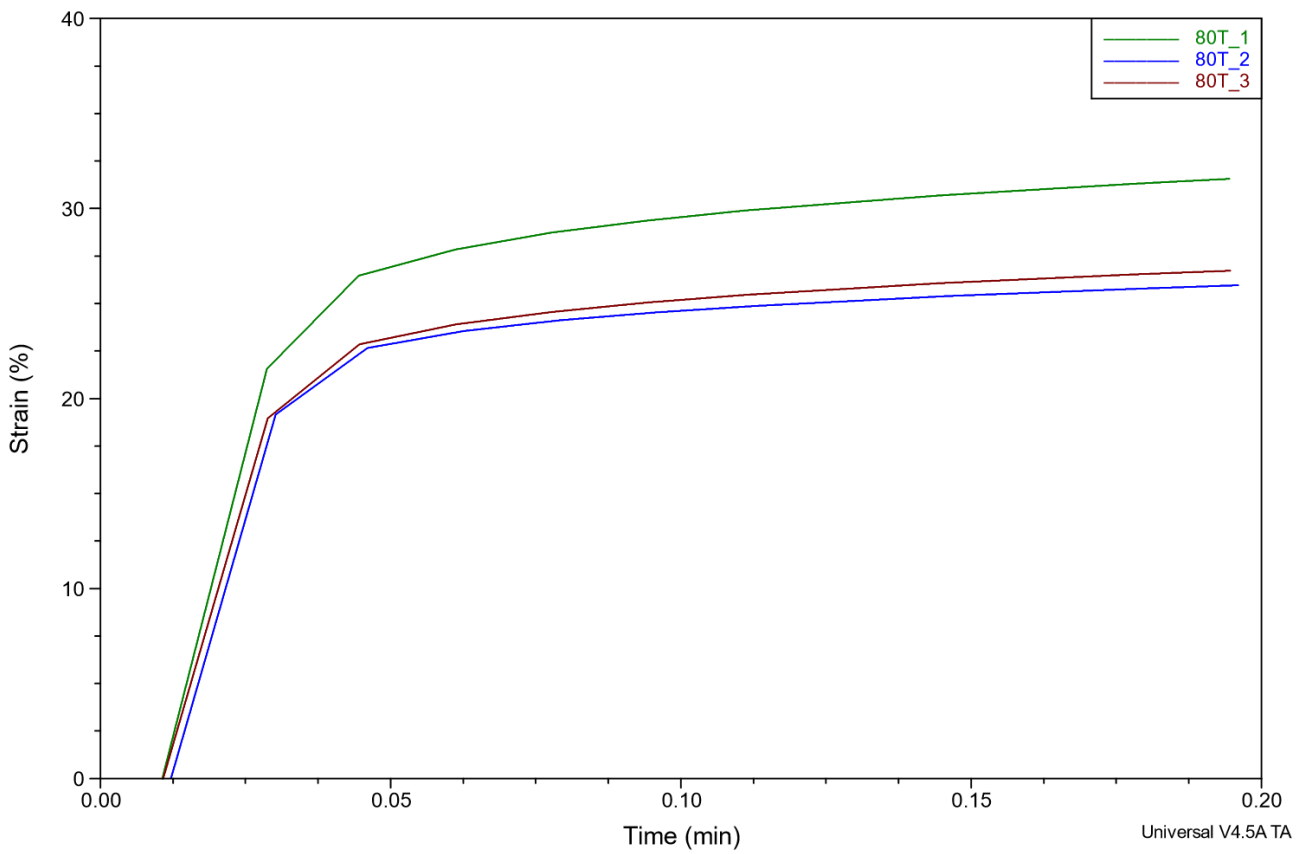


**Figura 3.2.8** Deformazione a seguito della compressione dell'espanso PUf-TP80 a 24h (in alto) e a plateau (in basso)

In Figura 3.2.9 sono riportati i grafici dell'andamento di deformazione e seguito della compressione per l'espanso PUF-T80 trascorse 24h e 8 giorni in soluzione SWF. Nel primo grafico (Figura 3.2.9), relativo alle 24h, è possibile apprezzare che tutte le curve presentano i medesimi cambi di pendenza agli stessi istanti di tempo; in particolare due curve risultano praticamente sovrapposte per tutta la durata del test mentre l'altra si distingue leggermente per il valore asintotico a cui tende. Il valore medio della deformazione massima raggiunta ( $\epsilon_{\max}$ ), infatti, è pari circa a 27,3% con una deviazione standard pari a 3,25.

Nel secondo grafico in Figura 3.2.9, relativo al test di compressione a plateau, è possibile notare che, anche in questo caso, tutte le curve presentano cambi di pendenza ai medesimi istanti di tempo e che appaiono sovrapposte nel tratto lineare e poi ciascuna tende ad un valore asintotico leggermente differente. Difatti, il valore medio della deformazione massima raggiunta ( $\epsilon_{\max}$ ) è pari circa a 27,5% con una deviazione standard di 2,22.

Tra i dati ottenuti di valore medio della deformazione massima raggiunta alla compressione eseguita alle 24h e al raggiungimento del plateau non è stata rilevata alcuna differenza significativa. Ciò significa che il comportamento meccanico dell'espanso PUF-T80 non varia alle 24h e dopo 8 giorni di immersione nel liquido SWF. Confrontando i valori di differenza percentuale riportati in Tabella 3.2.3 e in Tabella 3.2.4 è possibile notare che alle 24h e al raggiungimento del plateau, l'espanso PUF-T80 presenta due valori algebrici differenti per cui si potrebbe immaginare che tale schiuma presenti una migliore capacità di ritenzione dei fluidi alle 24h. Tuttavia i dati di differenza percentuale risultano incoerenti con i dati ottenuti dai grafici di deformazione ottenuti dal test di compressione. Si potrebbe ipotizzare che i campioni, una volta sospesa la compressione, abbiano riassorbito parte del liquido SWF fuoriuscito durante la compressione, andando ad alterare il peso del campione e, conseguentemente, il valore di differenza percentuale.



**Figura 3.2.9** Deformazione a seguito della compressione dell'espanso PUF-T80 a 24h (in alto) e a plateau (in basso)

### 3.3 Spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier

La spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier (FT-IR) è un'analisi qualitativa spettroscopica impiegata per valutare la composizione del materiale da un punto di vista chimico; tuttavia, può essere interpretata anche come un'analisi quantitativa in quanto a seconda dell'intensità di assorbimento è possibile valutare la concentrazione di un componente. Nel presente lavoro di tesi sono state impiegate due differenti tecniche, quali in ATR (Attenuated Total Reflectance) e in trasmissione. La prima tecnica consente di ottenere un'analisi della superficie dei campioni in quanto la radiazione viene riflessa diverse volte attraverso un cristallo trasparente all'IR e ad ogni riflessione il raggio penetra di qualche micron nel campione e viene attenuato (o assorbito). Diversamente, la FT-IR in trasmissione permette di ottenere un'analisi del campione nella sua interezza in quanto il raggio incidente deve attraversare la totalità dello spessore del campione.

In Tabella 3.3.1 Attribuzioni delle bande relative ai moti vibrazionali del PIME [9] Tabella 3.3.1 sono riportate le attribuzioni delle bande relative ai moti vibrazionali del PIME, in Tabella 3.3.2 le attribuzioni delle bande relative a specifici gruppi funzionali presenti nelle schiume PU che presentano la stessa composizione chimica degli espansi senza PIME e, infine, in Tabella 3.3.3 le attribuzioni delle bande relative a specifici legami presenti nell'eparina.

Nel presente lavoro di tesi la spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier (FT-IR) in ATR e in trasmissione è stata impiegata per verificare che gli espansi possano essere effettivamente funzionalizzati con l'eparina grazie all'interazione con il PIME. Ciò avviene grazie ad interazioni ioniche ed elettrostatiche tra i gruppi amminici (carichi positivamente a pH fisiologico) del PIME e i gruppi carbossilici e solfonici (carichi negativamente a pH fisiologico) dell'eparina [9] [10] [30].

Inoltre, è stato scelto di considerare sia le condizioni in cui per il trattamento di eparinizzazione è stata utilizzata la soluzione di eparina filtrata che non filtrata al fine

di valutare se tale passaggio potesse inficiare il trattamento di eparinizzazione degli espansi.

**Tabella 3.3.1** Attribuzioni delle bande relative ai moti vibrazionali del PIME [9]

<b>Frequenza (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Attribuzione</b>
<b>3500-3300</b>	Stretching di -OH
<b>3000-2880</b>	Stretching simmetrico e antisimmetrico di -CH <sub>2</sub>
<b>2815-22780</b>	Stretching simmetrico di -CH <sub>3</sub> e di N-CH <sub>3</sub>
<b>2820</b>	Stretching dell'ammine -N-C-H
<b>1650-1600</b>	Stretching dell'ammide -C=O
<b>1500-1350</b>	Bending di -CH <sub>2</sub>
<b>1370-1310</b>	Stretching dell'ammina alifatica terziaria >N-CH <sub>3</sub>
<b>1300-1150</b>	Stretching dell'ammide terziaria -C-N
<b>1230-1030</b>	Stretching dell'ammina alifatica terziaria -C-N

**Tabella 3.3.2** Attribuzioni delle bande ai moti vibrazionali di schiume PU che presentano la composizione chimica degli espansi realizzati senza PIME [8]

<b>Frequenza (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Attribuzione</b>
<b>3500-3300</b>	-N-H
<b>3300-3200</b>	Presenza di molecole d'acqua Legami a ponte di idrogeno intramolecolari
<b>3200-3100</b>	-N-H (legame uretano)
<b>2980</b>	Legami a ponte di idrogeno intramolecolari

	-C-H
<b>2930-2860</b>	C-H saturi: -C-H <sub>3</sub> e -C-H <sub>2</sub>
<b>1710</b>	Assorbimento di carbonile e chetone (C=O), -CHO e vibrazione di C=O del legame uretano
<b>1600</b>	Ammina primaria -N-H <sub>2</sub> C=C anello aromatico
<b>1540-1510</b>	Amide secondaria (legame uretano) R <sup>1</sup> -CO-NH-R <sup>2</sup>
<b>1440</b>	Deformazione -C-H da -C-H <sub>2</sub> e -C-H <sub>3</sub>
<b>1375-1310</b>	<i>Bending</i> -O-H
<b>1220</b>	<i>Stretching</i> -C-N
<b>1100</b>	<i>Stretching</i> CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub>
<b>1014</b>	<i>Stretching</i> -C-O
<b>920-820-760</b>	C-H aromatico (benzene bi-sostituiti dell'isocianato)
<b>720</b>	<i>Rocking</i> -C-H <sub>2</sub>

**Tabella 3.3.3** Attribuzione delle bande IR dell'eparina [31]

<b>Frequenza (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Attribuzione</b>
<b>3700-3500</b>	Libero -OH
<b>3700-3100</b>	Legame -OH
<b>3049-2800</b>	Stretching di -C-O e -C-C
<b>1718</b>	Carbossilato aciclico

<b>1650-1550</b>	Deformazione NAc
<b>1610-1540</b>	Stretching asimmetrico -C-O
<b>1565-1530</b>	Vibrazioni ammidi secondaria
<b>1468</b>	Scissoring di -C-H
<b>1432-1429</b>	Interazione tra il gruppo carbossile e -NS
<b>1433-1417</b>	Stretching del carbossilato
<b>1389-1382</b>	Stretching di C-H NAc
<b>1349</b>	-O-H
<b>1340</b>	Bending di -C-H
<b>1310-1250</b>	S=O
<b>1320-1210</b>	Acido carbossilico -C-O
<b>1240</b>	Stretching -C=O NAc Stretching asimmetrico di S=O
<b>1230</b>	S=O
<b>1200-1180</b>	Solfatazione di N
<b>1100</b>	Solfato
<b>1150-1070</b>	Stretching asimmetrico di -C-O-C
<b>1080-1030</b>	Legame -O-H
<b>1050-1020</b>	Stretching simmetrico di S=O
<b>1200-1000</b>	Stretching caratteristico di -C-O Bending di -C-O-H
<b>1170-950</b>	Stretching indicativo dell'anello piranosico
<b>1000-930</b>	Stretching -C-O-S

	Legame glicosidico
<b>913</b>	-O-H
<b>911</b>	C1-H
<b>890</b>	Accoppiamento tra -C-O-S e l'anello C-O-C
<b>875</b>	Equatoriale vs assiale -C-H
<b>950-850</b>	Deformazione di C6
<b>836</b>	C1-H
<b>827</b>	6S
<b>800</b>	2S
<b>720</b>	Legame ammine secondaria Deformazioni N-H

### 3.3.1 FT-IT in ATR

Come anticipato precedentemente, la spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier in ATR (Attenuated Total Reflectance) è stata impiegata per analizzare la superficie dei film PIME e dei film base trattati con soluzione PBS, soluzione di eparina filtrata e soluzione di eparina non filtrata al fine di valutare o meno la presenza di quest'ultima nei film PIME.

A titolo semplificativo gli spettri IR in ATR sono stati suddivisi nei paragrafi come segue:

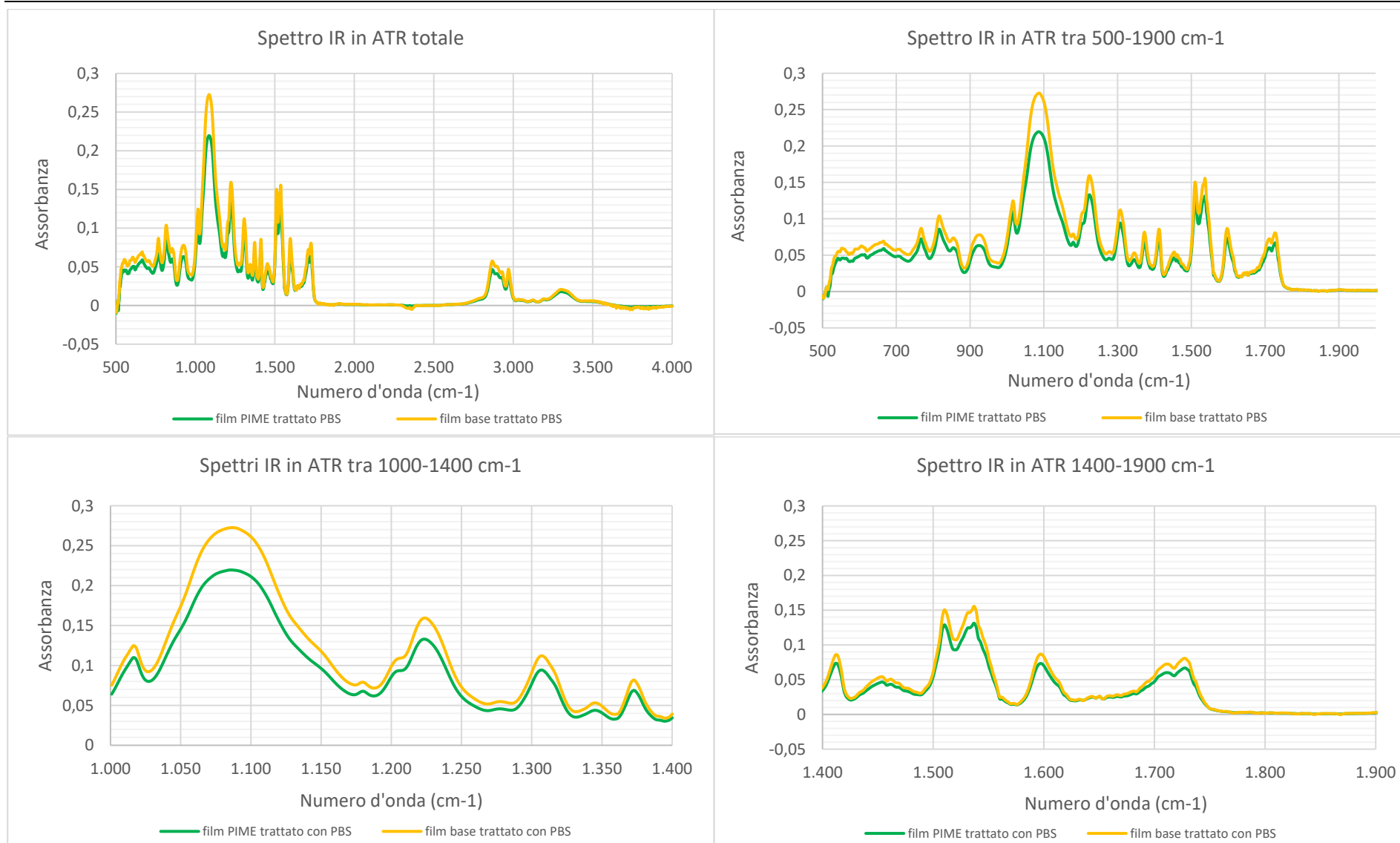
- Confronto tra spettro IR del campione film PIME e film base trattati con PBS;
- Confronto tra spettro IR dei campioni film PIME trattati con eparina filtrata e non filtrata rispetto al campione film PIME trattato con PBS (controllo);
- Confronto tra spettro IR dei campioni film base trattati con eparina filtrata e non filtrata rispetto al campione film base trattato con PBS (controllo);



Il confronto tra gli spettri IR ottenuti tramite ATR e trasmissione e il confronto tra i risultati ottenuti con gli spettri IR riportati nel precedente lavoro di tesi sono approfonditi in seguito nel paragrafo relativo della discussione.

