

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria dei Sistemi

Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria Biomedica



**ESPANSI POLIURETANICI
BIODEGRADABILI:
APPLICAZIONI PER INGEGNERIA DEI
TESSUTI**

Referente: Prof. ssa Maria Cristina TANZI

Correlatore: Ing. Serena BERTOLDI

Tesi di:

Stefano CAMESASCA

Matricola: 734616

Anno Accademico 2009 – 2010

Ringraziamenti

Desidero innanzitutto ringraziare la Prof. ssa Maria Cristina Tanzi, relatrice di questa tesi, per la grande cortesia e disponibilità dimostratemi in questi mesi, e per tutto il tempo dedicato a questo lavoro.

Desidero ringraziare l'Ing. Serena Bertoldi, che è sempre stata gentile e disponibile a chiarire i miei dubbi e a guidarmi durante la stesura di questo lavoro.

Ringrazio la Prof. ssa Silvia Farè, per la disponibilità dimostratami durante lo svolgimento di parte dell'attività sperimentale condotta in laboratorio.

Un ringraziamento ai miei compagni di corso, che mi sono sempre stati vicini e che mi hanno sostenuto in ogni momento; li considero dei veri amici.

Un sentito ringraziamento ai miei genitori, che con il loro sostegno e il loro affetto mi hanno sorretto nei momenti più difficili e mi hanno permesso di raggiungere questo traguardo.

Ringrazio Marco, il mio "fratellino", e tutti i miei parenti, che mi sono stati sempre accanto durante tutti questi anni di studio.

E ringrazio te, Sarah, che sei sempre stata al mio fianco e sempre lo sarai.

Indice

Sommario	11
Abstract	14
Introduzione	16
Il ruolo dello <i>scaffold</i> nell'ingegneria tissutale	17
1. Materiali per la realizzazione di <i>scaffold</i>	19
2. Porosità e struttura tridimensionale	20
3. Biodegradabilità	22
4. Proprietà meccaniche	23
5. Adesione cellulare e citocompatibilità	23
Poliuretani e ingegneria tissutale	25
Scopo della tesi	27
Capitolo 1	28
1.1 Poliuretani	28
1.1.1 Reazioni per la sintesi di poliuretani	28
1.1.2 Reagenti per la sintesi di poliuretani	30
1.1.2.1 Isocianato	30
1.1.2.2 Poliolo	31
1.1.2.3 Catalizzatori	32
1.1.3 Struttura e morfologia dei poliuretani lineari	32
1.2 Poliuretani espansi	34
1.2.1 Reazioni per la sintesi di poliuretani espansi	34
1.2.2 Curva di crescita di un poliuretano espanso	37
1.2.3 Reagenti per la sintesi di poliuretani espansi	38
1.2.3.1 Agenti espandenti	39
1.2.3.2 Surfattanti	39
1.2.3.3 Catalizzatori	40
1.2.4 Schiume poliuretatiche rigide	41
1.2.5 Schiume poliuretatiche flessibili	43
1.2.6 Produzione e <i>processing</i> di schiume poliuretatiche	45

Capitolo 2	48
2.1 Poliuretani in ambito biomedicale	48
2.2 Poliuretani biodegradabili per applicazioni biomedicali	51
2.2.1 Composizione chimica	51
2.2.2 Fenomeni di degradazione dei poliuretani	54
2.2.3 Possibili strategie per rallentare la cinetica di degradazione	58
2.3 Espansi poliuretanic biodegradabili per l'ingegneria dei tessuti	61
2.3.1 <i>Scaffold</i> per la rigenerazione della cartilagine	61
2.3.2 <i>Scaffold</i> per la rigenerazione dei tessuti molli	62
2.3.3 Espansi poliuretanic biodegradabili per la ricostruzione del tessuto osseo	65
2.3.3.1 Test di invecchiamento <i>in vitro</i>	67
2.3.3.2 Prove di calcificazione <i>in vitro</i>	71
2.3.3.3 Test di citocompatibilità <i>in vitro</i>	72
2.3.3.4 Studi di biocompatibilità <i>in vivo</i>	74
Capitolo 3	77
Attività sperimentale	77
3.1 Sintesi di espansi poliuretanic (PU)	78
3.1.1 Reagenti per espansi PU biointegrabili	78
3.1.2 Reagenti per espansi PU biodegradabili	78
3.1.3 Processo di sintesi	80
3.1.3.1 Titolazione del poliolo	80
3.1.3.2 Sintesi ad uno stadio	80
3.2 Caratterizzazione di espansi poliuretanic	83
3.2.1 Preparazione dei campioni	83
3.2.2 Analisi di microscopia elettronica a scansione (SEM)	84
3.2.3 Percentuale di porosità aperta	84
3.2.4 Prove di assorbimento di acqua a 37°C	86
3.2.5 Analisi di spettroscopia infrarossa (ATR – FTIR)	86
3.2.6 Prove meccaniche di compressione	87
3.3 Risultati delle prove di caratterizzazione	89
3.3.1 Analisi di microscopia elettronica a scansione (SEM)	89
3.3.2 Percentuale di porosità aperta	91

3.3.3 Prove di assorbimento di acqua a 37°C	91
3.3.4 Analisi di spettroscopia infrarossa (ATR – FTIR)	93
3.3.5 Prove meccaniche di compressione	94
3.4 Conclusioni	96
Conclusioni e sviluppi futuri	98
Bibliografia	100

Indice delle figure

Introduzione

- Figura 1** - Principi base per la generazione di un *graft* attraverso metodi di ingegneria tissutale. 17
- Figura 2** - Esempio di *scaffold* poliuretano poroso per la rigenerazione del tessuto osseo. 20
- Figura 3** - (a) Esempio di schema di posizionamento di campioni polimerici impiantati nella regione dorsale di ratti; (b) *Scaffold* poliuretano biodegradabile impiantato nella regione dorsale di un ratto. 24

Capitolo 1

- Figura 1.1** - (a) 4,4' MDI; (b) 2,4 MDI; (c) 2,2' MDI; (d) TDI. 30
- Figura 1.2** - (a) 1,6 esametilene diisocianato; (b) 4,4' - dicicloesilmetano di isocianato. 31
- Figura 1.3** - Schema della struttura di un poliuretano lineare a segmenti. 33
- Figura 1.4** - Struttura bifasica caratteristica dei poliuretani lineari a segmenti. 33
- Figura 1.5** - Esempi di strutture cellulari: (a) Struttura a nido d'ape; (b) Espanso polimerico a celle aperte. 34
- Figura 1.6** - Rappresentazione schematica della reazione di gelificazione. 36
- Figura 1.7** - Rappresentazione schematica della reazione di espansione. 36
- Figura 1.8** - Curva di crescita di un poliuretano espanso. 37
- Figura 1.9** - Relazione tra sforzo e densità apparente di una schiuma poliuretano rigida. 42
- Figura 1.10** - Pannelli isolanti realizzati con schiume poliuretano rigide. 43

Figura 1.11 - Esempio di schiuma poliuretanicamente flessibile.	43
Figura 1.12 - Cicli di isteresi relativi a schiume flessibili di diversa composizione.	44
Figura 1.13 - Impianto industriale per la produzione di schiume poliuretanicamente a sezione rettangolare.	46
Figura 1.14 - Particolare della testa di miscelazione di un impianto di schiumatura in continuo.	46
Figura 1.15 - (a) Esempi di tecniche di taglio secondo profili predefiniti e di processi di punzonatura; (b) Schiume sagomate per specifiche applicazioni.	47
Capitolo 2	
Figura 2.1 - (a) Catetere in poliuretano; (b) Esempi di sacche per il sangue in poliuretano.	49
Figura 2.2 - Esempio di dispositivo per assistenza ventricolare – VAD.	49
Figura 2.3 - Immagine ottenuta al microscopio elettronico a scansione di un espanso poliuretanicamente biodegradabile.	50
Figura 2.4 - Meccanismo di degradazione relativo a poliuretani biodegradabili.	54
Figura 2.5 - Perdita di massa di poliuretani incubati in buffer acquoso in presenza o in assenza di elastasi.	56
Figura 2.6 - (a) Fenomeno di auto-ossidazione (AO); (b) Fenomeno di <i>environmental stress cracking</i> (ESC).	57
Figura 2.7 - Analisi dell'altezza dei picchi di assorbimento a 1110 cm ⁻¹ (ATR-FTIR) dei gruppi etere relativa a poliuretani trattati con vitamina E e poliuretani non trattati.	59
Figura 2.8 - Degradazione dei segmenti <i>soft</i> polieteri.	60
Figura 2.9 - Esempio di <i>scaffold</i> poliuretanicamente poroso utilizzato per la rigenerazione del tessuto cartilagineo.	61
Figura 2.10 - Esempio di <i>patch</i> poliuretanicamente di diametro pari a 6 mm ottenuto con tecnica di punzonatura.	63
Figura 2.11 - Immagine relativa a <i>patch</i> poliuretanicamente a 12 settimane dall'impianto nel tratto di uscita del ventricolo destro di ratti adulti.	63

- Figura 2.12** - Rilascio di lisina da parte del polimero LDI-glicerolo in PBS a 37, 22 o 4°C in un periodo di incubazione fino a 60 giorni. 68
- Figura 2.13** - Rilascio di lisina e glicerolo da parte del polimero LDI-glicerolo in PBS a differenti temperature e istanti temporali. 68
- Figura 2.14** - (a) Effetto dei prodotti di degradazione dei polimeri LDI-glicerolo sul pH della soluzione PBS; (b) Variazione di pH durante prove di invecchiamento *in vitro* di poliuretani con diversi rapporti di idrofilicità a base policaprolattone, polietilenglicole e Pluronic F68®. 70
- Figura 2.15** - (a) Immagine al SEM di calcio-fosfati presenti sulla superficie di poliuretani con rapporto segmenti idrofilici – idrofobici pari a 70:30; (b) Particolare dell'ingrandimento della porzione evidenziata dal rettangolo dell'immagine (a). 71
- Figura 2.16** - Caratteristiche di adesione e crescita di cellule murine precursori di osteoblasti. 72
- Figura 2.17** – (a) Cellule stromali da midollo osseo di coniglio durante i primi stati di adesione al substrato a 6 ore dalla semina; (b) Monostrato cellulare presente sullo *scaffold* a 7 giorni dalla semina. 73
- Figura 2.18** - Analisi istologiche della reazione da corpo estraneo in seguito all'impianto della matrice polimerica LDI-glucosio. 74
- Figura 2.19** - (a) Impianto di *scaffold* poliuretanicici in difetti ossei della cresta iliaca di pecora; (b) Immagine radiografica del difetto colmato con *scaffold* poliuretanicico con il 70% di componenti idrofilici, dopo 6 mesi dall'impianto. 75

Capitolo 3

- Figura 3.1** - (a) Agitatore a colonna da banco; (b) Stampo in PMMA. 81
- Figura 3.2** - Seghetto con filo di acciaio e taglierina in PMMA. 83

Figura 3.3 - (a) Picnometro a variazione di volume; (b) Particolare della bolla.	85
Figura 3.4 - (a) Prova di compressione a secco; (b) Prova di compressione a umido.	87
Figura 3.5 - Curva del ciclo di compressione e rette interpolanti i tratti lineare e di collasso.	88
Figura 3.6 - Immagini al SEM della morfologia superficiale delle schiume PS, PL1, PL2.	89
Figura 3.7 - Immagini al SEM della morfologia superficiale delle schiume S1, S2.	90
Figura 3.8 - Curve di assorbimento di acqua a 37°C relative alle schiume PS, PL1, PL2, EF.	92
Figura 3.9 - Spettro di assorbimento della schiume biodegradabili PS, PL1, PL2.	93
Figura 3.10 - Curve sforzo-deformazione ottenute da prove meccaniche di compressione a secco della schiuma biointegrabile EF.	94
Figura 3.11 - Curve sforzo-deformazione ottenute da prove meccaniche di compressione a umido della schiuma biointegrabile EF.	94
Figura 3.12 - Valori dei parametri meccanici ricavati dall'elaborazione delle curve cicliche relative a prove di compressione.	95

Indice delle tabelle

Capitolo 2

Tabella 2.1 - Poliisocianati utilizzati per la sintesi di poliuretani biodegradabili.	51
Tabella 2.2 - Polioli per la sintesi di poliuretani biodegradabili.	52
Tabella 2.3 - Composizione chimica e sottoprodotti di degradazione relativi a poliuretani espansi biodegradabili, per applicazioni di ricostruzione del tessuto osseo.	66

Capitolo 3

Tabella 3.1 - Reagenti utilizzati per la sintesi di schiume poliuretatiche biointegrabili.	78
Tabella 3.2 - Reagenti utilizzati per le prove preliminari di sintesi di poliuretani biodegradabili.	79
Tabella 3.3 - Sigle utilizzate per i materiali sintetizzati.	82
Tabella 3.4 - <i>Water uptake</i> (%) relativi alle schiume sintetizzate.	91
Tabella 3.5 - Valori dei parametri meccanici ricavati dall'elaborazione delle curve cicliche relative a prove di compressione.	95

Sommario

Il successo dell'impiego di *scaffold* per applicazioni di ingegneria dei tessuti dipende, in maniera preponderante, dalle caratteristiche del materiale polimerico utilizzato, che dovrebbe degradarsi nel tempo senza indurre reazioni immunogeniche all'interno dell'ospite.

Negli ultimi due decenni, nella gamma dei polimeri impiegati per la produzione di supporti porosi tridimensionali per l'ingegneria dei tessuti, sono stati proposti i poliuretani. Questi materiali, comunemente utilizzati nel settore biomedicale per la realizzazione di dispositivi impiantabili a contatto con il sangue e con i tessuti molli, sono contraddistinti da una grande versatilità, che consente di combinare proprietà meccaniche e caratteristiche di biodegradabilità, in grado di promuovere la formazione di un nuovo tessuto. Proprio grazie alla loro versatilità, peculiarità unica dei poliuretani, questi polimeri sono diventati candidati per applicazioni di medicina rigenerativa.

Oggetto di questo lavoro di tesi sono, in particolare, gli espansi poliuretanici biodegradabili, per applicazioni di ingegneria tissutale. Questi materiali sono attualmente ancora in fase di studio e l'obiettivo della ricerca è quello di sintetizzare polimeri che permettano di produrre *scaffold* porosi tridimensionali, biocompatibili, che possiedano proprietà meccaniche adeguate per la specifica applicazione (ad esempio per la rigenerazione del tessuto osseo, della cartilagine o dei tessuti molli) e una cinetica di degradazione controllata. La velocità di riassorbimento del costrutto impiantato deve essere simile a quella di ricostruzione del tessuto e i prodotti di degradazione devono essere facilmente metabolizzabili dall'organismo, senza indurre una intensa reazione infiammatoria.

Nel corso di questa trattazione si considerano in particolare le forme poliuretatiche espanse (*schiume poliuretatiche*), caratterizzate da una struttura porosa. La porosità influenza fortemente le proprietà meccaniche degli espansi polimerici e ne determina il grado di flessibilità o di rigidità.

Oltre alla descrizione dei reagenti utilizzati e dei processi di sintesi di questi materiali, vengono accennati i metodi di produzione e di *processing* di schiume poliuretatiche, adottati su scala industriale.

In seguito si discute l'impiego dei poliuretani espansi biodegradabili per la produzione di *scaffold* per l'ingegneria del tessuto cartilagineo, dei tessuti molli (vasi ematici e tessuto nervoso) e, in particolare, del tessuto osseo. Vengono trattati nel dettaglio i reagenti necessari per conferire ai materiali proprietà di biodegradabilità, oltre ad alcuni metodi per rallentare la cinetica di riassorbimento; successivamente vengono discussi in maniera approfondita i risultati di studi presenti nella letteratura scientifica, relativi a prove di invecchiamento *in vitro* e test di biocompatibilità *in vitro* e *in vivo* di schiume poliuretatiche biodegradabili per la rigenerazione del tessuto osseo.

Si può affermare che i dati relativi agli studi effettuati in letteratura pongono attualmente gli espansi poliuretatici biodegradabili tra i materiali candidati per la realizzazione di *scaffold* per l'ingegneria dei tessuti. In futuro, lo sviluppo di tecniche per la modulazione della cinetica di degradazione e la ricerca di reagenti innovativi, biologicamente attivi, in grado cioè di promuovere la rigenerazione tissutale, potrebbero collocare questi polimeri tra le prime scelte per applicazioni di ingegneria dei tessuti.

Durante questo lavoro di tesi, sono stati condotti studi preliminari per la progettazione di schiume poliuretatiche biodegradabili, presso il Laboratorio di Biomateriali del Politecnico di Milano.

L'analisi della letteratura scientifica ha permesso la selezione dei reagenti necessari per prove preliminari di sintesi. Il processo di sintesi seguito è stato quello ad uno stadio, nel quale si esegue una reazione diretta tra poliolo, isocianato e catalizzatore.

Come poliolo è stato utilizzato poli-etilenglicole (peso molecolare pari a 1000 g/mole), mentre come isocianato è stato impiegato metilene-bis-fenilisocianato polimerico, comunemente detto *MDI*. La trietanolamina, ammina terziaria con funzionalità pari a 3, è stata selezionata come catalizzatore e agente reticolante.

Analisi di spettroscopia infrarossa (ATR-FTIR) mostrano come i reagenti selezionati portino alla formazione di poliuretani porosi, tuttavia gli espansi dimostrano instabilità strutturale, in quanto soggetti a collasso durante le prime 24 ore post-sintesi.

Prove di assorbimento di acqua a 37°C evidenziano l'idrofilicità dei materiali sintetizzati, tuttavia l'analisi della morfologia superficiale, condotta al microscopio elettronico a scansione, suggerisce come la struttura degli espansi sia scarsamente omogenea e con porosità poco interconnessa. Nel capitolo 3 di questa trattazione sono descritte accuratamente le prove di sintesi condotte presso il Laboratorio di Biomateriali e i risultati delle prime prove di caratterizzazione condotte.

È da sottolineare come i risultati ottenuti siano relativi ad esperimenti preliminari. Per questa ragione si ritiene che siano necessari ulteriori studi, prove di sintesi e di caratterizzazione per sviluppare espansi poliuretanicamente morfologicamente stabili, con una struttura porosa aperta e con proprietà di biodegradabilità controllabili.

Abstract

The success of *scaffold* for tissue engineering applications largely depends on the characteristic of the polymeric material used, which should degrade in a timely manner inducing the least immunogenicity in the host.

During the last twenty years, polyurethanes (PU) have been proposed among the large variety of polymers used for the production of porous tridimensional supports for tissue engineering. Polyurethanes are commonly used in medical practice to realize implantable devices in contact with blood and soft tissues. The main advantage offered by these polymers, in tissue engineering applications, is their great versatility. This allows the production of *scaffold* with suitable mechanical properties and in the meantime with tunable degradation rate, to promote the growth of a new tissue.

Thanks to their versatility, typical peculiarity of polyurethanes, these polymers have become candidates in the regenerative medicine applications.

The object of this work are biodegradable polyurethane foams, for tissue engineering applications. These materials are still being investigated and researchers' aim is the synthesis of polymers for the production of biocompatible tridimensional porous *scaffold*, with suitable mechanical properties and controlled degradation rate.

The degradation of the implanted matrix and the tissue regeneration rates should be similar, moreover the material should undergo controlled degradation to noncytotoxic decomposition products.

This work considers in particular polyurethane foams. Porosity affects mechanical properties and define foam's stiffness or flexibility. The reagents, the synthetic processes, the production and processing methods of polyurethane foams are described as well.

The second chapter considers the use of biodegradable polyurethane foams for the production of *scaffold* for cartilage, soft tissue (i. e. blood vessels and nerves) and, most of all, bone tissue engineering. Reagents and methods to tailor the degradation rate of these

materials are considered. Afterward the attention will be focused on the results of scientific works concerning with the study of *in vitro* and *in vivo* biodegradation of polyurethanes foams proposed as *scaffold* for bone tissue engineering.

During this work preliminary studies on biodegradable polyurethane foams were done at 'Laboratorio di Biomateriali' of Politecnico di Milano.

The critical analysis of scientific works concerning with biodegradable polyurethanes has lead to the selection of required reagents for preliminary synthesis experiments. The one-shot process was chosen for the production of biodegradable polyurethane foams. Polyethylene glycol (PEG, molecular weight 1000) was used as polyol, while polymeric 4,4'-diphenylmethane diisocyanate (MDI) was used as isocyanate. Triethanolamine (TEA), tertiary amine with functionality of 3, was selected as catalyst and crosslinker.

Infrared spectroscopy analysis (ATR-FTIR) shows the presence of urethane bonds along polymeric chains' backbone, however the foams suffer of structural instability which causes foam's shrinking in the first 24 hours after their synthesis.

Water uptake values at 37°C show polymer hydrophilicity, nevertheless analysis of scanning electron microscopy (SEM) suggest that foams' structure is few homogenous, with poorly interconnected pores.

In the third chapter of this work the synthesis trials done at 'Laboratorio di Biomateriali' are described, together with the first results of characterization techniques.

It is worth to underline that these are only preliminary results. For this reason further studies and synthesis, together with materials' analysis, are necessary to develop polyurethane foams with an open cell structure and tunable biodegradation properties.

Introduzione

Il ruolo dello *scaffold* nell'ingegneria tissutale^[1]

L'ingegneria dei tessuti è un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita allo sviluppo di sostituti che riparano, mantengono o migliorano la funzionalità dei tessuti^[2].

L'impiego di *scaffold* tridimensionali per sostituire tessuti e supportare la componente cellulare fu proposto circa venti anni fa da Robert Langer (Figura 1).

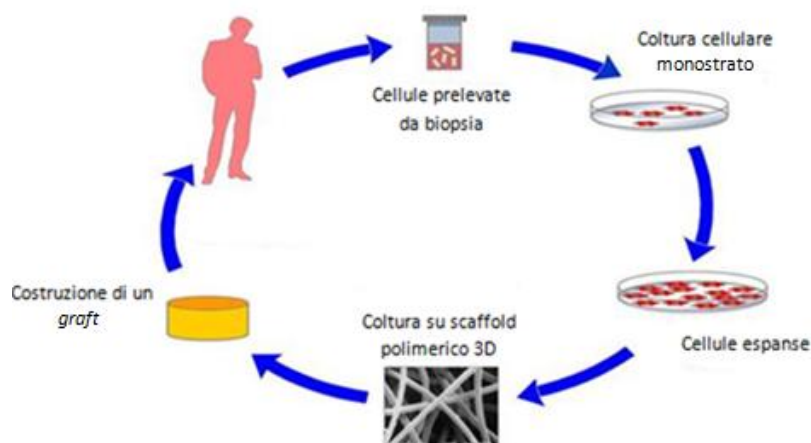


Figura 1. – Principi base per la generazione di un *graft* attraverso metodi di ingegneria tissutale^[3].

Si definisce *scaffold* una struttura tridimensionale, di origine naturale o artificiale, sulla quale vengono seminate e coltivate cellule, al fine di generare un costrutto biologico funzionale. Lo *scaffold* guida lo sviluppo del tessuto e fornisce alla componente cellulare una struttura di supporto temporanea, che può andare incontro a fenomeni di degradazione. La produzione di matrice extracellulare da parte delle cellule in maturazione contribuisce allo sviluppo del nuovo tessuto.

Occorre sottolineare come non esista uno *scaffold* “universale” per il trattamento dei difetti a carico dei diversi tessuti; ciò significa, ad esempio, che per la rigenerazione del tessuto osseo sono necessari supporti con caratteristiche differenti, in termini di struttura e proprietà meccaniche, rispetto a quelli impiegati per la terapia di lesioni ai tessuti molli, come i vasi ematici o il tessuto muscolare.

La quasi totalità dei tessuti biologici possiede un'architettura e un'organizzazione spaziale ben definita e strettamente correlata alle funzioni dei tessuti stessi. Per questa ragione, la realizzazione di costrutti per l'ingegneria tissutale richiede l'utilizzo di tecniche con un elevato controllo sui parametri strutturali dello *scaffold*, come la distribuzione e la geometria dei pori e la rugosità delle superfici.

La struttura gerarchica dei tessuti biologici, finemente organizzata a partire dalla scala nanometrica fino a quella millimetrica, ha portato al recente sviluppo di tecniche di produzione e di lavorazione dette *nano* e *micro* fabbricazione.

A livello nanometrico è necessario controllare la distribuzione di ligandi e siti di adesione, al fine di garantire la corretta organizzazione del citoscheletro e lo sviluppo di processi biochimici in grado di condurre la cellula verso il fenotipo desiderato. A questo proposito, sono stati recentemente sviluppati metodi di modifica superficiale, che utilizzano tecniche quali fotolitografia e *self assembly*.

Considerando invece il livello micrometrico, occorre fornire ai costrutti una struttura porosa che permetta un'adeguata perfusione di nutrienti, la rimozione dei prodotti di scarto del metabolismo cellulare e la possibilità di sviluppare una rete capillare, attraverso l'innescio di processi angiogenici. Per raggiungere questi obiettivi sono state sviluppate tecniche in grado di realizzare *scaffold* tridimensionali con pori interconnessi e dalle dimensioni controllate, che agevolino i processi di migrazione, proliferazione e differenziamento cellulare.

Spostandosi verso un ordine superiore di osservazione, infine, occorre realizzare un costrutto con morfologia compatibile con quella del tessuto trattato e con dimensioni adeguate per la corretta collocazione nel sito d'impianto.

Nei paragrafi successivi verranno considerati e descritti i requisiti e le caratteristiche principali di uno *scaffold* tridimensionale per applicazioni di ingegneria dei tessuti.

1. Materiali per la realizzazione di *scaffold*

Per realizzare *scaffold* per l'ingegneria tissutale, la scelta può ricadere sulla classe dei materiali polimerici sintetici, oppure quella dei materiali di origine naturale.

I primi, tra cui i polimeri organici, presentano un ampio spettro di proprietà meccaniche modulabili in fase di sintesi, sono facilmente processabili, riproducibili e reperibili in larghi volumi^[1].

I materiali di origine naturale presentano proprietà meccaniche non controllabili e sono difficilmente processabili, in quanto derivati da tessuti viventi. Nelle applicazioni terapeutiche il materiale impiantato deve espletare una funzione di supporto meccanico, interagendo con l'ambiente biologico circostante, per permettere la generazione di un nuovo tessuto sano e maturo. La criticità dell'applicazione di un qualsiasi biomateriale risiede nella risposta a lungo termine da parte dell'organismo; nel campo dell'ingegneria dei tessuti, è infatti richiesta una sostituzione progressiva dello *scaffold* con matrice extracellulare prodotta dalle cellule seminate sul costruito. È quindi necessario che la velocità di riassorbimento della matrice polimerica sia simile a quella di crescita del nuovo tessuto, inoltre i sottoprodotti di degradazione devono essere facilmente metabolizzabili dall'organismo, senza indurre un'intensa reazione infiammatoria.

I materiali sintetici più impiegati come *scaffold* sono in generale i materiali polimerici. Rispetto alle altre classi di materiali, i polimeri impiegati per la realizzazione di supporti cellulari offrono numerosi vantaggi tra cui la biocompatibilità, la possibilità di modificarne composizione e proprietà fisiche, la facile processabilità anche in forme e strutture complesse e la possibilità di modificarne chimicamente e fisicamente la superficie. Tecniche particolarmente avanzate consentono inoltre di immobilizzare cellule o biomolecole al loro interno.

Tra i principali svantaggi dell'utilizzo dei materiali polimerici si hanno la presenza di sostanze che possono essere rilasciate nell'organismo in seguito al processo di degradazione (monomeri, catalizzatori, additivi) e la difficoltà nel controllo della cinetica di riassorbimento dello *scaffold*, che spesso può rivelarsi incompatibile con quella di rigenerazione del tessuto.

Esempi di polimeri biodegradabili utilizzati già da tempo per applicazioni nell'ingegneria tissutale sono l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA) e il policaprolattone (PCL)^[4]. Si tratta di poliesteri biodegradabili, approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per usi nel campo delle suture, rilascio controllato di farmaci e mezzi di osteosintesi. Altri polimeri, come poliortoesteri, polianidridi e poliuretani biodegradabili non hanno ancora ricevuto l'approvazione dagli organismi competenti e sono attualmente in fase di sperimentazione^[4].

Considerando i polimeri di origine naturale, il loro impiego per la realizzazione di *scaffold* è da molti anni oggetto di studio e ricerca; tuttavia, le proprietà meccaniche talvolta inadeguate, la scarsa reperibilità in grandi volumi, variazioni significative delle proprietà inter-lotto e il rischio di trasferimento di agenti patogeni spesso ne limitano l'utilizzo. Tra i materiali di origine naturale maggiormente utilizzati nella medicina rigenerativa troviamo collagene, gelatina, acido ialuronico e alginato^[1].

2. Porosità e struttura tridimensionale

Nel campo dell'ingegneria del tessuto osseo e cartilagineo è necessario che la struttura di sostegno sia porosa (Figura 2), con pori interconnessi e di adeguate dimensioni, per permettere lo sviluppo e la formazione di un tessuto biologico funzionale^[5]. In questo una struttura porosa tridimensionale è un requisito fondamentale per lo *scaffold*.

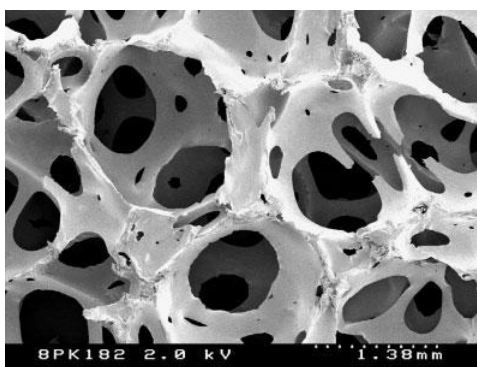


Figura 2. – Esempio di scaffold poliuretano poroso per la rigenerazione del tessuto osseo. L'immagine è stata ottenuta mediante microscopio elettronico a scansione (SEM)^[6].

Il rapporto tra il volume dei vuoti e il volume totale del materiale definisce la porosità, proprietà morfologica dipendente dai parametri fissati durante il processo di fabbricazione dello *scaffold*, come, ad esempio, la quantità di acqua utilizzata nei processi di *gas foaming* (cioè di espansione provocata da un gas, si veda il Capitolo1) dei poliuretani, o la quantità di agente porogeno (ad esempio cloruro di sodio, NaCl) utilizzato durante i processi di *solvent casting-particulate leaching*^[7].

La porosità di un materiale può essere aperta oppure chiusa. La porosità aperta definisce il grado di interconnessione dei pori e si esprime come percentuale del volume totale dello *scaffold* penetrabile da un gas dall'esterno; viceversa la porosità chiusa è espressa dalla percentuale del volume totale dello *scaffold* impenetrabile ad un gas dall'esterno.

La presenza di pori è necessaria in un costrutto tridimensionale in quanto favorisce la migrazione e la proliferazione cellulare all'interno della struttura, il passaggio di sostanze nutritive e la rimozione di cataboliti, oltre ad offrire un'elevata superficie di adesione cellulare in un ridotto volume.