### 3.3.1.1 Spettri IR in ATR dei film base e film PIME trattati con PBS

In Figura 3.3.1 è riportato lo spettro IR totale ( $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ) e i relativi ingrandimenti ottenuto dall'analisi FT-IR in ATR dei campioni di film base e di film PIME trattati esclusivamente con la soluzione PBS. Dai diversi ingrandimenti si evince che i due spettri non presentano alcuna differenza presentano le medesime bande, l'unica differenza è il valore di assorbanza che tende ad essere maggiore per lo spettro IR del film base. Tale aspetto implica semplicemente una maggior presenza di un dato gruppo funzionale. Si può concludere che da quest'analisi, non emergano differenze significative in merito alla composizione superficiale dei due film e, pertanto, si potrebbe ipotizzare che il PIME non sia presente sulla superficie del film PIME.



**Figura 3.3.1** Spettri IR in ATR a diversi ingrandimenti del film PIME e film base trattati con PBS

### 3.3.1.2 Spettri IR in ATR dei film PIME a confronto

In Figura 3.3.2 è riportato lo spettro IR totale ( $500-4000\text{ cm}^{-1}$ ) e i relativi ingrandimenti ottenuto tramite l'analisi FT-IR in ATR dei diversi campioni di film PIME a confronto dove un campione è stato trattato con soluzione PBS, un campione con soluzione di eparina filtrata e, infine, due campioni trattati con soluzione di eparina non filtrata. L'obiettivo era quello di valutare se effettivamente il PIME fosse in grado di interagire positivamente con l'eparina e se il filtraggio potesse alterare in qualche modo il processo di eparinizzazione. Purtroppo, dai tracciati si evince che tutti gli spettri presentano il medesimo andamento; l'unica differenza è il valore di assorbanza raggiunto. Come detto precedentemente tale aspetto si traduce in una maggior presenza di uno specifico gruppo funzionale sulla superficie e, pertanto, non indica una differenza nella composizione chimica superficiale del materiale. Ciò indica che tra i campioni trattati con eparina, sia filtrata sia non filtrata, e i campioni trattati con solo PBS non vi è alcuna differenza in termini di spettro IR. Tali risultati potrebbero confermare quanto detto nel paragrafo precedente, ossia che il PIME non sia presente sulla superficie dei campioni di film PIME e, conseguentemente, nemmeno l'eparina.

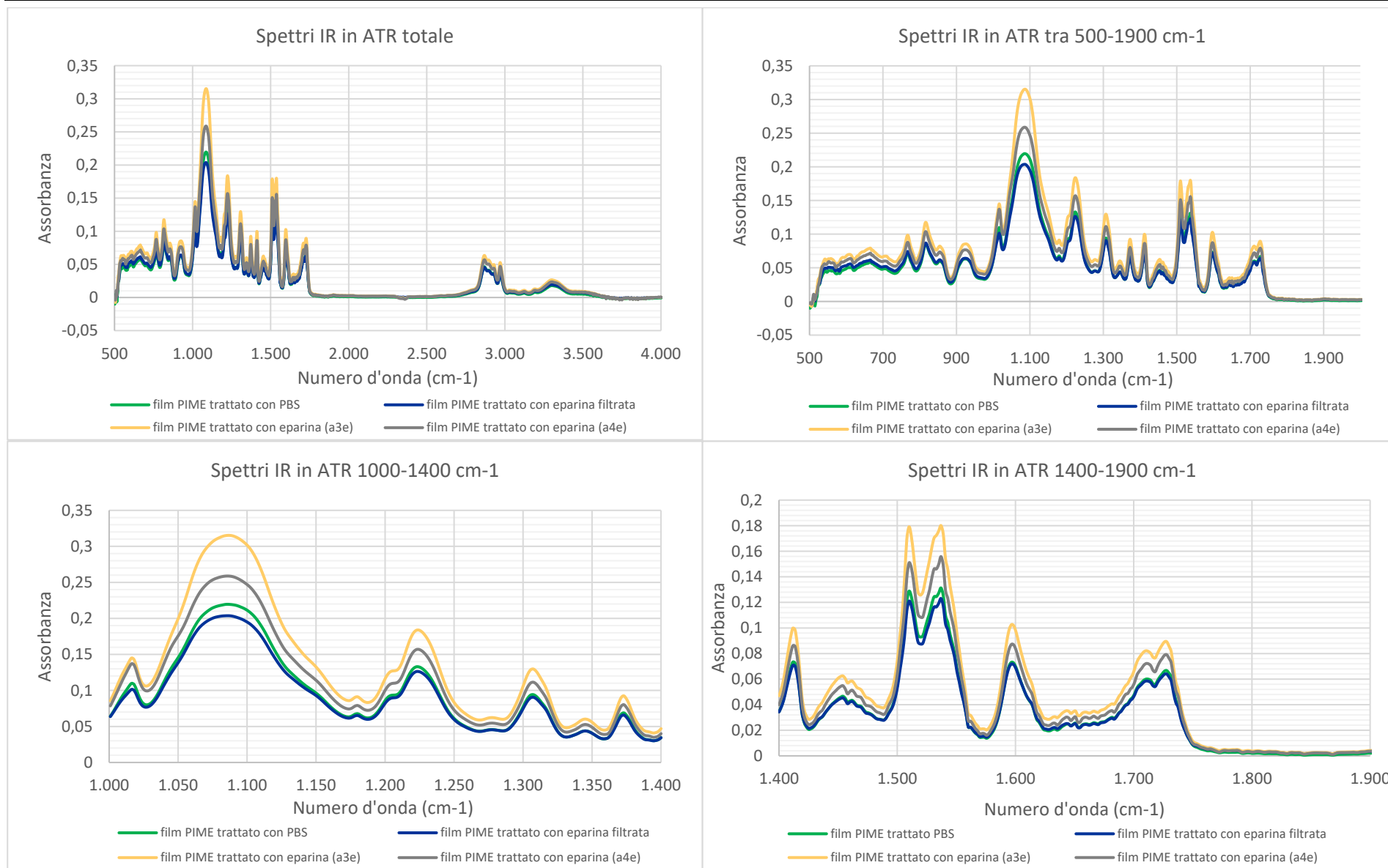
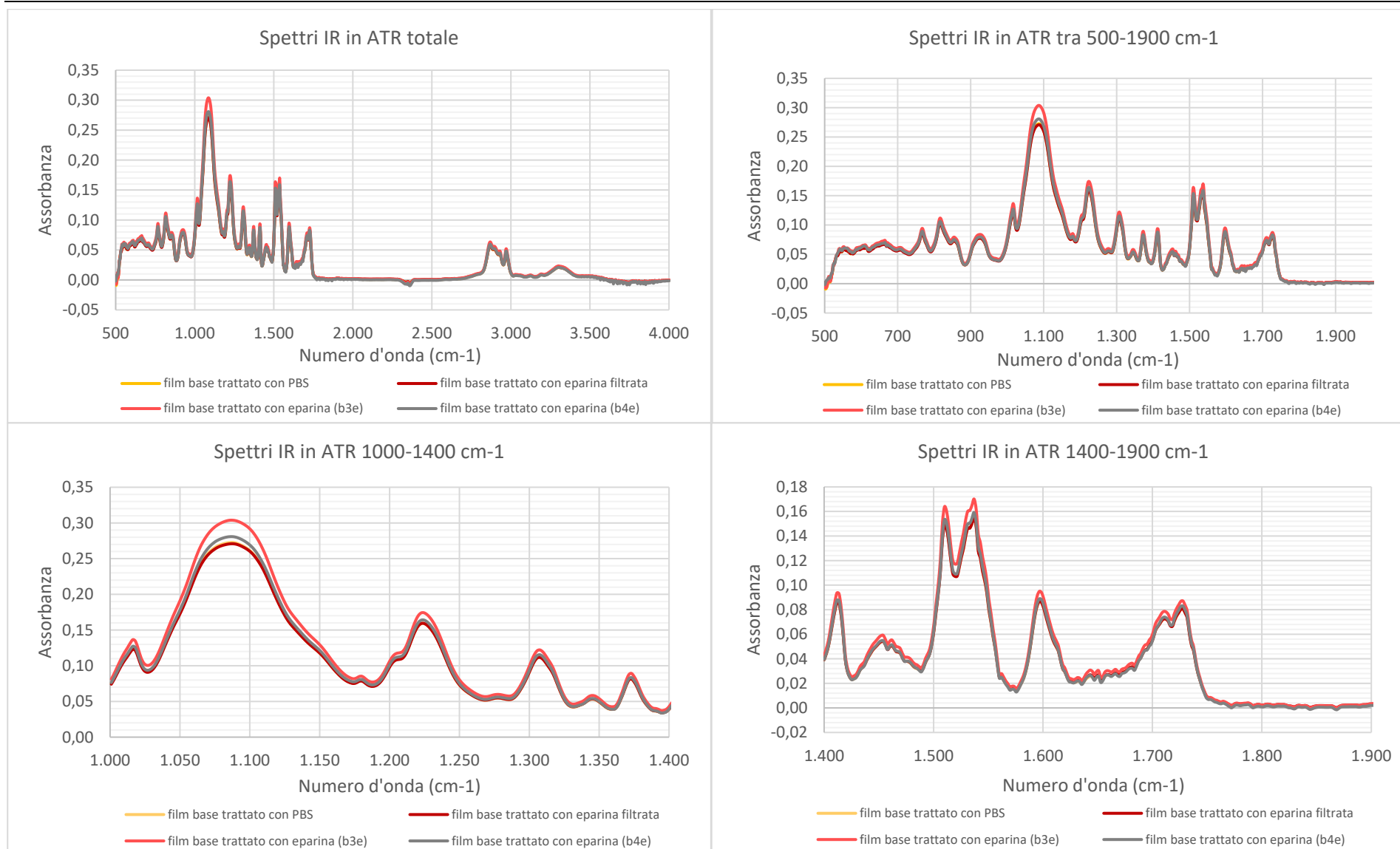


Figura 3.3.2 Spettri IR in ATR a diversi ingrandimenti dei film PIME trattati con PBS, eparina filtrata ed eparina non filtrata a confronto

### 3.3.1.3 Spettri IR in ATR dei film base a confronto

In Figura 3.3.3 è riportato lo spettro IR totale ( $500-4000\text{ cm}^{-1}$ ) e i relativi ingrandimenti ottenuto tramite l'analisi FT-IR in ATR dei diversi campioni di film base a confronto dove un campione è stato trattato con soluzione PBS, un campione con soluzione di eparina filtrata e, infine, due campioni trattati con soluzione di eparina non filtrata. Tali campioni sono stati realizzati come controllo positivo e negativo dell'analisi. Da tutti i grafici si evince che tutti gli spettri presentano il medesimo andamento e la differenza tra i valori di assorbanza raggiunti risulta essere particolarmente basso. Ciò indica che non vi sia alcuna distinzione nella composizione chimica superficiale tra i campioni di film base. Questi risultati risultano essere coerenti con quanto prospettato: data l'assenza di PIME nei campioni di film base, l'eparina non riesce ad interagire con la superficie del campione e quindi non è presente nello spettro IR.



**Figura 3.3.3** Spettri IR in ATR a diversi ingrandimenti dei film base trattati con PBS, eparina filtrata ed eparina non filtrata a confronto

### 3.3.2 FT-IR in trasmissione

La spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier in trasmissione è stata impiegata per analizzare i film PIME e dei film base trattati con soluzione PBS, soluzione di eparina filtrata e soluzione di eparina non filtrata nella loro interezza, al fine di valutare o meno la presenza di quest'ultima nei film PIME.

Come nel caso della FT-IR in ATR, a titolo semplificativo gli spettri IR in trasmissione sono stati suddivisi nei paragrafi come segue:

- Confronto tra spettro IR del campione film PIME e film base trattati con PBS;
- Confronto tra spettro IR dei campioni film PIME trattati con eparina filtrata e non filtrata rispetto al campione film PIME trattato con PBS (controllo);
- Confronto tra spettro IR dei campioni film base trattati con eparina filtrata e non filtrata rispetto al campione film base trattato con PBS (controllo);

Il confronto tra gli spettri IR ottenuti tramite ATR e trasmissione e il confronto tra i risultati ottenuti con gli spettri IR riportati nel precedente lavoro di tesi sono approfonditi in seguito nel paragrafo relativo della discussione.

#### 3.3.2.1 Spettri IR in trasmissione dei film base e film PIME trattati con PBS

In Figura 3.3.4 sono riportati a confronto gli spettri IR in trasmissione dei campioni film PIME e film base trattati con PBS a diversi ingrandimenti. Come si evince dai tracciati, in particolar modo l'ingrandimento  $1000-1400\text{ cm}^{-1}$  e  $1400-1900\text{ cm}^{-1}$ , lo spettro relativo al film base presenta un andamento simile a quello del film PIME pur registrando un valore di assorbanza maggiore in tutto l'intervallo considerato ( $400-4000\text{ cm}^{-1}$ ) con puntuali picchi nell'intervallo di frequenze tra  $1200-1250\text{ cm}^{-1}$  e tra  $1500$  e  $1560\text{ cm}^{-1}$  e un andamento frastagliato nell'intervallo di frequenze compreso tra  $1050-1175\text{ cm}^{-1}$ .