Il grado ottimale di porosità aperta, per dare luogo alla formazione di un tessuto funzionale *in vitro*, è dell'ordine dell'80 – 90%^[1]. Tuttavia, occorre ricordare che tale parametro influenza le prestazioni meccaniche e le caratteristiche di biodegradabilità del costrutto, per questa ragione il grado di porosità può variare a seconda dell'applicazione. Le proprietà meccaniche incrementano se la porosità è di tipo chiuso, tuttavia pori chiusi impedirebbero la colonizzazione della struttura da parte delle cellule e per questo motivo è necessario trovare un buon compromesso tra i due tipi di porosità. Per quanto concerne le dimensioni dei pori, è possibile controllare tale parametro ad esempio scegliendo opportunamente la granulometria dell'agente porogeno^[7] oppure controllando il quantitativo di agente espandente (ad esempio acqua, per i processi di *gas foaming*) introdotto in fase di sintesi. Il vantaggio offerto da una struttura porosa aperta è quello di permettere la libera diffusione di molecole prodotte dalle cellule o presenti nel mezzo di coltura. Inoltre, se le dimensioni dei pori sono sufficientemente elevate, è possibile osservare il fenomeno di migrazione cellulare all'interno del costrutto.

E' da sottolineare, infine, come il grado di porosità non sia costante nel tempo, bensì come esso diminuisca *in vivo* a causa dello sviluppo del tessuto biologico che occupa i pori dello *scaffold*.

3. Biodegradabilità

Le velocità di degradazione e di riassorbimento del costrutto devono essere simili a quella di ricostruzione del tessuto; inoltre, lo *scaffold* deve fornire un supporto meccanico adeguato, con proprietà meccaniche paragonabili a quelle dei tessuti presenti nel luogo di impianto^[8].

Le proprietà di massa dei materiali utilizzati come *scaffold* per la rigenerazione dei tessuti biologici dipendono dalla natura dei legami chimici presenti nel materiale (ionici, covalenti e metallici) e dalla loro suscettibilità alla degradazione da parte dell'organismo ospite. La cinetica di degradazione del costrutto impiantato deve essere compatibile con quella di ricostruzione del tessuto, legata a sua volta alla secrezione della matrice extracellulare da parte delle cellule^[1].

I polimeri biodegradabili subiscono meccanismi di degradazione che si distinguono in^[9]:

- ✚ *Bulk erosion*, o degradazione in massa, fenomeno in cui la degradazione ha luogo all'interno del materiale con iniziale riduzione del peso molecolare delle catene polimeriche, fino alla perdita di massa in seguito alla diffusione delle catene polimeriche;
- ✚ *Surface erosion*, o degradazione superficiale, fenomeno in cui la degradazione ha inizio dalla superficie del costrutto, procedendo verso l'interno.

Il rilascio di prodotti acidi, in grado di provocare un'intensa reazione infiammatoria, costituisce una delle maggiori problematiche inerenti alla degradazione^[9].

Nell'ambito della rigenerazione del tessuto osseo, ad esempio, l'introduzione in fase di sintesi di calcio-fosfati, idrossiapatite o sali basici costituisce una delle possibili soluzioni per modulare la cinetica di degradazione della matrice polimerica e per favorire l'iniziale adsorbimento di proteine, riducendo l'idrofobicità superficiale e tamponando i prodotti acidi di degradazione.

La valutazione della velocità di degradazione di uno scaffold *in vivo* non è semplice, tuttavia si ritiene che la cinetica di degradazione sia più rapida *in vivo* che *in vitro* a causa della presenza dei fluidi fisiologici e del metabolismo cellulare.

4. Proprietà meccaniche

Le proprietà meccaniche di un supporto poroso per l'ingegneria dei tessuti sono determinanti nell'interazione tra biomateriale e ambiente biologico *in vivo*.

Per la rigenerazione del tessuto osseo, ad esempio, sono da ricercarsi *scaffold* con caratteristiche meccaniche adeguate per supportare i carichi fisiologici^[10], tuttavia la necessità di realizzare strutture porose in materiale polimerico riduce notevolmente le caratteristiche meccaniche, avvicinandosi solo ai valori di modulo elastico dell'osso trabecolare, meno resistente di quello compatto. Per quanto riguarda applicazioni per l'ingegnerizzazione di tessuti molli, ad esempio i vasi ematici, sono invece necessari costrutti con ottime proprietà di elasticità, *compliance* e resistenza a fatica per sopportare i continui cicli di carico ai quali sono sottoposti i vasi in ambiente fisiologico^[11].

5. Adesione cellulare e citocompatibilità

Un fattore indispensabile per la formazione di un nuovo tessuto, sano e maturo, è la corretta interazione tra il costrutto polimerico e la componente biologica.

Lo *scaffold* deve essere biocompatibile e dovrebbe garantire l'adesione e la proliferazione cellulare, promuovendo contemporaneamente lo sviluppo dell'espressione fenotipica desiderata per la rigenerazione di un tessuto funzionale^[12].

Al fine di valutare la biocompatibilità dei materiali utilizzati per la realizzazione di *scaffold*, sono stati sviluppati numerosi test *in vitro* e *in vivo*, tra cui:

Test di citocompatibilità indiretta^[13]

Queste prove sono eseguite per valutare l'eventuale rilascio di prodotti tossici per le cellule da parte del materiale utilizzato per la realizzazione dello *scaffold*.

Il polimero viene immerso in un terreno di coltura per un periodo di tempo prefissato (generalmente alcuni giorni) e successivamente lo stesso terreno viene impiegato per una eseguire una coltura cellulare. Se il materiale ha rilasciato sostanze tossiche, queste saranno diffuse nel terreno di coltura e verranno a contatto con le cellule.

Per la valutazione del grado di tossicità di eventuali prodotti rilasciati dal biomateriale si utilizzano, ad esempio, tecniche di colorazione in grado di distinguere le cellule vive dalle cellule morte.

✚ Test di citocompatibilità diretta^[13]

L'analisi della citocompatibilità diretta si esegue attraverso un saggio quantitativo della vitalità di cellule seminate sulla superficie del materiale, valutata in diversi istanti temporali. Misure in assorbanza o fluorescenza stimano la riduzione chimica di un indicatore *redox* come risultato della proliferazione cellulare e permettono di valutare la biocompatibilità della superficie del costrutto.

✚ Test di biocompatibilità *in vivo*^[13]

Nel caso in cui il biomateriale mostri compatibilità con la componente cellulare, risulta fondamentale valutarne l'interazione con i tessuti biologici di un organismo, *in vivo*. Esistono diverse tipologie di saggi *in vivo*, tutte regolate da rigide normative, come nel caso delle colture cellulari *in vitro*. Ad esempio, lo *scaffold* può essere impiantato in posizione sottocutanea in animali da laboratorio, generalmente ratti o topi (Figura 3). Per valutare i fenomeni di infiammazione acuta è necessario che il costrutto rimanga a contatto con i tessuti per un periodo di almeno quattro giorni. La valutazione istologica dei tessuti circostanti il sito d'impianto viene eseguita dopo il sacrificio dell'animale.

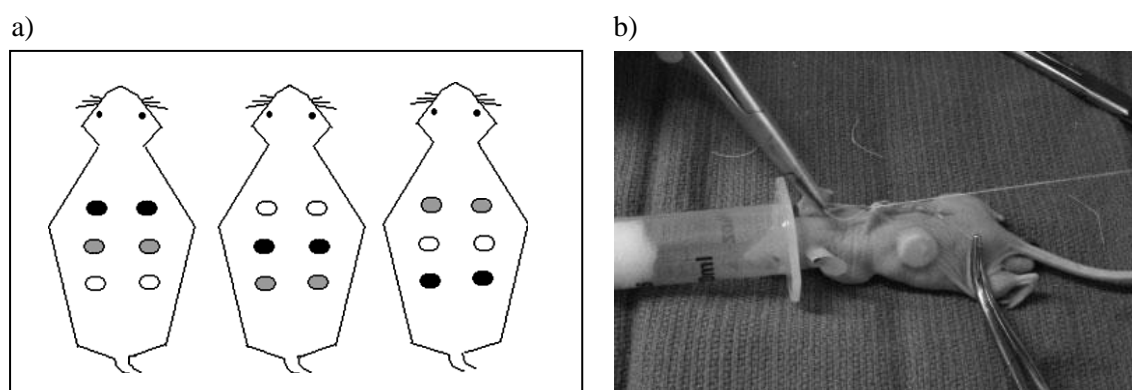


Figura 3. – (a) Esempio di schema di posizionamento di campioni polimerici impiantati nella regione dorsale di ratti. I tre colori identificano materiali diversi^[14]. (b) Scaffold poliuretano biodegradabile impiantato nella regione dorsale di un ratto^[15].

Poliuretani e ingegneria tissutale

I poliuretani rappresentano un'importante classe di materiali impiegati nel settore biomedicale; sono definiti poliuretani (PU) tutte le sostanze polimeriche contenenti legami uretanici [R – NH – CO – O – R'].

A questa categoria appartengono numerosi materiali con caratteristiche, quali densità e rigidità, che possono essere molto diverse tra loro, il che li rende potenzialmente utilizzabili per una vasta gamma di applicazioni. A seconda della loro struttura e composizione, questi materiali possono esistere in forma lineare (PU termoplastici, in genere a segmenti) oppure reticolata (PU termoindurenti), anche espansa (schiume rigide o flessibili)^[16].

In ambito biomedico i poliuretani lineari trovano applicazione nella realizzazione di dispositivi impiantabili a contatto con il sangue e con i tessuti molli, quali protesi cardiovascolari (ventricoli artificiali, protesi vascolari di piccolo calibro, valvole cardiache biomorfe, cateteri, guide di *pace-makers*), membrane, cannule, tubi endotracheali^[16]. I maggiori limiti dell'impiego di questi materiali in applicazioni a lungo termine sono la scarsa stabilità *in vivo* e la suscettibilità alla calcificazione *in vivo*. I fenomeni di idrolisi e di ossidazione costituiscono infatti un limite per impianti a lungo termine, in quanto possono comprometterne il successo; al contrario questi processi possono essere sfruttati per progettare materiali biodegradabili utilizzabili nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti^[17;18].

Nel presente lavoro di tesi verranno considerate in particolare i poliuretani espansi biodegradabili, le cui potenziali applicazioni risiedono nella produzione di *scaffold* per ingegneria dei tessuti, ad esempio per la rigenerazione della cartilagine articolare o del tessuto osseo spongioso. In quest'ultimo caso la tendenza dei poliuretani alla calcificazione si rivelerebbe un enorme vantaggio^[5;10;17;18].

Il grande vantaggio offerto dall'impiego dei poliuretani, rispetto ad altri materiali polimerici, per la realizzazione di *scaffold*, risiede nella grande versatilità di questi polimeri: attraverso un'appropriata selezione dei reagenti di base e dei loro rapporti stechiometrici, è possibile infatti ottenere materiali con differenti proprietà meccaniche, come ad esempio rigidità o flessibilità, e proprietà di biocompatibilità e biodegradabilità^[19;20]. In fase di sintesi, quindi, è possibile progettare materiali con proprietà meccaniche e strutturali desiderate per la specifica applicazione, che possiedano

contemporaneamente adeguate cinetiche di degradazione, per permettere la rigenerazione di un tessuto sano e maturo.

Progettando accuratamente la sintesi di questi materiali si possono ottenere, dunque, costrutti che soddisfano i requisiti di base di uno *scaffold*: elevata porosità, interconnessione dei pori, proprietà meccaniche simili a quelle dei tessuti circostanti il sito d'impianto, superficie chimicamente adeguata per adesione, crescita e proliferazione cellulare, biocompatibilità, biodegradabilità, o in alternativa, biointegrazione.

Si possono distinguere schiume biodegradabili e schiume biointegrabili^[21]. Le prime sono realizzate con espansi poliuretanic sintetizzati appositamente per subire il fenomeno di degradazione; la scelta dei reagenti di partenza determina tale caratteristica. Diversamente dalle schiume biodegradabili, gli espansi poliuretanic biointegrabili vanno incontro a modifiche delle proprietà chimico-fisiche e meccaniche molto lente nel tempo^[21].

Scopo della tesi

I poliuretani, famiglia di polimeri largamente utilizzata per la produzione di dispositivi nel campo dell'ingegneria biomedica, sono stati proposti, negli ultimi anni, come candidati per la realizzazione di supporti per la medicina rigenerativa. In questo settore sono necessari materiali espansi porosi, per permettere la colonizzazione dello *scaffold* da parte delle cellule, che possiedano proprietà di biodegradabilità, per agevolarne il riassorbimento da parte dell'organismo.

Oggetto del presente lavoro di tesi è l'indagine e l'analisi critica dei risultati di lavori presenti nella letteratura scientifica inerenti la progettazione di schiume poliuretatiche biodegradabili e le rispettive applicazioni come *scaffold* nell'ingegneria dei tessuti.

Nel Capitolo 3, inoltre, verranno descritte prove preliminari di sintesi di schiume poliuretatiche biodegradabili svolte presso il Laboratorio di Biomateriali.

Capitolo 1

1.1 Poliuretani

1.1.1 Reazioni per la sintesi di poliuretani

Si definiscono *poliuretani* i materiali polimerici preparati con una reazione di poliaddizione che conduce alla formazione di gruppi uretano [R-NH-CO-O-R'] e gruppi urea [R-NH-CO-NH-R']. In fase di sintesi è possibile variare la composizione chimica, al fine di ottenere polimeri con proprietà molto diverse: flessibilità o rigidità, materiali termoindurenti o termoplastici, espansi o compatti^[1.1].

Questi polimeri possono esistere in diverse forme, a seconda della loro composizione e della loro struttura; è possibile ottenere macromolecole lineari (poliuretani termoplastici) partendo da reagenti difunzionali. Utilizzando monomeri trifunzionali o polifunzionali si ottengono materiali reticolari (poliuretani termoindurenti) ed espansi (schiume poliuretatiche)^[1.1].

La caratteristica che contraddistingue i poliuretani dagli altri polimeri è la presenza del gruppo uretano, che si forma durante la reazione di poliaddizione:



Il gruppo R, appartenente al monomero contenente il gruppo isocianato (-NCO), e il gruppo R', appartenente al diolo (monomero con gruppi ossidrilici (-OH)), influenzano le proprietà del polimero ottenuto.

Uno dei grandi vantaggi offerti dalla chimica dei poliuretani risiede nella possibilità di produrre materiali partendo da reagenti allo stato liquido; ciò contribuisce a semplificare e ad accelerare i processi industriali di produzione^[1.2].

Nella preparazione dei poliuretani è possibile seguire due differenti procedure:

- ✚ Sintesi a singolo stadio: in questo processo si esegue una reazione diretta tra diisocianato, macroglicole e diolo;
- ✚ Sintesi a due stadi: inizialmente diisocianato e poliolo reagiscono a formare un prepolimero; in seguito, il macromonomero ottenuto reagisce con l'estensore di catena, producendo un polimero ad elevato peso molecolare.

Il processo di poliaddizione per la sintesi dei poliuretani possiede le seguenti peculiarità^[1,2]:

- ✚ è disponibile un gran numero di reagenti differenti;
- ✚ la reazione è esotermica e può avvenire a temperatura ambiente;
- ✚ la velocità di reazione può essere controllata da un'ampia gamma di catalizzatori;
- ✚ la scelta dei rapporti stechiometrici tra i reagenti influenza la massa molecolare del polimero e le sue proprietà strutturali;
- ✚ la composizione può essere scelta per ottenere prodotti con diversi requisiti, ad esempio flessibilità o rigidità.

La sintesi a singolo stadio è fortemente esotermica, con temperature che possono raggiungere i 180°C, e la reazione può durare da 0.5 a 30 minuti, a seconda del catalizzatore scelto^[1,2] (per i catalizzatori utilizzati nella sintesi dei poliuretani si veda il paragrafo 1.1.2.3).

Il processo basato sulla sintesi del prepolimero ha il vantaggio di agevolare il controllo della reazione, di diminuire il quantitativo di diisocianato libero (quindi di ridurre il grado di tossicità) e di abbassare l'esotermicità della reazione. Lo svantaggio principale di questa tecnica risiede tuttavia nella sintesi del prepolimero, che aumenta i costi globali di produzione^[1,3].

1.1.2 Reagenti per la sintesi di poliuretani

1.1.2.1 Isocianato

Il monomero isocianato [OCN – R – NCO] può avere due, tre o più gruppi (-NCO) in grado di reagire con il gruppo ossidrilico e quindi può essere difunzionale, trifunzionale o polifunzionale. I gruppi R possono essere uno o più anelli aromatici, gruppi alifatici o cicloalifatici.

Più del 90% dei poliuretani sono prodotti da isocianati aromatici che hanno un'elevata reattività verso i composti idrossilici e conferiscono al prodotto finito proprietà meccaniche migliori rispetto ai monomeri alifatici e cicloalifatici^[1,2].

Gli isocianati maggiormente utilizzati sono il metilene-bis-fenilisocianato, comunemente chiamato MDI, e il toluene diisocianato, detto TDI (Figura 1.1 d). Esistono diverse tipologie di monomeri MDI che differiscono l'una dall'altra per la loro struttura chimica (Figura 1.1 a,b,c).

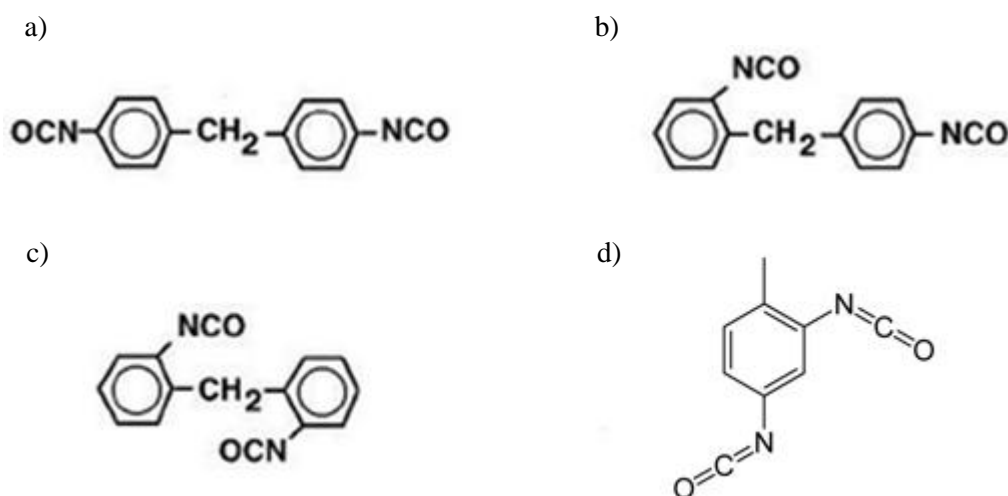


Figura 1.1 – a) 4,4' MDI; b) 2,4 MDI; c) 2,2' MDI; d) TDI^[1,4].

Il diisocianato più utilizzato in campo biomedicale è il 4,4'- difenilmetano diisocianato (MDI)^[1,5]; esso è di tipo aromatico, più reattivo rispetto ad un isocianato alifatico, grazie alla configurazione elettronica degli anelli benzenici presenti. Questo reagente può essere impiegato in forma pura (4,4'-MDI puro, Figura 1.1 a) oppure sotto forma di miscele a composizione variabile di isomeri 2,4' e 2,2' (Figura 1.1 b, c).

Per quanto riguarda gli isocianati alifatici, quelli maggiormente utilizzati sono l' 1,6-esametilene diisocianato e il 4,4'-dicicloesilmetano diisocianato (Figura 1.2).

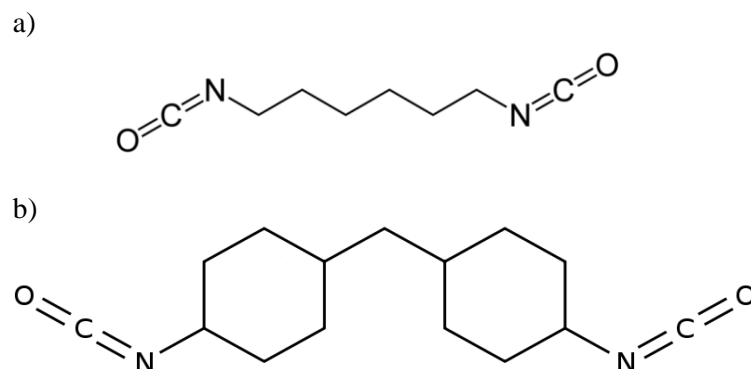


Figura 1.2 – a) 1,6-esametilene diisocianato; b) 4,4'-dicicloesilmetano diisocianato^[1.4].

1.1.2.2 Poliolo

I gruppi R' del monomero idrossile appartengono a tre famiglie principali: poliesteri, polieteri e policarbonati, da cui dipendono le proprietà chimico-fisiche e meccaniche del poliuretano ottenuto. In fase di sintesi è possibile utilizzare monomeri difunzionali (dioli), trifunzionali o polifunzionali^[1.1].

- ✚ I poliesteri sono impiegati per la produzione di poliuretani sia rigidi che flessibili, in forma compatta o espansa, dotati di ottima resistenza chimica, resistenza fisica a flessione e abrasione e buone proprietà elastomeriche; tuttavia, risultano suscettibili a idrolisi.
- ✚ I polieteri sono utilizzati per l'ottenimento di poliuretani flessibili, sono più resistenti all'idrolisi rispetto ai poliesteri, ma subiscono ossidazione.
- ✚ I policarbonati mostrano maggiore resistenza sia all'idrolisi che all'ossidazione ed esibiscono buona stabilità strutturale.

I polioli utilizzati per la produzione di poliuretani possono essere a basso peso molecolare (PM nell'ordine dei 100 g/mole, ad esempio il butandiolo) oppure ad alto peso molecolare (PM mediamente nell'ordine degli 8000 g/mole).

Il peso molecolare dei polioli maggiormente utilizzati è compreso tra 500 e 6000 g/mole^[1,2], i dioli a basso peso molecolare hanno funzione di estensori di catena (cioè servono ad incrementare il peso molecolare delle catene polimeriche), mentre quelli a peso molecolare elevato sono definiti macrodioli. La lunghezza della catena del poliolo determina le proprietà meccaniche del prodotto finale; più estesa è la catena, più flessibile è il poliuretano. Dioli corti e strutture reticolate danno luogo a poliuretani rigidi.

1.1.2.3 Catalizzatori^[1,2]

Per controllare la velocità di reazione sono di norma impiegati agenti con proprietà catalizzanti. Il gruppo isocianato è sensibile a molti tipi di catalizzatore: acidi e basi di Lewis, catalizzatori metallici, sali alcalini di acidi organici e particolari fenoli.

La catalisi relativa alle reazioni dei poliuretani è estremamente complessa a causa dei numerosi fattori che la influenzano, come ad esempio l'effetto catalitico esercitato dal gruppo uretanico stesso. In generale, i catalizzatori metallici attivano il gruppo isocianato incrementandone il carattere elettrofilo, mentre le basi rendono maggiormente nucleofili i gruppi ossidrili.

Tra i catalizzatori più diffusi troviamo ammine alifatiche terziarie e sali organici di stagno.

1.1.3 Struttura e morfologia dei poliuretani lineari^[1,1;1,2]

I poliuretani possono presentare una vasta gamma di proprietà, che sono influenzate dalla composizione chimica, dalla lunghezza delle catene polimeriche e dalle interazioni fisiche tra le stesse.

I poliuretani lineari a segmenti sono prodotti dalla reazione di tre diverse molecole: diisocianato, macroglicole ed estensore di catena (diolo o diammina a basso peso molecolare). Il risultato dell'interazione di questi tre elementi è un copolimero a blocchi, caratterizzato da una struttura (Figura 1.3) in cui si alternano segmenti *soft* (costituiti dal macrodiolo) e segmenti *hard* (costituiti da isocianato ed estensore di catena).

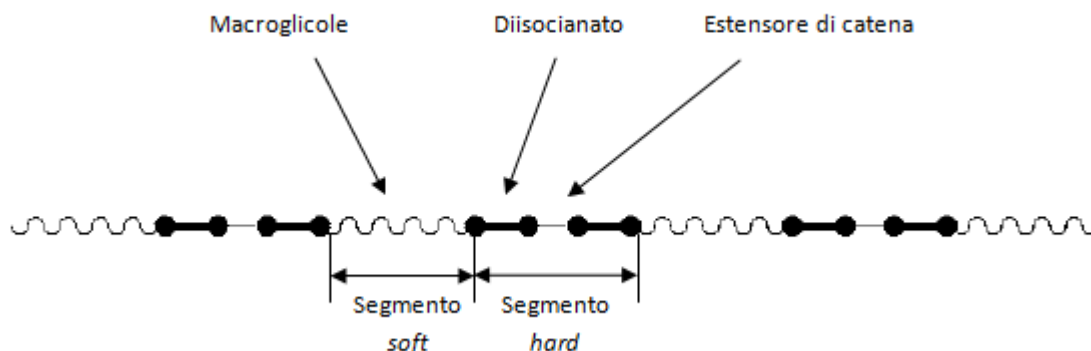


Figura 1.3 – Schema della struttura di un poliuretano lineare a segmenti^[1,2].

L'incompatibilità fisica tra i due tipi segmenti porta alla formazione di una struttura bifasica, in cui i domini *hard* sono dispersi in una matrice costituita dai segmenti *soft* (Figura 1.4).

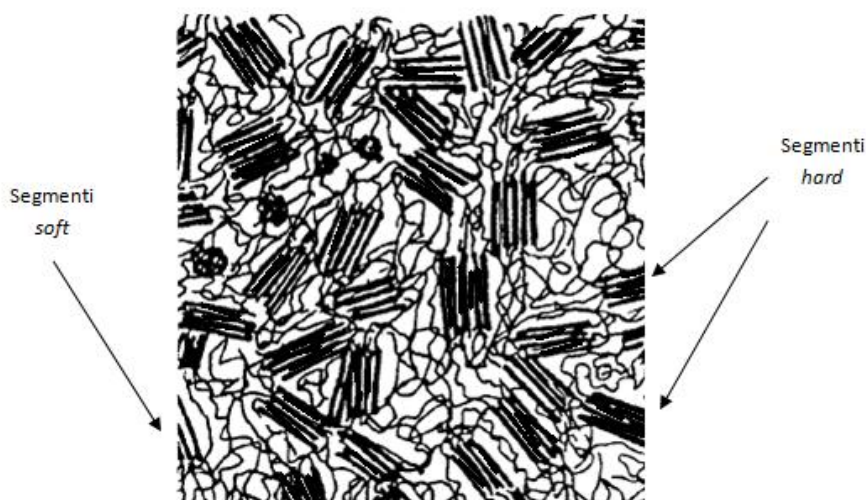


Figura 1.4 – Struttura bifasica caratteristica dei poliuretani lineari a segmenti^[1,2].

I segmenti *hard* interagiscono tra loro mediante interazioni non covalenti (legami intermolecolari, quali legami a idrogeno e forze di Van der Waals), formando domini semicristallini o vetrosi, a seconda della temperatura, all'interno della matrice polimerica amorfa e flessibile composta dai segmenti *soft*. L'elevato numero di ponti idrogeno tra i gruppi (NH) e (C=O) di catene adiacenti determina un'elevata forza d'interazione, in grado, tuttavia, in presenza di un carico, di permettere spostamenti e riarrangiamenti nella

disposizione delle molecole polimeriche. Dal momento che segmenti *hard* e *soft* sono uniti da legami covalenti, lo scorrimento delle catene è limitato e ciò, unito alle numerose interazioni fisiche tra le catene, determina le proprietà elastomeriche tipiche dei poliuretani a segmenti. La risposta meccanica di questi materiali dipende quindi dalla composizione chimica e dal contenuto dei diversi segmenti. Un numero elevato di domini *hard* ne incrementa la durezza, il modulo elastico e la resistenza meccanica, mentre al crescere del numero dei segmenti *soft* aumenta l'allungamento in campo elastico e diminuisce la temperatura di transizione vetrosa.

Progettandone accuratamente la sintesi, è quindi possibile realizzare materiali con proprietà adatte alle specifiche applicazioni.

1.2 Poliuretani espansi

1.2.1 Reazioni per la sintesi di poliuretani espansi

Il termine *espanso* si riferisce ad una classe di materiali caratterizzati da una struttura a celle, con spigoli e pareti solide delimitanti uno spazio contenente un gas. Durante il fenomeno di espansione, la formazione di bolle di gas all'interno della miscela viscosa di reazione determina la formazione dei pori.

Esistono diverse strutture cellulari, la più semplice e regolare è quella a nido d'ape composta da celle prismatiche parallele, mentre la struttura più comune è quella irregolare, tipica degli espansi polimerici (Figura 1.5).

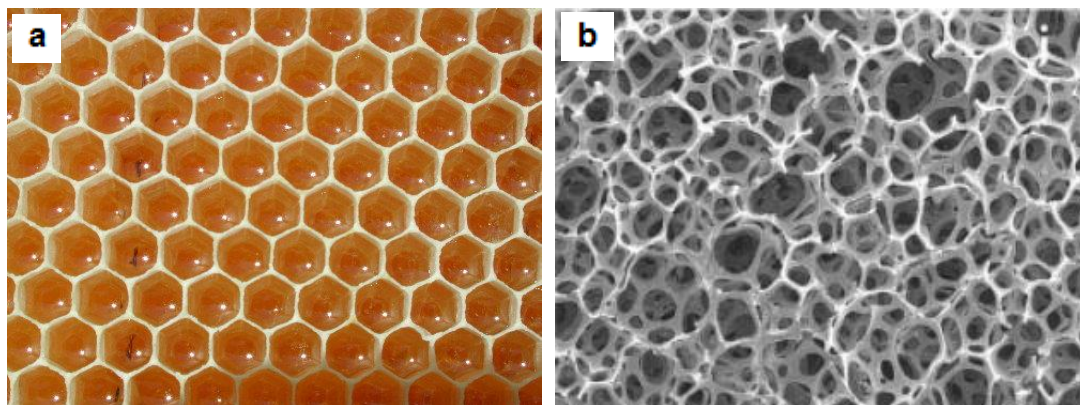


Figura 1.5 – Esempi di strutture cellulari: (a) struttura a nido d'ape^[1.6]; (b) espanso polimerico a celle aperte^[1.7].

La porosità influenza fortemente le proprietà meccaniche degli espansi polimerici e determina il grado di flessibilità o di rigidità della schiuma. In particolare, se le pareti dei pori sono identificabili con superfici fisiche, si dice che l'espanso è a pori chiusi poiché il gas vi rimane confinato all'interno (schiume rigide), altrimenti l'espanso è detto a pori aperti, dal momento che il gas è libero di spostarsi da una cavità all'altra (schiume flessibili). Esistono inoltre espansi con morfologia a porosità parzialmente aperta (semi-aperta).

Gli espansi poliuretanicici, detti anche *schiume*, sono sintetizzati a partire da una miscela composta da tre reagenti principali: isocianato, poliolo e agente espandente (per il ruolo degli agenti espandenti, tra cui liquidi bassobollenti e gas, si veda il paragrafo 1.2.3.1)^[1.2]. La produzione degli espansi è il risultato di una combinazione di processi chimici, fisici e reologici e in fase di sintesi possono essere introdotti additivi (ad esempio stabilizzanti, coloranti, agenti rinforzanti) e catalizzatori per aumentare la velocità di reazione^[1.2].