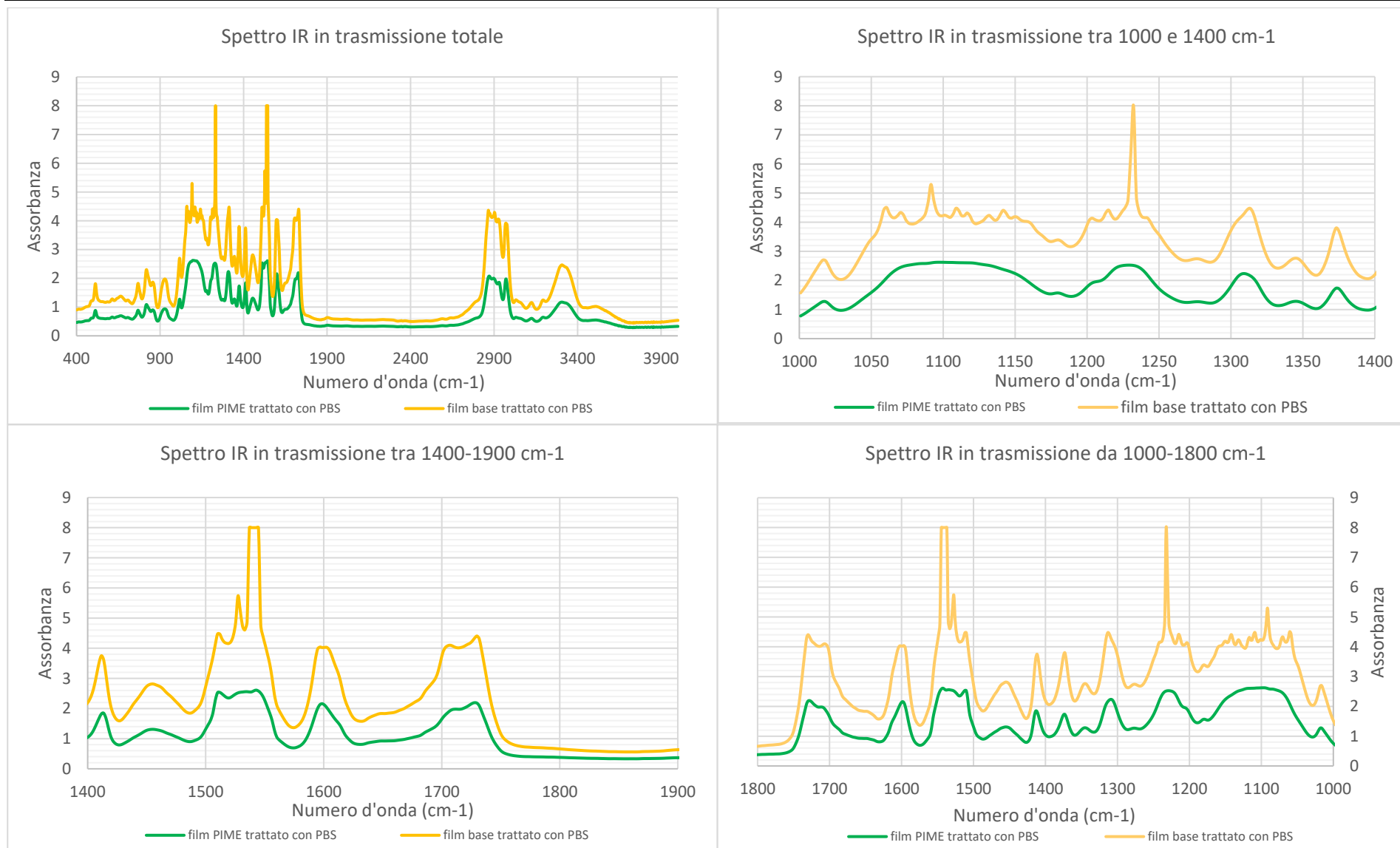


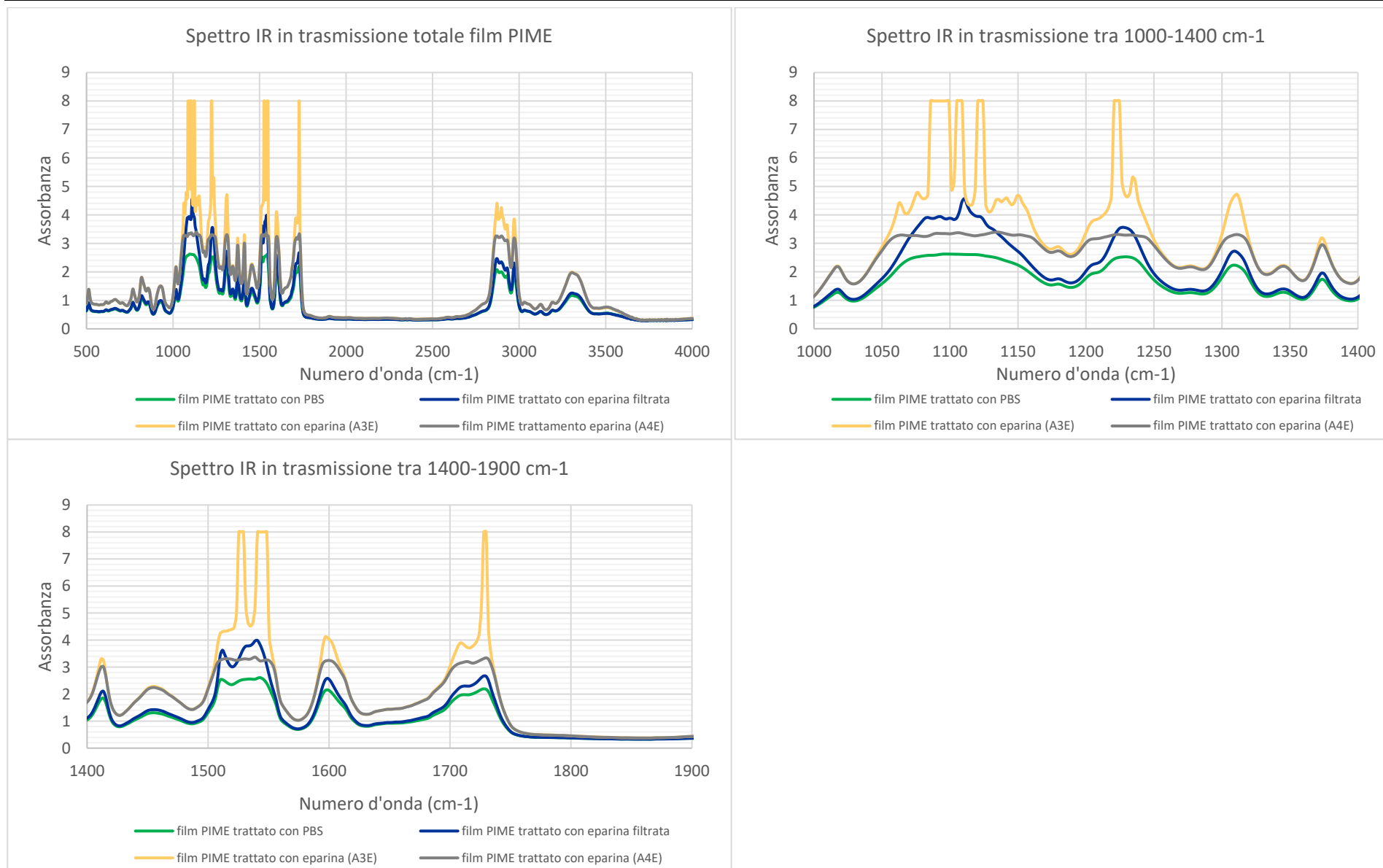
Figura 3.3.4 Spettri IR in trasmissione a diversi ingrandimenti del film PIME e film base trattati con PBS



Lo spettro IR del campione di film PIME non presenta significativi picchi o bande dissonanti con quello relativo al film base che potrebbero indicare la presenza del PIME. È possibile, dunque, ipotizzare che il PIME non sia presente all'interno della struttura chimica del film PIME.

### 3.3.2.2 Spettri IR in trasmissione dei film PIME a confronto

In Figura 3.3.5 sono riportati a confronto gli spettri IR in trasmissione dei campioni di film PIME differentemente trattati e i relativi diversi ingrandimenti. Dal primo tracciato, relativo allo spettro IR totale, è possibile notare che gli spettri dei campioni presentano andamenti differenti per cui è necessario far riferimento agli ingrandimenti al fine di poter analizzare i risultati ottenuti. Dall'ingrandimento relativo all'intervallo  $1000-1400\text{ cm}^{-1}$  si evince che lo spettro relativo al campione trattato con eparina filtrata presenta un andamento molto simile a quello del campione trattato con PBS a meno di alcune creste presenti nell'intervallo di frequenze compreso tra  $1075-1125\text{ cm}^{-1}$ . Gli spettri dei campioni trattati con eparina non filtrata, contrariamente a quanto si potesse immaginare, presentano due andamenti differenti. Il campione A4E presenta un andamento dello spettro IR simile a quello dei campioni trattati con PBS a meno di un leggero appiattimento nelle bande  $1050-1150\text{ cm}^{-1}$  e  $1200-1250\text{ cm}^{-1}$ ; diversamente il campione A3E presenta picchi e creste in alcune bande in specifici intervalli di frequenze, quali  $1050-1150\text{ cm}^{-1}$  e  $1200-1250\text{ cm}^{-1}$ , rispetto a qualsiasi altro spettro considerato. È bene notare che, al di fuori di tali intervalli appena considerati, gli spettri IR in trasmissione di A3E e A4E risultano perfettamente sovrapponibili. Dall'ingrandimento relativo all'intervallo  $1400-1900\text{ cm}^{-1}$  è possibile trarre le medesime considerazioni precedenti: la curva relativa al campione trattato con eparina filtrata è sovrapposta a quella del campione trattato con PBS a meno del raggiungimento di valori più alti di assorbanza in alcuni intervalli dove comunque è mantenuto il medesimo andamento; la curva di A4E presenta il medesimo andamento del campione trattato con PBS; infine, la curva A3E risulta sovrapposta a quella di A4E con significativi picchi negli intervalli  $1500-1550\text{ cm}^{-1}$  e  $1700-1750\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 3.3.5** Spettri IR in trasmissione a diversi ingrandimenti dei film PIME trattati con PBS, eparina filtrata ed eparina non filtrata a confronto

### 3.3.2.3 Spettri IR in trasmissione dei film base a confronto

In Figura 3.3.6 sono riportati i grafici relativi al confronto tra gli spettri IR in trasmissione relativi a campioni di film base diversamente trattati. Dal grafico relativo allo spettro IR totale è possibile constatare che tutti i tracciati sembrano abbastanza sovrapposti tra loro, tuttavia, per valutare l'effettivo andamento bisogna far riferimento ai singoli ingrandimenti. Dall'ingrandimento relativo all'intervallo compreso tra 1000-1400  $\text{cm}^{-1}$  si evince che tutti i tracciati seguono il medesimo andamento ad eccezione di due intervalli quali 1200-1250  $\text{cm}^{-1}$  e 1050-1160  $\text{cm}^{-1}$ . Nel primo caso, il campione relativo al film base trattato con PBS mostra un picco intorno alla frequenza 1230  $\text{cm}^{-1}$ ; il campione B4E (film base trattato con eparina) presenta un picco intorno alla frequenza 1220  $\text{cm}^{-1}$ ; il campione relativo al film base trattato con eparina non filtrata mostra un andamento più simile a quello del campione B4E ad eccezione del picco a 1220  $\text{cm}^{-1}$ ; infine, il campione B3E presenta un andamento più omogeneo caratterizzato dall'assenza di creste o picchi definiti. Nel secondo caso è stato necessario effettuare un ulteriore ingrandimento (1000-1200  $\text{cm}^{-1}$ ) per riuscire a distinguere con maggiore chiarezza i tracciati. Da tale grafico si evince che tutte gli spettri presentano creste e picchi all'interno dell'intervallo compreso tra 1050-1160  $\text{cm}^{-1}$  completamente differenti. In particolar modo, l'andamento dei campioni B3E e B4E, che hanno subito il medesimo trattamento, risulta essere fortemente discordante. Dall'ingrandimento relativo all'intervallo compreso tra 1400-1900  $\text{cm}^{-1}$  tutti i tracciati appaiono nuovamente con il medesimo andamento a discrezione dell'intervallo 1500-1550  $\text{cm}^{-1}$  dove gli spettri relativi ai campioni di film base trattati con PBS, eparina non filtrata e il campione B4E presentano dei picchi a frequenze differenti. Anche in questo caso si può constatare una differenza tra gli andamenti dei tracciati dei campioni B3E e B4E seppure abbiano subito il medesimo trattamento.

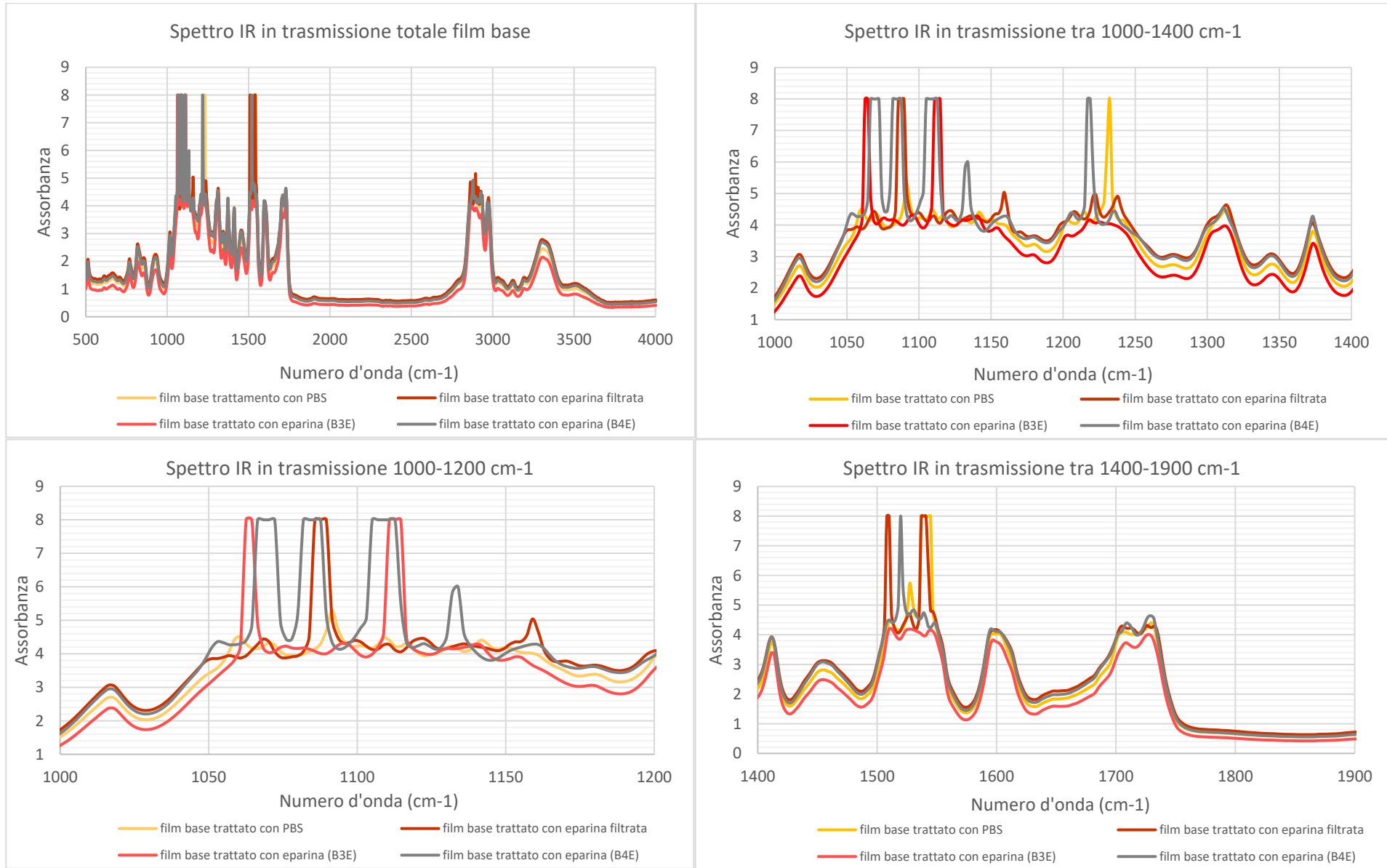
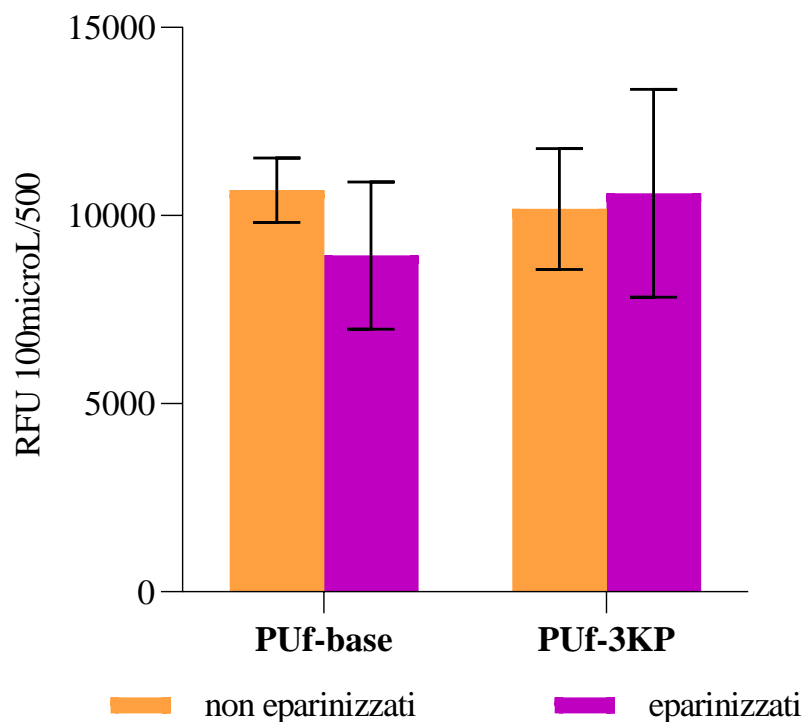


Figura 3.3.6 Spettri IR in trasmissione a diversi ingrandimenti dei film base trattati con PBS, eparina filtrata ed eparina non filtrata a confronto

### 3.4 Prove di adesione batterica

Le prove di adesione batterica sono state eseguite al fine di valutare se sull'espanso PUF-3KP, caratterizzato dalla presenza di PIME, si verifici un'inferiore adesione batterica rispetto al controllo (PUF-base) grazie alla presenza di eparina chimicamente legata ad esso. Come saggio quantitativo colorimetrico è stato impiegato l'Alamar Blue che viene generalmente impiegato per valutare la citotossicità indiretta e la citocompatibilità diretta nei test cellulari *in vitro*; si tratta di un indicatore di redox vitale non distruttivo in quanto le cellule viventi riducono la resazurina in resorufina tramite una reazione di riduzione chimica. Tale molecola, a seconda che sia presente nel suo stato ossidato o ridotto, emette luce a due lunghezze d'onda differenti ( $\lambda=570\text{nm}$  nello stato ridotto,  $\lambda=630\text{nm}$  nello stato ossidato) per cui è possibile la quantificazione della proliferazione cellulare tramite metodi spettroscopici.

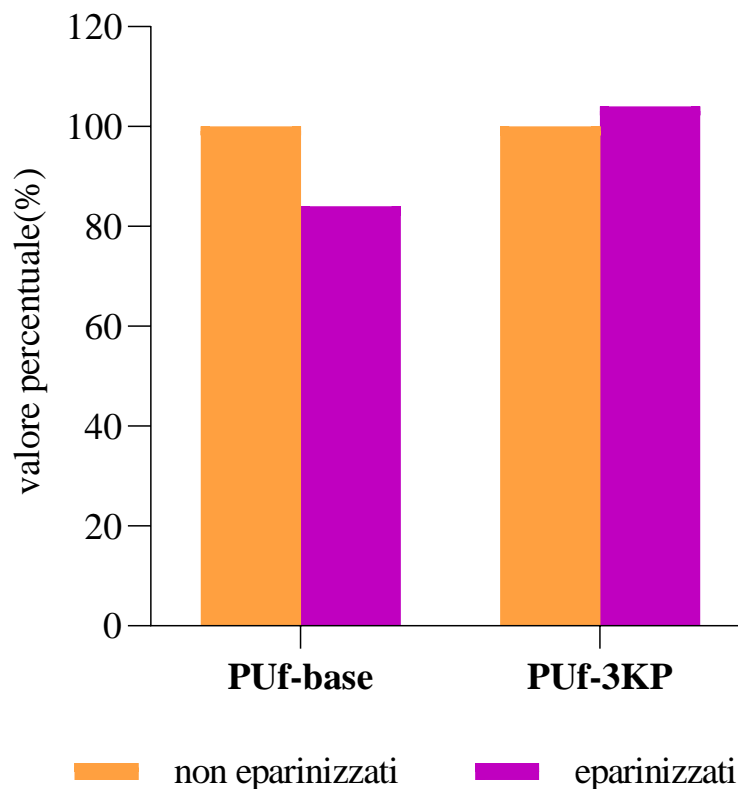
I risultati delle prove di adesione batterica sono stati riportati in Figura 3.4.1 dove è possibile apprezzare il quantitativo medio e relativa deviazione standard dell'attività metabolica dei batteri (espresso in RFU, unità fluorescenza relativa) dai campioni PUF-base e PUF-3KP trattati con eparina rispetto ai campioni PUF-base e PUF-3KP non trattati con eparina (controlli). Dal grafico si evince che i campioni PUF-base eparinizzati mostrano un valore medio inferiore rispetto ai corrispettivi non eparinizzati; pertanto, sembrerebbe che su tali campioni sia avvenuta una proliferazione minore delle cellule batteriche. Ciò potrebbe essere causato dalla permanenza di molecola di eparina non chimicamente legata all'espanso che ha determinato una inferiore adesione e conseguente proliferazione delle cellule batteriche. Tuttavia a causa dell'alto valore di deviazione standard non è stata rilevata



**Figura 3.4.1** Valore medio e di deviazione standard della attività metabolica dei batteri (espressa in RFU 100µL/500) dei campioni PUF-base e PUF-3KP trattati con eparina a confronto con quelli non trattati (controlli)

una differenza significativa da un punto di vista statistico ( $p > 0.05$ ). Per quanto riguarda i campioni PUF-3KP, dal grafico si può notare che i campioni trattati con eparina hanno riportato un valore di attività metabolica medio leggermente superiore a quelli non trattati; pertanto, sembrerebbe che la presenza dell'eparina non abbia influito sull'adesione batterica e conseguente proliferazione. Anche in questo caso è stata riscontrata un'alta variabilità dei dati, specialmente per i campioni eparinizzati, e non è stata rilevata una differenza statisticamente significativa ( $p > 0.05$ ). Per riuscire a dare una migliore interpretazione dei dati sono stati realizzati altri grafici.

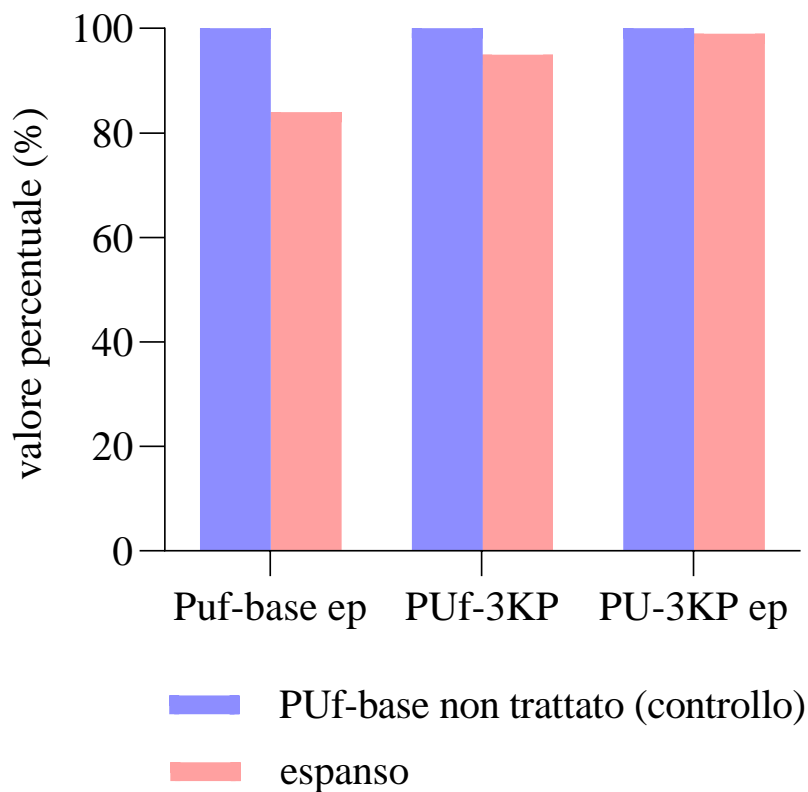
In Figura 3.4.2 è riportato un grafico a barre che permette di confrontare in valore percentuale l'attività metabolica media dei campioni eparinizzati a confronto con quelli non eparinizzati (utilizzati questi come controllo) per ciascuna tipologia di espanso. Il grafico riportato conferma le considerazioni volte precedentemente: i campioni PUF-base eparinizzati hanno riportato un valore percentuale di attività metabolica



**Figura 3.4.2** Valore percentuale di attività metabolica dei batteri dei campioni PUF-base e PUF-3KP eparinizzati a confronto con i campioni non eparinizzati

inferiore circa del 20% rispetto ai corrispettivi non eparinizzati; diversamente, i campioni PUF-3KP hanno riportato un valore percentuale superiore rispetto ai corrispettivi campioni non eparinizzati.

In Figura 3.4.3 è stato invece riportato un grafico a barre che ha permesso di confrontare i valori medi percentuali di attività metabolica di tutti i campioni rispetto all'espanso PUF-base non trattato con eparina. Come visto nei grafici precedenti, i campioni PUF-base trattati con eparina hanno riportato un valore percentuale inferiore di circa il 20%. I campioni PUF-3KP presentano un valore percentuale pari a 95% rispetto all'espanso PUF-base non trattato: ciò sembrerebbe indicare che non vi sia alcuna differenza tra le due tipologie di espansi non trattati in termini di adesione e conseguente proliferazione batterica.



**Figura 3.4.3** Valore percentuale di attività metabolica dei batteri dei campioni Puf-base non trattato a confronto con quello dei campioni PUF-base trattati con eparina (PUF-base ep), PUF-3KP trattati con eparina (PUF-3KP ep) e PUF-3KP non trattati (PUF-3KP)

Infatti, da un punto di vista statistico non è stata rilevata alcuna differenza significativa ( $p > 0.05$ ). I campioni PUF-3KP eparinizzati hanno riportato un valore percentuale pari al 99% tale per cui, anche in questo caso, è possibile ipotizzare che non vi sia alcuna differenza in termini di attività metabolica tra i campioni PUF-3KP eparinizzati e i campioni PUF-base non trattati. Difatti, non è stata rilevata alcuna differenza significativa ( $p > 0.05$ ) da un punto di vista statistico.

Tutti i valori medi con relativa deviazione standard della attività metabolica espressa in RFU, in valore percentuale rispetto all'espanso PUF-base non trattato e rispetto al relativo espanso non trattato sono riportati in Tabella 3.4.1.



**Tabella 3.4.1** Valori di RFU medi e deviazione standard per ogni tipologia di espanso trattato o meno con eparina; valore percentuale considerando come controllo il valore di PUF-base non trattato; valore percentuale considerando come controllo i corrispettivi campioni di espanso non trattati con eparina

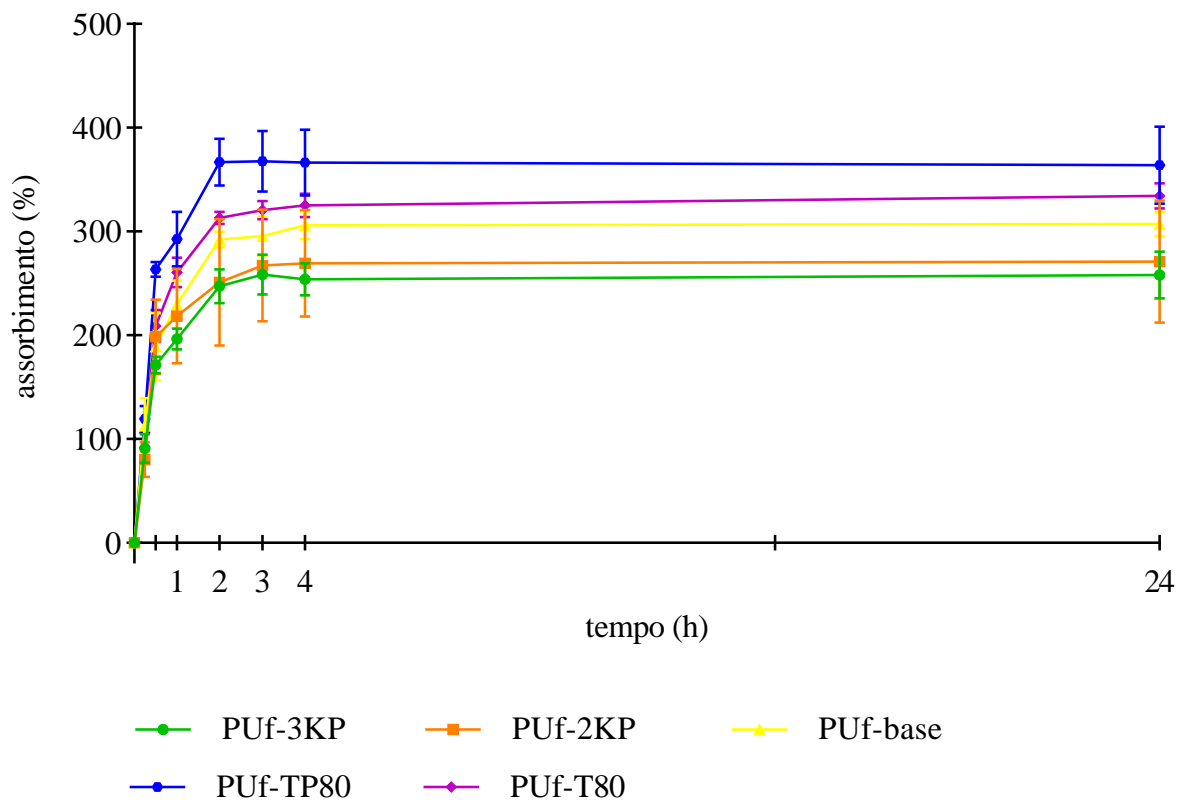
<b>Espanso</b>	<b>Trattamento</b>	<b>RFU medio</b>	<b>% vs PUF-base non trattato</b>	<b>% controllo non trattato</b>
<b>PUf-base</b>	-	10679 ± 856	100 ± 8	100 ± 8
<b>PUf-base</b>	Eparinizzato	8938 ± 1956	84 ± 18	84 ± 18
<b>PUf-3KP</b>	-	10177 ± 1602	95 ± 15	100 ± 16
<b>PUf-3KP</b>	Eparinizzato	10597 ± 2761	99 ± 26	104 ± 27

## CAPITOLO 4: DISCUSSIONE

In questo capitolo vengono confrontati e analizzati i risultati degli espansi PUf-TP80, PUf-T80, PUf-base, PUf-2KP e PUf-3KP a confronto tra loro riportati nei paragrafi 3.1, 3.2, 0 e 3.4. Tali risultati verranno poi confrontati con quanto svolto nel precedente lavoro di tesi [8] e presente in letteratura al fine di ottenere una panoramica completa delle proprietà di *wound dressing* degli espansi medesimi.

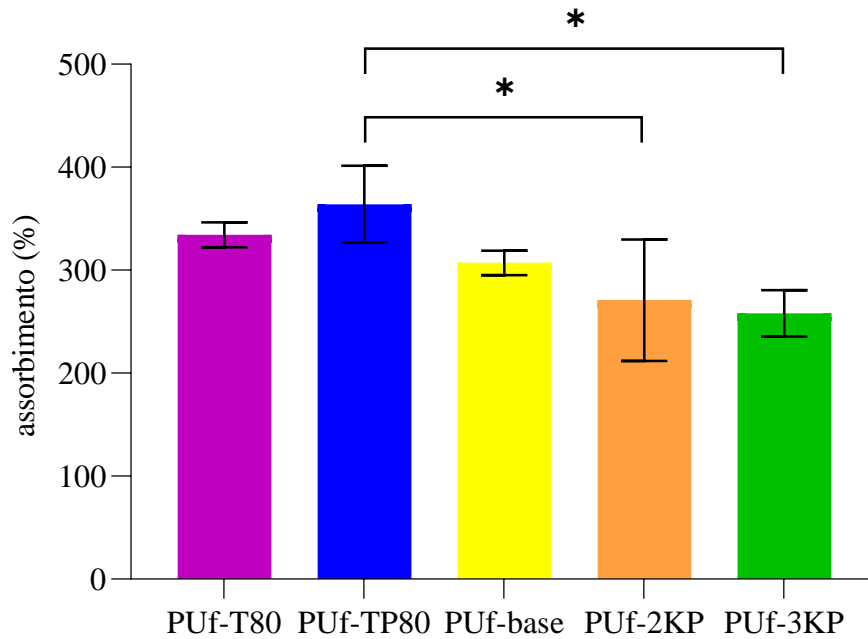
### 4.1 Prove di assorbimento in SWF

In Figura 4.1.1 è riportato l'andamento dell'assorbimento medio percentuale di tutte le tipologie di espanso (PUf-T80, PUf-TP80, PUf-base, PUf-2KP e PUf-3KP) entro le prime 24h. Come visto nei paragrafi 3.1.1 e 3.1.2, tutte le schiume presentano un rapido incremento nella prima ora di immersione nel fluido SWF per poi lentamente stabilizzarsi dopo 4h; tale valore viene mantenuto praticamente costante fino al raggiungimento delle 24h. Dal grafico, è possibile constatare che l'espanso PUf-TP80 raggiunge dei valori medi di assorbimento maggiori lungo tutto l'intervallo considerato, seguito dall'espanso PUf-T80 e dall'espanso PUf-base. Infine si hanno gli espansi PUf-2KP e PUf-3KP che raggiungono dei valori di assorbimento più simili tra loro seppur l'espanso PUf-3KP presenti i valori più bassi in assoluto nelle prime 24h.