In pochi minuti la massa polimerica si trasforma in una struttura espansa, il cui volume può essere riempito di aria fino al 99%^[1.8]. Nonostante la complessità del sistema, la chimica utilizzata per descrivere tale processo risulta piuttosto semplice.

Come nel caso dei poliuretani lineari è possibile eseguire processi di sintesi a singolo stadio oppure a due stadi.

Le due reazioni principali che hanno luogo durante la sintesi dei poliuretani espansi sono conosciute come reazione di gelificazione (*gelling*, Figura 1.6) e reazione di espansione (*blowing*, Figura 1.7)^[1.8].

La reazione di gelificazione avviene tra il monomero isocianato e i gruppi ossidrilici del poliolo, a formare legami uretano responsabili dell'innalzamento del peso molecolare e della viscosità del polimero.

La reazione di espansione è il risultato dell'interazione tra molecole d'acqua (l'acqua viene comunemente utilizzata per dare luogo alla formazione del gas porogeno durante la sintesi dei poliuretani espansi) e gruppi isocianato in rapporto stechiometrico 1:2, in due passaggi successivi. Inizialmente l'acqua reagisce con l'isocianato producendo acido carbammico, composto intermedio che in breve tempo si decompone a dare un'ammina e anidride carbonica. L'anidride carbonica è l'agente porogeno, responsabile della formazione della schiuma. L'ammina reagisce con un secondo gruppo isocianato a dare un legame urea.

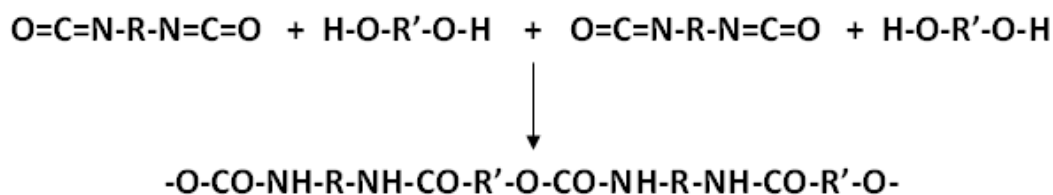


Figura 1.6 – Rappresentazione schematica della reazione di gelificazione^[1.2].

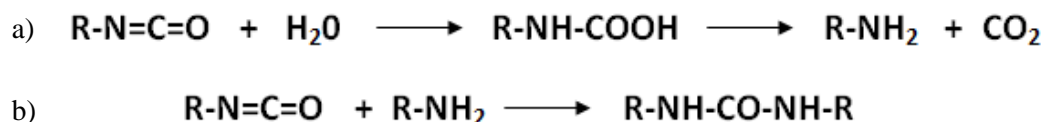


Figura 1.7 – Rappresentazione schematica della reazione di espansione^[1.2].

Come si osserva dalla reazione precedente, il gruppo terminale dell'isocianato reagisce con l'acqua e si decompone spontaneamente in anidride carbonica (CO₂) e ammina (NH₂) (Figura 1.7 a). Il gruppo amminico reagisce istantaneamente con l'isocianato, portando alla formazione di un gruppo urea (-NH-CO-NH-) (Figura 1.7 b). Il macromonomero risultante può reagire nuovamente con l'acqua. L'anidride carbonica generata agisce come agente porogeno nella fase di polimerizzazione del poliuretano.

Per ottenere un espanso stabile è necessario che le velocità delle reazioni descritte in precedenza, che avvengono in concomitanza, siano simili. In seguito all'innesco delle reazioni di *gelling* e di *blowing* la schiuma inizia la propria espansione finché la massa polimerica raggiunge il punto di gelificazione, in prossimità del quale si registra un aumento della viscosità del sistema^[1.9]. È necessario che la formazione di pori all'interno della miscela avvenga prima che la schiuma raggiunga il punto di gelificazione, per dare luogo ad un materiale stabile che non vada incontro a collasso^[1.9].

Per completezza, occorre ricordare che il monomero isocianato può reagire con qualsiasi composto idrogenato, inclusi i gruppi uretani o urea formati in precedenza^[1.8]. Questi fenomeni di *crosslink* avvengono generalmente in ogni reazione di espansione e sono caratterizzati da cinetiche più lente rispetto alle reazioni di gelificazione ed espansione^[1.8]. In fase di sintesi, occorre quindi scegliere accuratamente il quantitativo di isocianato da utilizzare, considerando che una quantità eccessiva di isocianato dà luogo a queste reazioni secondarie che incrementano la rigidità della schiuma.

Nella chimica dei poliuretani si introduce l'indice isocianato (*isocyanate index*), definito come il rapporto percentuale tra la quantità di gruppi isocianato e i gruppi ossidrilici presenti nella miscela^[1.8]. Questo indice viene utilizzato per influenzare la struttura dell'espanso, determinando il grado di reticolazione tra le molecole polimeriche, che aumenta al crescere dell'indice isocianato. Un valore pari a 100 indica che nella formulazione è presente un quantitativo di isocianato esattamente sufficiente per reagire con l'acqua e con tutti i gruppi ossidrilici, un valore pari a 110 indica che la schiuma è stata prodotta con il 10% di isocianato in eccesso.

Anche nel caso in cui l'indice di isocianato sia superiore a 100, nel prodotto finito non esistono gruppi isocianato non reagiti e ciò significa che l'isocianato in eccesso deve necessariamente reagire con gruppi urea e uretano. Incrementando l'indice si ottengono schiume più rigide, a cause delle reticolazioni indotte dalle interazioni tra isocianato e gruppi urea e uretano.

La maggior parte delle schiume poliuretaniche flessibili ha un indice compreso tra 90 e 110, tuttavia è possibile realizzare prodotti con indici differenti per specifiche applicazioni^[1.8].

1.2.2. Curva di crescita di un poliuretano espanso^[1.2,1.10]

Durante la formazione dell'espanso, si possono identificare alcuni punti caratteristici in un grafico (Figura 1.8) nel quale si riporta l'andamento del volume specifico della schiuma in funzione del tempo di reazione^[1.10].

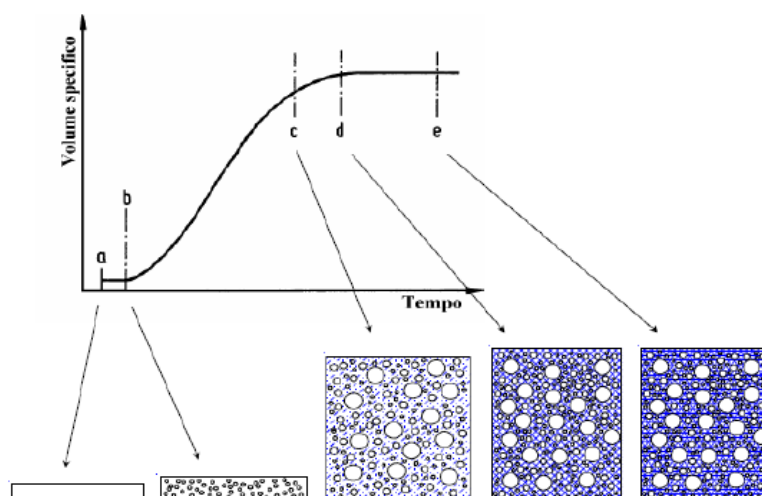


Figura 1.8 – Curva di crescita di un poliuretano espanso: (a) tempo di fine miscelazione; (b) tempo di crema; (c) tempo di filo; (d) tempo di fine crescita; (e) tempo di impronta^[1.10].

Il punto 'a' identifica il tempo di fine miscelazione, mentre il tempo 'b' è definito tempo di crema e rappresenta l'istante in cui la massa di reazione passa da un colore bruno ad un colore crema. Questa variazione di tonalità è da attribuire alla formazione di microbolle di CO₂ all'interno della miscela viscosa ed è legata alla velocità di reazione isocianato-acqua. A questa reazione è riconducibile anche il tempo 'd', chiamato tempo di fine crescita, in cui l'espansione ha termine e l'espanso raggiunge il volume specifico finale.

Nell'arco della reazione, la viscosità incrementa esponenzialmente e, al tempo di filo, individuato dal punto 'c', il polimero comincia ad assumere caratteristiche sempre più simili a quelle di un solido.

Il tempo di impronta, in corrispondenza dell'istante 'e', identifica il raggiungimento di una condizione simile a quella del prodotto finito, in cui la superficie risulta meno "appiccicosa".

I punti 'c' ed 'e' dipendono dal grado di reattività dei reagenti scelti e per questa ragione la loro posizione è determinata dalla composizione della miscela; al contrario i punti 'b' e 'd' sono fissi sul grafico e sono identificati dal passaggio della derivata della curva dal valore zero ad un valore positivo e viceversa. Il corretto posizionamento del punto 'c' risulta un fattore critico nel processo di produzione dei poliuretani espansi.

1.2.3 Reagenti per la sintesi di poliuretani espansi

Tra i reagenti utilizzati per la sintesi di poliuretani espansi, oltre ad isocianati e polioli, utilizzati con la stessa funzione vista nella trattazione dei poliuretani lineari, vengono impiegati agenti espandenti, surfattanti e specifici catalizzatori. Nei prossimi paragrafi, quindi, verranno descritti gli agenti espandenti, i surfattanti e i catalizzatori impiegati per la produzione di schiume poliuretaniche.

Per quanto concerne i polioli, quelli maggiormente impiegati per la sintesi di poliuretani espansi rigidi (si veda il paragrafo 1.2.4) sono poliesteri e polieteri a basso peso molecolare (inferiore a 1000 g/mole); mentre per la produzione di poliuretani espansi flessibili (si veda il paragrafo 1.2.5) sono impiegati poliesteri e polieteri ad elevato peso molecolare (2000 ÷ 8000 g/mole). Tra gli isocianati più utilizzati per la produzione di espansi, sia rigidi che flessibili, troviamo toluene diisocianato (TDI) e metilene-bis-fenilisocianato (MDI).

1.2.3.1 Agenti espandenti

Gli agenti espandenti sono responsabili della formazione della schiuma e tra i più utilizzati troviamo liquidi bassobollenti (come idrocarburi alifatici o alcoli) e gas (ad esempio aria o CO₂)^[1.10].

Nel caso in cui l'agente espandente sia prodotto durante la reazione di sintesi, l'espansione è detta *chimica*; al contrario, se esso agisce attraverso fenomeni di tipo fisico (ad esempio passaggi di stato), senza l'intervento di reazioni chimiche, l'espansione è definita *fisica*^[1.10].

Nella produzione di poliuretani in forma espansa l'acqua, impiegata come agente espandente, svolge un ruolo fondamentale. Essa reagisce con il monomero isocianato a produrre anidride carbonica (CO₂), provocando l'espansione della miscela di reazione nella fase di polimerizzazione e permette di ottenere un espanso. Per la produzione di schiume flessibili vengono generalmente fissati rapporti massici acqua/poliolo compresi tra 1 e 6%^[1.8], mentre per le schiume rigide spesso si combina l'utilizzo di acqua e liquidi bassobollenti. La reazione tra le molecole d'acqua e i monomeri isocianato è fortemente esotermica e in fase di sintesi la temperatura della miscela può raggiungere i 175°C gradi^[1.9].

1.2.3.2 Surfattanti^[1.8]

I surfattanti sono additivi multifunzionali essenziali per la realizzazione di poliuretani espansi. Questi agenti fungono da stabilizzanti e ricoprono tre funzioni fondamentali durante il processo di espansione.

Il primo compito di un surfattante consiste nel ridurre la tensione superficiale all'interno della miscela di reazione, in modo tale da permettere la formazione di pori. La seconda funzione è quella di emulsionare acqua, poliolo, isocianato ed eventuali additivi per agevolare la formazione di un espanso con caratteristiche morfologiche omogenee.

Durante la fase di crescita si registra la formazione di celle e pori all'interno della miscela, ulteriore ruolo del surfattante è quello di stabilizzarne la creazione e di permetterne contemporaneamente la rottura, per favorire la formazione di una struttura a celle aperte.

Esistono diverse tipologie di surfattanti e ciascuna è specifica per una precisa formulazione. Ad esempio, i surfattanti realizzati per schiume a base di poliesteri non funzionano correttamente in sistemi a base di polietere, e viceversa.

A livello industriale la maggior parte dei surfattanti impiegati appartiene alla classe dei copolimeri a blocchi polisilossani-polieteri; in ambito biomedicale sono utilizzati anche stabilizzanti di origine naturale come fosfolipidi, sali metallici di acidi grassi, lecitina e vitamina D₃^[1.9; 1.11-1.13].

1.2.3.3 Catalizzatori^[1.8]

Generalmente le schiume poliuretatiche prodotte a livello industriale raggiungono la massima crescita in meno di 2 minuti. L'elevata velocità di reazione migliora l'efficienza di produzione e minimizza l'intervallo di tempo critico tra l'espansione e la gelificazione, conferendo al prodotto buone proprietà strutturali. Schiume con velocità di reazione inferiori sono soggette a morfologie scarsamente porose, con possibili fenomeni di instabilità e collasso.

A temperatura ambiente i monomeri isocianato reagiscono molto lentamente con acqua e gruppi ossidrilici, per questa ragione vengono utilizzati catalizzatori per accelerare la reazione e controllare la crescita della schiuma. Come già visto, esistono diverse reazioni chimiche che hanno luogo durante il processo di espansione e ogni catalizzatore influenza una reazione in modo differente. Alcuni catalizzatori vengono impiegati per accelerare la reazione tra poliolo e isocianato (*gel catalysts*), altri catalizzatori sono utilizzati per ottimizzare l'interazione tra isocianato e acqua che conduce alla formazione del gas espandente (*blow catalysts*).

Molti composti organometallici possiedono proprietà catalizzanti, i più comuni sono l'octoato di stagno e il dibutiltindilaurato. Inoltre, anche le tri-alchilammine sono utilizzate come catalizzatori delle reazioni di gelificazione.

Per accelerare la reazione di espansione sono impiegate ammine terziarie con 2 atomi di carbonio interposti tra il gruppo amminico catalitico e un'altra ammina terziaria o un gruppo etere. Questa struttura è in grado di formare un complesso con molecole d'acqua, aumentandone la reattività verso i gruppi isocianato^[1.14].

1.2.4 Schiume poliuretatiche rigide

Gli *espansi poliuretatici rigidi* sono stati introdotti per applicazioni industriali come isolanti a partire dagli anni '50^[1,3]. Questi materiali possono essere realizzati in processi a uno stadio o a due stadi, utilizzando toluene diisocianato (TDI) oppure metilene-bis-fenilisocianato (MDI)^[1,3].

Per la produzione di questa tipologia di schiume, caratterizzate da una porosità di tipo chiuso, gli agenti espandenti non sono utilizzati con il solo scopo di conferire al materiale una forma espansa, ma, dal momento che rimangono confinati all'interno dei pori chiusi, essi influenzano le proprietà isolanti del materiale (ad esempio in termini di isolamento termico)^[1,2]. La scelta dell'agente espandente dipende dalla specifica applicazione e nella maggior parte dei casi si utilizza la combinazione di un agente fisico (un liquido basso bollente oppure un gas) con un agente chimico (solitamente CO₂ formata dalla reazione tra acqua e isocianato)^[1,2].

Le schiume poliuretatiche rigide possono essere distinte in schiume poliuretatiche (*PU foams*) e poliisocianurati (*PIR foams*)^[1,3]. Alla prima categoria appartengono schiume prodotte dalla reazione di isocianati (solitamente MDI) con polioli a basso peso molecolare (inferiore a 1000 g/mole); i poliisocianurati sono sintetizzati invece a partire da quantitativi di isocianato più elevati rispetto a quelli stechiometrici (maggiori del 50%), in presenza di particolari catalizzatori a base di sali metallici.

L'eccesso di isocianato (in questo caso l'*isocyanate index* risulta maggiore di 100) gioca un ruolo chiave nella produzione di poliisocianurati in quanto l'isocianato in eccesso reagisce con se stesso a formare gruppi isocianurati trimerici ciclici.

La struttura finale del materiale contiene sia gruppi uretano sia gruppi isocianurato e tali composti risultano termicamente più stabili rispetto alle *PU foams*, mostrando una maggiore resistenza alle elevate temperature^[1,3].

Il rapido incremento dell'utilizzo di schiume poliuretatiche rigide, dopo la loro introduzione sul mercato agli inizi degli anni '50, è da attribuire principalmente alla stabilità e resistenza all'acqua, oltre che alla bassa conducibilità termica.

I primi espansi rigidi prodotti a livello industriale per applicazioni di isolamento mostravano valori di conducibilità termica intorno ai 32 mW/m*K a 10°C e possedevano generalmente una struttura a celle aperte, che determina l'abbassamento delle proprietà isolanti. I nuovi espansi, con struttura a celle chiuse, sono essenzialmente impermeabili

all'acqua e mediante l'utilizzo in fase di espansione di gas con basso coefficiente di conducibilità termica i valori di conducibilità del materiale vengono ridotti a $17 \text{ mW/m}\cdot\text{K}^{[1.3]}$.

Nelle applicazioni industriali lo spessore degli strati isolanti può essere dimezzato rispetto a quello utilizzato con i materiali precedenti; è tuttavia da sottolineare come le *performance* isolanti di questi nuovi materiali a celle chiuse diminuiscano progressivamente nel tempo in seguito alla fuoriuscita dell'agente espandente all'esterno del materiale, causata da fenomeni diffusivi.

La densità standard è compresa tra 25 e 60 Kg/m^3 , ma possono essere realizzate schiume con valori di densità che raggiungono i 200 Kg/m^3 ^[1.2]. Proprietà meccaniche quali resistenza a trazione, resistenza a compressione e modulo elastico sono importanti per applicazioni in cui è richiesto il supporto di carichi e i valori di questi parametri crescono con l'aumentare della densità^[1.2] (Figura 1.9).

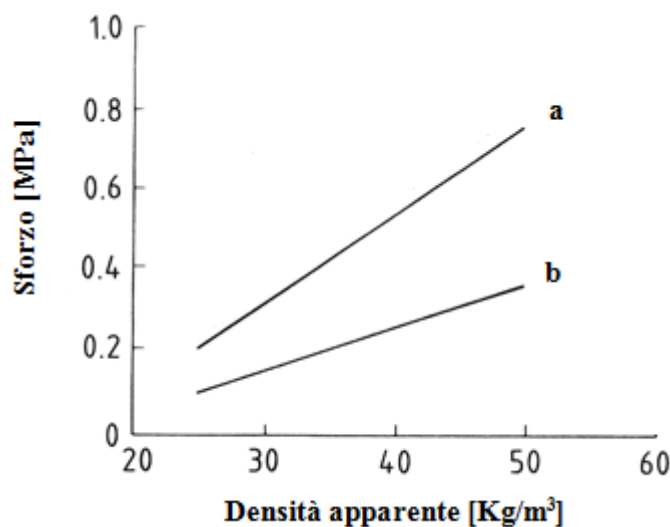


Figura 1.9 – Relazione tra sforzo e densità apparente di una schiuma poliuretanicica rigida:
a) sforzo di trazione; b) sforzo di compressione^[1.2].

Le maggiori applicazioni di queste schiume sono legate alle eccellenti proprietà di isolamento termico (Figura 1.10) e sono da ricercarsi nell'ambito degli elettrodomestici (frigoriferi, congelatori), dell'isolamento termico di serbatoi, tubazioni e dei pannelli per l'edilizia^[1.2].

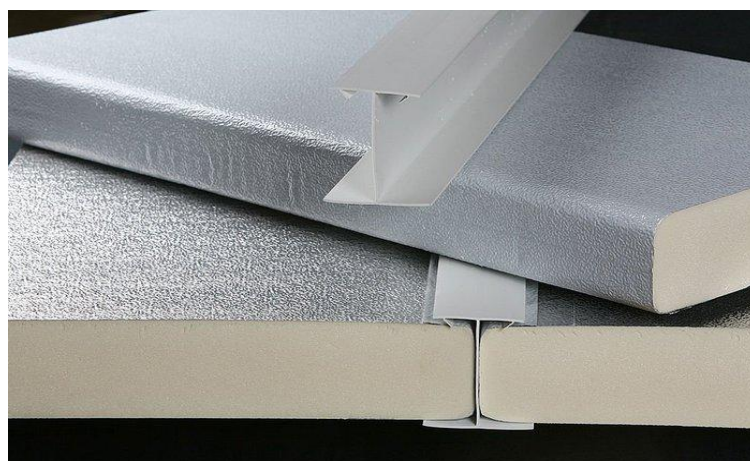


Figura 1.10 – Pannelli isolanti realizzati con schiume poliuretaniche rigide^[1.15].

1.2.5 Schiume poliuretaniche flessibili

La prima pubblicazione scientifica riguardante le *schiume poliuretaniche flessibili* (Figura 1.11) risale agli anni '40, in Germania^[1.16], ad opera di Otto Bayer.



Figura 1.11 – Esempio di schiuma poliuretaniche flessibile^[1.17].

A partire dai primi esperimenti, si sviluppò un'ampia produzione a livello industriale e nell'arco di un decennio sorsero centri manifatturieri sia in Europa sia in Nord America. Nell'anno 2000 sono state prodotte in tutto il mondo più di 3 tonnellate di questi materiali, l'industria è in continua espansione verso nuovi mercati e nuove tipologie di espansi sono costantemente sviluppate per soddisfare le richieste dei consumatori^[1.8].

A differenza delle schiume rigide, le schiume flessibili sono caratterizzate da una morfologia a celle aperte e interconnesse, il cui volume è riempito al 99% da aria^[1.8].

I polioli comunemente utilizzati per l'ottenimento delle schiume flessibili sono ad elevato peso molecolare (2000 ÷ 8000 g/mole), con una funzionalità compresa tra 2 e 6, mentre per quanto concerne gli isocianati, il toluene diisocianato (TDI) risulta quello più impiegato a livello industriale^[1.2].

Le proprietà meccaniche di questi materiali sono determinate dai reagenti, dalla formulazione scelta e dalla densità apparente. La densità standard è generalmente compresa tra 20 e 40 Kg/m³, tuttavia per specifici campi di applicazione è possibile produrre schiume ultraleggere e ultraspesanti (da 16 a 130 kg/m³)^[1.2]. La scelta della densità è determinata dalla tipologia di utilizzo del prodotto.

La durezza, misurata come lo sforzo corrispondente ad un valore di compressione pari al 40%^[1.2], è una proprietà importante delle schiume flessibili che può essere controllata entro ampi limiti, variando i rapporti stechiometrici tra i reagenti.

Oltre alla durezza, altre proprietà caratteristiche delle schiume flessibili possono essere ricavate analizzando il ciclo di isteresi della curva sforzo - deformazione: la pendenza della curva di carico e l'area sottesa tra le curve di carico e scarico (isteresi) sono misure dell'elasticità e dell'energia assorbita dalla schiuma (Figura 1.12).

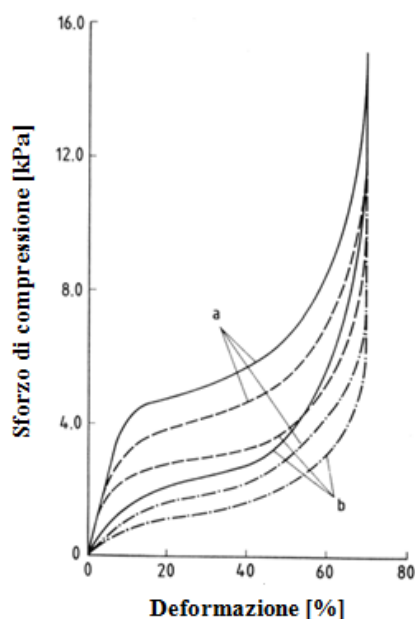


Figura 1.12 – Cicli d'isteresi relativi a schiume flessibili di diversa composizione
 a) Curve di carico; b) Curve di scarico; - Schiuma a base di poliuretano; --- Schiuma a base di poliuretano;
 - - - - Schiuma con proprietà di elevata resilienza, a base di poliuretano^[1.2].

La conoscenza di questi parametri è necessaria per la produzione di schiume con proprietà adatte alla specifica applicazione; ad esempio, la stima della durezza e dell'energia assorbita è fondamentale per applicazioni in cui gli espansi sono utilizzati come ammortizzatori o riempitivi. In questi casi è importante conoscere quanta forza è necessaria per dare luogo ad una particolare deformazione del materiale, oppure qual è il massimo carico supportato dall'espanso.

Per un espanso con proprietà elastiche la curva di carico approssima quella di scarico; al contrario un'ampia area di isteresi è indice di dissipazione di energia^[1,2].

La vasta gamma di proprietà e il continuo sviluppo di nuove tipologie di espansi hanno reso questi prodotti indispensabili per molte applicazioni. Ad esempio, schiume flessibili sono impiegate nel settore dell'arredamento (materassi, cuscini, tappeti), nel settore dell'*automotive* (riempitivi, isolanti acustici), a livello industriale come materiali per l'imballaggio e l'isolamento termico^[1,2].

Esistono inoltre numerosi ambiti di applicazione per i quali sono necessarie schiume con particolari requisiti tecnici, che vengono prodotte in bassi volumi. Queste applicazioni richiedono dimensioni e struttura dei pori controllate, particolari caratteristiche di porosità e specifiche proprietà meccaniche (ad esempio per la produzione di *scaffold* per *soft tissue engineering*).

1.2.6 Produzione e *processing* di schiume poliuretatiche^[1,2]

A livello industriale, le schiume poliuretatiche rigide e flessibili sono prodotte seguendo due tecniche principali: processi di schiumatura in continuo oppure di schiumatura in *batch* all'interno di stampi.

Con il processo di schiumatura in continuo (Figure 1.13-1.14,) si realizzano blocchi di poliuretano espanso di grandi dimensioni, mediante l'utilizzo di un nastro trasportatore in movimento. Le colate di poliuretano espanso in lastre assumono dimensioni approssimative di 220 cm di larghezza e 120 cm di altezza, mentre la lunghezza varia in un ampio intervallo a seconda della velocità del nastro trasportatore e della colata.

Normalmente alle lastre viene impartita una forma a parallelepipedo al fine di minimizzare le perdite di materiale durante le successive operazioni di taglio, per la realizzazione di manufatti di vario tipo.

Nella massa colata si raggiungono temperature attorno ai 180°C a causa della reazione esotermica che si svolge: il processo di schiumatura può considerarsi completato dopo circa 3 minuti, tuttavia la fase di polimerizzazione necessita dalle 12 alle 72 ore, a seconda della tipologia di schiuma.

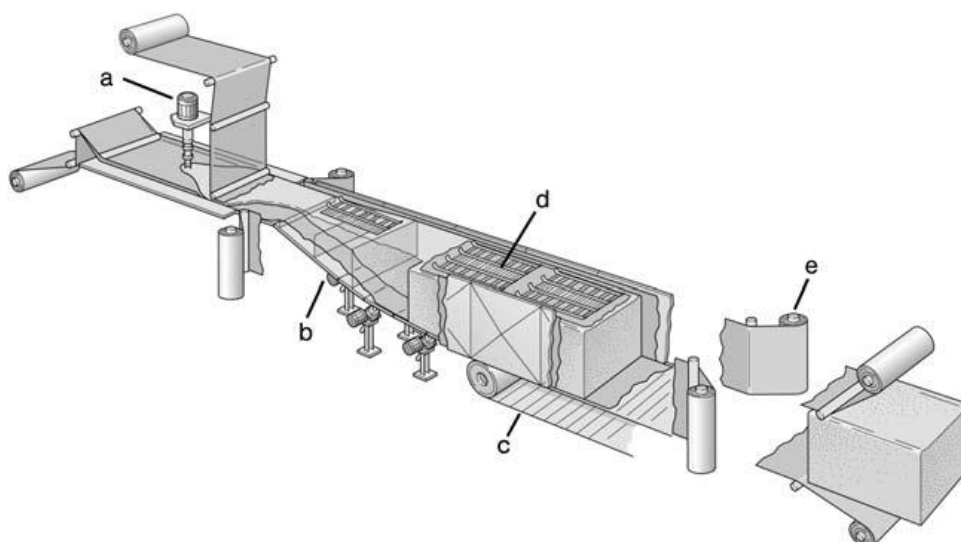


Figura 1.13 – Impianto industriale per la produzione di schiume poliuretaniche a sezione rettangolare: a) testa di miscelazione; b) zona di espansione; c) nastro trasportatore; d) dispositivo per conferire alla schiuma una sezione rettangolare; e) distributore di carta per evitare l'adesione della schiuma al nastro trasportatore^[1,2].



Figura 1.14 – Particolare della testa di miscelazione di un impianto di schiumatura in continuo^[1,2].

I processi di schiumatura all'interno di stampi sono invece utilizzati quando risulta impossibile o troppo costoso realizzare geometrie complesse a partire da lastre di grandi dimensioni, oppure nel caso in cui sia necessario incorporare nella schiuma inserti metallici (ad esempio per applicazioni nel settore dell'arredamento). In questo caso si utilizzano stampi metallici la cui superficie è trattata con prodotti a base di cera o silicone, al fine di impedire l'adesione della schiuma alle pareti. Gli stampi sono appositamente progettati e realizzati con spessore delle pareti in grado di resistere all'incremento di pressione interna, dovuta all'espansione della schiuma.

Esistono diversi metodi di taglio e formatura delle lastre poliuretaniche, per la realizzazione di articoli di vario genere (Figura 1.15). Le tecniche più semplici consistono nel taglio in direzione orizzontale oppure verticale, mentre processi di taglio secondo profili appositamente disegnati e processi di punzonatura sono impiegati per ottenere una vasta gamma di forme.

Sono inoltre utilizzate numerose tecniche di fresatura per il trattamento e la rifinitura della superficie dei manufatti.

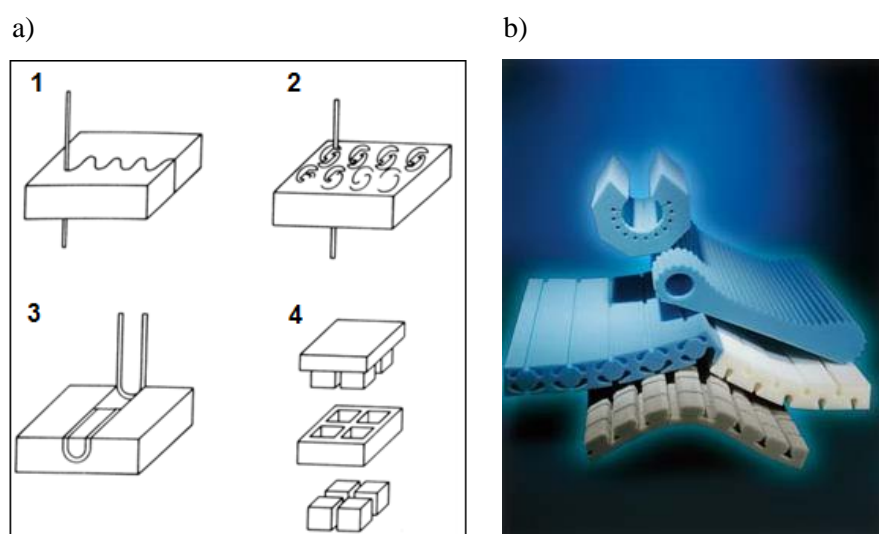


Figura 1.15^[1,2] – a) Esempi di tecniche di taglio secondo profili predefiniti (1), (2), (3) e di processi di punzonatura (4);
b) schiume sagomate per specifiche applicazioni.