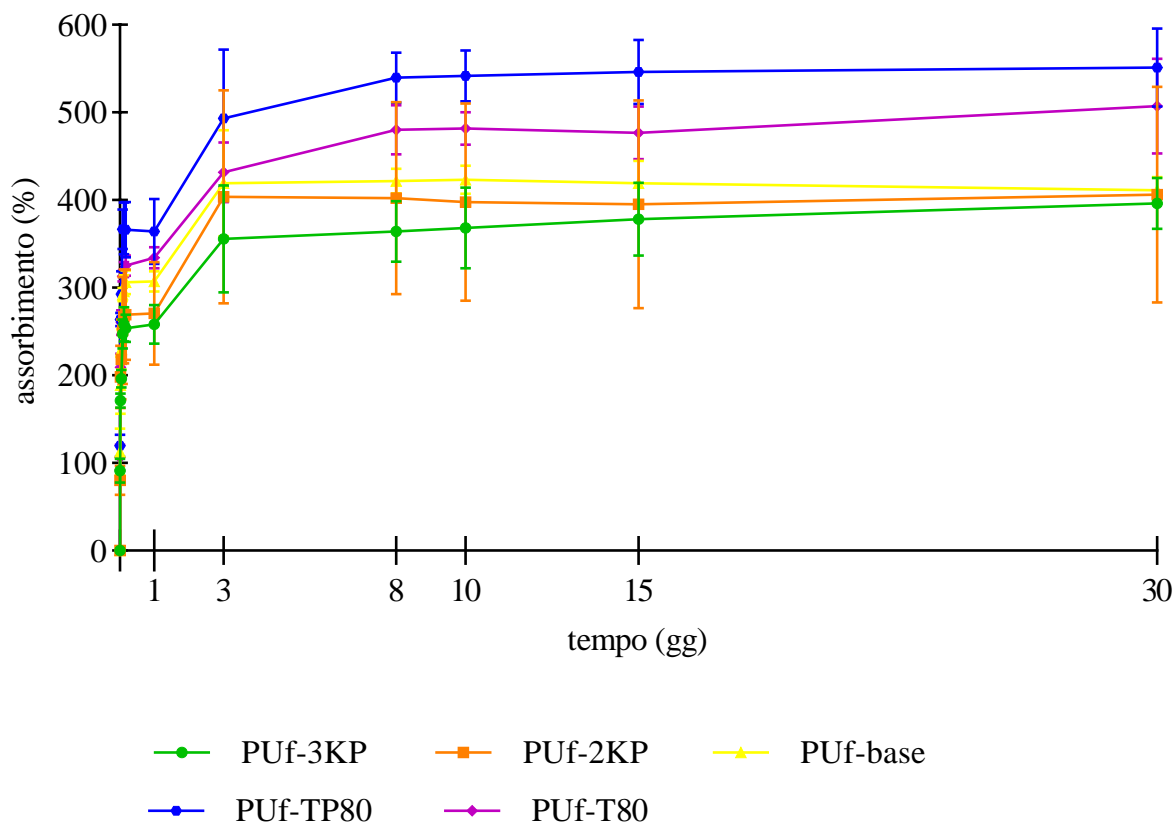
**Figura 4.1.1** Assorbimento percentuale di tutti gli espansi a confronto in liquido SWF valutato in 24h

Svolgendo il test statistico ANOVA *one way*, come riportato in Figura 4.1.2, è stato possibile rilevare una differenza significativa ( $p < 0.05$ ) esclusivamente tra l'espanso PUF-TP80 e l'espanso PUF-2KP e tra l'espanso PUF-TP80 e PUF-3KP a causa dell'alta variabilità mostrata dai dati.



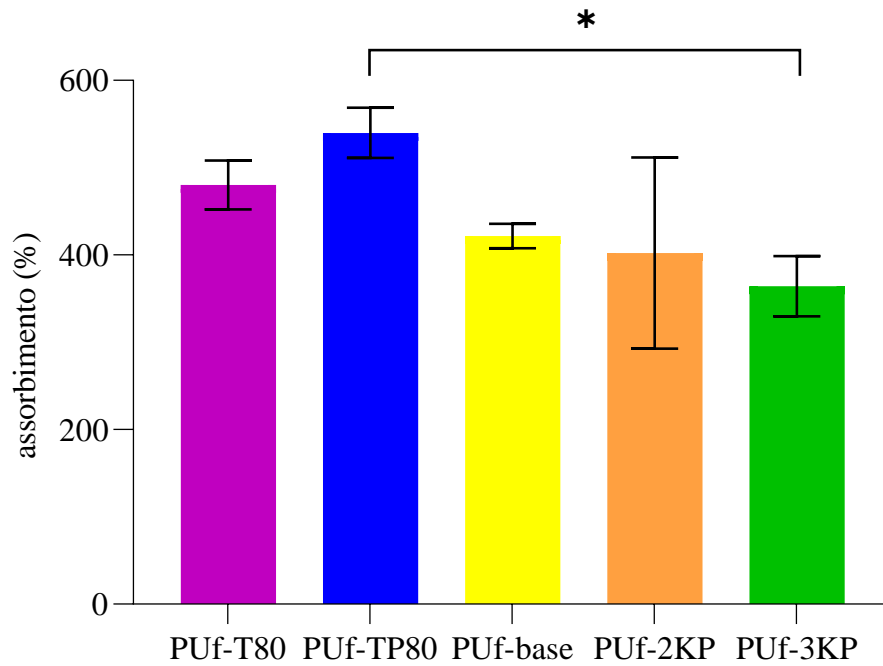
**Figura 4.1.2** Valore di assorbimento percentuale (media e deviazione standard) del fluido SWF per tutti gli espansi alle 24h. Il simbolo \* indica i valori per cui è stata rilevata una differenza statistica significativa ( $p < 0.05$ )

In Figura 4.1.3 è riportato l'andamento medio percentuale di assorbimento di tutte le tipologie di espanso in fluido SWF per tutta la durata del test (30 giorni). Dal grafico emerge che tutte le schiume hanno presentato una rapida crescita nelle prime 4h di immersione in SWF per stabilizzarsi attorno ad uno specifico valore per le 24h; successivamente le schiume hanno subito un rapido incremento fino alle 72h (3 giorni) per poi lentamente stabilizzarsi e raggiungere il plateau attorno all'ottavo giorno, come riportato nei paragrafi 3.1.1 e 3.1.2.

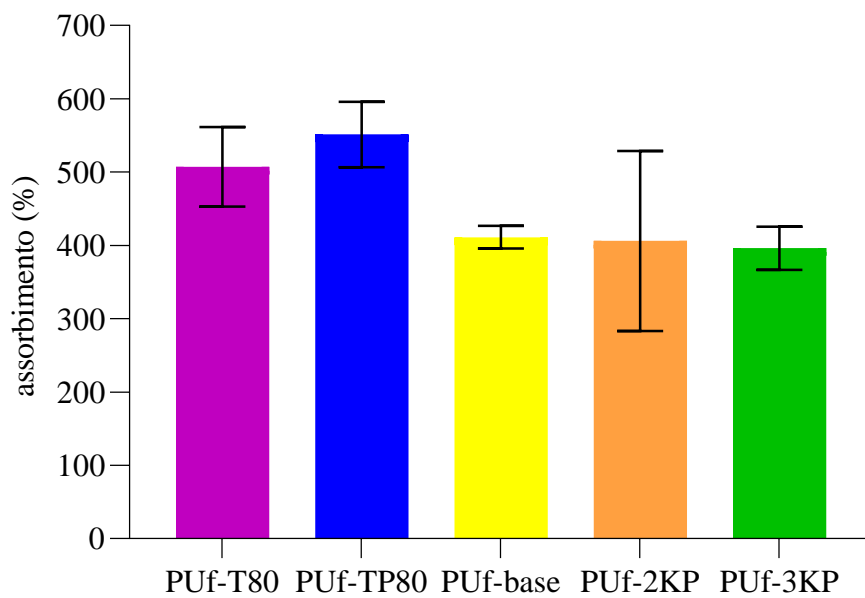


**Figura 4.1.3** Assorbimento percentuale di tutti gli espansi in fluido SWF fino a 30 giorni di immersione

Al raggiungimento del plateau e al trentesimo giorno è stato indagato se è vi fosse una differenza statisticamente significativa tra i valori di assorbimento raggiunti dagli espansi; i risultati sono riportati in Figura 4.1.4 e in Figura 4.1.5. Dalla prima analisi è emerso che vi sia una differenza significativa ( $p < 0.05$ ) da un punto di vista statistico esclusivamente tra l'espanso PUf-TP80 e l'espanso PUf-3KP mentre nella seconda analisi non è stata rilevata alcuna differenza statisticamente significativa ( $p > 0.05$ ) tra i valori di assorbimento raggiunti da tutti gli espansi a causa dell'alta variabilità dei dati.

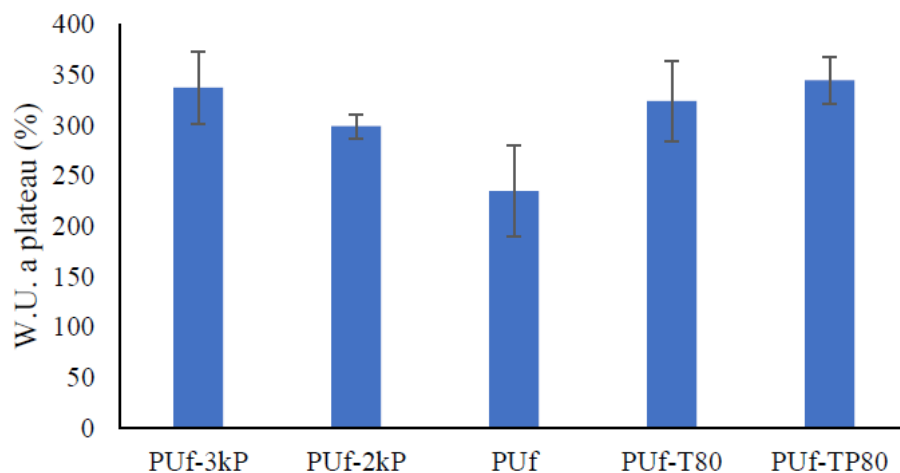


**Figura 4.1.4** Valori di assorbimento percentuale (media e deviazione standard) del fluido SWF per ogni espanso a plateau. Il simbolo \* indica i valori per cui è stata rilevata una differenza significativa da un punto di vista statistico ( $p < 0.05$ )



**Figura 4.1.5** Valori di assorbimento percentuale (media e deviazione standard) per tutti gli espansi dopo 30 giorni di immersione in fluido SWF

Nel precedente lavoro di tesi [8], al raggiungimento del plateau era stato riscontrato che tutte le schiume caratterizzate dalla presenza del PIME (PUf-3KP, PUf-base e PUf-TP80) avevano riportato valori medi di *water uptake* leggermente superiori ai relativi controlli (PUf-base e PUf-T80) seppure da un punto di vista statistico non era stato possibile determinare alcuna differenza significativa ( $p < 0.05$ ) tra questi a causa dell'alta deviazione standard. Il grafico è stato riportato in Figura 4.1.6.



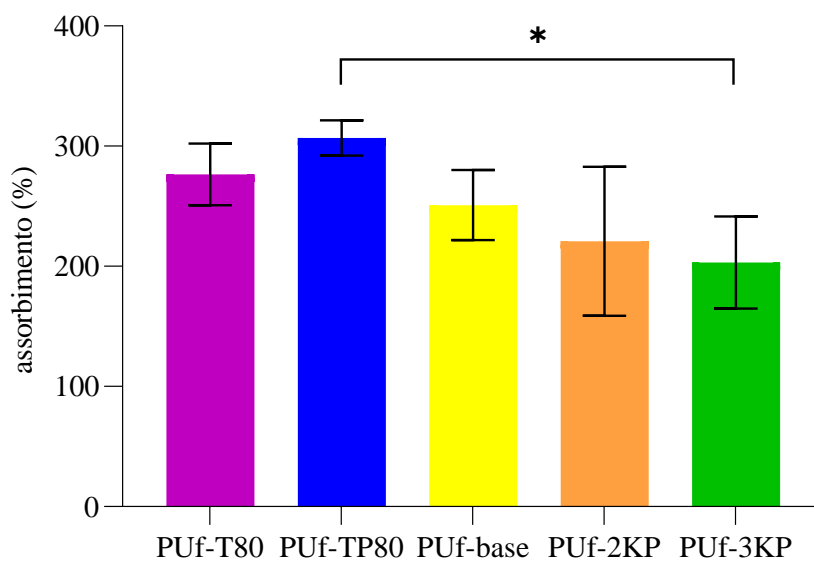
**Figura 4.1.6** Valore di assorbimento percentuale medio di tutti gli espansi in acqua deionizzata [8]

Si era ipotizzato che la presenza del PIME potesse aumentare l'idrofilicità degli espansi grazie alla presenza dei gruppi amminici terziari, protonati a pH fisiologico, in grado di instaurare un numero maggiore di legami intermolecolari con le molecole d'acqua. Al raggiungimento del plateau in liquido SWF invece gli espansi hanno presentato un comportamento differente e solamente la schiuma PUf-TP80 contenente PIME ha mostrato un valore di assorbimento superiore al rispettivo controllo (PUf-T80). Questo differente comportamento può essere attribuito alla differente composizione del fluido SWF, contenente sali a pH controllato, quindi alla sua forza ionica, oppure, nel caso peggiore, dalla minore presenza del PIME nella composizione attuale delle schiume PUf-2KP, PUf-3KP e PUf-TP80. Tale aspetto viene approfondito nei seguenti paragrafi. Ad ogni modo, è bene specificare che, sia acqua deionizzata sia in fluido SWF, non è stata rilevata alcuna differenza statisticamente significativa ( $p > 0.05$ ) gli

espansi PUf-TP80 e PUf-T80 e tra gli espansi PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-base; l'unica differenza significativa ( $p < 0.05$ ) è stata rilevata tra gli espansi PUf-TP80 e PUf-3KP in fluido SWF.

## 4.2 Prove di ritenzione dei fluidi

In Figura 4.2.1 sono riportati i valori di assorbimento percentuali (media e deviazione standard) ottenuti per tutti gli espansi a seguito della compressione eseguita dopo 24h di immersione in SWF. Dal grafico si evince che tutti gli espansi hanno mantenuto il medesimo andamento mostrato prima della compressione (Figura 4.1.2): l'espanso PUf-TP80 presenta un valore medio superiore al rispettivo PUf-T80, mentre sia l'espanso PUf-2KP sia PUf-

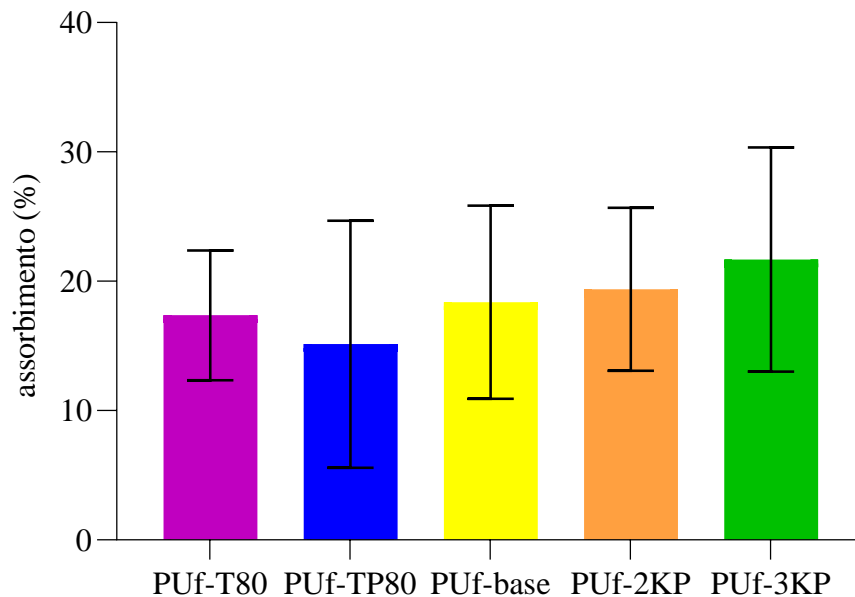


**Figura 4.2.1** Valore di assorbimento percentuale (media e deviazione standard) per tutti gli espansi dopo la compressione a 24h. Il simbolo \* indica i valori per cui è stata riscontrata una differenza significativa statisticamente ( $p < 0.05$ )

3KP presentano un valore medio inferiore rispetto al rispettivo PUf-base. Tuttavia, è bene specificare che in questo caso è stata rilevata una differenza statisticamente significativa esclusivamente tra l'espanso PUf-3KP e l'espanso PUf-TP80 a causa

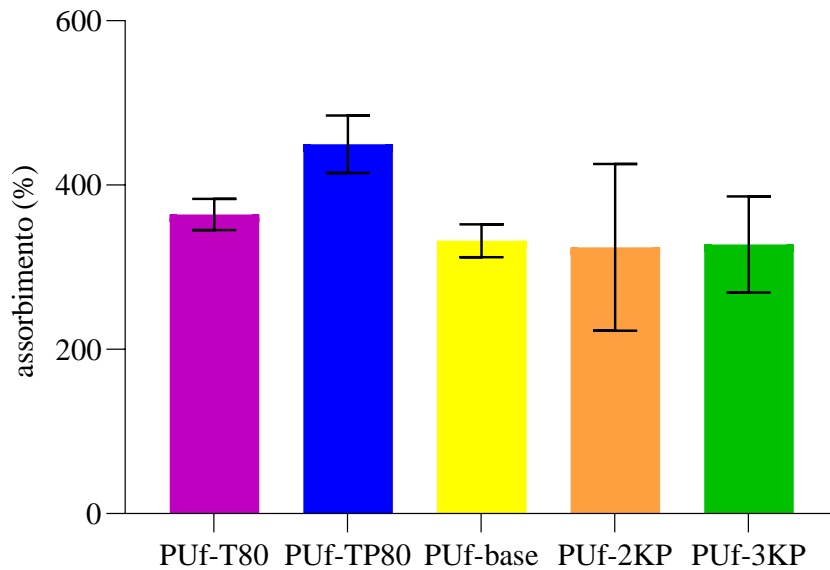


dell'alta variabilità dei dati. Il fatto che dopo la compressione si siano mantenuti valori simili di assorbimento implica che tutti gli espansi abbiano rilasciato un quantitativo simile di fluido SWF simile come mostrato in Figura 4.2.2. È bene specificare che tra i valori medi di differenza percentuale non è stata rilevata alcuna differenza significativa da un punto di vista statistico.



**Figura 4.2.2** Differenza percentuale (media e deviazione standard) tra i valori di assorbimento percentuale degli espansi prima e dopo la compressione a 24h

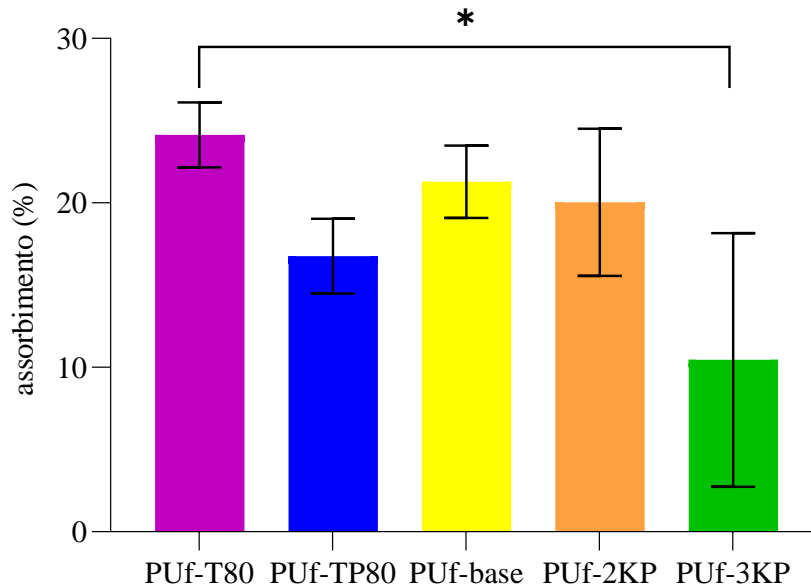
In Figura 4.2.3 è riportato il grafico a barre dei valori medi con relativa deviazione standard dell'assorbimento percentuale di tutti gli espansi a seguito della compressione eseguita a plateau. Anche in questo caso si è mantenuto l'andamento di assorbimento percentuale prima della compressione: difatti, l'espanso PUF-TP80 presenta un valore medio superiore al rispettivo TP80, mentre gli espansi PUF-base, PUF-2KP e PUF-3KP presentano un valore medio molto simile. Ad ogni modo, non è stata rilevata alcuna differenza significativa ( $p > 0.05$ ) tra nessuna coppia di espansi considerata.



**Figura 4.2.3** Valore di assorbimento percentuale (media e deviazione standard) per tutti gli espansi dopo la compressione a plateau di assorbimento

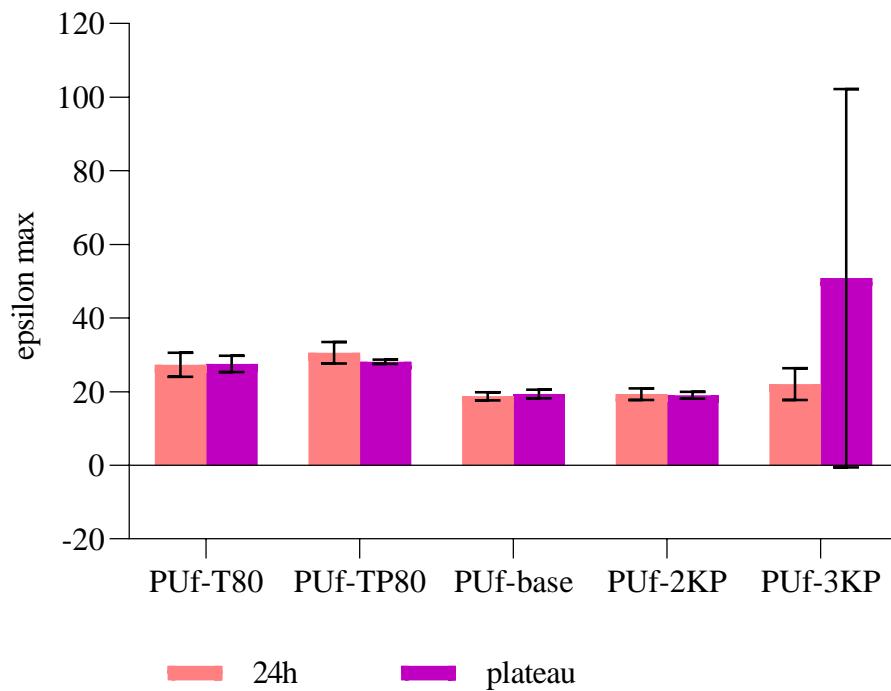
In Figura 4.2.4 è riportato il valore medio di differenza percentuale degli espansi dopo la compressione a plateau. In questo caso è possibile notare che sono non state rilevate differenze significative da un punto di vista statistico ( $p > 0.05$ ) per tutte le tipologie di espanso ad eccezione della schiuma PUF-3KP che ha riportato un valore di differenza percentuale significativamente inferiore ( $p < 0.05$ ) all'espanso PUF-T80.

Da questo esame preliminare si può concludere che tutti gli espansi abbiano mostrato medesime capacità di ritenzione del liquido SWF sia alle 24h sia al raggiungimento del plateau a meno dell'espanso PUF-3KP che ha mostrato una significativa differenza statistica ( $p < 0.05$ ) e, pertanto, una maggiore capacità di ritenzione al plateau rispetto a all'espanso PUF-T80. Tuttavia, vista l'alta variabilità dei dati e la possibilità di introduzione di errori casuali, è bene valutare anche la deformazione massima raggiunta durante la compressione a 24h e a plateau.

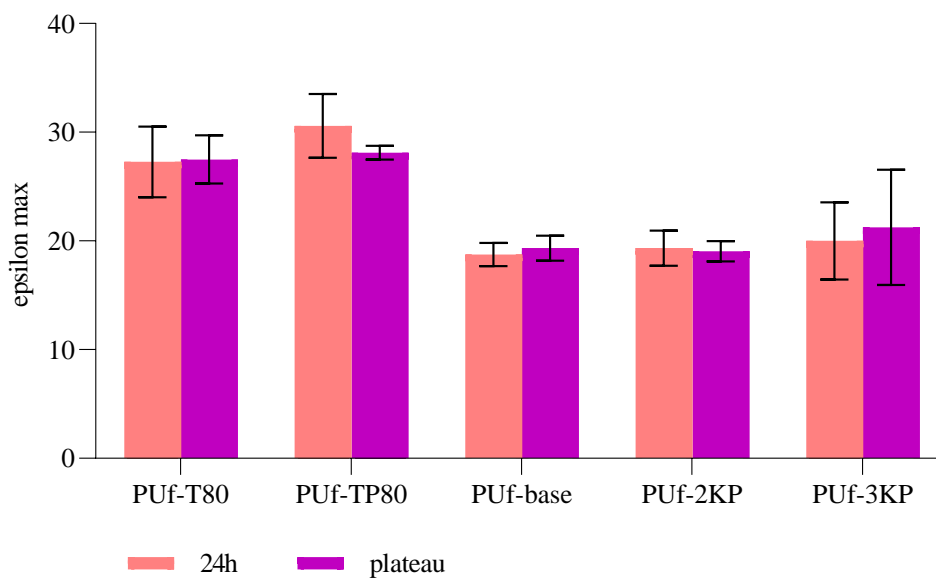


**Figura 4.2.4** Differenza percentuale (media e deviazione standard) tra i valori di assorbimento percentuale degli espansi prima e dopo la compressione a plateau. Il simbolo \* indica i valori per cui è stata riscontrata una differenza statistica significativa ( $p < 0.05$ )

In Figura 4.2.6 sono riportati a confronto i valori di deformazione massima raggiunta nei test di compressione eseguiti alle 24h e al raggiungimento del plateau per tutte le tipologie di espanso, considerando tutti i campioni di espanso PUf-3KP. Lo scopo è quello di valutare se dopo 24h di assorbimento e al plateau le schiume raggiungono valori differenti di deformazione massima. Dal grafico in Figura 4.2.6 si può notare che non vi sono differenze significative tra i valori di deformazione raggiunti per alcuna tipologia di espanso, considerando anche i valori di deviazione standard riportati, ad eccezione dell'espanso PUf-3KP che, contrariamente, ha riportato un valore di deformazione massima a plateau e di deviazione standard particolarmente elevato a causa di un campione anomalo.



**Figura 4.2.5** Valori di deformazione massima (media e deviazione standard) a 24h e a plateau a confronto di tutti gli espansi. Per l’espanso PUf-3KP sono stati considerati tutti e tre i campioni valutati



**Figura 4.2.6** Valori di deformazione massima (media e deviazione standard) a 24h e a plateau a confronto di tutti gli espansi. Per l’espanso PUf-3KP sono stati considerati solo due campioni

Escludendo tale campione, si ottiene grafico a barre riportato in Figura 4.2.6 in cui si può notare che non vi sia alcuna distinzione significativa in termini di deformazione massima raggiunta alle 24h e a plateau dagli altri due campioni PUF-3KP.

In conclusione, è possibile affermare che gli espansi PUF-base, PUF-2KP, PUF-T80 e PUF-TP80 sia alle 24h sia al plateau mostrano le medesime capacità di ritenzione di liquidi, coerentemente con le considerazioni relative alla differenza percentuale di assorbimento prima e dopo la compressione.

Come visto nel paragrafo 3.2.1, la deformazione massima media della schiuma PUF-3KP è alterato dal solo campione (1a, Tabella 4.2.1) che ha riportato un valore pari al 110%; è possibile ipotizzare che il comportamento anomalo del terzo campione di PUF-3KP sia stato causato da un cedimento delle pareti della schiuma una volta applicata la compressione. Diversamente, osservando la differenza di assorbimento percentuale a plateau, non viene riscontrata alcuna anomalia, per cui è possibile supporre che il campione abbia riassorbito un volume considerevole di liquido SWF una volta terminata la compressione. Ad ogni modo, escludendo tale campione, i valori di deformazione massima alle 24h e a plateau risultano coerenti e simili tra loro, ed è quindi possibile concludere che anche la schiuma PUF-3KP presenti la medesima capacità di ritenzione dei fluidi nei due differenti intervalli di tempo considerati. A supporto di tali considerazioni, in Tabella 4.2.1 sono mostrati i valori di differenza percentuale e di deformazione massima raggiunti da ciascun campione PUF-3KP a 24h e a plateau.

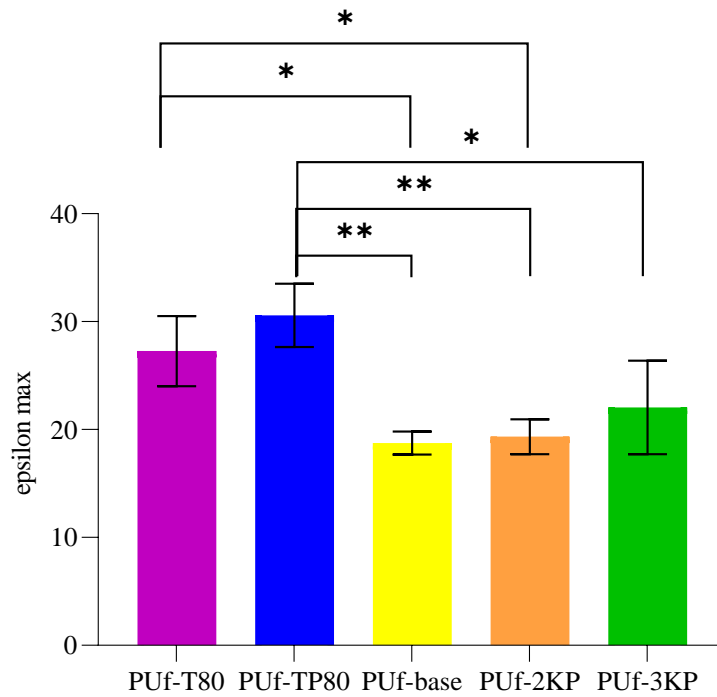
**Tabella 4.2.1** Valori di differenza percentuale e di deformazione massima alle 24h, valori di differenza percentuale e valore di deformazione massima a plateau per tutti i campioni di PUf-3KP

Campione	Diff % 24h	Def 24h	Diff % plateau	Def plateau
<b>1a</b>	27,79	26,125	11,61	110
<b>2a</b>	11,75	22,5	2,23	25
<b>3a</b>	25,50	17,5	17,52	17,5

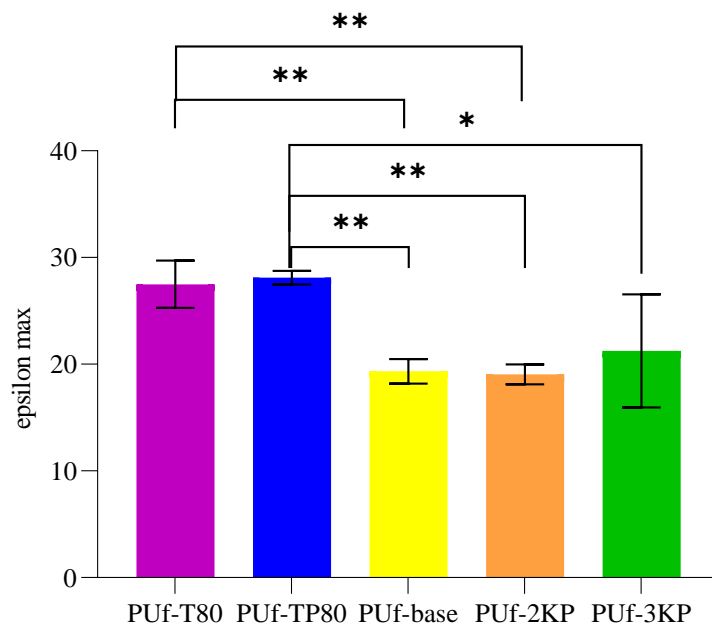
In Figura 4.2.7 è riportato il valore medio di deformazione massima raggiunta dagli espansi durante il test di compressione a 24h da cui è possibile notare che: gli espansi PUf-base, PUf-3KP e PUf-2KP hanno presentato valori che non mostrano una differenza statisticamente significativa ( $p > 0.05$ ); anche tra gli espansi PUf-TP80 e PUf-T80 non è stata rilevata una differenza statisticamente significativa ( $p > 0.05$ ); infine, differenze statistiche significative ( $p < 0.05$ ) sono state riscontrate tra PUf-T80 e PUf-2KP e PUf-base, e tra PUf-TP80 e PUf-base, PUf-2KP e PUf-3KP.