Capitolo 2

2.1 Poliuretani in ambito biomedicale

Nonostante i polimeri uretanici furono commercializzati per applicazioni industriali a partire dagli anni '30, i poliuretani per applicazioni biomedicali trovarono impiego sul mercato solo all'inizio degli anni '60^[2.1].

I poliuretani lineari si collocano tra i polimeri maggiormente bio- ed emocompatibili conosciuti attualmente. Essi hanno giocato un ruolo importante nello sviluppo di molti dispositivi biomedicali, dai cateteri al progetto di cuore artificiale.

Proprietà quali resistenza a fatica, *compliance*, bio- ed emocompatibilità sono tra le caratteristiche peculiari di questi biomateriali; inoltre, metodi di modifica superficiale per l'introduzione di ligandi o agenti anticoagulanti contribuiscono ad accrescere il numero di applicazioni di questi polimeri^[2.2].

Per la progettazione di dispositivi impiantabili a lungo termine, i primi poliuretani lineari ad essere stati utilizzati sono stati i poliesteri-uretani, suscettibili a idrolisi, che sono stati in seguito sostituiti da poliuretani a base di polieteri, più stabili all'idrolisi, anche se maggiormente sensibili all'ossidazione.

Attualmente, è possibile sintetizzare materiali poliuretanici lineari che possono resistere nel luogo d'impianto per molti anni, mediante l'impiego di polioli a base di policarbonato, resistenti all'ossidazione, in combinazione anche con agenti antiossidanti, come la vitamina E^[2.2].

Tra le applicazioni principali dei poliuretani lineari troviamo dispositivi cardiovascolari (ad esempio ventricoli artificiali, protesi vascolari di piccolo calibro, valvole cardiache biomorfe, cateteri, guide per pace-makers), oltre a membrane, tubi endotracheali e sacche per il sangue^[2.3] (Figure 2.1-2.2).

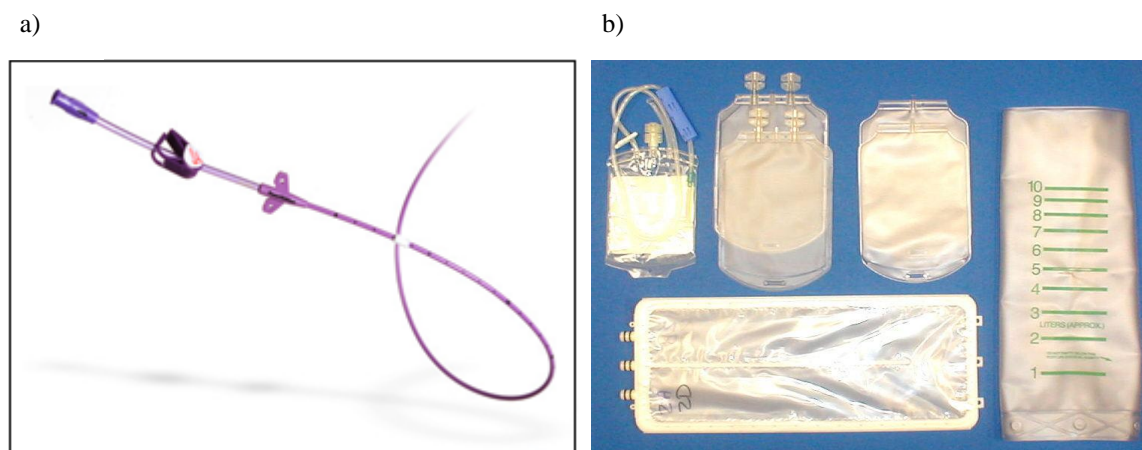


Figura 2.1 - a) Catetere in poliuretano^[2.4]; b) Esempi di sacche per il sangue in poliuretano^[2.5].

Il primo poliuretano lineare per applicazioni biomedicali è stato ritirato dal mercato nel 1991 a causa di fenomeni di *microcracking* superficiale, dovuto all'ossidazione a carico del segmento *soft* polietero^[2.6].



Figura 2.2 - Esempio di dispositivo per assistenza ventricolare – VAD (ventricular assistance device)^[2.7].

Contrariamente ai materiali lineari utilizzati per impianti *in vivo* a lungo termine, per i quali sono necessarie stabilità e proprietà costanti nel tempo, i biomateriali impiegati nella produzione di *scaffold* per l'ingegneria dei tessuti sono progettati per andare incontro a biodegradazione, con l'obiettivo di portare alla rigenerazione un tessuto sano e funzionale. Negli ultimi anni è stato registrato un incremento dell'interesse verso i poliuretani espansi biodegradabili (Figura 2.3) per la realizzazione di *scaffold* e sistemi per *drug - delivery*.

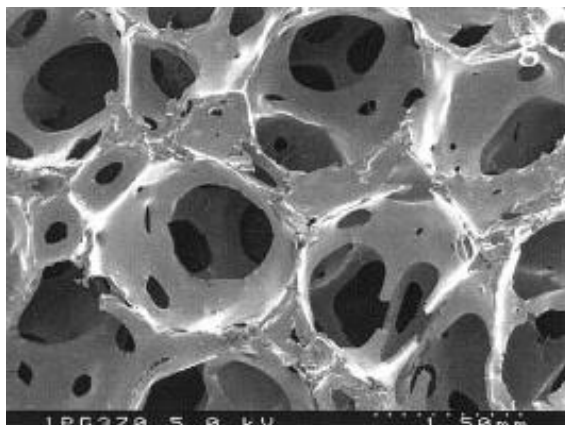


Figura 2.3 – Immagine ottenuta al microscopio elettronico a scansione di un espanso poliuretano biodegradabile^[2,8].

Un grande vantaggio di questi materiali risiede nel fatto che essi possono essere sintetizzati a partire da miscele liquide, il che li rende potenzialmente utili come biomateriali iniettabili, per terapie non invasive^[2,6], ad esempio per il riempimento di difetti ossei o per il rilascio controllato di farmaci.

Sebbene l'instabilità all'idrolisi e all'ossidazione siano da evitare nella progettazione di materiali per dispositivi per impianti a lungo termine, questi fenomeni possono essere sfruttati per la realizzazione di espansi biodegradabili per applicazioni di ingegneria dei tessuti. Il futuro della chimica dei poliuretani espansi prevede la realizzazione di *scaffold* biodegradabili per *tissue engineering*, che diano luogo a prodotti di degradazione non citotossici.

2.2 Poliuretani biodegradabili per applicazioni biomedicali

2.2.1 Composizione chimica

I poliisocianati maggiormente impiegati per sintetizzare biomateriali uretanici biodegradabili impiegati per la produzione di *scaffold* sono elencati in tabella 2.1.

Tabella 2.1 – Poliisocianati utilizzati per la sintesi di poliuretani biodegradabili^[2,6].

Nomenclatura chimica	Struttura
1,6 Diisocianato esano (HDI)	
1,4 Butandiisocianato (BDI)	
Isoforone diisocianato (IPDI)	
Dicicloesilmetano diisocianato (H12MDI)	
Lisina-metil-estere diisocianato (LDI)	
4,4' Difenilmetano diisocianato (MDI)	

L'MDI (4,4'-difenilmetano diisocianato) è una molecola aromatica, mentre i più importanti isocianati alifatici includono dicicloesilmetano diisocianato (H12MDI), esametildiisocianato (HDI) e 1,4-butandiisocianato (BDI).

In aggiunta a questi monomeri tradizionali, sono stati recentemente studiate nuove molecole derivate dall'amminoacido lisina, come ad esempio lisina-metil-estere diisocianato (LDI)^[2,9-2.13].

Uno studio presente in letteratura riporta come i poliuretani sintetizzati con poliisocianati alifatici diano luogo *in vitro* e *in vivo* a prodotti di degradazione non citotossici^[2.6]. Al contrario, la citotossicità dei prodotti di degradazione dei composti realizzati con isocianati aromatici è stata per lungo tempo oggetto di dibattito, in quanto l'idrolisi dei gruppi uretano e urea può dare luogo ad ammine aromatiche potenzialmente tossiche. Ad esempio uno studio relativo a schiume poliuretaniche biodegradabili preparate con 2,4-toluene diisocianato ha riscontrato la presenza di prodotti tossici, cancerogeni e mutageni^[2.14]; per quanto concerne i composti sintetizzati utilizzando MDI, invece, è stata riscontrata l'assenza di prodotti dannosi per l'ambiente fisiologico, anche se va sottolineato come questi materiali abbiano cinetiche di degradazione molto lente.

Per quanto concerne i polioli, la maggior parte dei poliuretani biodegradabili per la produzione di *scaffold* è realizzata con l'impiego di poliesteri o polieteri. Il peso molecolare dei macrodioli utilizzati per la sintesi di composti biodegradabili è generalmente compreso tra 400 e 5000 g/mole, con funzionalità (cioè numero di gruppi ossidrilici per molecola) maggiore o pari a 2^[2.6].

In tabella 2.2 sono riportati alcuni tra i polioli maggiormente utilizzati per realizzare *scaffold* per l'ingegneria tissutale.

Tabella 2.2 – Polioli utilizzati per la sintesi di poliuretani biodegradabili^[2.6].

Nomenclatura chimica	Struttura
Poli(etilenossido) (PEO)	$\text{HO} \left[\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} \right]_n \text{H}$
Poli(propilene ossido) (PPO)	$\text{HO} \left[\text{CH}_2 - \overset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{O} \right]_n \text{H}$
Poli(ϵ -caprolattone) (PCL)	$\text{HO} \left[\left(\text{CH}_2 \right)_5 \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \right]_n \text{O} \left(\text{CH}_2 \right)_4 \text{O} \left[\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \left(\text{CH}_2 \right)_5 \right]_m \text{OH}$
Poli(D,L-lattide)	$\text{HO} \left[\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{O} - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \right]_m \text{O} \left(\text{CH}_2 \right)_4 \text{O} \left[\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{O} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} \right]_m \text{OH}$
Poli(glicolide)	$\text{HO} \left[\text{CH}_2 - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{O} - \text{CH}_2 - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \right]_m \text{O} \left(\text{CH}_2 \right)_4 \text{O} \left[\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{CH}_2 - \text{O} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{CH}_2 \right]_m \text{OH}$

I polioli a base di poliestere, sintetizzati attraverso la polimerizzazione ad apertura di anello dei monomeri ciclici ϵ -caprolattone, glicolide e D,L-lattide, sono tra i reagenti più studiati a causa delle note proprietà di riassorbimento *in vivo*. Miscelando accuratamente questi poliesteri idrofobici con molecole idrofiliche (ad esempio il polietilenoossido, PEO), sono stati realizzati poliuretani con cinetiche di degradazione più rapide e proprietà superficiali favorevoli per l'adesione cellulare.

Per la sintesi di materiali biodegradabili vengono scelti reagenti che in seguito a degradazione rilascino sostanze non tossiche, che possano essere metabolizzate dall'organismo. Impiegando reagenti a base di peptidi, ad esempio lisina diisocianato (LDI), derivato dalla lisina, oppure poliesteri biodegradabili, come l'acido poliglicolico (PGA) e l'acido polilattico (PLA), che rilasciano rispettivamente acido glicolico e acido lattico, sono stati realizzati espansi i cui sottoprodotti di degradazione risultano essere biocompatibili e metabolizzabili dal corpo umano.

Sono inoltre allo studio reagenti innovativi, come il 1,4:3,6-dianidro-D-sorbitolo (Isosorbide)^[2,15], i cui componenti e derivati sono farmacologicamente attivi, soprattutto come vasodilatatori e agenti promotori della formazione ossea, per la sintesi di espansi poliuretanicici per la produzione di *scaffold* per la rigenerazione del tessuto osseo.

2.2.2 Fenomeni di degradazione dei poliuretani

L'analisi dei fenomeni di degradazione dei poliuretani in ambiente fisiologico risulta molto complessa, poiché esistono numerose cause che influenzano questi meccanismi, come ad esempio attacco chimico, enzimatico, batterico e azioni meccaniche che possono condurre a degradazione di tipo ossidativo o idrolitico^[2.16].

L'ossidazione dell'atomo di ossigeno appartenente ai gruppi uretano, e ad eventuali gruppi etere lungo le catene polimeriche, è responsabile della degradazione di questi materiali, che può verificarsi anche per idrolisi dei legami estere, laddove essi siano presenti.

I meccanismi di degradazione idrolitica, che sono stati proposti in letteratura^[2.6], sono rappresentati schematicamente in figura 2.4.

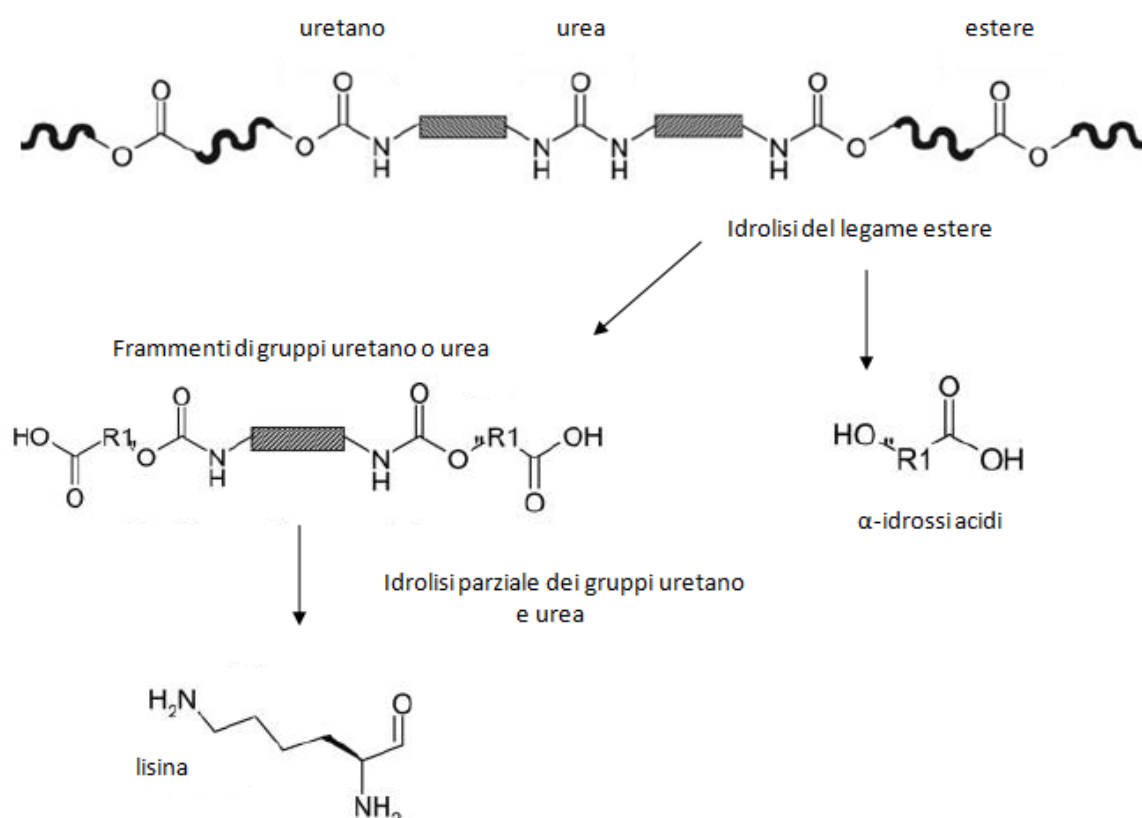


Figura 2.4 – Meccanismo di degradazione relativo a poliuretani biodegradabili. Si noti che la formazione di lisina è riportata a titolo di esempio, in quanto i prodotti di degradazione del materiale dipendono dalla composizione chimica iniziale^[2.6].

Diversi autori^[2.34;2.35] hanno ipotizzato l'idrolisi dei legami estere, sia *in vivo* che *in vitro*, e la conseguente formazione di prodotti di degradazione quali α -idrossiacidi e frammenti uretanici con gruppi acidi terminali.

È stato dimostrato come tramite la composizione dei poliesteri di partenza si possa controllare la cinetica di degradazione *in vitro*, ed è stato osservato come i poliuretani con segmenti *soft* amorfi si degradino più rapidamente rispetto a quelli semicristallini^[2.6]. Allo stesso modo, poliuretani realizzati con macrodioli idrofilici^[2.38;2.39] mostrano elevati valori di *water uptake* (ovvero di assorbimento di acqua), responsabili dell'incremento della velocità di riassorbimento.

A seconda dell'isocianato utilizzato in fase di sintesi, sono stati riscontrati fenomeni di degradazione idrolitica dei gruppi uretano^[2.11-2.13], tuttavia in letteratura si riscontra l'assenza di consenso relativamente all'idrolisi di questi legami.

In alcuni studi, nei quali sono stati impiegati poliisocianati derivati dalla lisina, gli autori riportano l'idrolisi del gruppo uretano e la conseguente formazione di lisina^[2.11-2.13]; altri studiosi, tuttavia, sostengono che i gruppi urea e uretano siano suscettibili alla sola degradazione enzimatica^[2.17].

In letteratura, tra i metodi adottati per la sintesi di poliuretani biodegradabili per la produzione di *scaffold*, troviamo l'utilizzo di particolari estensori di catena, progettati *ad hoc* per essere riconosciuti e scissi da particolari enzimi, con l'obiettivo di favorire il riassorbimento del costruito da parte dell'organismo.

Un esempio si trova nel lavoro di Guan *et al.*^[2.18], nel quale sono stati sintetizzati poliuretani lineari biodegradabili partendo da butandiisocianato, da un poliolo copolimero a blocchi PCL-PEG-PCL e da un peptide Alanina-Alanina-Lisina (AAK), utilizzato come estensore di catena. I segmenti *hard* di questo polimero sono stati appositamente progettati per essere suscettibili a degradazione enzimatica, sfruttando la specificità dell'enzima elastasi per il taglio tra due monomeri consecutivi di alanina.

È stato riscontrato come la cinetica di degradazione *in vitro* dei materiali ottenuti con estensore di catena peptidico sia molto più rapida in presenza dell'enzima elastasi, rispetto a quella registrata nel solo buffer acquoso (Figura 2.5), ed è stata verificata l'assenza di citotossicità dei prodotti di degradazione.

Un ulteriore vantaggio offerto da questi materiali risiede nelle proprietà meccaniche comparabili con quelle dei materiali di controllo.

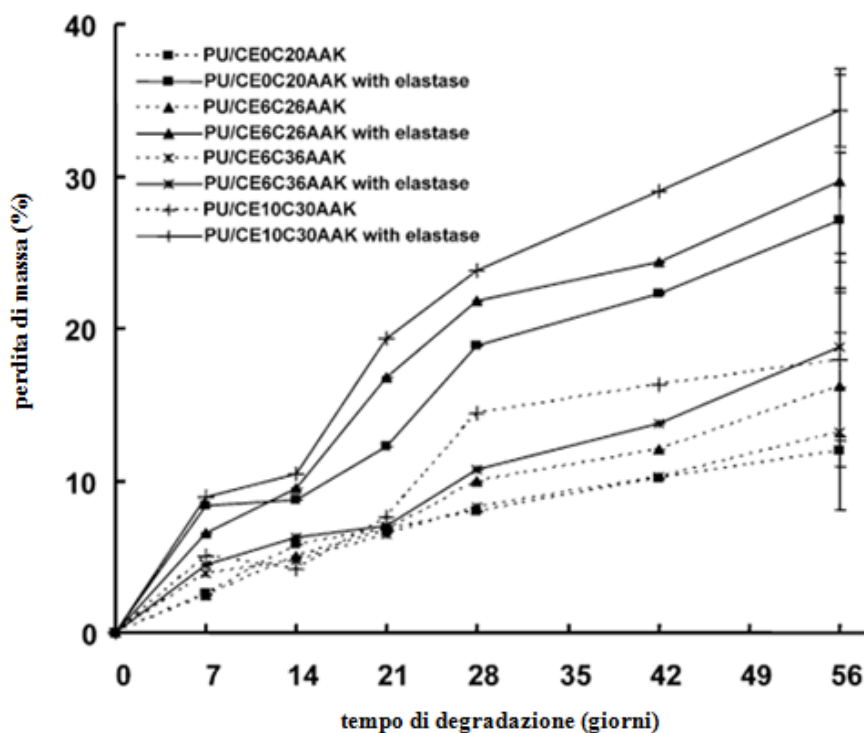


Figura 2.5 – Perdita di massa di poliuretani incubati in buffer acquoso in presenza (linee continue) o in assenza (linee tratteggiate) di elastasi (0.3 mg/mL). Le barre di errore vengono mostrate per chiarezza solo per l'ultimo istante temporale^[2.18].

In letteratura, la maggior parte degli studi effettuati su costrutti in poliuretano riporta l'idrolisi come causa principale di degradazione.

L'assorbimento da parte del poliuretano di un solvente, come l'acqua, ne rigonfia la struttura e porta ad un progressivo calo delle proprietà meccaniche del materiale, in seguito alla rottura per idrolisi dei legami estere e dei gruppi uretano.

Nel caso dei poliuretani espansi impiegati nell'ingegneria dei tessuti, proprietà chimiche di idrofilicità, e proprietà morfologiche come la dimensione media dei pori e il grado di interconnessione, determinano la quantità di solvente assorbito e di conseguenza la cinetica di degradazione. Tale fenomeno di degradazione risulta influenzato dal rapporto tra i componenti idrofilici e idrofobici che costituiscono il materiale, e perciò dalla scelta dei reagenti di partenza. Inoltre un'elevata percentuale di porosità aperta, unita a pori di grandi dimensioni, consente al solvente di raggiungere il *bulk* della schiuma, incrementando la porzione di materiale soggetta a meccanismi di idrolisi.

Oltre alla degradazione per idrolisi, i poliuretani a base di polietere-uretani sono soggetti a fenomeni di ossidazione. Sono stati identificati fenomeni di auto-ossidazione (AO, *Auto Oxidation*) ed ossidazione indotta da ioni metallici eventualmente presenti nel luogo d'impianto (MIO, *Metal Ion Oxidation*)^[2.19].

L'adesione e l'attivazione superficiale di cellule fagocitiche, in particolare macrofagi, richiamati nel sito d'impianto durante la reazione infiammatoria da corpo estraneo, determinano il fenomeno di auto-ossidazione (AO) (Figura 2.6 a). Entrambi i meccanismi, *Metal Ion Oxidation* e *Auto Oxidation*, inducono la formazione di microfessurazioni; cricche profonde a carico dell'intera massa polimerica sono tipiche del fenomeno di ossidazione da ioni metallici, mentre nel caso di auto-ossidazione si registrano lesioni superficiali.

In seguito alla presenza di *stress* meccanici, causati dai processi di lavorazione e di trasformazione dei materiali, è possibile che il fenomeno di auto-ossidazione si trasformi in *environmental stress cracking* (ESC) (Figura 2.6 b), con estensione delle fessurazioni superficiali fino al *bulk* del materiale)^[2.19].

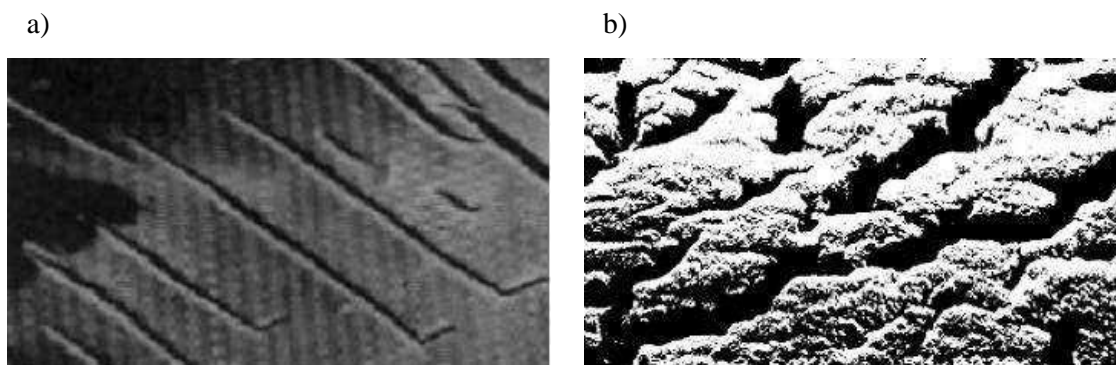


Figura 2.6 – (a) Fenomeno di auto-ossidazione (AO); (b) fenomeno di *environmental stress cracking* (ESC)^[2.42].

2.2.3 Possibili strategie per rallentare la cinetica di degradazione

In letteratura sono presenti diversi studi relativi alla ricerca di strategie per il controllo della cinetica di degradazione dei poli-etere-uretani (PEU), con l'obiettivo di rallentare il processo di ossidazione dei gruppi etere dall'ossidazione in ambiente biologico^[2.20-2.22]. Tra le tecniche adottate, alcune prevedono l'utilizzo di agenti chimici.

Gli agenti chimici antiossidanti maggiormente utilizzati in ambito biomedicale sono composti sintetici come Santowhite® (a base di idrossitoluene butilato) e Irganox® (un fenolo), tuttavia alcuni di essi possono compromettere la biocompatibilità del costrutto, se utilizzati in concentrazioni troppo elevate o nel caso in cui essi diano luogo a prodotti di degradazione tossici per le cellule. Per evitare tali rischi, sono stati introdotti nuovi composti naturali con proprietà antiossidanti, tra cui la vitamina E e la sua forma maggiormente attiva, l' α -tocoferolo.

Questa molecola risulta particolarmente apprezzata in quanto è solubile nei poli-etere-uretani e i suoi prodotti di degradazione sono innocui. Grazie a queste proprietà l' α -tocoferolo è già riconosciuto come sostanza sicura da parte dell'FDA (*Food and Drug Administration*) e potrebbe facilmente guadagnare la futura approvazione per l'introduzione in commercio^[2.20].

In uno studio condotto da Schubert *et al.*^[2.22], è stata valutata l'efficacia antiossidante della vitamina E, impiegata come additivo durante la sintesi di PEU lineari, successivamente impiantati in posizione sottocutanea in ratti.

L'influenza della vitamina E sulla biostabilità dei poliuretani è stata analizzata mediante indagini di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier in riflettenza totale attenuata (ATR-FTIR) e microscopia elettronica a scansione (SEM). I risultati indicano come la vitamina E sia in grado di prevenire la degradazione chimica superficiale dei materiali trattati fino a cinque settimane dall'impianto del dispositivo, e di rallentarne il processo di ossidazione durante le settimane successive.

La figura 2.7 mostra i valori di altezza dei picchi di assorbimento del legame etere (1110 cm^{-1}) espressi come frazione percentuale rispetto all'altezza dei picchi di assorbimento iniziale (risultati ottenuti mediante spettroscopia infrarossa). Dopo cinque settimane il contenuto di gruppi etere sulla superficie del poliuretano non trattato con vitamina E risulta dimezzato, mentre l'aggiunta dell'antiossidante mantiene il contenuto di gruppi etere in prossimità del 100%. Alla decima settimana, la presenza di legami etere nel polimero di

controllo risulta essere del 18%, mentre il poliuretano trattato mostra valori attorno all'82%.

La velocità di degradazione dei gruppi etere del costrutto sintetizzato con l'agente antiossidante, stimata tra la quinta e la decima settimana d'impianto, è circa il doppio rispetto a quella del materiale di controllo. Da questi risultati, è possibile affermare che le proprietà antiossidanti della vitamina E sono in grado di rallentare il processo di ossidazione dei poli-etere-uretani *in vivo*.

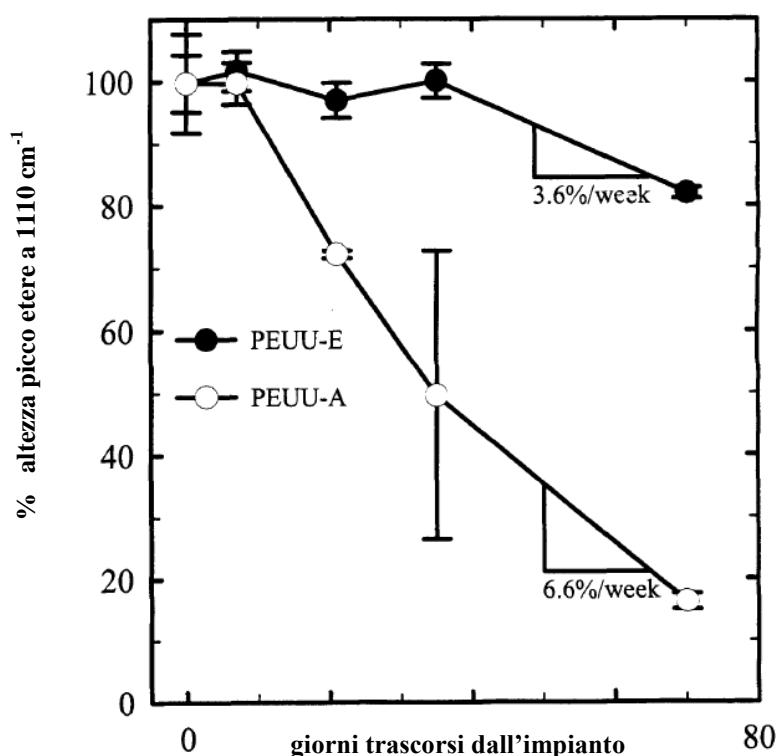


Figura 2.7 – Analisi dell'altezza dei picchi di assorbimento a 1110 cm⁻¹ (ATR-FTIR) dei gruppi etere relativa a poliuretani trattati con vitamina E (PEUU-E) e poliuretani non trattati (PEUU-A)^[2,22].

In uno studio condotto da Chou *et al.*^[2,21], è stato valutato l'effetto di nanoparticelle di oro e di argento sulla biodegradabilità di poli-etere-uretani (PEU) lineari.

Gli autori hanno sintetizzato PEU incorporando in fase di sintesi nanoparticelle di oro o di argento, per verificarne l'eventuale influenza sulla resistenza del materiale alla degradazione. Sono stati condotti su suini test di degradazione *in vivo*, mediante l'impianto di provini di PEU (1 cm x 2,5 cm x 0,05 cm) nella regione dorsale degli animali.

Dopo un periodo di tempo pari a 19 giorni, i campioni sono stati estratti e valutati tramite indagini di microscopia elettronica a scansione (SEM), spettroscopia infrarossa (FTIR) e analisi istologica.

I risultati hanno indicato il quantitativo ottimale di oro (43.5 ppm) e di argento (30.2 ppm) in grado di incrementare la stabilità superficiale dei costrutti rispetto agli attacchi degradativi ossidativi (Figura 2.8).

La quantità di oro o di argento aggiunta ha una forte influenza sulla formazione di legami idrogeno, sulle proprietà meccaniche del materiale e sulla capacità del nanocomposito di ridurre l'attività dei radicali liberi. Il contenuto ottimale stimato in questo studio è dell'ordine delle 43.5 ppm per l'oro e di 30.2 ppm per l'argento; gli autori ipotizzano che quantitativi maggiori potrebbero dare luogo alla formazione di aggregati di nanoparticelle, con un conseguente peggioramento delle proprietà precedentemente descritte.