Queste considerazioni sono perfettamente coerenti con quanto riportato in Figura 4.2.8, in cui è riportato il valore medio di deformazione massima raggiunta dagli espansi a plateau, e confermano l'ipotesi che le singole schiume presentano la medesima risposta al test di compressione a 24h e a plateau. Pertanto, si può concludere da tali analisi che non siano emerse differenze significative tra le schiume PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-base e tra le schiume PUf-T80 e PUf-TP80.

Queste considerazioni non sono in accordo con i risultati riportati nel precedente lavoro di tesi, in cui le schiume PUf-3KP e PUf-2KP avevano mostrato delle proprietà meccaniche superiori rispetto a tutti gli altri espansi portando a concludere che il PIME, inserito nella struttura della schiuma PU, contribuisse ad aumentare la capacità di deformazione e la resistenza a compressione [8].



**Figura 4.2.7** Valore medio e di deviazione standard di deformazione massima degli espansi alle 24h. Il simbolo \* indica i valori per cui è stata determinata una differenza statistica significativa ( $p < 0.05$ )



**Figura 4.2.8** Valore medio e di deviazione standard di deformazione massima degli espansi a plateau. Il simbolo \* indica i valori per cui è stata determinata una differenza statistica significativa ( $p < 0.05$ )

È utile evidenziare che il PIME è caratterizzato, oltre che dalla presenza dei gruppi ossidrilici anche da gruppi amminici alifatici terziari che lo rendono di fatto un catalizzatore della reazione di blowing come confermato dai risultati ottenuti dal precedente lavoro di tesi relativi alla cinetica di espansione e alla caratterizzazione morfologica.

Tuttavia dai risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi non è stato possibile identificare alcuna differenza significativa tra espansi caratterizzati dalla presenza di PIME e senza. Pertanto, è possibile presupporre che gli espansi caratterizzati dalla presenza del PIME, abbiano subito un riarrangiamento strutturale in modo da non presentare differenze a confronto con i rispettivi controlli. Tale aspetto viene approfondito nel seguente paragrafo grazie all'analisi FT-IR.



### 4.3 Spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier

Poiché nei paragrafi 3.3.1.1 e 3.3.2.1 relativi all'analisi degli spettri IR in ATR e in trasmissione dei film PIME e il film base trattati con PBS non è emersa alcuna differenza, in questo paragrafo verranno esclusivamente approfonditi tali spettri e confrontati con quanto rilevato nel precedente lavoro di tesi con lo scopo di verificare la presenza del PIME nella struttura chimica del film PIME. Ad ogni modo, è bene evidenziare che l'analisi in ATR fornisce informazioni relative alla composizione chimica superficiale dei film mentre l'analisi in trasmissione rispetto all'interezza dello spessore del campione. Per tale motivo, a parità di composizione chimica, gli spettri IR in ATR e in trasmissione possono presentare delle differenze in alcune bande in termini di intensità, forma e posizione nonostante vengano impiegati degli algoritmi di correzione nell'analisi ATR [32].

In Figura 4.3.1 sono riportati gli ingrandimenti  $1000-1400\text{ cm}^{-1}$  e  $1400-1900\text{ cm}^{-1}$  degli spettri IR in ATR e in trasmissione dei film PIME e film base trattato con solo PBS in modo tale da poter confrontare i dati ottenuti. Dall'analisi dei primi due tracciati (ATR) è possibile constatare che non vi sia alcuna differenza tra il film PIME e il film base per cui è possibile presupporre che il PIME non sia presente sulla superficie del materiale. Tuttavia, tale affermazione risulta incoerente con quanto presente in letteratura poiché è stato dimostrato che il PIME, anche quando è presente all'interno della catena principale del poliuretano (Hepitan), riesce a migrare sulla superficie del materiale grazie all'idrofilicità dell'ammine terziarie alifatiche [12]. Per verificare se effettivamente il PIME sia presente all'interno del film è necessario analizzare gli ingrandimenti in trasmissione (Figura 4.3.1). Come visto precedentemente, le differenze tra i due spettri sono picchi nell'intervallo di frequenze tra  $1200-1250\text{ cm}^{-1}$ , che corrisponde allo *stretching* del legame C-N (Tabella 3.3.2), e tra  $1500$  e  $1560\text{ cm}^{-1}$ , che corrisponde al legame uretano (Tabella 3.3.2). Ad ogni modo, non emerge alcuna differenza significativa tra i due spettri, in particolar modo in quello del film PIME. Infine, confrontando gli spettri IR in ATR e in trasmissione è possibile riscontrare che

le curve presentano andamenti molto simili tra loro ad esclusione dei picchi presentati in ATR nel film base, nella zona tra  $1200\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$  e  $1500$  e  $1560\text{ cm}^{-1}$ . Le altre leggere differenze possono essere attribuibili alla differente tecnica impiegata, come accennato precedentemente.

Nel precedente lavoro di tesi i film base e film PIME erano stati analizzati in trasmissione e ciascun tipo di campione era stato valutato in diversi punti al fine di controllare anche l'omogeneità della composizione chimica. Poiché i vari spettri erano risultati simili tra loro, a titolo esemplificativo è stato riportato un solo grafico in Figura 4.3.2 da cui è possibile individuare due picchi (contrassegnati dalle frecce) nello spettro IR del film PIME tra le frequenze  $1370\text{-}1310\text{ cm}^{-1}$ , attribuibili allo *stretching* dell'ammina terziaria alifatica ( $> \text{N}-\text{CH}_3$ ) del PIME, e tra  $1300\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ , attribuibili allo *stretching* dell'ammide terziaria  $\text{C}-\text{N}$  del PIME secondo quanto riportato in Tabella 3.3.1. Le differenze comprese tra  $1700\text{ cm}^{-1}$  e  $1400\text{ cm}^{-1}$  possono essere attribuibili ad un riarrangiamento strutturale delle catene polimeriche dovuto alla presenza del PIME. Si era quindi concluso che il film PIME presentasse una composizione differente dal film base grazie alla presenza del PIME e che questo fosse uniformemente distribuito all'interno del campione [8].

A fronte di ciò, confrontando gli spettri IR del presente lavoro di tesi con il precedente, è possibile presupporre che il PIME non sia più presente nella struttura chimica del campione del film PIME e che allo stato attuale i due campioni di film analizzati presentino una composizione chimica simile. Le cause per cui il PIME non sia attualmente più visibile all'interno della struttura chimica del film PIME potrebbero essere le seguenti:

- Una concentrazione particolarmente bassa del PIME (pari a  $0.5\%$  p/p<sub>miscela</sub>) o una distribuzione non omogenea del PIME
- minor potere risolutivo dello strumento IR impiegato per la nuova analisi;
- Alterazione della struttura chimica per supposti fenomeni degradativi;
- Rilascio nel tempo del PIME nel caso di un mancato inserimento iniziale tramite legami covalenti.

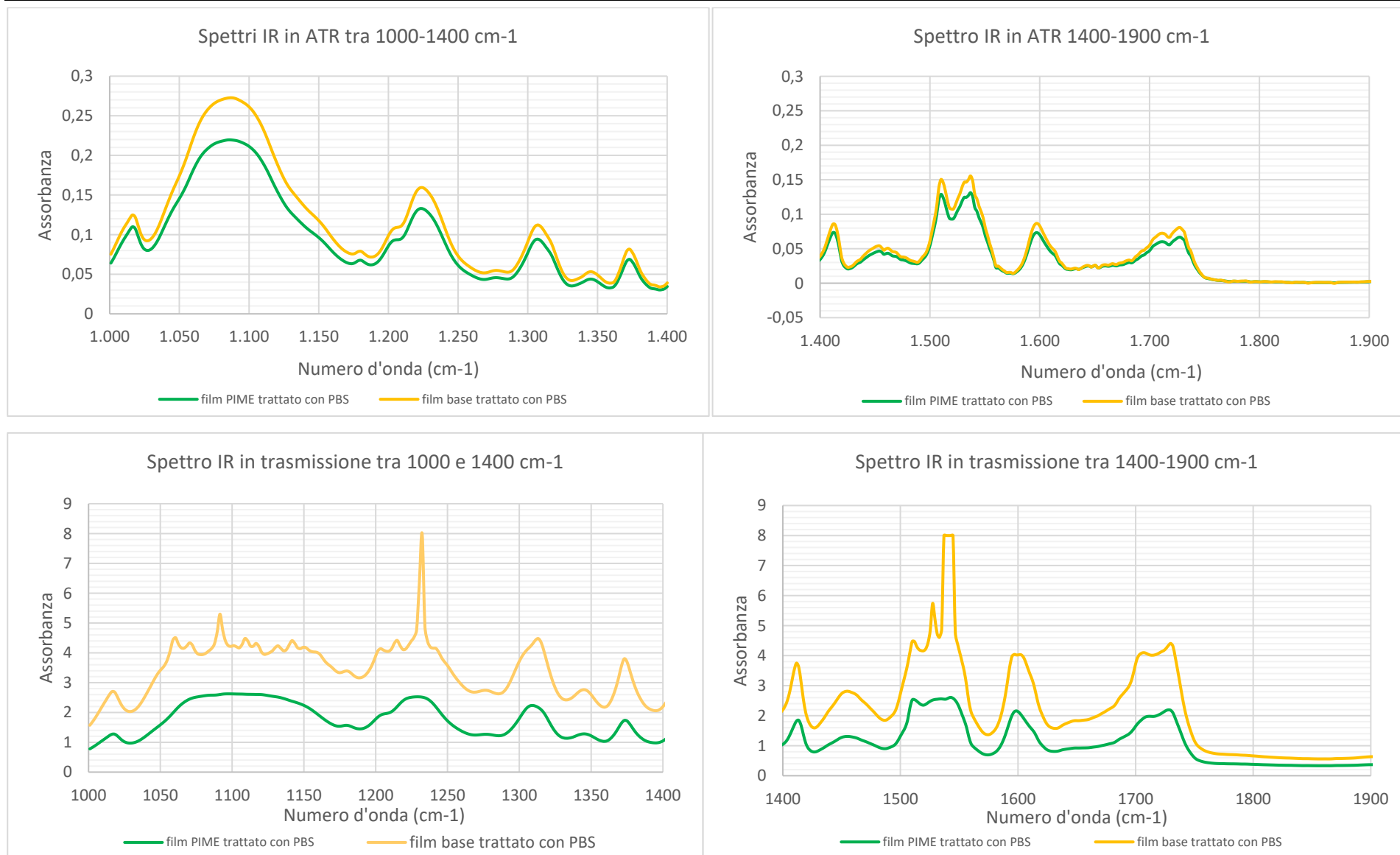
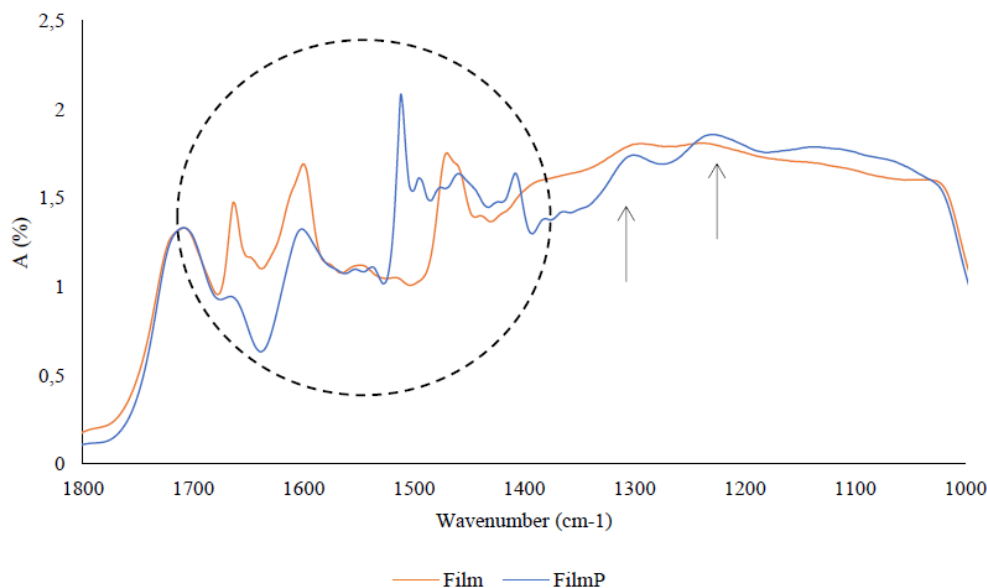


Figura 4.3.1 Spettri IR in ATR e in trasmissione a confronto tra film PIME e film base trattati con PBS



**Figura 4.3.2** Spettro IR in trasmissione del film PIME e film base [8]

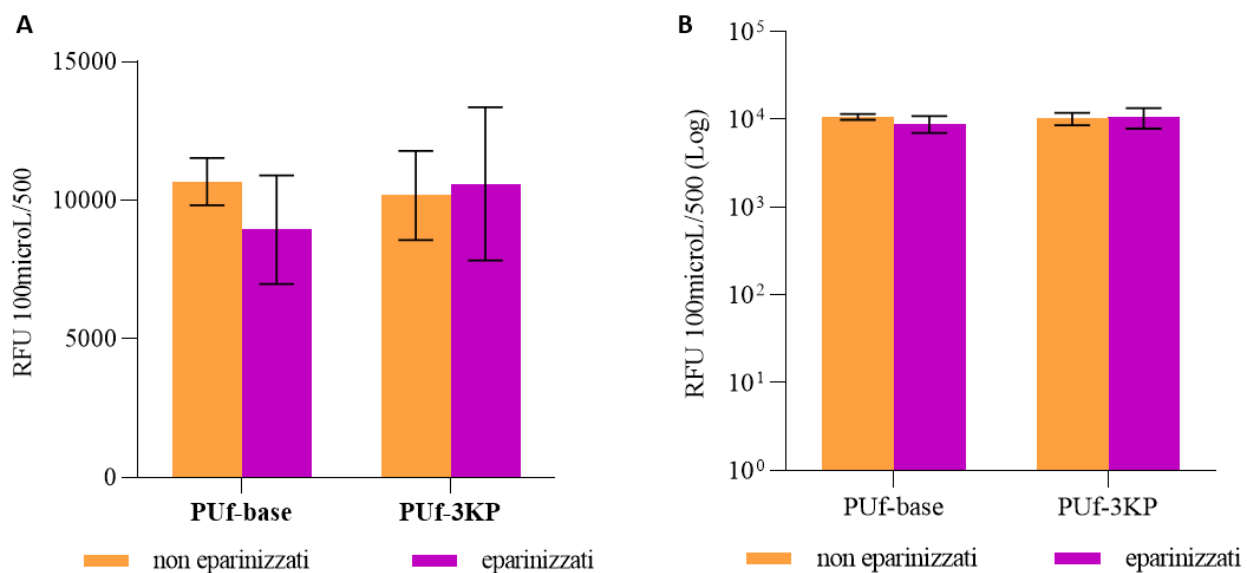
La prima ipotesi risulta debole in quanto nel precedente lavoro di tesi era stata verificata sia la presenza sia l'omogeneità di distribuzione del PIME [8]. Lo strumento potrebbe effettivamente presentare una sensibilità analitica inferiore rispetto a quello usato nel precedente lavoro di tesi; in tal caso, se il PIME fosse presente ma non rilevabile dallo strumento, dovremmo ottenere dei risultati soddisfacenti nelle prove di adesione batterica. Tali considerazioni verranno approfondite nel relativo paragrafo (4.4). Anche la terza ipotesi risulta debole in quanto dovrebbero essere visibili negli spettri IR delle nuove bande e, inoltre, il PIME risulta un elemento stabile nel tempo [9]. L'ipotesi più probabile è che il PIME non sia più presente all'interno della struttura chimica del film in quanto non era legato covalentemente alle catene poliuretaniche bensì tramite interazioni intermolecolari deboli per cui, a fronte del tempo trascorso e dei diversi lavaggi a cui sono stati sottoposti i campioni, è possibile che il PIME sia stato rilasciato nell'ambiente esterno. L'assenza del PIME potrebbe giustificare quanto emerso dalle prove di assorbimento in SWF (4.1) e di ritenzione dei fluidi (4.2).