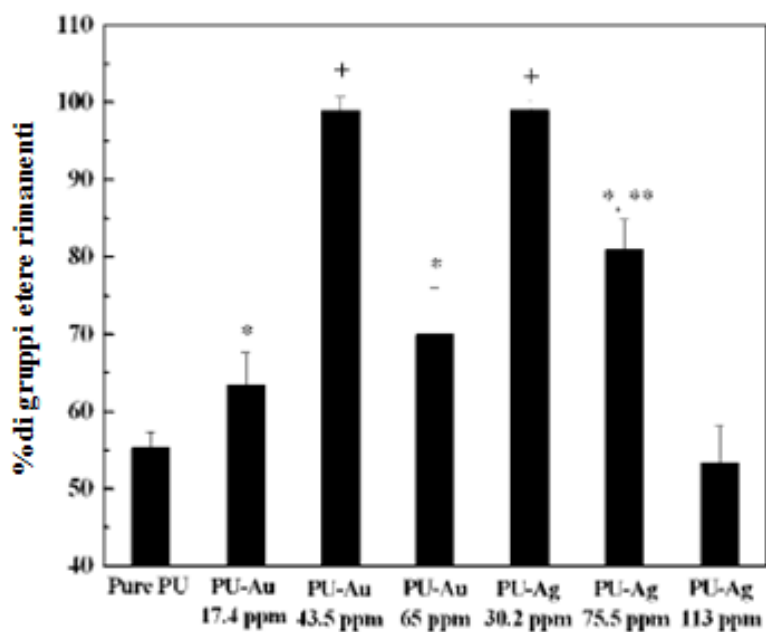


Figura 2.8 – Degradazione dei segmenti soft polietere ($p < 0.05$). * maggiore rispetto al PU puro; ** maggiore rispetto al PU-Au 17.4 ppm e PU-Ag 113 ppm; + maggiore rispetto a tutti gli altri campioni^[2,21].

2.3 Espansi poliuretanicici biodegradabili per l'ingegneria dei tessuti

Gli espansi poliuretanicici biodegradabili sono stati negli ultimi anni oggetto di ricerca per la produzione di supporti tridimensionali per l'ingegneria dei tessuti.

Nello specifico, l'utilizzo di *scaffold* poliuretanicici è stato studiato nell'ambito dell'ingegneria del tessuto cartilagineo^[2.23-2.26], dei tessuti molli (ad esempio, vasi ematici^[2.27-2.29] e fibre nervose^[2.30-2.33]) e in maniera preponderante per la rigenerazione del tessuto osseo^[2.11-2.13;2.15;2.34-2.40].

2.3.1 Scaffold per la rigenerazione della cartilagine

La riparazione di traumi a carico della cartilagine è un processo molto complesso, a causa della natura stessa del tessuto, costituito da un'estesa matrice extracellulare, popolata da un numero ridotto di cellule^[2.26]. Le aree danneggiate mostrano una scarsa capacità autorigenerativa a causa dell'assenza di vascolarizzazione e del ridotto potenziale rigenerativo della componente cellulare^[2.41]. Una strategia alternativa al trapianto autologo di condrociti, utilizzato attualmente nella pratica clinica, consiste nella realizzazione di un costrutto, costituito da cellule seminate e coltivate su un espanso polimerico, da impiantare nella porzione di tessuto interessata da lesione, in modo da permetterne l'integrazione e la crescita con la cartilagine circostante^[2.41]. Il supporto per l'adesione e la proliferazione dei condrociti potrebbe essere garantito, in questo caso, dall'impiego di *scaffold* poliuretanicici porosi, inseriti appositamente nel sito d'impianto (Figura 2.9).

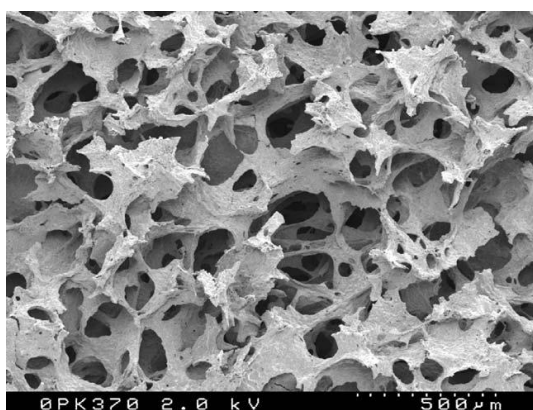


Figura 2.9 - Esempio di scaffold poliuretanicico poroso utilizzato per la rigenerazione del tessuto cartilagineo. L'immagine è stata ottenuta al microscopio elettronico a scansione^[2.25].

In uno studio condotto da Chia *et al.*^[2.24], sono state sintetizzate membrane poliuretaniche microporose, a base di esametildiisocianato, policaprolattone e isosorbide diolo, per potenziali applicazioni nell'ingegneria del tessuto cartilagineo. Tre diverse tipologie di costrutti, con differente dimensione dei pori (10÷20 µm, 40÷60 µm e inferiori a 5 µm), sono state impiegate come substrati per la coltura *in vitro* di condrociti bovini, mentre un espanso microporoso in acido polilattico (PLA) è stato utilizzato come controllo.

Durante un periodo di coltura pari a 30 giorni, non sono state registrate differenze rilevanti nei profili di proliferazione cellulare relativi alle quattro membrane considerate, inoltre i condrociti seminati sui diversi costrutti hanno mostrato risultati simili in termini di produzione di proteoglicani e collagene di tipo II. Ciò dimostra che l'impiego di poliuretani biodegradabili conduce a risultati comparabili con quelli ottenuti utilizzando materiali polimerici biodegradabili tradizionali.

I risultati di questi test preliminari dimostrano il potenziale utilizzo di questa classe di materiali biodegradabili come sostituti delle porzioni di periostio impiegate nel trapianto autologo di condrociti, tuttavia ulteriori studi sono necessari per definirne con maggior dettaglio il ruolo in applicazioni cliniche per il riparo della cartilagine.

2.3.2 Scaffold per la rigenerazione dei tessuti molli

Come già accennato, i poliuretani espansi microporosi trovano applicazione come *scaffold* nell'ambito dell'ingegneria tissutale dei tessuti molli, per il ripristino, ad esempio, di lesioni a vasi ematici o fibre nervose.

Nel settore vascolare, sono necessari costrutti con ottime proprietà di elasticità e resistenza meccanica per sopportare i continui cicli di carico ai quali sono sottoposti i vasi in ambiente fisiologico, oltre a profili di degradazione controllabili, per permettere una corretta rigenerazione del tessuto *in vivo*^[2.29]. Grazie alle note caratteristiche di emocompatibilità, resistenza a fatica e alle elevate proprietà elastomeriche, *scaffold* realizzati con poliuretani biodegradabili sono attualmente oggetto di studio, al fine di valutarne un futuro impiego in questo settore^[2.42].

In uno studio *in vivo* condotto da Fujimoto *et al.*^[2.43], sono stati sintetizzati, mediante un processo di separazione di fase termicamente indotta, *patches* cardiovascolari (Figura 2.10) a base di butandiisocianato, policaprolattone e putrescina, con porosità pari all'85%.

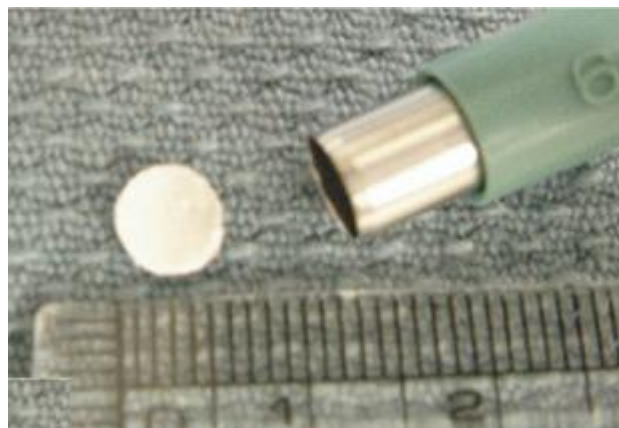


Figura 2.10 – Esempio di patch poliuretano di diametro pari a 6 mm, ottenuto con tecnica di punzonatura ^[2.43].

Gli *scaffold* poliuretani sono stati utilizzati per colmare difetti transmurali, realizzati chirurgicamente, a livello del tratto d'uscita del ventricolo destro di ratti adulti (Figura 2.11), e protesi in politetrafluoroetilene (PTFE) sono state impiantate come controllo in un secondo gruppo di animali.

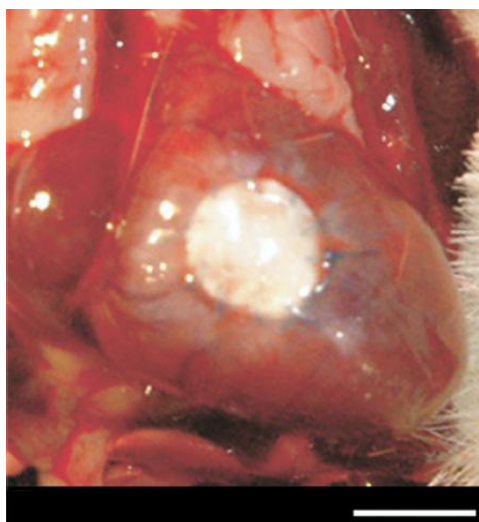


Figura 2.11 – Immagine relativa a patch poliuretano a 12 settimane dall'impianto nel tratto di uscita del ventricolo destro di ratti adulti. La barra indica una dimensione pari a 5 mm ^[2.43].

I costrutti sono stati espantati e valutati istologicamente a intervalli temporali pari a 4, 8 e 12 settimane. A quattro settimane dall'impianto è stata osservata la presenza di fibroblasti all'interno dei *patches* poliuretani e si è registrato un incremento della proliferazione cellulare all'aumentare del periodo di permanenza della protesi all'interno dell'organismo.

Il livello di attività di cellule fagocitiche, in particolare macrofagi, valutato con tecniche di immunoistochimica, cresce con la degradazione del materiale, mantenendosi nei limiti fisiologici.

I materiali di controllo in PTFE non hanno mostrato alcuna crescita cellulare, provocando l'insorgere di una reazione da corpo estraneo, il cui picco è stato riscontrato a 4 settimane dall'impianto. Gli autori riportano come gli *scaffold* poliuretanicici abbiano fornito un supporto per la colonizzazione cellulare e siano apparsi quasi completamente riassorbiti dopo circa 12 settimane, dimostrandosi adeguati per la cura di traumi o lesioni del sistema cardiovascolare.

Per quanto concerne le fibre nervose, è noto come il sistema nervoso periferico possieda capacità autorigenerativa e, in seguito a lesioni ridotte, gli assoni siano in grado di rigenerarsi, colmando il *gap* tra le parti lese. In presenza di traumi di natura più ampia, tuttavia, risulta necessaria l'applicazione di guide tubulari per la rigenerazione guidata del tessuto, al fine di assicurare una corretta riconnessione tra i prolungamenti citoplasmatici assonici. In quest'ottica, gli *scaffold* poliuretanicici biodegradabili sono attualmente in fase di studio come substrati per applicazioni di ingegneria dei tessuti, nell'ambito della ricostruzione guidata del tessuto nervoso^[2.30-2.33].

Nei paragrafi successivi verranno analizzati con maggior dettaglio gli *scaffold* per il tessuto osseo e le prove di invecchiamento *in vitro* e test di citocompatibilità *in vitro* e *in vivo* relativi a poliuretanicici espansi biodegradabili per la ricostruzione di questo tessuto, in quanto numerosi studi sono presenti a riguardo nella letteratura scientifica.

2.3.3 Espansi poliuretanic biodegradabili per la ricostruzione del tessuto osseo

La presenza di traumi, degenerazioni patologiche, osteoporosi, perdita di potenzialità rigenerativa e deformazioni congenite richiedono applicazioni cliniche per il riparo o la sostituzione del tessuto osseo. Attualmente, le terapie cliniche si basano sull'impiego di sostituti artificiali come le ceramiche, oppure innesti di tessuto osseo provenienti dallo stesso paziente (*autograft*), da tessuti prelevati da cadavere (*allograft*) o da una specie animale diversa da quella umana (*eterograft*)^[2.44]. Nonostante il trapianto autologo sia la soluzione più impiegata grazie all'elevato potenziale osteoinduttivo, spesso esso non è realizzabile a causa della presenza di una patologia estesa ai potenziali siti donatori o per la scarsità di tessuto osseo disponibile per il prelievo. Per quanto riguarda gli *allograft* e gli *eterograft*, queste strategie sono spesso veicolo di patologie e possono causare reazioni immunogeniche.

L'ingegneria del tessuto osseo è un campo innovativo e promettente, che sfrutta e combina i vantaggi dei sostituti naturali e sintetici per superare le suddette limitazioni.



















































L'obiettivo è quello di colmare le lacune ossee attraverso l'utilizzo di cellule autologhe (staminali mesenchimali o osteoblasti, coltivati ed espansi *in vitro*) seminate all'interno di uno *scaffold*, oppure di indurre la migrazione dai tessuti circostanti nella fase successiva all'impianto, per guidare la rigenerazione di un tessuto funzionale^[2.44].

In questo quadro, la medicina rigenerativa propone, tra le diverse strategie, l'impiego di *scaffold* poliuretanic porosi che si presentano come validi sostituti dei *graft* per la rigenerazione del tessuto osseo.

In tabella 2.3 sono riportati esempi ritenuti significativi di lavori presenti in letteratura inerenti la sintesi di poliuretanic espansi biodegradabili, impiegati per la rigenerazione del tessuto osseo.

Tabella 2.3 – Composizione chimica e sottoprodotti di degradazione relativi a poliuretani espansi biodegradabili, per applicazioni di ricostruzione del tessuto osseo.

(*) Agente espandente comune a tutti gli esperimenti: acqua

Composizione chimica (*)	Prodotti di degradazione	Riferimento bibliografico
<ul style="list-style-type: none">  Policaprolattone-co-glicolide triolo;  Lisina diisocianato 	<ul style="list-style-type: none">  α-idrossi-acidi;  lisina 	Guelcher <i>et al.</i> , [2.34]
<ul style="list-style-type: none">  Policaprolattone-co-glicolide-co-lattide triolo;  Lisina diisocianato 	<ul style="list-style-type: none">  α-idrossi-acidi;  lisina 	Guelcher <i>et al.</i> , [2.35]
<ul style="list-style-type: none">  Policaprolattone;  Policaprolattone-co-glicolide-co-lattide triolo;  Lisina diisocianato;  Lisina triisocianato 	<ul style="list-style-type: none">  α-idrossi-acidi;  lisina 	Guelcher <i>et al.</i> , [2.40]
<ul style="list-style-type: none">  Glicerolo;  Lisina diisocianato 	<ul style="list-style-type: none">  lisina;  etanolo;  glicerolo 	Zhang <i>et al.</i> , [2.11]
<ul style="list-style-type: none">  Glicerolo;  Acido ascorbico;  Lisina diisocianato 	<ul style="list-style-type: none">  lisina;  glicerolo;  acido ascorbico;  etanolo 	Zhang <i>et al.</i> , [2.12]
<ul style="list-style-type: none">  D-glucosio;  Lisina diisocianato 	<ul style="list-style-type: none">  lisina;  glucosio 	Zhang <i>et al.</i> , [2.13]
<ul style="list-style-type: none">  Polietilenossido;  Policaprolattone;  Esametildiisocianato 	<ul style="list-style-type: none">  acido idrossicaproico;  polietilenossido oligomerico;  1,6 esametildiammina 	Gogolweski <i>et al.</i> , [2.36]
<ul style="list-style-type: none">  Polietilenossido o poliolo idrofilico Pluronic ®;  Policaprolattone,  1,4 butandiolo;  Esametildiisocianato 	<ul style="list-style-type: none">  acido idrossicaproico;  polietilenossido oligomerico;  1,6 esametildiammina 	Gorna <i>et al.</i> , [2.38]
<ul style="list-style-type: none">  Polietilenossido;  Policaprolattone;  Poliolo a base di saccarosio o di ammina;  Esametildiisocianato 	<ul style="list-style-type: none">  acido idrossicaproico;  polietilenossido oligomerico;  1,6 esametildiammina 	Gorna <i>et al.</i> , [2.39]

Dalla tabella riportata è possibile osservare come i poliuretani espansi biodegradabili sintetizzati in questi studi siano accuratamente progettati per dare luogo a prodotti di degradazione non citotossici e metabolizzabili dall'organismo, come ad esempio α -idrossiacidi, lisina, etanolo o glucosio.

2.3.3.1 Test di invecchiamento *in vitro*

Lo studio delle proprietà di biodegradabilità dei materiali polimerici è di norma condotto attraverso prove di invecchiamento *in vitro*, in cui si utilizzano soluzioni acquose a base di PBS (*phosphate buffered saline*), che simulano l'azione dei principali fluidi biologici presenti all'interno dell'organismo. Occorre tuttavia considerare che tali esperimenti possono fornire risultati differenti da quelli ottenibili da prove *in vivo*, nelle quali la cinetica di degradazione del materiale risulta più rapida, a causa della presenza di fluidi biologici circolanti e di cellule metabolicamente attive^[2.11-2.13].

Le prove di invecchiamento *in vitro* possono essere eseguite in modalità pseudodinamica oppure statica. Nel primo caso la soluzione buffer viene sostituita ogni quattro settimane, mentre nel caso di prova statica il mezzo non viene sostituito per tutto il periodo dell'esperimento, al fine di monitorare eventuali variazioni di pH all'interno della soluzione, dovute al rilascio di prodotti di degradazione.

Effetto della temperatura sulla cinetica di degradazione

Zhang *et al.* hanno condotto prove di degradazione *in vitro* su poliuretani espansi sintetizzati con lisina diisocianato e glicerolo^[2.11], ponendo i polimeri in PBS (10 mg/mL di PBS) a 4, 22 e 37°C, per un periodo di tempo pari a 60 giorni. Ogni giorno, in seguito ad agitazione meccanica, è stato prelevato 1 mL di soluzione ed è stata valutata la concentrazione di lisina rilasciata dal polimero, mediante un saggio colorimetrico. È stato riscontrato come la degradazione della matrice sia dipendente dalla temperatura: la cinetica di degradazione risulta lineare a 37°C, con una riduzione dei fenomeni degradativi pari al 50% a 22°C e pari a circa il 95% a 37°C (Figura 2.12). Ulteriori indagini sui prodotti di degradazione hanno mostrato la presenza di glicerolo in concentrazioni simili a quelle dell'amminoacido lisina, a tutte le temperature testate (Figura 2.13). Questi risultati concordano con la presunta idrolisi dei legami uretano dei materiali sintetizzati in questo

studio, a dare lisina, glicerolo, etanolo e anidride carbonica e risultano in linea con quelli pubblicati dagli stessi autori, inerenti a poliuretani a base di glucosio e lisina diisocianato^[2.13].

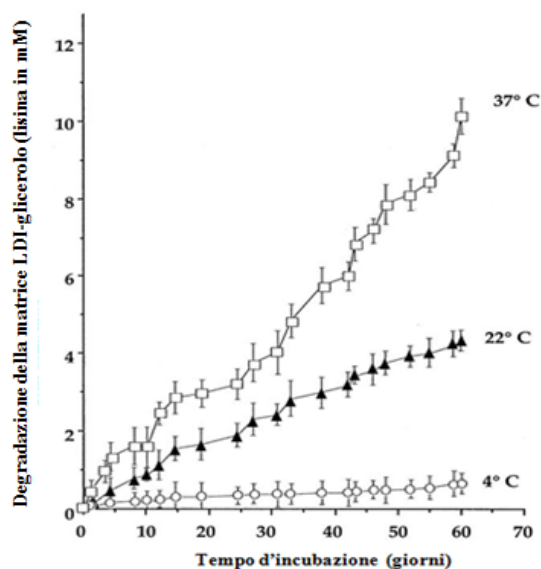


Figura 2.12 - Rilascio di lisina da parte del polimero LDI-glicerolo in PBS a 37, 22 o 4°C in un periodo d'incubazione fino a 60 giorni^[2.11].

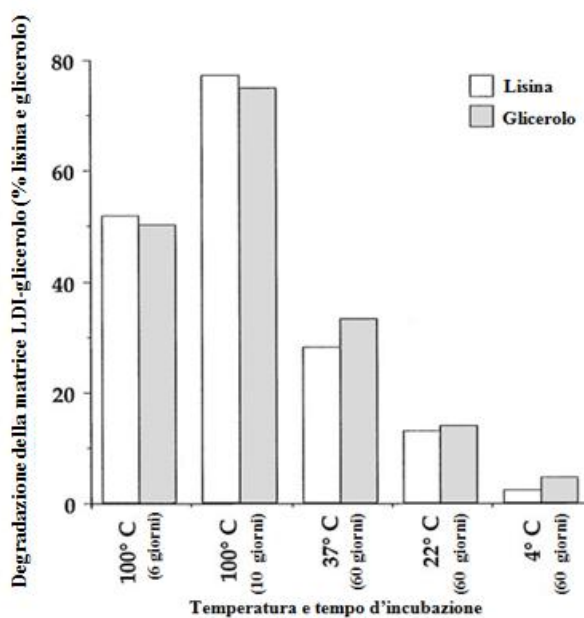


Figura 2.13 - Rilascio di lisina e glicerolo da parte del polimero LDI-glicerolo in PBS a differenti temperature e istanti temporali^[2.11].

Al fine di valutare la stabilità termica del materiale, sono state eseguite prove di invecchiamento ad una temperatura pari a 100°C, che hanno mostrato una degradazione del materiale pari al 77.2 % dopo 10 giorni di incubazione in PBS, mentre un valore pari al solo 2% è stato osservato nelle prime 6 ore di trattamento in soluzione acquosa bollente. Secondo gli autori, ciò dimostra come il polimero con LDI e glicerolo sia termicamente stabile e vada incontro a cambiamenti strutturali ridotti, se sottoposto alle alte temperature per periodi brevi, rivelandosi indicato per la sterilizzazione in autoclave per tempi brevi.

In questi esperimenti^[2.11-2.13] le cinetiche di rilascio sono state misurate in condizioni di agitazione lenta della soluzione (2 giri/minuto); uno studio presente in letteratura^[2.45] mostra come poliuretani biodegradabili, sintetizzati con acido lattico oppure acido poliglicolico e poli-ε-caprolattone uniti a LDI, si degradino con una velocità doppia *in vivo* rispetto a quella registrata *in vitro*. Alla luce di queste osservazioni, gli autori ritengono che la cinetica di degradazione sia più rapida *in vivo*, a causa della presenza dei fluidi fisiologici e del metabolismo cellulare; ciò va quindi considerato in fase di progettazione del materiale, al fine di evitarne un riassorbimento troppo rapido, che non permetta la corretta rigenerazione del tessuto.

Variazioni del pH in seguito a fenomeni di degradazione

E' noto come i prodotti di degradazione dei polimeri a base di acido lattico o glicolico inducano l'acidificazione dell'ambiente biologico *in vivo*. Il pH è uno degli indici fisiologici più importanti all'interno dell'organismo e l'omeostasi di tale parametro è fondamentale, per garantire la vitalità cellulare e l'attività degli agenti enzimatici.

Durante le prove di invecchiamento *in vitro* condotte da Zhang *et al.*^[2.11-2.13], è stato monitorato il pH delle soluzioni per un periodo di tempo pari a 60 giorni (Figura 2.14 a). In tutte le condizioni di prova i prodotti di degradazione non hanno apportato variazioni significative ai valori di pH, per ogni temperatura testata. L'assenza di cambiamenti di rilievo denota l'assenza di prodotti di degradazione in grado di condurre la soluzione verso pH acidi o basici, tuttavia questi risultati non escludono la possibilità di variazioni più rilevanti nel micro-ambiente nelle immediate vicinanze dello *scaffold* polimerico.

Studi condotti da Gorna *et al.*^[2.38;2.39], su poliuretani alifatici con diversi gradi di idrofilicità, confermano l'assenza di cambiamenti significativi nel pH della soluzione, con variazioni dell'ordine di 0.1 – 0.7, per un periodo d'incubazione pari a 80 settimane (Figura 2.14 b). Gli autori giustificano tali risultati ipotizzando l'insorgere di prodotti di

degradazione sia acidi che basici, la cui interazione conduce a reazioni di neutralizzazione, con effetti minimi sui valori di pH della soluzione.

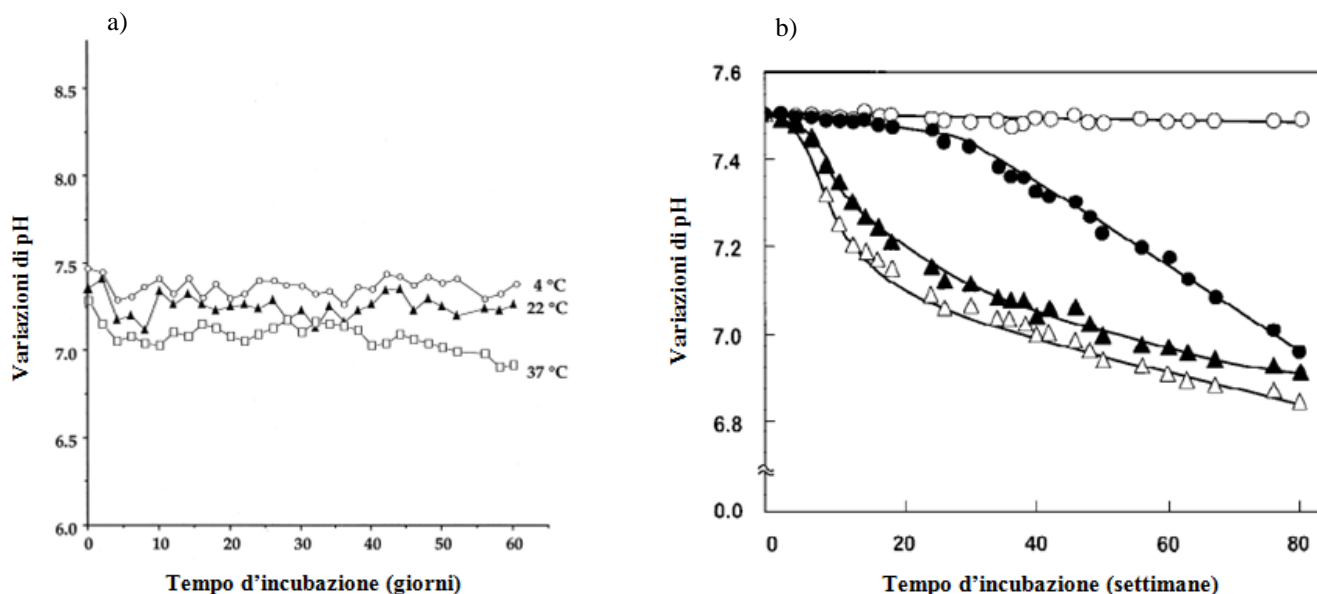


Figura 2.14 - (a) Effetto dei prodotti di degradazione del polimero LDI-glicerolo sul pH della soluzione PBS. Il polimero è stato incubato a 37, 22 o 4°C per 60 giorni e il pH della soluzione è stato misurato ogni 24 ore^[2.13]. (b) Variazioni di pH durante prove di invecchiamento in vitro di poliuretani con diversi gradi di idrofilicità, a base di policaprolattone (PCL), polietilenoossido (PEO) e Pluronic® F68. (○) PCL con peso molecolare pari a 2000; (●) PCL con peso molecolare pari a 530; (△) PCL530 e PEO2000 in rapporto 50:50; (▲) PCL2000 e Pluronic® F68 in rapporto 70:30^[2.38].

Grado di idrofilicità e peso molecolare delle catene polimeriche

Negli stessi lavori^[2.38;2.39], sono stati riscontrati due fattori principali in grado di influenzare i meccanismi di degradazione dei poliuretani: il grado di idrofilicità del materiale e il peso molecolare delle catene. I composti a basso peso molecolare mostrano una cinetica più rapida rispetto a quelli ad elevato peso molecolare; tuttavia, i fenomeni di degradazione più marcati si registrano a carico dei polimeri con il più alto contenuto di segmenti idrofilici, indipendentemente dal peso molecolare iniziale. Ciò conferma l'ipotesi che la dissoluzione dei poliuretani in ambienti acquosi proceda sostanzialmente per effetto idrolitico.

2.3.3.2 Prove di calcificazione *in vitro*

È noto come i poliuretani siano soggetti a calcificazione *in vivo*, e, benché questi fenomeni siano da evitarsi in presenza di dispositivi a contatto con il sangue, essi potrebbero rivelarsi un vantaggio nell'ambito della ricostruzione del tessuto osseo.

Gorna *et al.*^[2.39] hanno condotto esperimenti di calcificazione *in vitro*, ponendo provini poliuretanicamente espansi in incubatore a 37°C per un periodo pari a 80 giorni. La soluzione a base di PBS veniva sostituita ogni 48 ore per assicurare un'adeguata concentrazione ionica. La presenza di calcio e fosforo è stata valutata mediante analisi di spettroscopia a raggi X (EDAX) e di microscopia elettronica a scansione (SEM), a 16, 32, 48 e 80 giorni d'incubazione. Le indagini hanno rivelato la formazione di cristalli di sali di calcio sulla superficie dei provini (Figura 2.15), ed è stato riscontrato come la suscettibilità alla calcificazione aumenti con l'idrofilicità del materiale. Una possibile spiegazione di tali fenomeni risiede nell'attrazione selettiva verso gli ioni calcio, da parte dell'atomo di ossigeno appartenente ai gruppi etere dei composti maggiormente idrofilici. È stato inoltre osservato come i calcio-fosfati presenti sulla superficie dei polimeri siano inizialmente amorfi e si trasformino progressivamente, passando attraverso alcuni stadi intermedi, in idrossiapatite cristallina.

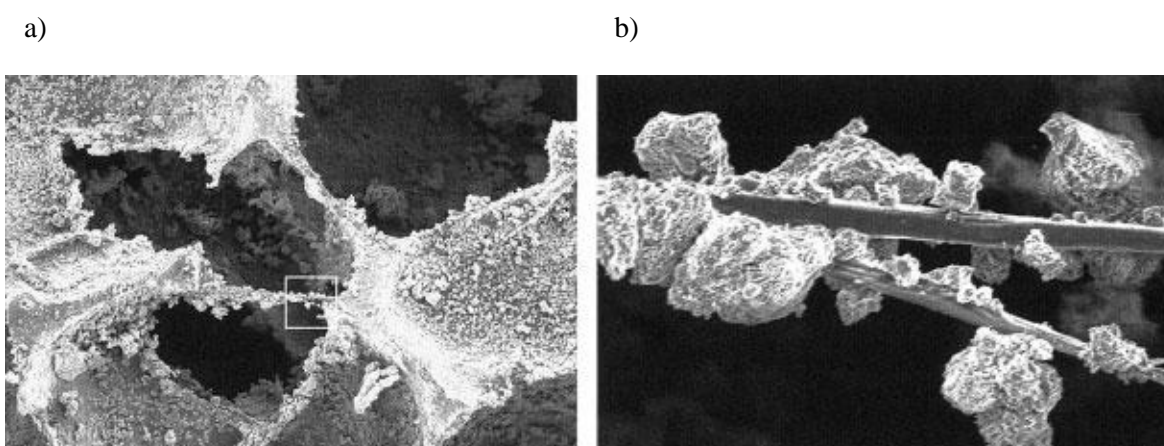


Figura 2.15 - (a) Immagine al SEM di calcio fosfati presenti sulla superficie di poliuretani con rapporto segmenti idrofilici – idrofobici pari a 70:30. (b) Particolare dell'ingrandimento della porzione evidenziata dal rettangolo nell'immagine (a)^[2.39].

2.3.3.3 Test di citocompatibilità *in vitro*

Nei lavori presenti in letteratura sono spesso condotte prove di citocompatibilità *in vitro*, utilizzando diverse linee cellulari, per valutare la risposta cellulare nei confronti degli *scaffold* biodegradabili sintetizzati. I risultati dimostrano, in generale, la buona citocompatibilità dei materiali polimerici realizzati.

In uno studio di Zhang *et al.*^[2.12], ad esempio, sono state utilizzate cellule di linea murine, precursori di osteoblasti (OPC, *osteoblastic precursor cells*), per testare la citocompatibilità di schiume poliuretaniche biodegradabili, sintetizzate con lisina diisocianato, glicerolo e acido ascorbico. La crescita delle cellule seminate sugli *scaffold* ha mostrato le stesse caratteristiche di quella relativa a colture cellulari su piastre in polistirene di controllo. Durante i primi due giorni di coltura è stata registrata proliferazione cellulare, con presenza di cellule ipertrofiche di forma sferica, come si osserva in figura 2.16.

Al quarto giorno di coltura, si sono osservati fenomeni di migrazione cellulare, accompagnati da sintesi di matrice extracellulare, e durante la prima settimana di coltura sono stati monitorati l'attacco, lo *spreading* e la proliferazione di cellule con morfologia allungata o poligonale. Entro la seconda settimana di coltura, le cellule hanno dato luogo alla colonizzazione di intere porzioni di substrato e si inizia ad osservare una produzione di matrice extracellulare. Al termine dell'esperimento, dopo un periodo di coltura pari a 14 giorni, le cellule hanno dato luogo a multistrati giunti a confluenza, caratteristica tipica delle cellule del tessuto osseo. Tali risultati dimostrano la citocompatibilità dei substrati realizzati.

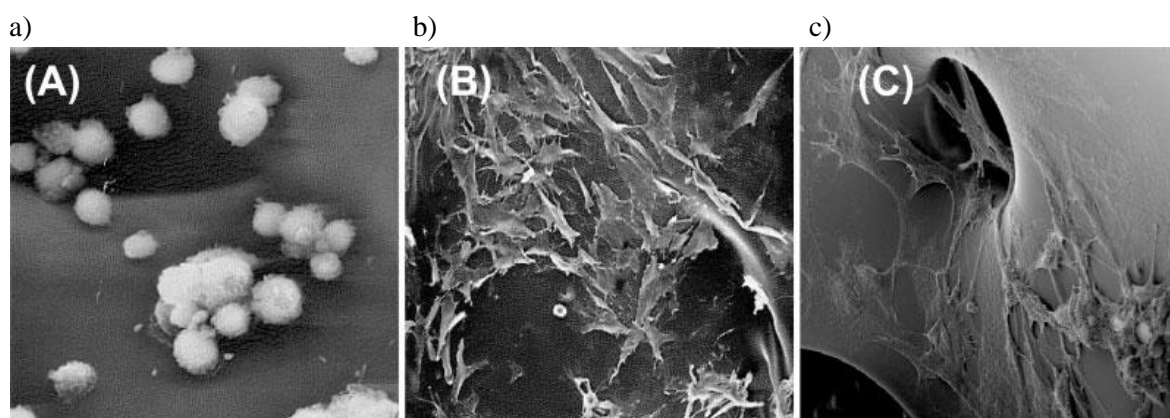


Figura 2.16 - Caratteristiche di adesione e crescita di cellule murine precursori di osteoblasti. (A) Fase di attacco cellulare alla superficie del polimero dopo un periodo di coltura pari a 4 ore. (B) Monostrato cellulare dopo 5 dalla semina. (C) Multistrato cellulare a 12 giorni dalla semina^[2.12].

In altri lavori condotti dagli stessi autori^[2.11;2.13] sono state impiegate cellule stromali prelevate dal midollo osseo di coniglio (Figura 2.17). Le cellule aderiscono al substrato entro 6 ore dalla semina e a 7 giorni le cellule seminate sulla superficie dello *scaffold* hanno colonizzato i pori della matrice polimerica, suggerendo che la porosità dell'espanso risulta interconnessa e di dimensioni adeguate per permettere la proliferazione cellulare all'interno del costruito. Inoltre, dopo 30 giorni dalla semina, si osserva la crescita di strati cellulari multipli all'interno dei pori dello *scaffold*.

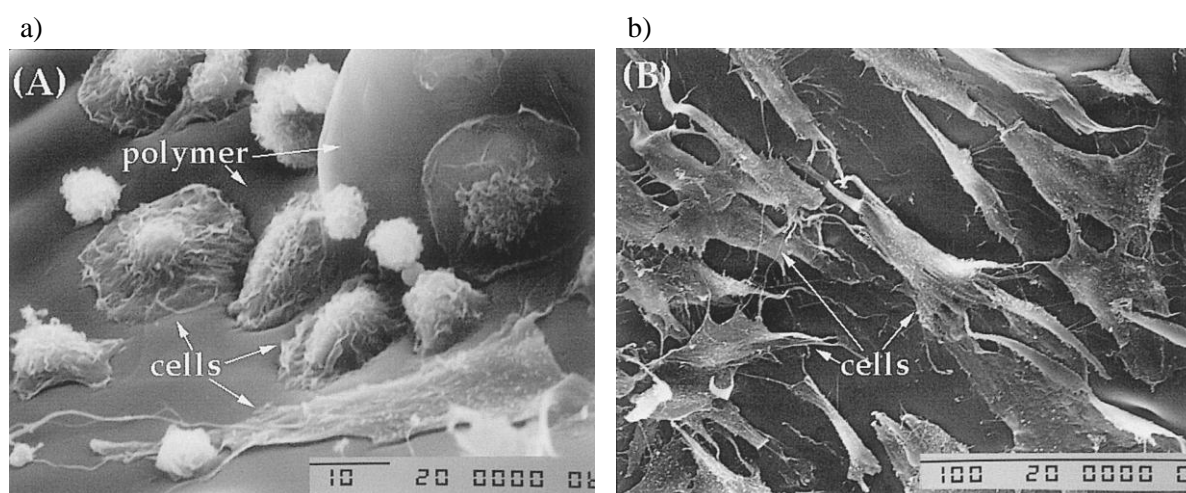


Figura 2.17 - (a) Cellule stromali da midollo osseo di coniglio durante i primi stati di adesione al substrato a 6 ore dalla semina; (b) monostrato cellulare presente sullo scaffold poliuretano a 7 giorni dalla semina. Le immagini sono state ottenute mediante microscopio elettronico a scansione^[2.11].

Negli studi condotti da Guelcher *et al.*^[2.9] su poliuretani biodegradabili con lisina diisocianato e copolimero policaprolattone - acido poliglicolico, è stata testata la citocompatibilità dei substrati mediante la coltura di cellule di linea MG-63, da osteosarcoma umano. Per tutti gli espansi la vitalità cellulare registrata è maggiore del 95% a 21 giorni dalla semina e il numero di cellule adese ai costrutti poliuretano è di due ordini di grandezza superiore a quello relativo ai materiali di controllo in polietilene. Questi risultati trovano giustificazione nell'elevata porosità delle schiume poliuretano (95%), rispetto a quella dei substrati di controllo (29%), che conferisce ai costrutti un'elevata area superficiale disponibile per la colonizzazione cellulare.

La presenza di cellule all'interno del materiale dimostra come i pori siano aperti e interconnessi, inoltre la proliferazione cellulare suggerisce l'assenza di citotossicità da parte dei prodotti di degradazione degli *scaffold* realizzati in questi studi.

2.3.3.4 Studi di biocompatibilità *in vivo*

In letteratura sono presenti studi relativi alla valutazione della biodegradabilità e della biocompatibilità *in vivo* di *scaffold* poliuretanic, al fine di indagare la risposta dei tessuti circostanti il costrutto e la reazione dell'ospite all'impianto del materiale estraneo. In uno studio presente in letteratura, Zhang *et al.*^[2,13] hanno impiantato provini di espansi poliuretanic, a base di lisina diisocianato e glucosio, nella regione addominale di ratti. Sono stati posizionati quattro campioni in ogni ratto, in posizione sottocutanea.

Analisi istologiche (Figura 2.18) condotte a 15 giorni dall'impianto hanno rivelato la formazione di tessuto di granulazione e di una esigua capsula fibrotica attorno alla matrice polimerica, con presenza di vascolarizzazione nei tessuti circostanti, e nessun segno di necrosi. Non è stata osservata, inoltre, la presenza di cellule giganti (*foreign body giant cells*, FBGC) nell'intorno del sito d'impianto. Indagini eseguite a 60 giorni post-impianto hanno mostrato la completa degradazione dell'espanso in tre delle cinque cavie esaminate, mentre negli altri due animali è stata registrata una degradazione di circa il 90%.

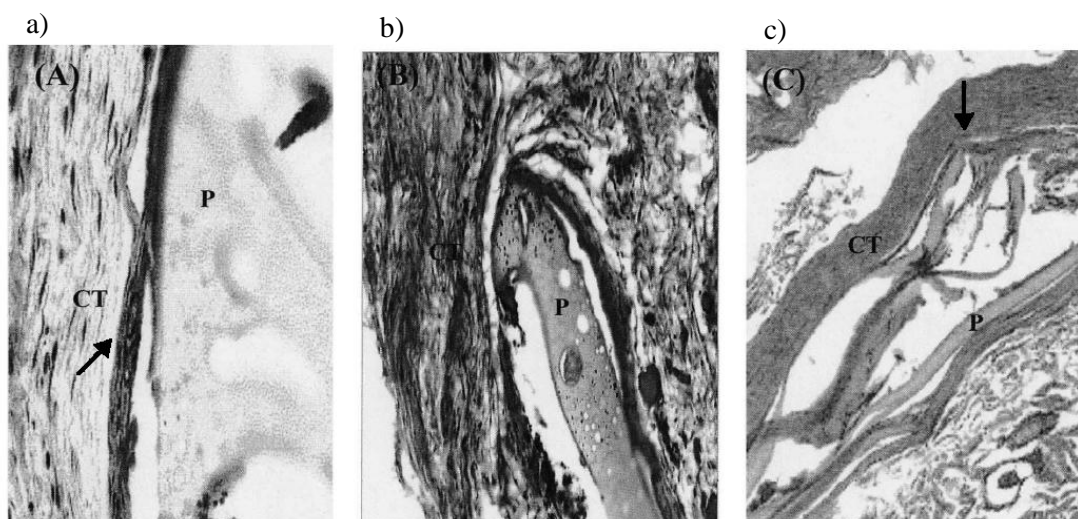


Figura 2.18 - Analisi istologiche della reazione da corpo estraneo in seguito all'impianto della matrice polimerica LDI-glucosio. Sezioni dell'espanto a 15 giorni (a), 30 giorni (b), 60 giorni (c). La sezione in figura (c) mostra una degradazione del materiale maggiore del 90%. CT: tessuto connettivo, P: poliuretano espanso^[2,13].

Gli autori riportano assenza d'incremento nel tempo dello spessore della capsula fibrotica e di accumulo di cellule giganti coinvolte nella reazione da corpo estraneo. Analisi ELISA di campioni di siero prelevato dalle cavie hanno escluso la presenza di anticorpi rivolti verso il materiale polimerico, ciò dimostra come il costrutto non sia immunogenico *in vivo*.

Per quanto concerne la cinetica di degradazione è stato osservato come l'espanso si degradi tre volte più velocemente *in vivo* che *in vitro*.

In un altro studio, condotto da Gogolewski *et al.*^[2.36], sono stati impiantati *scaffold* porosi poliuretanicici in difetti ossei appositamente creati della cresta iliaca di 8 pecore (Figura 2.19a), per una durata complessiva dell'esperimento pari a 6 mesi. Gli animali sono stati separati in due gruppi distinti: nel primo gruppo sono stati utilizzati poliuretani espansi con 70% di componente idrofilica e 30% di componente idrofobica, mentre nel secondo sono stati impiegati espansi con rapporto tra segmenti idrofilici e idrofobici pari a 30:70.

Dati presenti in letteratura, relativi a difetti ossei iliaci non trattati con alcun riempitivo, sono stati utilizzati come controllo.

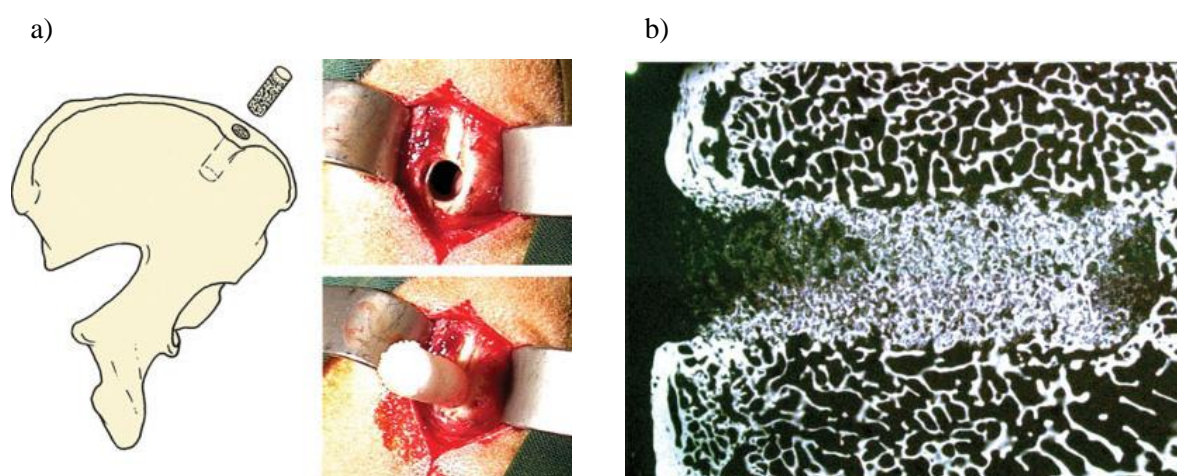


Figura 2.19 – (a) impianto di scaffold poliuretanicici in difetti ossei della cresta iliaca di pecora; (b) immagine radiografica del difetto colmato con scaffold poliuretanicico con il 70% di componenti idrofilici, dopo 6 mesi dall'impianto^[2.36].

Tutti gli animali sono sopravvissuti all'esperimento e in nessuno di essi sono stati riscontrati sintomi di infezione. A sei mesi dall'impianto, tutti i difetti mostrano neoformazione di tessuto osseo spongioso all'interno dei pori degli *scaffold*, in quantità simile per tutti i materiali testati. È inoltre da sottolineare come il contenuto di minerali all'interno dei polimeri più idrofilici, dovuto alla deposizione di calcio-fosfati, sia superiore rispetto a quello registrato per gli espansi più idrofobici, a conferma dei risultati ottenuti da prove di calcificazione *in vitro*^[2.38;2.39].

Analisi radiografiche (Figura 2.19 b) confermano la formazione di tessuto osseo più denso in confronto a quello nativo, con un rapporto calcio-fosforo pari a 1.76, rispetto al valore fisiologico di 1.83 dell'osso della cresta iliaca.

Sebbene gli autori non forniscano alcun dato inerente alla velocità di degradazione del materiale, gli espansi poliuretanicici considerati in questo esperimento hanno condotto alla parziale rigenerazione di difetti ossei della cresta iliaca, che difficilmente giungono spontaneamente a guarigione, come testimoniato dai risultati di test di controllo, nei quali è stata osservata la sola formazione di tessuto fibroso.

Capitolo 3

Attività sperimentale

Durante la fase sperimentale di questo lavoro di tesi sono state condotte prove preliminari di sintesi ad uno stadio di poliuretani espansi, i cui reagenti sono stati selezionati con l'obiettivo di conferire al prodotto proprietà di biodegradabilità.

Inizialmente, per sviluppare la conoscenza delle procedure di laboratorio e per apprendere le tecniche di caratterizzazione comunemente utilizzate, è stata eseguita la sintesi un poliuretano espanso biointegrabile, ad elevata idrofilicità. L'espanso ottenuto è stato poi caratterizzato valutandone il *water uptake* a 37°C, la porosità aperta e il comportamento meccanico a compressione.

In seguito, dopo un'accurata selezione dei reagenti, basata sulle informazioni presenti nella letteratura scientifica, al fine di ottenere polimeri altamente idrofilici e biodegradabili, sono state condotte prove di sintesi di poliuretani espansi biodegradabili. Occorre sottolineare come le prove eseguite siano prettamente preliminari; esse sono state svolte in numero ridotto e inoltre la caratterizzazione effettuata ha riguardato un numero limitato di parametri (o proprietà). Prove di rigonfiamento in acqua a 37°C hanno permesso di valutare l'idrofilicità dei materiali; analisi di spettroscopia infrarossa e di microscopia elettronica a scansione hanno consentito, rispettivamente, di indagarne la composizione chimica e la morfologia superficiale.

Nei prossimi paragrafi verranno descritti il processo di sintesi delle schiume poliuretatiche e le relative tecniche di caratterizzazione, con i risultati delle prime analisi effettuate sui materiali sintetizzati.

3.1 Sintesi di espansi poliuretanic (PU)

3.1.1 Reagenti per espansi PU biointegrabili

Per determinare le quantità di reagenti da utilizzare nella sintesi delle schiume biointegrabili, si utilizza un foglio di calcolo, strutturato in funzione della massa di schiuma che si vuole ottenere. Tutti i reagenti impiegati per la sintesi delle schiume poliuretaniche biointegrabili si trovavano a disposizione presso il Laboratorio di Biomateriali del Politecnico di Milano (Tabella 3.1).

Tabella 3.1 – Reagenti utilizzati per la sintesi di schiume poliuretaniche biointegrabili.

Reagente	Schiuma PU biointegrabile ad elevata idrofilicità
Poliolo	<i>Elastoflex:</i> 2 poli-etero polioli; 1,5% polioli ammina; butandiolo; etilen glicole
Isocianato	<i>MDI polimerico Desmodur PF (Bayer):</i>
Acqua	Acqua distillata (2% w/w _{poliolo})
Catalizzatore	Ferro acetilacetato (FeAA)

3.1.2 Reagenti per espansi PU biodegradabili

In questo lavoro di tesi sono state eseguite prove preliminari di sintesi di schiume poliuretaniche biodegradabili. Inizialmente sono stati sintetizzati materiali sfruttando il grado di umidità del poliolo (cioè senza introdurre acqua in fase di sintesi), per verificare l'effettiva formazione di un poliuretano in seguito all'interazione tra i reagenti selezionati. Successivamente, è stata introdotta acqua in fase di sintesi, per ottenere un rapporto massico acqua/poliolo pari a 0,02 o 0,01. In tabella 3.2 sono riportati i reagenti utilizzati per queste prove preliminari.

Tabella 3.2 – Reagenti utilizzati per prove preliminari di sintesi di poliuretani biodegradabili.

Reagente	Schiume PU biodegradabili
Poliolo	Poli-etilenglicole (PEG, peso molecolare pari a 1000 g/mole)
Isocianato	<i>MDI polimerico</i> Desmodur PF (Bayer)
Acqua	Acqua distillata (2% oppure 1% w/w _{poliolo})
Catalizzatore – agente reticolante	Trietanolamina (TEA)

Il poli-etilenglicole (Sigma-Aldrich®) è stato selezionato al fine di realizzare un polimero altamente idrofilico; è infatti noto come la velocità di degradazione di un materiale polimerico cresca all'aumentare del grado di idrofilicità delle sue catene^[3,6;3.7].

Per quanto concerne l'isocianato, è stato impiegato MDI polimerico (metilene-bis-fenilisocianato), già utilizzato presso il Laboratorio di Biomateriali per la sintesi di schiume poliuretatiche biointegrabili, altamente reattivo e i cui prodotti di degradazione sono biocompatibili.

Come catalizzatore e agente reticolante è stata utilizzata trietanolamina (Sigma-Aldrich®), un'ammina terziaria trifunzionale. È riconosciuto come le ammine terziarie siano molecole in grado di catalizzare la reazione di espansione (*blowing reaction*, Capitolo 1) tra isocianato e acqua; inoltre la funzionalità maggiore di 2 consente l'ottenimento di un polimero reticolato.

Il primo passo, dopo la scelta dei reagenti, consiste nella determinazione delle quantità degli stessi da impiegare in fase di sintesi. A tale scopo, è stato realizzato un apposito foglio di calcolo, in grado di restituire le masse da utilizzare per ciascun reagente, considerando rapporti stechiometrici (isocianato:poliolo) e (isocianato:catalizzatore) pari a 5:2 e partendo da un quantitativo di TEA prestabilito.

3.1.3 Processo di sintesi

3.1.3.1 Titolazione del poliolo

La prima operazione da eseguire nel processo di sintesi delle schiume poliuretatiche consiste nella titolazione del poliolo, che permette di determinare la percentuale di acqua in esso presente.

Questo passaggio è necessario per la determinazione della esatta quantità di acqua che deve essere impiegata in fase di sintesi; infatti, la massa totale dell'acqua necessaria (utilizzata come agente espandente) è costituita in parte dall'acqua presente nel poliolo e in parte da quella che dovrà essere aggiunta durante la sintesi. La titolazione del poliolo, quindi, consente di calcolare l'esatto quantitativo d'acqua da aggiungere.

Lo strumento utilizzato per la titolazione è un titolatore Karl Fischer METTLER®DL18. Il poliolo, introdotto all'interno del titolatore, entra in contatto con il liquido titolante e lo strumento restituisce il quantitativo d'acqua, espresso in percentuale, presente all'interno del reagente. Questa misura viene ripetuta per 5 volte e il risultato della titolazione è espresso come valor medio e deviazione standard dei valori relativi alle 5 prove eseguite.

3.1.3.2 Sintesi ad uno stadio

Terminata la titolazione del poliolo, è possibile proseguire con la sintesi degli espansi poliuretatici, che viene condotta mediante reazione ad uno stadio. La procedura di sintesi è la stessa sia per le schiume biointegrabili, sia per quelle biodegradabili.

Un becher di polipropilene (PP) viene posizionato sulla bilancia di precisione e si procede all'introduzione dei reagenti, utilizzandone quantità stabilite dal foglio di calcolo, secondo questo ordine:

1. Catalizzatore;
2. Acqua deionizzata;
3. Poliolo (che deve essere introdotto rapidamente per non fare evaporare l'acqua).

I componenti vengono a questo punto miscelati utilizzando un agitatore a colonna da banco (ALCW750 MAVER®, Figura 3.1 a) per 40 secondi a 2000 giri/minuto.

4. Si introduce infine l'isocianato, che innesca la reazione di polimerizzazione e la concomitante espansione della schiuma.

La miscela viene agitata per 90 secondi a 2000 giri / minuto e al termine dell'agitazione la massa polimerica può essere trasferita in uno stampo chiuso, oppure può essere lasciata all'interno del becher in cui si è svolta la reazione, per l'espansione libera.

Nel caso di sintesi delle schiume biointegrabili una quantità nota di miscela (definita dal foglio di calcolo) viene versata all'interno di uno stampo, in polimetilmetacrilato (PMMA PERSPEX®), che viene chiuso velocemente per evitare la fuoriuscita di parte della massa poliuretanica (Figura 3.1 b). Al termine della reazione, l'espanso viene lasciato riposare nello stampo per tre giorni, in condizioni di temperatura e umidità controllate.

Nel caso di sintesi delle schiume biodegradabili, invece, il becher viene coperto con un foglio di alluminio per consentire la polimerizzazione in condizioni di temperatura e umidità controllate.

a)



b)

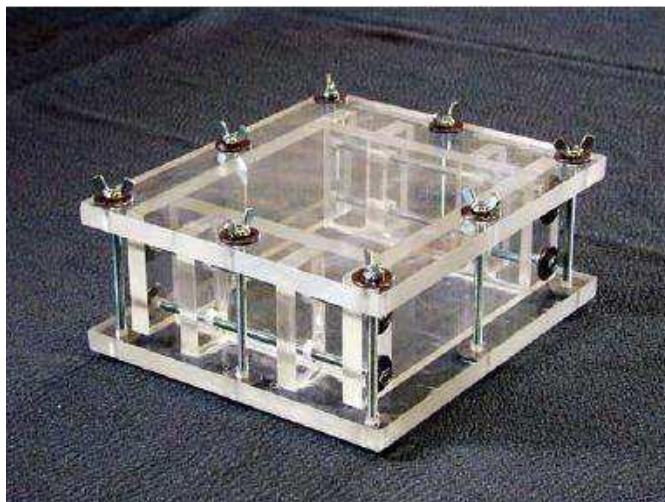


Figura 3.1 – a) Agitatore a colonna da banco; b) stampo in PMMA^[3.1].

Sono state eseguite complessivamente 6 sintesi di schiume poliuretatiche (Tabella 3.3), con le seguenti caratteristiche:

- ✚ Una schiuma biointegrabile, ad elevata idrofilicità con contenuto di acqua pari al 2% w/w_{poliolo} (in seguito denominata EF);
- ✚ Cinque schiume biodegradabili, di cui:
 - ✓ Tre realizzate senza aggiungere acqua in fase di sintesi, sfruttando quindi il grado di umidità del poliolo (in seguito denominate PS, PL1, PL2);
 - ✓ Una realizzata con contenuto d'acqua pari al 2% w/w_{poliolo} (S2);
 - ✓ Una realizzata con contenuto d'acqua pari all' 1% w/w_{poliolo} (S1).

Per le due schiume biodegradabili sintetizzate con aggiunta di acqua al 2% e all'1% w/w_{poliolo} è stato osservato il collasso del materiale in un arco di tempo pari a 24 ore, segno dell'instabilità della struttura porosa.

Tabella 3.3 – Sigle utilizzate per i materiali sintetizzati.

Sigla Espanso	Caratteristiche dell'espanso
EF	Biointegrabile; ad elevata idrofilicità
PS	Biodegradabile; realizzato con PEG ceroso, senza aggiungere acqua in fase di sintesi
PL1	Biodegradabile; realizzato con PEG posto in stufa termostata a 100°C(*), senza aggiungere acqua in fase di sintesi
PL2	Biodegradabile; realizzato con PEG posto in stufa termostata a 100°C(*), senza aggiungere acqua in fase di sintesi
S2	Biodegradabile; realizzato con PEG posto in stufa termostata a 100°C(*), aggiungendo una quantità d'acqua pari a 2% w/w _{poliolo}
S1	Biodegradabile; realizzato con PEG posto in stufa termostata a 100°C(*), aggiungendo una quantità d'acqua pari a 1% w/w _{poliolo}

(*) Il PEG è stato posto in stufa termostata a 100°C prima della sintesi al fine di ottenerne il passaggio da una fase cerosa ad una fase liquida, per agevolare il processo di miscelazione con gli altri reagenti.

3.2 Caratterizzazione di espansi poliuretanici

3.2.1 Preparazione dei campioni

Trascorsi tre giorni dalla sintesi, la schiuma viene estratta dallo stampo e si procede all'eliminazione dei primi strati superficiali a contatto con le pareti dello stampo. Questi strati superficiali sono comunemente detti "pelli" e sono caratterizzati da una struttura più compatta, con assenza di porosità.

L'operazione di rimozione delle pelli viene eseguita mediante un filo di acciaio montato su un seghetto, con l'ausilio di una taglierina in PMMA^[3.2] (Figura 3.2).

Al termine di questa operazione è necessario attendere che la schiuma raggiunga un peso costante, in seguito alla perdita di peso che l'espanso subisce a causa della sostituzione dell'anidride carbonica, contenuta nei pori, con aria.

Successivamente si procede al taglio della schiuma in lastre di spessore pari a quello dei provini necessari per le prove di caratterizzazione. Da ogni lastra vengono ricavati provini cilindrici (altezza 10 mm, diametro 15 mm) mediante un punzone circolare montato sull'agitatore meccanico. È necessario che tutti i provini siano identici, per permettere una ripetitività durante le misure di caratterizzazione.

Per le schiume biodegradabili non è stato possibile ricavare provini cilindrici a causa dello spessore ridotto e dell'eccessiva flessibilità del materiale, che non consentono l'utilizzo del punzone circolare. In questo caso sono stati ricavati manualmente provini di forma cubica, servendosi di un bisturi e avendo cura di realizzare provini di dimensioni simili.

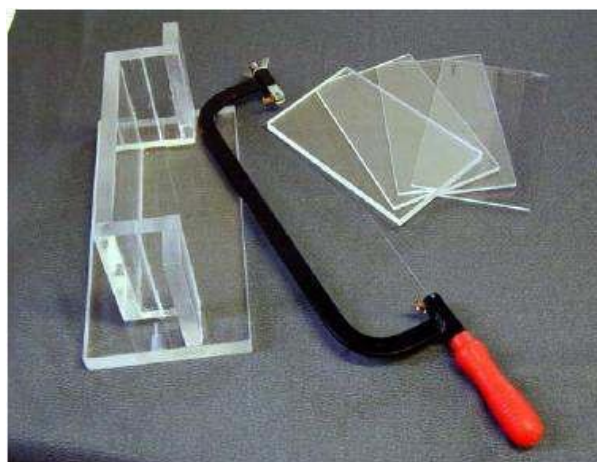


Figura 3.2 – Seghetto con filo di acciaio e taglierina in PMMA^[3.2].

3.2.2 Analisi di microscopia elettronica a scansione (SEM)

Le schiume poliuretaniche biodegradabili sintetizzate (PS, PL1, PL2, S1, S2) sono state osservate al microscopio elettronica a scansione (StereoScan 360 Cambridge), per indagarne la morfologia superficiale. I campioni polimerici sono stati ricoperti con un rivestimento d'oro mediante tecnica di *sputtering* (Sputter Coater SC7640, Polaron) e successivamente osservati ad ingrandimenti di 30 e 100X, applicando una tensione di 10 kV.

3.2.3 Percentuale di porosità aperta

La porosità aperta di un espanso è rappresentata dal rapporto tra il volume di pori aperti ($V_{p.a.}$) e il volume totale (V_{tot}) e si indica come percentuale di pori aperti (% p. a.). Questo parametro viene calcolato mediante la seguente formula:

$$\% p.a. = \frac{V_{p.a.}}{V_{tot}} \times 100$$

con $V_{p.a.} = V_p - V_i$, in cui V_p è il volume del provino e V_i è il volume impenetrabile al gas.

Per la misura della percentuale di porosità aperta si utilizza un *picnometro a variazione di volume* (Figura 3.3), seguendo le indicazioni riportate nella normativa UNI EN ISO 4590^[3.3].