## 4.4 Prove di adesione batterica

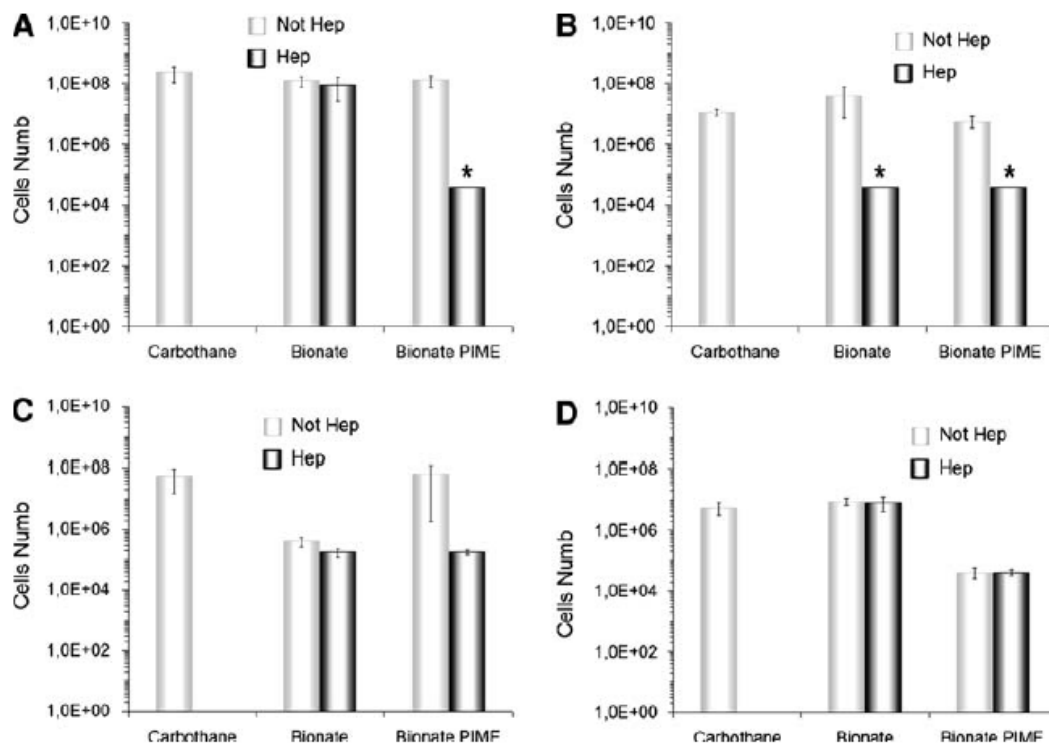
Come visto nel paragrafo 3.4, dalle prove di adesione batterica non sono emerse differenze significative tra gli espansi trattati e non con eparina. Nello specifico, tale risultato risulta valido per l'espanso PUF-base in quanto, non presentando il PIME all'interno della composizione chimica, non dovrebbe essere in grado di trattenere l'eparina e conseguentemente non dovrebbe mostrare una differenza in termini di proliferazione batterica. Osservando la Figura 4.4.1 A) è possibile constatare che il valore medio di RFU per l'espanso PUF-base risulta essere inferiore, possibilmente a causa della presenza di molecole di eparina rimaste debolmente legate all'interno della struttura porosa dell'espanso; ad ogni modo non è stata rilevata una differenza significativa ( $p > 0.05$ ) da un punto di vista statistico tra gli espansi PUF-base trattati e non con eparina. Contrariamente, l'espanso PUF-3KP avrebbe dovuto mostrare una significativa riduzione del numero di batteri presenti grazie alla presenza del PIME nella struttura chimica che, come ampiamente mostrato in letteratura, è in grado di legare l'eparina grazie a interazioni prevalentemente ioniche ma anche elettrostatiche [30]. Ad ogni modo, in Figura 4.4.1 A) è possibile constatare che i campioni dell'espanso PUF-3KP trattati con eparina hanno riportato un valore medio di RFU addirittura superiore rispetto a quelli non trattati, anche se da un punto di vista statistico non è stata rilevata alcuna differenza significativa ( $p > 0.05$ ). Inoltre, è bene specificare che solitamente tali valori vengono espressi in scala logaritmica come riportato in Figura 4.4.1 B), dove è ancor più evidente la similitudine tra tutti i risultati ottenuti tramite Saggio Alamar alle 24h. Si conferma, quindi, che è sia stata riscontrata alcuna differenza significativa tra tutti i campioni trattati e non trattati con eparina.

Nel lavoro di De Nardo et. Al [10], da cui è stato preso il protocollo di eparinizzazione per le prove di adesione batterica qui adottato, erano già state eseguite delle prove di adesione batterica sui policarbonato uretani Carbothane®, Bionate e Bionate®PIME eparinizzati e non trattati e successivamente incubati con *S. aureus* Cowan, *S. aureus* 8325-4, *S. epidermidis* RP62A e *S. epidermidis* HB. La composizione chimica dei

diversi policarbonato uretani studiati è indicata in Tabella 4.4.1. In Figura 4.4.2 sono riportati i risultati del saggio MTT dopo 24h per ogni categoria di espanso (trattato con eparina e non) in scala logaritmica. Dai grafici A e B si può notare che il numero di cellule batteriche di *S. aureus* Cowan e *S. aureus* 8325-4 sui campioni di Bionate®PIME eparinizzati è significativamente inferiore rispetto a tutte le altre tipologie di policarbonato uretani trattati o meno con eparina. Invece, dal grafico C emerge che non vi è una differenza statisticamente significativa tra i campioni eparinizzati di Bionate® e Bionate®PIME. Infine, dal grafico D i campioni Bionate®PIME, sia eparinizzati che non trattati, hanno mostrato una colonizzazione significativamente inferiore ( $p < 0.05$ ) rispetto alle altre tipologie di policarbonato uretani. Dunque, è stato possibile dimostrare che il PIME abbia interagito positivamente con l'eparina mantenendone la bioattività e creando un complesso stabile che, conseguentemente, ha comportato una riduzione della adesione e proliferazione delle cellule batteriche sulla superficie del materiale.



**Figura 4.4.1** Risultati del saggio Alamar Blue a 24h di *Escherichia Coli* sugli espansi PUF-base e PUF-3KP: **A)** scala lineare **B)** scala logaritmica



**Figura 4.4.2** Risultati del saggio MTT dopo 24h sui policarbonato uretani Carbothane®, Bionate® e Bionate®PIME: **A)** *S. aureus* Cowan, **B)** *S. aureus* 8325-4 **C)** *S. epidermidis* RP62A **D)** *S. epidermidis* HB. \* indica un numero di batteri inferiore al valore limite della curva di calibrazione (<10<sup>4</sup> cell) [10]

**Tabella 4.4.1** Composizione chimica dei policarbonato uretani [10]

Tipologia	Diisocianato	Segmenti soft	Estensori di catena
<b>Carbonate</b>	HMDI	Polycarbonate diol	BD
<b>Bionate</b>	MDI	PHCD	BD
<b>Bionate PIME</b>	HDI	PHCD	BD/PIME (PIME < 0,5% molare)

A fronte di ciò, è possibile dedurre che nel presente lavoro di tesi le prove di adesione batterica non siano avvenute con successo a causa o del basso quantitativo di PIME (pari a 0.5% p/p<sub>miscela</sub>) tale per cui il quantitativo di eparina presente non sia stata sufficiente a determinare una diminuzione della proliferazione batterica, oppure dalla mancata funzionalizzazione della superficie dell'espanso PUf-3KP con eparina a causa dell'assenza del PIME nella struttura chimica dell'espanso. A fronte dei risultati ottenuti dall'analisi FT-IR in ATR e in trasmissione (4.3), l'ipotesi più probabile è che il PIME non sia più presente nella struttura chimica dell'espanso in quanto, essendo legato alle catene poliuretaniche tramite interazioni intermolecolari deboli, è stato rilasciato all'esterno a fronte del tempo trascorso e dei numerosi lavaggi a cui sono stati sottoposti i campioni.



## CAPITOLO 5: CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

In questo lavoro di tesi si è valutato valutare se gli espansi funzionalizzati con PIME (PUf-3KP, PUf-2KP e PUf-TP80) realizzati in un precedente lavoro di tesi abbiano la capacità di essere funzionalizzati con eparina ed essere impiegati favorevolmente per la realizzazione di sistemi di *wound dressing* primario nell'ambito del *wound healing* di ustioni ed ulcere. Il sistema di medicazione prevede la funzionalizzazione con eparina al fine di ridurre l'adesione e la proliferazione batterica.

A tale scopo, sono state condotte prove fisiche di assorbimento in un fluido che simulasse la composizione chimica dell'essudato (*Simulated Wound Fluid*, SWF) e prove di ritenzione dei fluidi. Per valutare l'effettiva capacità di adsorbimento dell'eparina e la diminuzione di adesione e proliferazione batterica, sono state eseguite un'analisi in spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier (FT-IR), sia in ATR sia in trasmissione, e prove di adesione batterica sull'espanso PUf-3KP e sul relativo controllo (PUf-base). È stato scelto esclusivamente l'espanso PUf-3KP in quanto nel precedente lavoro di tesi si era distinto tra tutti in termini di proprietà meccaniche e di vitalità cellulare.

Purtroppo, da tutte le prove eseguite non è emersa una significativa differenza tra le caratteristiche degli espansi funzionalizzati con PIME (PUf-3KP, PUf-3KP e PUf-TP80) a confronto con i rispettivi controlli (PUf-base e PUf-TP80). Nello specifico, dagli spettri IR non è emersa alcuna significativa differenza tra la composizione chimica del film PIME e film base.

A fronte di quanto è emerso nelle discussioni (4.1, 4.2, 4.3 e 4.4), è possibile presupporre che attualmente il PIME non sia più presente nella struttura chimica degli espansi. Ciò potrebbe essere causato dal fatto che il PIME non fosse legato covalentemente alle catene poliuretaniche ma interagisse con esse tramite legami intermolecolari deboli, per cui sia stato rilasciato nell'ambiente esterno a fronte del tempo trascorso e dei numerosi lavaggi a cui sono stati sottoposti i campioni.

In conclusione, il PIME presenta sicuramente delle ottime potenzialità dettate principalmente dalla sua abilità di interagire positivamente con l'eparina mantenendone la bioattività e costituendo un complesso stabile. Tuttavia, si dovrebbe mettere a punto un differente metodo di sintesi che prevede l'introduzione del PIME in soluzione anziché in forma solida al fine di determinare la formazione di legami covalenti tra il PIME e le catene poliuretatiche e, quindi, garantire una continuità temporale delle caratteristiche degli espansi realizzati.

## BIBLIOGRAFIA

---

- [1] P. Ferreira, U. De Coimbra, and H. Gil, “Biomedical Polyurethane,” *Based Mater.*, no. May 2014, 2012.
- [2] M. Szychers, *Szycher’s handbook of Polyurethanes*, 2nd editio. CRC Press, 1999.
- [3] A. Kaneyoshi, *Polyurethane and Related Foams: Chemistry and Technology*. Taylor & Francis Group, 2007.
- [4] V. Jones, J. E. Grey, and K. G. Harding, “ABC of wound healing: Wound dressings,” *Br. Med. J.*, vol. 332, no. 7544, pp. 777–780, 2006.
- [5] A. Sood, M. S. Granick, and N. L. Tomaselli, “Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data,” *Adv. Wound Care*, vol. 3, no. 8, pp. 511–529, 2014.
- [6] M. C. Tanzi, S. Farè, P. Petrini, P. Milan, and P. L. Vinci, “HEPITAN □ : a New Family of Heparinizable Polymers for Blood-Contacting Devices,” vol. 981, p. 20133, 1999.
- [7] S. Murugesan, J. Xie, and R. Linhardt, “Immobilization of Heparin: Approches and Applications,” *Curr Top Med Chem*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2013.
- [8] D. Ganz, “Espansi poliuretanicı funzıonalızzatı con il dıammino-dıammıde dıolo PIME per applicazıonı nell’ıngegnerıa dei tessutı,” Polıtecnıco dı Mılano, 2017.
- [9] M. C. Tanzi, “Chain extender for the synthesis of heparinizable biocompatible polymers,” EP0870766B1, 1997.
- [10] L. De Nardo *et al.*, “New heparinizable modified poly ( carbonate urethane ) surfaces dımmınıshıng bacterıal colonızatıon,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 18, no. 11, pp. 2109–2115, 2007.

- [11] M. C. Tanzi, "Bioactive technologies for hemocompatibility," *Expert Rev. Med. Devices*, vol. 2, no. 4, pp. 473–492, 2005.
- [12] R. S. Ward, K. R. McCrea, Y. Tian, and M. C. Tanzi, "Use of SFG to Optimize a Polyurethane with Heparin Binding Sites Incorporated During Synthesis," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 11, no. 4, p. 353, 2000.
- [13] P. Petrini, L. Visai, P. Speziale, and M. C. Tanzi, "HEPITAN: Heparin-Adsorbing Properties," vol. 981, p. 27100, 1999.
- [14] L. Visai, P. Petrini, C. Liffredo, P. Speziale, and M. C. Tanzi, "HEPITAN: Cytocompatibility Properties," p. 27100, 1999.
- [15] M. C. Tanzi, S. Farè, P. Petrini, P. Milan, and P. L. Vinci, "HEPITAN: a New Family of Heparinizable Polymers for Blood-Contacting Devices," vol. 981, p. 20133, 1999.
- [16] M. Ionescu, *Chemistry and Technology of Polyols for Polyurethanes*, vol. 2. iSmithers Rapra Publishing, 2016.
- [17] M. C. Tanzi, S. Farè, and P. Petrini, "In vitro Stability of Polyether and Polycarbonate Urethanes," *Biomater. Appl.*, vol. 14, pp. 325–345, 2000.
- [18] N. V Gama, A. Ferreira, and A. Barros-Timmons, "Polyurethane Foams: Past, Present, and Future," *Materials (Basel)*, vol. 11, no. 10, pp. 1841–1876, 2018.
- [19] A. Kaneyoshi, *Polyurethane and Related Foams : Chemistry and Technology*. New York: Taylor & Francis, 2007.
- [20] V. Angeloni *et al.*, "Polyurethane foam scaffold as in vitro model for breast cancer bone metastasis," *Acta Biomater.*, vol. 63, pp. 306–316, 2017.
- [21] S. Bertoldi *et al.*, "Ability of polyurethane foams to support placenta-derived cell adhesion and osteogenic differentiation: Preliminary results," *J. Mater. Sci.*

*Mater. Med.*, vol. 21, no. 3, pp. 1005–1011, 2010.

- [22] S. M. Giannitelli *et al.*, “Graded porous polyurethane foam: A potential scaffold for oro-maxillary bone regeneration,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 51, pp. 329–335, 2015.
- [23] S. Grad, L. Kupcsik, K. Gorna, S. Gogolewski, and M. Alini, “The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: Potential and limitations,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 28, pp. 5163–5171, 2003.
- [24] M. Partac, “Progettazione e sviluppo di idrogeli di gelatina reticolata flessibili ed adesivi per sistemi di medicazione avanzata,” 2017.
- [25] G. C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, and M. T. Longaker, “Wound repair and regeneration,” *Nature*, vol. 453, no. 7193, pp. 314–321, 2008.
- [26] G. Han and R. Ceilley, “Chronic Wound Healing : A Review of Current Management and Treatments,” *Adv. Ther.*, vol. 34, no. 3, pp. 599–610, 2017.
- [27] J. Boateng, R. Burgos-Amador, O. Okeke, and H. Pawar, “Composite alginate and gelatin based bio-polymeric wafers containing silver sulfadiazine for wound healing,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 79, pp. 63–71, 2015.
- [28] D. Gi, H. Jun, H. Soon, and T. Thambi, “Polyurethane foam containing rhEGF as a dressing material for healing diabetic wounds : Synthesis , characterization , in vitro and in vivo studies,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 135, pp. 699–706, 2015.
- [29] S. M. Lee, I. K. Park, Y. S. Kim, H. J. Kim, H. Moon, and S. Mueller, “Physical , morphological , and wound healing properties of a polyurethane foam-film dressing,” *Biomater. Res.*, pp. 1–11, 2016.
- [30] M. C. Tanzi, “Bioactive technologies for hemocompatibility,” *Expert Rev. Med. Devices*, vol. 2, no. 4, pp. 473–492, 2005.

- [31] A. Devlin, L. Mauri, M. Guerrini, E. Yates, and M. Skidmore, “The use of ATR-FTIR spectroscopy to characterise crude heparin samples by composition and structural features,” *bioRxiv*, no. August, 2019.
- [32] W. Querido, R. Ailavajhala, M. Padalkar, and N. Pleshko, “Validated Approaches for Quantification of Bone Mineral Crystallinity Using Transmission Fourier Transform Infrared (FT-IR), Attenuated Total Reflection (ATR) FT-IR, and Raman Spectroscopy,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 72, no. 11, pp. 1581–1593, 2018.