Esso si basa sulla legge di Boyle-Mariotte, che, per trasformazioni isoterme, può essere espressa come:

$$\frac{\Delta P}{P} = - \frac{\Delta V}{V}$$

In cui:

- P rappresenta la pressione iniziale del gas;
- V rappresenta il volume della camera di prova in cui è contenuto il gas;
- ΔV rappresenta la variazione di volume;
- ΔP rappresenta la variazione di pressione.

Se un gas subisce un'espansione isoterma, è possibile determinarne il volume iniziale noti la pressione di partenza, il volume di espansione e la depressione raggiunta. Eseguendo misure con provini compatti di volume noto, completamente occlusi, e conoscendo come ΔP varia con V , è possibile ricavare la curva di taratura ΔP - V dello strumento. Essa viene tracciata eseguendo prove nel seguente ordine: a camera vuota, successivamente con 3 e infine con 6 provini metallici, ciascuno di volume pari a $0,3032 \text{ cm}^3$.

Occorre ripetere la procedura di taratura ad ogni sessione di prova, in quanto lo strumento è fortemente influenzato dalle condizioni di temperatura, pressione e umidità relative all'ambiente in cui si esegue la misura.

Introducendo nella camera un provino di campione espanso, le celle chiuse si comportano come corpi compatti, aumentando la depressione raggiunta a seguito dell'espansione, mentre le celle aperte non influiscono sulla misura.

Per determinare la percentuale di porosità aperta si utilizzano 3 provini della schiuma sintetizzata, dei quali, note le dimensioni geometriche, è stato calcolato il volume V_p .

Successivamente si introduce un provino alla volta nella camera e si fa compiere al sistema un'espansione isoterma; questa operazione viene ripetuta 3 volte per ogni campione. Dopo aver letto la depressione raggiunta e servendosi della curva di taratura, è possibile calcolare il volume impenetrabile al gas (V_i) e la percentuale di porosità aperta della schiuma, espressa come valor medio e deviazione standard delle nove misure eseguite.

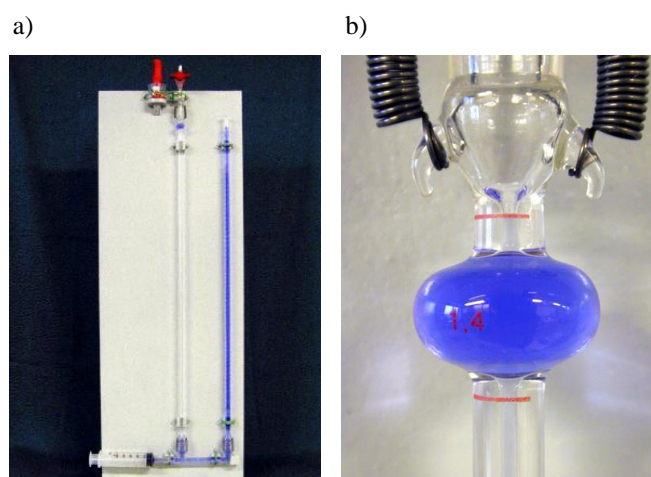


Figura 3.3 – a) Picnometro a variazione di volume; b) particolare della bolla^[3,4].

Prove di misura della porosità aperta sono state condotte sulla schiuma biointegrabile EF, con l'obiettivo di apprendere la procedura di taratura e di utilizzo dello strumento.

3.2.4 Prove di assorbimento di acqua a 37°C

Le prove di assorbimento sono condotte per determinare la capacità dell'espanso di assorbire un fluido, in questo caso acqua. L'idrofilicità del materiale e la percolazione del fluido all'interno delle cavità del provino costituiscono i due fattori principali dai quali dipende l'assorbimento del fluido. La percolazione di acqua dipende, a sua volta, dalla percentuale di porosità aperta.

Per questa prova vengono impiegati 3 provini che, dopo essere stati misurati e pesati, vengono posti in acqua distillata all'interno di contenitori distinti e numerati, posti in stufa termostata a 37°C.

Ad istanti temporali prestabiliti (30 min, 2, 6, 24, 48, 96 e 240 ore) si estraggono i provini dai rispettivi contenitori, si asciugano leggermente con carta da laboratorio per eliminare l'acqua in superficie e si procede alla verifica del peso e alla misura delle dimensioni, al fine di determinare il *water uptake* (WU), parametro così definito:

$$WU(\%) = \frac{\text{Massa campione } (t) - \text{Massa campione } (t_0)}{\text{Massa campione } (t_0)} \times 100$$

In cui t rappresenta l'istante temporale in cui si misura il peso del provino e t_0 il tempo di inizio della prova.

Prove di *water uptake* sono state condotte sulla schiuma biointegrabile EF e sulle schiume biodegradabili sintetizzate sfruttando l'umidità del poliolo (PS, PL1, PL2).

3.2.5 Analisi di spettroscopia infrarossa (ATR-FTIR)

Per verificare la formazione di legami uretano lungo le catene polimeriche, i poliuretani espansi biodegradabili sintetizzati sono stati oggetto di analisi di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier in riflettanza totale attenuata (ATR – FTIR). Le analisi sono state condotte mediante spettrometro Nicolet 6700, Thermo Electron Corporation®. Ogni spettro registrato è il risultato dell'elaborazione di 64 scansioni eseguite ciclicamente sul campione.

3.2.6 Prove meccaniche di compressione

Le prove a compressione vengono eseguite secondo le indicazioni della norma UNI 6350-68, utilizzando una macchina INSTRON® 4200 (Figura 3.4).

È possibile eseguire prove di compressione a secco e ad umido (in questo caso il provino ha raggiunto il *plateau* di assorbimento, in acqua distillata a 37°C) per osservare come l'acqua assorbita dal materiale ne influenzi il comportamento meccanico.

Per ogni schiuma si eseguono test su 3 provini cilindri ($h = 10 \text{ mm}$, $\Phi = 15 \text{ mm}$).

Il provino viene posizionato al centro delle due incudini della macchina e si opera in controllo di spostamento della traversa mobile ad una velocità pari a 1 mm/minuto, con l'applicazione di un precarico pari a 1N. Ogni provino viene sottoposto ad un ciclo di prova (Figura 3.5) durante il quale il carico viene applicato e successivamente rimosso, in seguito al raggiungimento di una deformazione prefissata, pari al 50% dell'altezza del provino. I valori relativi allo spostamento della traversa e alla forza sono acquisiti da un *software*; successivamente l'elaborazione di questi valori permette di ottenere l'andamento della curva sforzo/deformazione relativa ad ogni campione.

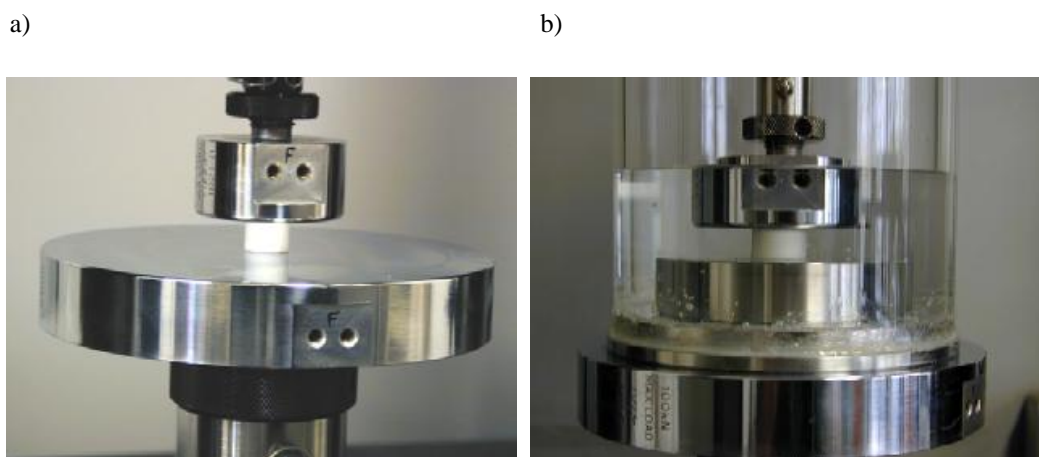


Figura 3.4 – a) Prova di compressione a secco; b) prova di compressione a umido^[3.5].

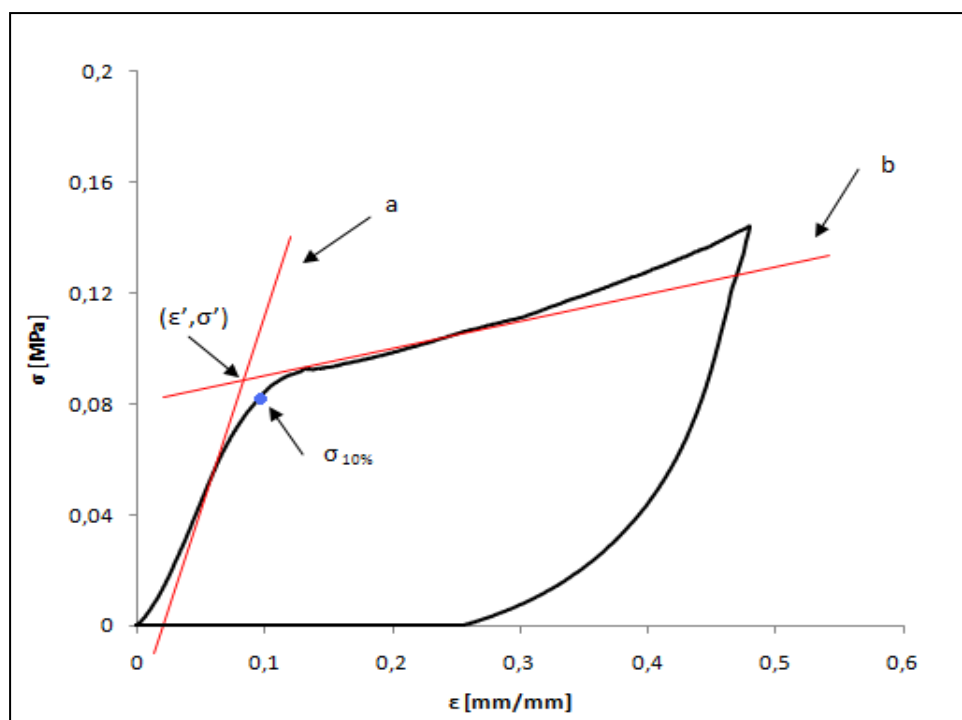


Figura 3.5 – Curva del ciclo di compressione e rette interpolanti i tratti lineare (a) e di collasso (b)^[3,5].

L'elaborazione delle curve consente di ricavare i valori dei seguenti parametri:

- ✚ sforzo corrispondente ad una deformazione del 10% ($\sigma_{10\%}$);
- ✚ pendenza della retta interpolante il primo tratto lineare (E^*);
- ✚ pendenza della retta interpolante il tratto di collasso (m^*);
- ✚ sforzo e deformazione relativi al punto di snervamento, ovvero il punto di intersezione delle due rette interpolanti il tratto elastico e quello di collasso (σ' ed ε');
- ✚ area del ciclo di isteresi, indice della dispersione energetica.

Il valore dei parametri meccanici sopra riportati è espresso come valore medio e deviazione standard dei valori relativi a 3 provini.

Per il calcolo dell'area di isteresi è stato utilizzato il programma Origin 6.0, che ne consente il calcolo mediante la sottrazione dell'area sottesa dalla curva di scarico all'area sottesa dalla curva di carico.

Al fine di valutarne il comportamento meccanico a compressione, sono state condotte prove di compressione sulla schiuma biointegrabile EF, a secco (EFs) e a umido (EFu).

3.3 Risultati delle prove di caratterizzazione

3.3.1 Analisi di microscopia elettronica a scansione (SEM)

Tutte le schiume poliuretaniche biodegradabili sintetizzate sono state osservate al SEM per valutarne la morfologia superficiale.

In figura 3.6 sono riportati ingrandimenti a 30X della morfologia superficiale delle schiume biodegradabili realizzate senza aggiungere acqua in fase di sintesi. L'indagine al SEM mostra come anche in questi materiali sia presente una minima porosità, dovuta all'umidità del poliolo, che ha dato luogo alla reazione di alcune molecole d'acqua con l'isocianato, con la conseguente formazione di anidride carbonica. In nessuno dei tre provini la struttura appare omogenea, si osservano pori di diverse dimensioni, scarsamente interconnessi. La schiuma PL1 mostra una morfologia più compatta rispetto agli altre due espansi, ciò ne potrebbe giustificare il ridotto valore di assorbimento registrato nelle prove di *water uptake*.

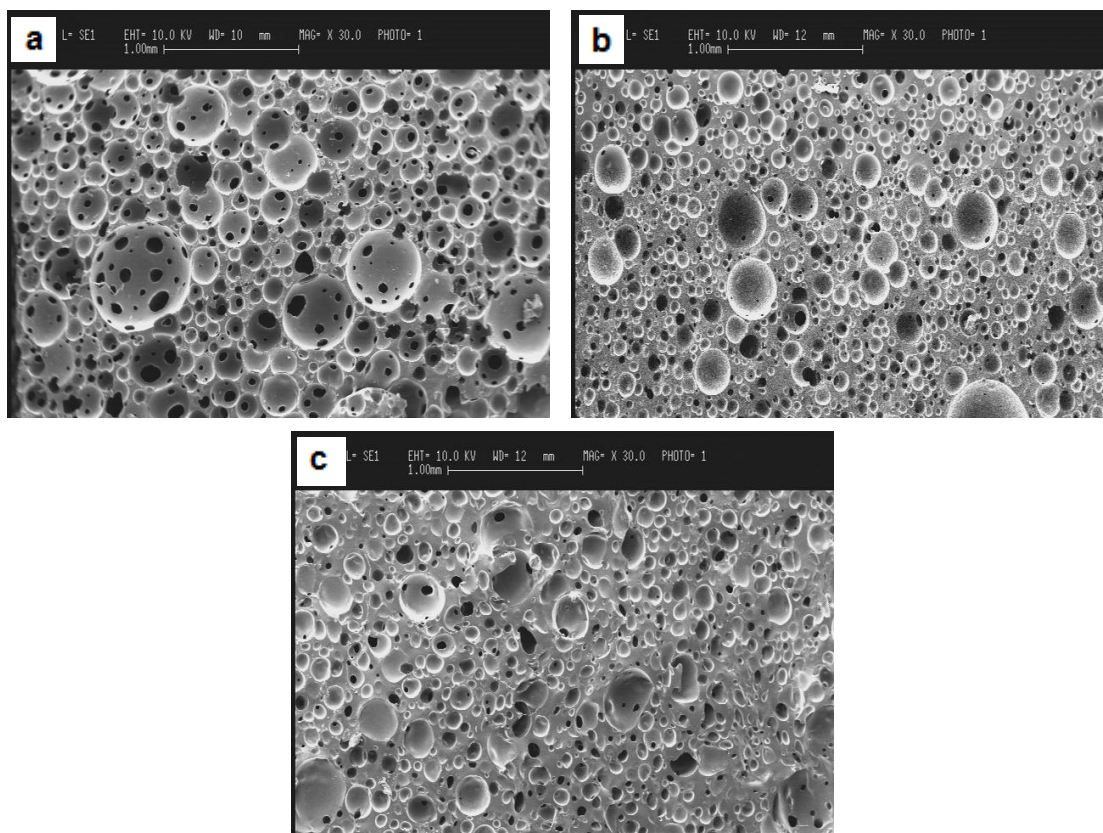


Figura 3.6 – Immagini al SEM della morfologia superficiale delle schiume PS (a), PL1 (b) e PL2 (c). Ingrandimento 30X.

Le immagini relative alle schiume poliuretaniche biodegradabili prodotte aggiungendo acqua in fase di sintesi mostrano una porosità in apparenza superiore rispetto a quella osservata per i materiali compatti (Figura 3.7 a,b). La schiuma S1 è caratterizzata da celle di dimensioni uniformi, in parte interconnesse. L'espanso S2, realizzato con un contenuto d'acqua pari al 2%, presenta una struttura omogenea, caratterizzata dalla presenza di punti d'innesco di un processo di espansione non giunto a termine (in figura 3.7c è possibile osservare porzioni di materiale in cui la formazione di pori non si è completata). Come per la schiuma S1, anche in questo caso la morfologia dei pori non è sferoidale, ciò potrebbe essere dovuto al collasso dell'espanso, avvenuto probabilmente a causa dell'incompatibilità della cinetica delle reazioni di espansione e di gelificazione. È inoltre da osservare come i pori dell'espanso S2 abbiano dimensioni maggiori rispetto a quelle dell'espanso S1; questo fatto potrebbe trovare giustificazione nel maggior quantitativo di acqua utilizzato in fase di espansione, che ha dato luogo alla formazione di una quantità maggiore di CO₂.

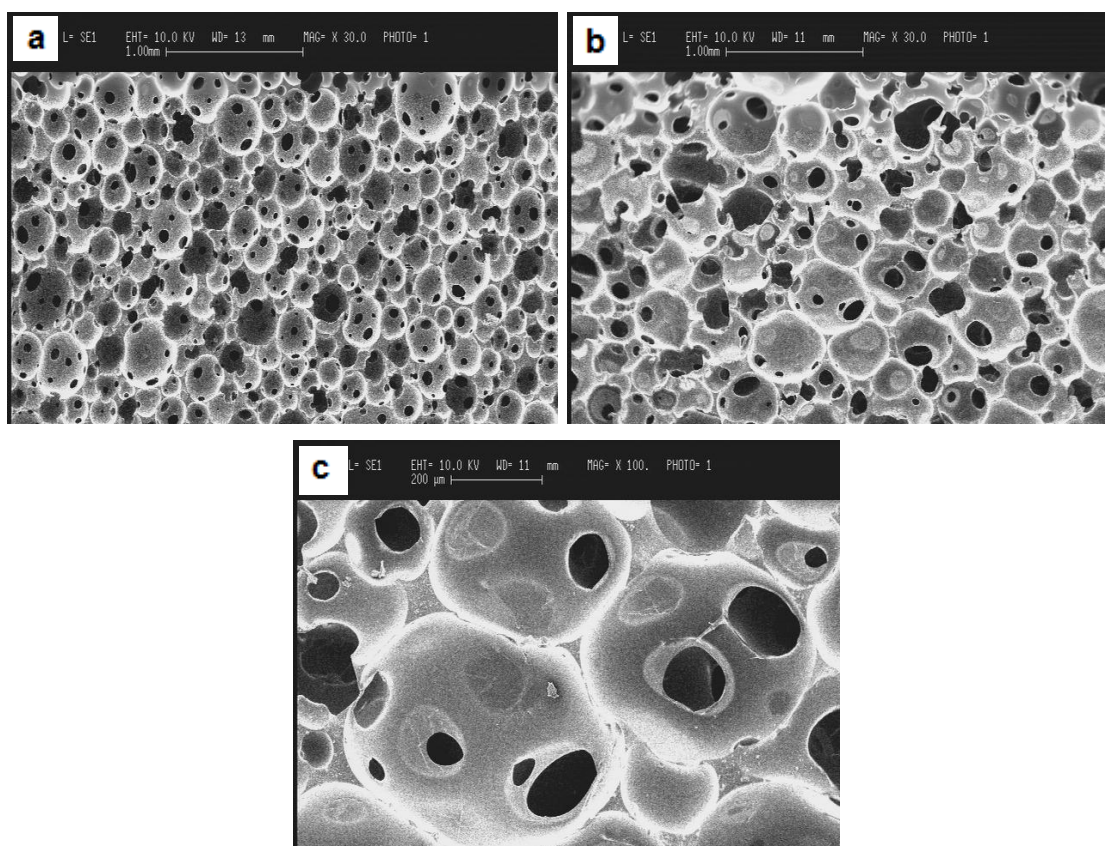


Figura 3.7 – Immagini al SEM della morfologia superficiale delle schiume S1 (a) e S2 (b), ingrandimento 30X. (c) Ingrandimento a 100X della morfologia superficiale dell'espanso S2.

3.3.2 Percentuale di porosità aperta

Il valore di porosità aperta misurato, espresso come valor medio e deviazione standard delle misure relative a 3 provini, è pari a $91\% \pm 3,2$. Dalle dimensioni dei provini cilindrici e dalla loro massa è stata inoltre calcolata la densità media della schiuma, pari a $(0,074 \pm 0,002) \text{ g/cm}^3$. L'elevata porosità aperta, oltre all'elevato grado di idrofilicità, giustifica gli alti valori di *water uptake* registrati per l'espanso biointegrabile EF (vedi paragrafo 3.3.3).

3.3.3 Prove di assorbimento di acqua a 37°C

In tabella 3.4 (a, b) sono riportati i valori di *water uptake* (espressi come valor medio e deviazione standard dei valori relativi a 3 provini per ogni espanso) e i rispettivi tempi, ai quali sono stati registrati i valori di assorbimento.

Tabella 3.4 – *Water uptake* (%) relativi alle schiume sintetizzate.

Tempo (h)	Valori di Water Uptake (%)			
	EF	PS	PL1	PL2
0	0	0	0	0
0,5	106,50 ± 31,65	241,49 ± 13,11	31,14 ± 0,95	61,44 ± 2,93
2	125,50 ± 19,73	250,01 ± 9,58	50,27 ± 2,64	116,46 ± 8,39
6	140,12 ± 22,83	253,28 ± 9,90	63,69 ± 5,56	163,55 ± 5,02
24	193,64 ± 35,57	258,12 ± 10,69	105,19 ± 2,90	234,40 ± 3,39
48	261,97 ± 48,42	263,86 ± 8,52	122,47 ± 3,12	246,23 ± 4,71
96	293,48 ± 53,70	264,08 ± 8,57	136,25 ± 2,45	251,75 ± 5,05
240	379,04 ± 47,21	264,22 ± 8,60	139,33 ± 1,64	253,77 ± 6,15
270	387,99 ± 44,08	-	-	-

La schiuma EF mostra un valore di assorbimento a *plateau* pari a circa il 388%, a conferma dell'elevata idrofilicità del materiale. Per questa schiuma è stato necessario verificare il valore di assorbimento oltre le 240 ore di incubazione, non essendo stato registrato il *plateau*.

I polimeri PS e PL2 mostrano valori di *water uptake* a *plateau* rispettivamente pari a 264,2% e 253,8%, indice delle proprietà idrofiliche del materiale. È da osservare, tuttavia, come il polimero PS abbia una cinetica di assorbimento molto più rapida (Figura 3.8) rispetto al polimero PL2 (dopo 30 minuti i valori di WU sono rispettivamente del 241,5% e del 61,4%).

Il massimo assorbimento della schiuma PL1 risulta pari al 139,3%, valore molto inferiore rispetto a quelli relativi agli altri polimeri sintetizzati. Una possibile causa di questo scostamento potrebbe risiedere nelle caratteristiche di scarsa porosità del materiale, nel quale è presente un numero ridotto di pori, all'interno di una struttura prevalentemente compatta.

I grafici in figura 3.8 mostrano l'andamento dei valori di assorbimento nel tempo delle schiume EF, PS, PL1, PL2.

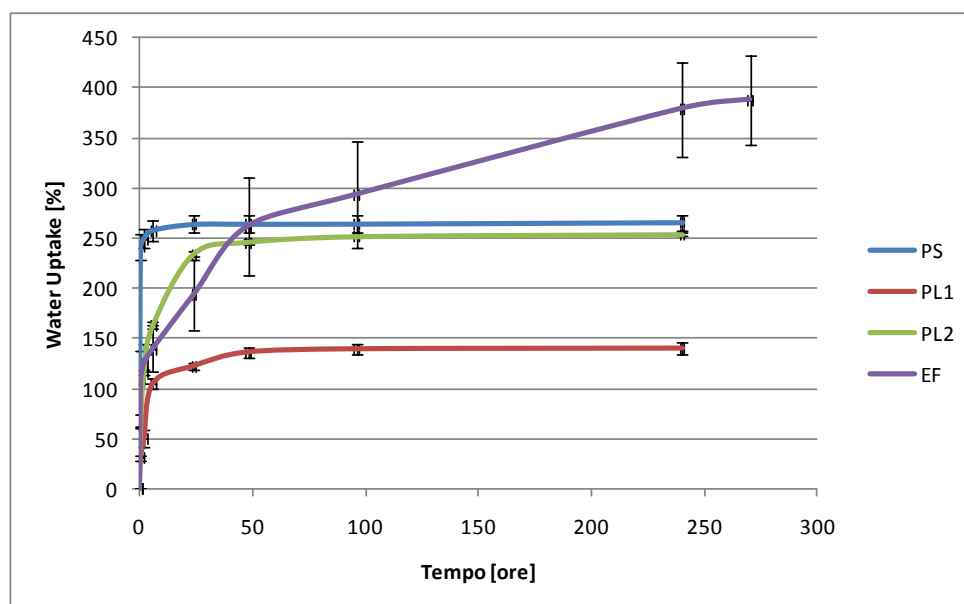


Figura 3.8 – Curve di assorbimento di acqua a 37°C relative alle schiume PS, PL1, PL2, EF.

3.3.4 Analisi di spettroscopia infrarossa (ATR-FTIR)

In figura 3.9 sono riportati i risultati delle analisi di spettroscopia infrarossa relativi ai poliuretani PS, PL1 e PL2.

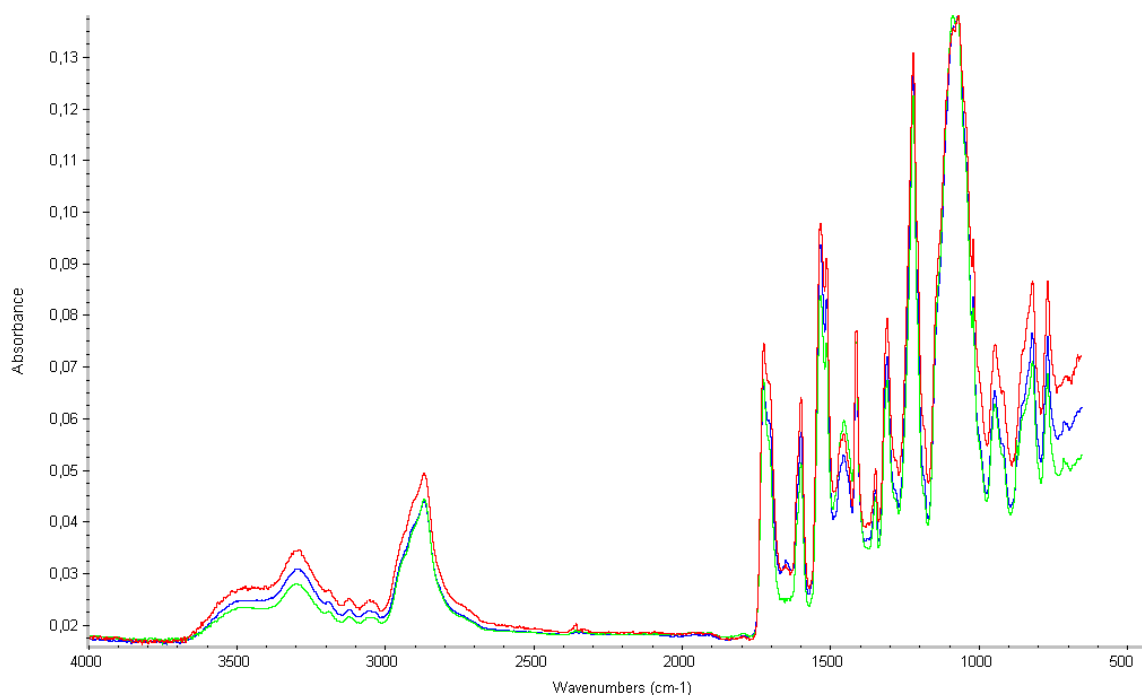


Figura 3.9 – Spettro di assorbimento delle schiume biodegradabili PS (blu), PL1 (rosso), PL2 (verde).

L'osservazione di picchi di assorbimento a 1724 e 1532 cm⁻¹ indica la presenza di legami uretano all'interno del materiale (picchi rispettivamente di *stretching* del legame C=O e di *bending* del legame N-H appartenenti a gruppi uretano). Il picco di assorbimento a 1221, 1108 e 1018 cm⁻¹ è dovuto alla presenza di legami etere (C-O-C), caratteristici del poli-etilenglicole, utilizzato come poliolo.

L'assenza di picchi di assorbimento nella banda 2100 – 2270 cm⁻¹ conferma l'assenza nel materiale di gruppi isocianato non reagiti.

3.3.5 Prove meccaniche di compressione

I grafici relativi alle prove eseguite a secco (Figura 3.10) e a umido (Figura 3.11) mostrano l'influenza dell'acqua assorbita, presente nella struttura porosa, sul comportamento meccanico del materiale, le cui proprietà diminuiscono in condizioni di umidità.

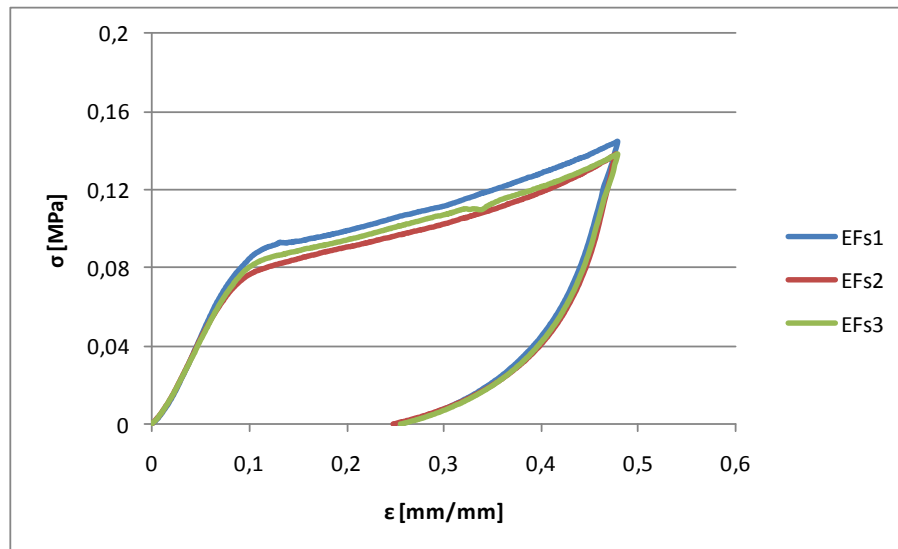


Figura 3.10 – Curve sforzo–deformazione ottenute da prove meccaniche di compressione a secco della schiuma biointegrabile EF.

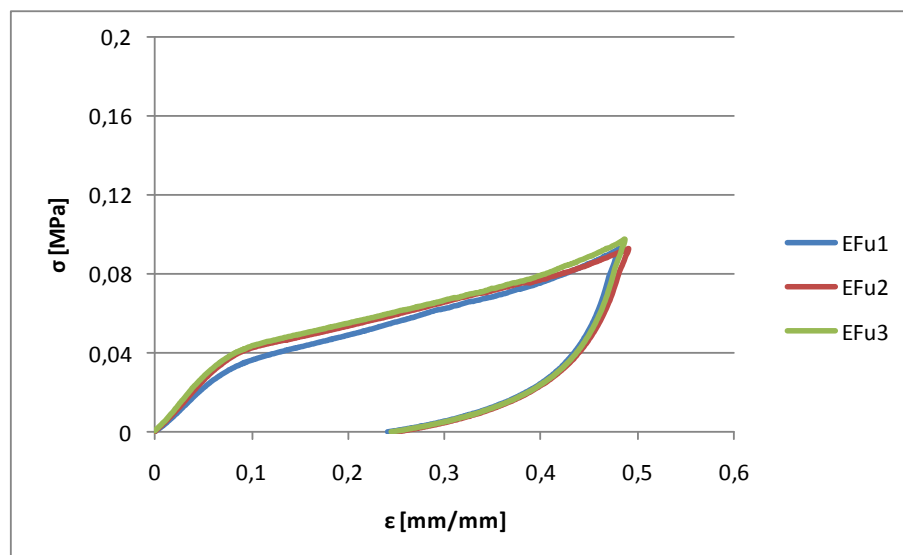


Figura 3.11 – Curve sforzo–deformazione ottenute da prove meccaniche di compressione a umido della schiuma biointegrabile EF.

In tabella 3.5 e in figura 3.12 sono riportati i valori medi dei parametri calcolati dall'elaborazione dei dati. Tali dati confermano una diminuzione delle proprietà meccaniche del materiale in seguito all'assorbimento di acqua.

Tabella 3.5 – Valori dei parametri meccanici ricavati dall'elaborazione delle curve cicliche relative a prove di compressione.

Espanso	E^* [MPa]	m^* [MPa]	σ^* [MPa]	ε^* [mm/mm]	$\sigma_{10\%}$ [MPa]	Isteresi [J/cm ³]
EFs	$0,98 \pm 0,07$	$0,14 \pm 0,002$	$0,08 \pm 0,004$	$0,09 \pm 0,003$	$0,08 \pm 0,004$	$0,04 \pm 0,001$
EFu	$0,49 \pm 0,05$	$0,13 \pm 0,006$	$0,04 \pm 0,003$	$0,07 \pm 0,003$	$0,04 \pm 0,004$	$0,02 \pm 0,001$

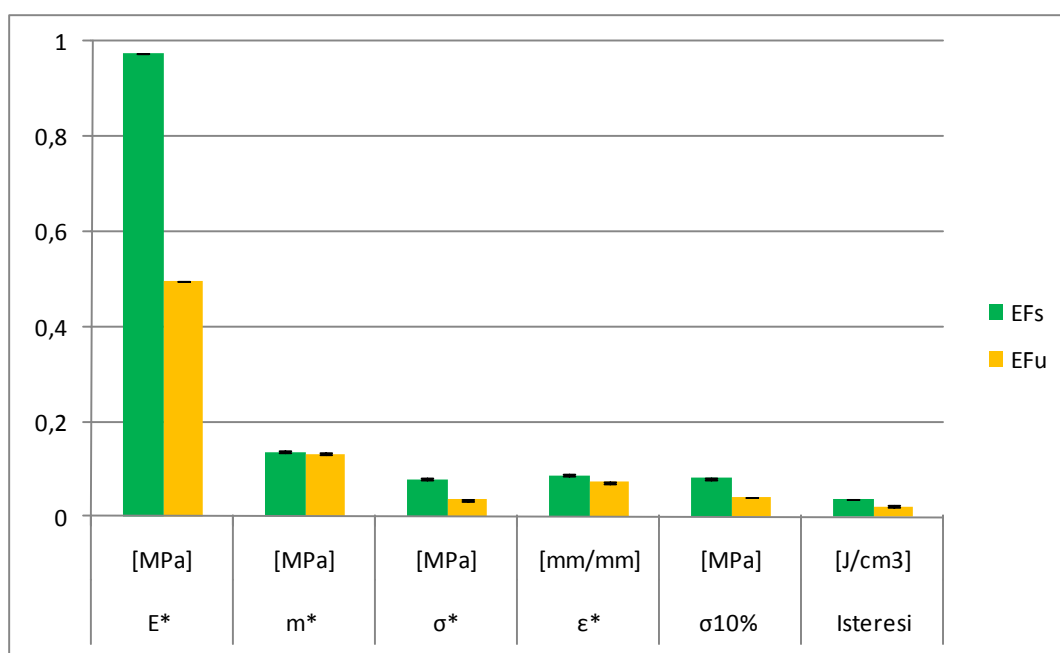


Figura 3.12 – Valori dei parametri meccanici ricavati dall'elaborazione delle curve cicliche relative a prove di compressione.

3.4 Conclusioni

In questo capitolo è stata considerata l'attività sperimentale condotta in questo lavoro di tesi, con l'obiettivo di selezionare i reagenti necessari ed eseguire prove preliminari di sintesi di poliuretani espansi, con proprietà di biodegradabilità.

Dai primi risultati ottenuti è stato riscontrato come i reagenti diano luogo alla formazione di poliuretani, con proprietà idrofiliche. L'osservazione al SEM dei campioni realizzati senza l'utilizzo di acqua come agente espandente evidenzia una morfologia superficiale non omogenea, con la presenza di pori scarsamente interconnessi.

L'introduzione dell'agente espandente (acqua) in fase di sintesi ha portato alla formazione di schiume con un grado di porosità aperta in apparenza superiore, tuttavia gli espansi sono stati soggetti a collasso durante le prime 24 ore successive alla sintesi, prova della loro instabilità strutturale.

Una possibile causa del collasso dei materiali potrebbe risiedere nell'utilizzo in un quantitativo di acqua eccessivo, che ha determinato la formazione di una quantità di anidride carbonica superiore a quella necessaria per dare luogo ad un processo di espansione la cui cinetica fosse simile a quella del processo di gelificazione dell'espanso (*gelling reaction*, Capitolo 1). Un'ulteriore possibile spiegazione del collasso potrebbe essere dovuta all'introduzione in fase di sintesi di un quantitativo eccessivo di catalizzatore: è noto come le ammine terziarie fungano da catalizzatore per la reazione tra molecole d'acqua e gruppi isocianato (Capitolo 1, paragrafo 1.2.3.3). In questo caso un eccesso di trietanolamina potrebbe aver innescato una reazione di espansione con cinetica molto più rapida rispetto a quella della reazione di gelificazione, conducendo al collasso del materiale.

Si ritiene che in futuro siano necessarie ulteriori prove di sintesi per individuare una composizione chimica che porti alla formazione di schiume stabili, non soggette a collasso, caratterizzate da una struttura omogenea e porosa, con elevato grado di interconnessione tra i pori.

Ad esempio, sarebbero necessarie prove di sintesi variando il quantitativo d'acqua e di catalizzatore introdotto, al fine di individuarne quello ottimale per la produzione di espansi stabili. Potrebbero essere sperimentati altri catalizzatori (ad esempio ammine terziarie diverse dalla trietanolamina) osservandone gli effetti sulla morfologia del materiale.

Inoltre, per aumentare la stabilità degli espansi e per favorire la formazione di una morfologia porosa interconnessa, potrebbero trovare applicazione in fase di sintesi agenti surfattanti e stabilizzanti, come fosfolipidi o sali metallici di acidi grassi.

Test di invecchiamento *in vitro* saranno infine necessari per verificare le proprietà di biodegradabilità dei materiali sintetizzati.

Conclusioni e sviluppi futuri

Negli ultimi anni, è stato registrato un importante incremento nell'interesse verso i poliuretani espansi biodegradabili, per applicazioni di ingegneria dei tessuti.

I dati presenti in letteratura, relativi a prove di biocompatibilità *in vitro* e *in vivo* (Capitolo 2), dimostrano come in futuro questi polimeri potrebbero rivelarsi una valida alternativa all'impiego dei materiali biodegradabili tradizionali, come poli(α -esteri), poli(propilene-fumarato) e polifosfazeni, per la produzione di *scaffold* e di sistemi per il rilascio controllato di farmaci.

Come è stato sottolineato durante questa trattazione, il grande vantaggio offerto dall'impiego dei poliuretani rispetto ai polimeri biodegradabili, risiede nella loro versatilità: in fase di sintesi, attraverso un'accurata selezione dei reagenti, è possibile combinare proprietà meccaniche, come rigidità o flessibilità, a caratteristiche di biocompatibilità e biodegradabilità. È possibile progettare materiali con proprietà meccaniche e strutturali adatte alla specifica applicazione (ad esempio per la ricostruzione del tessuto osseo, cartilagineo oppure dei tessuti molli), che possiedano contemporaneamente cinetiche di degradazione modulabili, con l'obiettivo di promuovere la formazione di un tessuto sano e funzionale.

Un'ulteriore peculiarità di questi polimeri è la possibilità di sintesi a partire da miscele liquide, il che li rende potenzialmente utili come materiali iniettabili *in situ*, per terapie non invasive, ad esempio per il riempimento di difetti a carico del tessuto osseo o per il rilascio controllato di farmaci.

I risultati di lavori presenti in letteratura relativi alla progettazione di poliuretani espansi biodegradabili, in termini di proprietà meccaniche, di degradazione e di biocompatibilità, sia *in vitro* che *in vivo*, sono incoraggianti e pongono le basi per il largo impiego di questi polimeri per applicazioni di ingegneria dei tessuti.

Il futuro della chimica dei poliuretani prevede la ricerca di nuovi reagenti (ad esempio isocianati sintetizzati partendo da amminoacidi) per la realizzazione di supporti per la medicina rigenerativa, capaci di degradarsi nel tempo dando luogo a prodotti di degradazione non citotossici, che siano facilmente metabolizzabili dall'organismo.

Per incrementare la stabilità degli espansi e per favorire la formazione di una struttura porosa interconnessa potrebbero ricercarsi nuovi agenti surfattanti e stabilizzanti biocompatibili, come fosfolipidi o sali metallici di acidi grassi.

In questo lavoro di tesi, oltre all'indagine e all'analisi critica della letteratura scientifica, sono stati selezionati i reagenti e condotte prove preliminari di sintesi ad uno stadio di schiume poliuretatiche biodegradabili.

I primi risultati mostrano come i reagenti scelti conducano alla formazione di poliuretani, tuttavia gli espansi sintetizzati si rivelano instabili, poiché soggetti a collasso durante le prime 24 ore successive alla sintesi.

Possibili cause dell'instabilità strutturale potrebbero risiedere nell'eccessivo quantitativo di acqua o di catalizzatore utilizzato in fase di sintesi, che potrebbe aver condotto ad uno squilibrio tra le cinetiche delle reazioni di espansione e gelificazione che hanno luogo durante il processo di crescita della schiuma (nel caso delle sintesi eseguite, la reazione di espansione risulta troppo rapida rispetto alla reazione di gelificazione).

Si ritiene che in futuro siano necessarie ulteriori prove di sintesi per individuare una composizione chimica che dia luogo ad espansi stabili nel tempo, che non siano quindi soggetti a collasso. Come già affermato nel Capitolo 3, saranno necessarie nuove prove di sintesi al fine di individuare il quantitativo ottimale di acqua e di catalizzatore per ottenere espansi poliuretatici stabili. Successivi test di invecchiamento *in vitro* sanno necessari per studiare e ottimizzare la cinetica di degradazione dei materiali sintetizzati, con l'obiettivo di realizzare espansi porosi biodegradabili, per applicazioni nel campo della medicina rigenerativa.

Bibliografia

Introduzione

- [1] Mantero, S.; Remuzzi, A.; Raimondi, M. T.; Ahluwalia, A.; Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa; 2009; 67 – 110.
- [2] Raimondi, M. T.; Dispense del corso di “Ingegneria dei Tessuti”, A.A. 2008 – 2009.
- [3] www.iitd.ac.in
- [4] Tanzi, M. C.; Fondamenti di Bioingegneria Chimica: non solo Biomateriali. Pitagora Editrice Bologna, 2006; 207 – 215.
- [5] Gorna, K.; Gogolewski, S.; Biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration. *Journal of Biomedical Material Research*, 2006; 79A: 128 – 138.
- [6] Gogolewski, S.; Gorna, K.; Turner, A. S.; Regeneration of bicortical defects in the iliac crest of estrogen-deficient sheep, using new biodegradable polyurethane bone graft substitutes. *Journal of Biomedical Material Research*, 2006; 77(4): 802 – 810.
- [7] Tanzi, M. C.; Fondamenti di Bioingegneria Chimica: non solo Biomateriali. Pitagora Editrice Bologna, 2006; 215 – 221.
- [8] Zhang, J. Y.; Beckman, E. J.; Hu, J.; Yuang, G. G.; Agarwal, S.; Hollinger, J. O.; Synthesis, biodegradability, and biocompatibility of lysine diisocyanate-glucose polymers. *Tissue Engineering*, 2002; 8 (5): 771 – 785.
- [9] Tanzi, M. C.; Dispense del corso di “Strutture Bioartificiali e Biomimetiche”, A. A. 2008 – 2009.
- [10] Gorna, K.; Gogolewski, S.; Preparation, degradation, and calcification of biodegradable polyurethane foams for bone graft substitutes. *Journal of Biomedical Material Research*, 2003; 67A: 813 – 827.
- [11] Sharifpoor, S.; Labow, R. S.; Santerre, J. P.; Synthesis and characterization of degradable polar hydrophobic ionic polyurethane scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 2009; 10: 2729 – 2739.
- [12] Armentano, I.; Dottori, M.; Fortunati, E.; Mattioli, S.; Kenny, J. M.; Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. *Polymer Degradation and Stability*, 2010; 95: 2126 – 2146.

- [13] Giordano, C.; Dispense del corso di “Laboratorio di Biocompatibilità e Colture Cellulari – Micro e nano strutture”, A.A. 2009 – 2010.
- [14] Van Minnen, B.; Van Leeuwen, M. B.; Stegenga B., Zuidema, J.; Hissink, C. E.; Van Kooten, T. G.; Bos, R. R.; Short-term *in vitro* and *in vivo* biocompatibility of a biodegradable polyurethane foam based on 1,4-butanediisocyanate. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 2005; 16: 221 – 227.
- [15] Hill, C. M.; An, Y. H.; Kang, Q. K.; Hartsock, L. A.; Gogolewski, S.; Gorna, K.; Osteogenesis of Osteoblast Seeded Polyurethane-Hydroxyapatite Scaffolds in Nude Mice. *Macromolecular Symposia*, 2007; 253: 94 – 97.
- [16] Tanzi M. C., Fondamenti di Bioingegneria Chimica: non solo Biomateriali. Pitagora Editrice Bologna, 2006; 94 – 98.
- [17] Gorna, K.; Gogolewski, S.; Biodegradable polyurethanes for implants. II. In vitro degradation and calcification of materials from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide) diols and various chain extenders. *Journal of Biomedical Material Research*, 2002; 60: 592 – 606.
- [18] Gorna, K.; Gogolewski, S.; Biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration. *Journal of Biomedical Material Research*, 2006; 79A: 128 – 138.
- [19] Anderson, J. M.; Hiltner, A.; Wiggins, M. J.; Schubert, M. A.; Collier, T. O.; Kao, W. J.; Mathur, A. B.; Recent advances in biomedical polyurethane biostability and biodegradation. *Polymer International*, 1998; 46: 163 – 171.
- [20] Tanzi, M. C.; Farè, S.; Petrini, P.; Tanini, A.; Piscitelli, E.; Zecchi-Orlandini, S.; Brandi, M.L.; Cytocompatibility of polyurethane foams as biointegrable matrices for the preparation of scaffolds for bone reconstruction. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*, 2003; 1: 58 – 66.
- [21] Zanetta, M.; Quirici, N.; Demarosi, F.; Tanzi, M. C.; Rimondini, L.; Farè, S.; Ability of polyurethane foams to support cell proliferation and the differentiation of MSCs into osteoblasts. *Acta Biomaterialia*, 2009; 5: 1126 – 1136.

Capitolo 1

- [1.1] Tanzi, M.C.; Fondamenti di Bioingegneria Chimica: non solo Biomateriali. Pitagora Editrice Bologna, 2006; 94 – 98.
- [1.2] Adam, N.; Avar, G.; Blankenheim, H.; Friederichs, W.; Giersig, M.; Weigand, E.; Halfmann, M.; Wittbecker, F. W.; Larimer, D. R.; Maier, U.; Meyer-Ahrens, S.; Noble, K.-L.; Wussow, H. G.; Polyurethanes. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry; 2005.
- [1.3] Eaves, D.; Handbook of Polymer Foams, Rapra Technology Limited, 2004; Capitolo 4.
- [1.4] www.wikipedia.org
- [1.5] Guelcher, S. A.; Biodegradable polyurethanes: synthesis and applications in regenerative medicine. *Tissue Engineering*, 2008; 14B (1): 3 – 17.
- [1.6] www.msu.edu
- [1.7] Gorna, K.; Gogolewski, S.; Preparation, degradation, and calcification of biodegradable polyurethane foams for bone graft substitutes. *Journal of Biomedical Material Research*, 2003; 67A: 813 – 827.
- [1.8] Eaves, D.; Handbook of Polymer Foams, Rapra Technology Limited, 2004; Capitolo 5.
- [1.9] Guelcher, S. A.; Patel, V.; Gallagher, K. M.; Connolly, S.; Didier, J. E.; Doctor, J. S.; Hollinger, J. O.; Synthesis and *in vitro* biocompatibility of injectable polyurethane foam scaffolds. *Tissue Engineering*, 2006; 12 (5): 1247 – 1259.
- [1.10] Tanzi, M. C.; Dispense del corso di “Strutture Bioartificiali e Biomimetiche”, A. A. 2008 – 2009.
- [1.11] Guelcher, S. A.; Srinivasan, A.; Hafeman, A. E.; Gallagher, K. M.; Doctor, J. S.; Khetan, S.; Mc Bride, S. B.; Holliger, J. O.; Synthesis, *in vitro* degradation, and mechanical properties of two-component poly(ester urethane)urea scaffolds: effect of water and polyol composition. *Tissue engineering*, 2007; 13 (9): 2321 – 2333.
- [1.12] Guelcher, S. A.; Srinivasan, A.; Dumas, J. E.; Didier, J. E.; McBride, S.; Hollinger, J. O.; Synthesis, mechanical properties, biocompatibility, and biodegradation of polyurethane networks from lysine polyisocyanates. *Biomaterials*, 2008; 29: 1762 – 1775.
- [1.13] Gorna, K.; Gogolewski, S.; Preparation, degradation, and calcification of biodegradable polyurethane foams for bone graft substitutes. *Journal of Biomedical Material Research*, 2003; 67A: 813 – 827.

[1.14] Listemann, M. L.; Wressel, A. L.; Lassila, K. R.; Klotz, H. C.; Johnson, G. L.; Savoca, A. C.; Proceedings of the SPI Polyurethanes World Congress, Vancouver, Canada, 1993; 595.

[1.15] www.pu2pu.com

[1.16] Bayer, O.; Das Di-Isocyanat-Polyadditionsverfahren (Polyurethane). *Angewandte Chemie*, 1947; 59: 257 – 272.

[1.17] www.tonuccisnc.it

Capitolo 2

[2.1] Lelah, M.D.; Cooper, J.L.; Polyurethanes in Medicine. Boca Raton, FL: CRC Press, 1987.

[2.2] Zdrahala, R. J.; Zdrahala, I. J.; Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future. *Journal of Biomaterials Applications*, 1999; 14 (1): 67 – 90.

[2.3] Tanzi, M.C.; Fondamenti di Bioingegneria Chimica: non solo Biomateriali. Pitagora Editrice Bologna, 2006; 94 – 98.

[2.4] www.bardaccess.com

[2.5] www.ksmfinc.com

[2.6] Guelcher, S. A.; Biodegradable polyurethanes: synthesis and applications in regenerative medicine. *Tissue Engineering*, 2008; 14B (1): 3 – 17.

[2.7] www.images.businessweek.com

[2.8] Gorna, K.; Gogolewski, S.; Preparation, degradation, and calcification of biodegradable polyurethane foams for bone graft substitutes. *Journal of Biomedical Material Research*, 2003; 67A: 813 – 827.

[2.9] Guelcher, S. A.; Patel, V.; Gallagher, K. M.; Connolly, S.; Didier, J. E.; Doctor, J. S.; Hollinger, J. O.; Synthesis and *in vitro* biocompatibility of injectable polyurethane foam scaffolds. *Tissue Engineering*, 2006; 12 (5): 1247 – 1259.

[2.10] Guelcher, S. A.; Srinivasan, A.; Hafeman, A. E.; Gallagher, K. M.; Doctor, J. S.; Khetan, S.; Mc Bride, S. B.; Hollinger, J. O.; Synthesis, *in vitro* degradation, and mechanical properties of two-component poly(ester urethane)urea scaffolds: effect of water and polyol composition. *Tissue engineering*, 2007; 13 (9): 2321 – 2333.

- [2.11] Zhang, J. Y.; Beckman, E. J.; Piesco, N. P.; Agarwal, S.; A new peptide-based urethane polymer: synthesis, biodegradation, and potential to support cell growth in vitro. *Biomaterials*, 2000; 12: 1247 – 1258.
- [2.12] Zhang, J. Y.; Doll, B. A.; Beckman, E. J.; Hollinger, J. O.; A biodegradable polyurethane-ascorbic acid scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Material Research*, 2003; 67 (2): 389 – 400.
- [2.13] Zhang, J. Y.; Beckman, E. J.; Hu, J.; Yuang, G. G.; Agarwal, S.; Hollinger, J. O.; Synthesis, biodegradability, and biocompatibility of lysine diisocyanate-glucose polymers. *Tissue Engineering*, 2002; 8 (5): 771 – 785.
- [2.14] Szycher, M.; Siciliano, A.; An assessment of 2,4-TDA formation from Surgitek polyurethane foam under stimulated physiological conditions. *Journal of Biomaterials Applications* 5, 323, 1991.
- [2.15] Gorna, K.; Gogolewski, S.; Biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration. *Journal of Biomedical Material Research*, 2006; 79A: 128 – 138.
- [2.16] Tanzi, M.C.; Fondamenti di Bioingegneria Chimica: non solo Biomateriali. Pitagora Editrice Bologna, 2006; 123 – 131.
- [2.17] Elliott, S.L.; Fromstein, J.D.; Santerre, J.P.; Woodhouse, K.A.; Identification of biodegradation products formed by L-phenylalanine based segmented polyurethaneureas. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2002; 13: 691 – 711.
- [2.18] Guan, J.; Wagner, W. R.; Synthesis, characterization and cytocompatibility of polyurethaneurea elastomers with designed elastase sensitivity. *Biomacromolecules*, 2005; 6 (5): 2833 – 2842.
- [2.19] Tanzi, M.C.; Fondamenti di Bioingegneria Chimica: non solo Biomateriali. Pitagora Editrice Bologna, 2006; 123 – 131.
- [2.20] Anderson, J. M.; Hiltner, A.; Wiggins, M. J.; Schubert, M. A.; Collier, T. O.; Kao, W. J.; Mathur, A. B.; Recent advances in biomedical polyurethane biostability and biodegradation. *Polymer International*, 1998; 46: 163 – 171.
- [2.21] Chou, C. W.; Hsu, S. H.; Wang, P. H.; Biostability and biocompatibility of poly(ether)urethane containing gold or silver nanoparticles in aporcine model. *Journal of Biomedical Material Research*, 2008; 84 (3): 785 – 794.

- [2.22] Schubert, M. A.; Wiggins, M. J.; DeFife, K. M.; Hiltner, A.; Anderson, J. M.; Student Research Award in the Doctoral Degree Candidate Category, Fifth World Biomaterials Congress (22nd Annual Meeting of the Society for Biomaterials), Toronto, Canada, May 29-June 2, 1996. *Journal of Biomedical Material Research*, 1996; 32 (4): 493 – 504.
- [2.23] Bonakdar, S.; Emami, S. H.; Shokrgozar, M. A.; Farhadi, A.; Ahmadi, S. A.; Amanzadeh, A.; Preparation and characterization of polyvinyl alcohol hydrogels crosslinked by biodegradable polyurethane for tissue engineering of cartilage. *Material Science and Engineering C*, 2010; 30 (4): 636 – 643.
- [2.24] Chia, S. L.; Gorna, K.; Gogolewski, S.; Alini, M.; Biodegradable elastomeric polyurethane membranes ad chondrocyte carriers for cartilage repair. *Tissue Engineering*, 2006; 12 (7): 1945 – 1953.
- [2.25] Grad, S.; Kupcsik, L.; Gorna, K.; Gogolewski, S.; Alini, M.; The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. *Biomaterials*, 2003; 24: 5163 – 5171.
- [2.26] Laschke, M. W.; Strohe, A.; Scheuer, C.; Eglin, D.; Verrier, S.; Alini, M.; Pohlemann, T.; Menger, M. D.; In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 2009; 5: 1991 – 2001.
- [2.27] Grenier, S.; Sandig, M.; Mequanint, K.; Polyurethane biomaterials for fabricating 3D porous scaffolds and supporting vascular cells. *Journal of Biomedical Material Research*, 2007; 82 (4): 802 – 809.
- [2.28] Guan, J.; Fujimoto, K. L.; Sacks, M. S.; Wagner, W. R.; Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications. *Biomaterials*, 2005; 26: 3961 – 3971.
- [2.29] Sharifpoor, S.; Labow, R. S.; Santerre, J. P.; Synthesis and characterization of degradable polar hydrophobic ionic polyurethane scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 2009; 10: 2729 – 2739.
- [2.30] Borkenhagen, M.; Stoll, R. C.; Neuenschwander, P.; Suter, U. W.; Aebischer, P.; In vivo performance of a new biodegradable polyester urethane system used as a nerve guidance channel. *Biomaterials*, 1998; 19: 2155 – 2165.

- [2.31] Johnson, E. O.; Soucacos, P. N., Nerve repair: experimental and clinical evaluation of biodegradable artificial nerve guides. *International Journal of the Care of the Injured*, 2008; 39S: 30 – 36.
- [2.32] Soldani, A.; Varelli, G.; Minnocci, A.; Dario, P.; Manufacturing and microscopical characterisation of polyurethane nerve guidance channel featuring a highly smooth internal surface. *Biomaterials*, 1998; 19: 1919 – 1924.
- [2.33] Zhang, N.; Zhang, C.; Wen, X.; Fabrication of semipermeable hollow fibers membranes with highly aligned texture for nerve guidance. *Journal of Biomedical Material Research*, 2005; 75 (4): 941 – 949.
- [2.34] Guelcher, S. A.; Patel, V.; Gallagher, K. M.; Connolly, S.; Didier, J. E.; Doctor, J. S.; Hollinger, J. O.; Synthesis and *in vitro* biocompatibility of injectable polyurethane foam scaffolds. *Tissue Engineering*, 2006; 12 (5): 1247 – 1259.
- [2.35] Guelcher, S. A.; Srinivasan, A.; Hafeman, A. E.; Gallagher, K. M.; Doctor, J. S.; Khetan, S.; Mc Bride, S. B.; Hollinger, J. O.; Synthesis, *in vitro* degradation, and mechanical properties of two-component poly(ester urethane)urea scaffolds: effect of water and polyol composition. *Tissue engineering*, 2007; 13 (9): 2321 – 2333.
- [2.36] Gogolewski, S.; Gorna, K.; Biodegradable polyurethane cancellous bone graft substitutes in the treatment of iliac crest defects. *Journal of Biomedical Material Research*, 2007; 80A: 94 – 101.
- [2.37] Gorna, K.; Gogolewski, S.; In vitro degradation of novel medical biodegradable aliphatic polyurethanes based on ϵ -caprolactone and Pluronics® with various hydrophilicities. *Polymer Degradation and Stability*, 2002; 75 (1): 113 – 122.
- [2.38] Gorna, K.; Gogolewski, S.; Biodegradable polyurethanes for implants. II. In vitro degradation and calcification of materials from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide) diols and various chain extenders. *Journal of Biomedical Material Research*, 2002; 60: 592 – 606.
- [2.39] Gorna, K.; Gogolewski, S.; Preparation, degradation, and calcification of biodegradable polyurethane foams for bone graft substitutes. *Journal of Biomedical Material Research*, 2003; 67A: 813 – 827.
- [2.40] Guelcher, S. A.; Srinivasan, A.; Dumas, J. E.; Didier, J. E.; McBride, S.; Hollinger, J. O.; Synthesis, mechanical properties, biocompatibility, and biodegradation of polyurethane networks from lysine polyisocyanates. *Biomaterials*, 2008; 29: 1762 – 1775.

- [2.41] Raimondi, M. T.; Dispense del corso di “Ingegneria dei Tessuti”, A.A. 2008-2009.
- [2.42] Tanzi M. C., Dispense del Corso di “Biomateriali”, A. A. 2008 – 2009.
- [2.43] Fujimoto, K. L.; Guan, J.; Oshima, H.; Sakai, T.; Wagner, W. R.; In vivo evaluation of a porous, elastic, biodegradable patch for reconstructive cardiac procedures. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2007; 83 (2): 648 – 654.
- [2.44] Boschetti, F.; Tomei, A. A.; Turri, S.; Swartz, M. A.; Levi, M.; Design, fabrication, and characterisation of a composite scaffold for bone tissue engineering. *The International Journal of Artificial Organs*, 2008; 31: 697 – 707.
- [2.45] Bruin, P.; Veenstra, G. J.; Nijenhuis, A. J.; Pennings, A. J.; Design and synthesis of biodegradable poly(ester-urethane) elastomer networks composed of non-toxic building blocks. *Macromolecular Chemistry*, 1988; 9: 589 – 597.

Capitolo 3

- [3.1] Farè, S.; Petrini, P.; Tanzi, M. C.; Bigi, A.; Roveri, N.; Biointegrable 3D Polyurethane/ α -TCP Composites for Bone Reconstruction. *Advanced Materials for Biomedical Application*, Ed. D. Mantovani, Copyright Canadian Institute of Mining, Metallurgy and Petroleum, 2002; 17 - 26.
- [3.2] Pellacani, P.; Prantera, D.; Studio dell'effetto della sterilizzazione al plasma e all'ozono su *scaffold* porosi poliuretanic; Tesi di Laurea Specialistica in Ingegneria Biomedica, Politecnico di Milano, a. a. 2006 – 2007.
- [3.3] UNI EN ISO 4590:2002 – “Rigid cellular plastics – Determination of the volume percentage of open cells and of closed cells”.
- [3.4] Zanetta, M.; Schiume poliuretaniche biointegrabile e loro interazione con cellule staminali e di linea per la rigenerazione dell'osso mandibolare; Tesi di Laurea Specialistica in Ingegneria Biomedica, Politecnico di Milano, a. a. 2004 – 2005.
- [3.5] Bertoldi, S.; Studio della risposta tissutale *in vivo* di espansi poliuretanic sterilizzati al plasma; Tesi di Laurea Specialistica in Ingegneria Biomedica, Politecnico di Milano, a. a. 2005 – 2006.
- [3.6] Gorna, K.; Gogolewski, S.; Biodegradable polyurethanes for implants. II. In vitro degradation and calcification of materials from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide) diols and various chain extenders. *Journal of Biomedical Material Research*, 2002; 60: 592 – 606.

[3.7] Gorna, K.; Gogolewski, S.; Preparation, degradation, and calcification of biodegradable polyurethane foams for bone graft substitutes. *Journal of Biomedical Material Research*, 2003; 67A: 813 – 827.