

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II



FACOLTA' DI INGEGNERIA

Dottorato di Ricerca in Ingegneria dei Materiali e delle  
Strutture, indirizzo Biomateriali.

XX ciclo

**Realizzazione di espansi biodegradabili a porosità  
controllata mediante l'utilizzo combinato di  
elementi porogeni ed agenti espandenti per  
applicazioni biomediche**

Coordinatore

Ch.mo Prof. Domenico Acierno

Relatore

Ch.mo Prof. Paolo Netti

Dottorando

Aurelio Salerno

Co-relatori

Ch.mo Prof. Salvatore Iannace

Ing. Ernesto Di Maio

Triennio accademico 2004/2007



## INDICE

### RIASSUNTO, ABSTRACT, RESUMEN

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>2</b>
1.1.1	SCAFFOLD DESIGN:MATERIALI	3
	➤ <i>Materiali organici di origine naturale</i>	4
	➤ <i>Materiali organici di sintesi</i>	4
	➤ <i>Materiali inorganici</i>	6
1.1.2	SCAFFOLD DESIGN:PROPRIETÀ MICROSTRUTTURALI	7
	➤ <i>Proprietà morfologiche</i>	7
	➤ <i>Proprietà meccaniche</i>	9
1.1.3	TECNICHE DI FABBRICAZIONE DEGLI SCAFFOLD	10
	➤ <i>Reverse templating</i>	10
	➤ <i>Gas foaming</i>	11
	➤ <i>Phase separation</i>	12
	➤ <i>Rapid prototyping</i>	12
	➤ <i>Elettrospinning</i>	13
<b>1.2</b>	<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>MATERIALI</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>POLYCAPROLACTONE</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>GELATINA</b>	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>IDROSSIAPATITE SINTETICA</b>	<b>22</b>
<b>2.4</b>	<b>CLORURO DI SODIO E AGENTI ESPANDENTI</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>METODI</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>GAS FOAMING/MICROPARTICULATE TEMPLATING</b>	<b>30</b>
3.1.1	PREPARAZIONE DI SCAFFOLD DI PCL A PARTIRE DA SISTEMI COMPOSITI PCL/NaCl MICRONIZZATO	32
	(1) Preparazione dei materiali compositi	32
	(2) Espansione dei materiali compositi	32
	(3) Estrazione dell'agente templante	34
3.1.2	CARATTERIZZAZIONE DEI MATERIALI COMPOSITI PCL/NaCl MICRONIZZATO TAL QUALI E DEGLI SCAFFOLD	35
	(1) Proprietà viscoelastiche dei compositi tal quali	35

• <i>Cenni sulle proprietà viscoelastiche di fusi polimerici puri e caricati</i>	35
(2) Misure di dissoluzione dell'NaCl	37
(3) Porosità e proprietà microstrutturali degli scaffold	38
3.1.3 PREPARAZIONE DEGLI SCAFFOLD DI PCL A PARTIRE DA SISTEMI COMPOSITI PCL/NaCl 300-500µm	40
(1) Preparazione dei materiali compositi	40
(2) Espansione dei materiali compositi	41
(3) Estrazione dell'agente templante	42
3.1.4 CARATTERIZZAZIONE DELLE MATRICI PCL/nHAP E DEGLI SCAFFOLD OTTENUTI IMPIEGANDO NaCl 300-500µm	43
(1) Stabilità termica e composizione ponderale dei sistemi PCL/nHAP	43
(2) Porosità e proprietà microstrutturali degli scaffold	43
<b>3.2 GAS FOAMING/CONTINUOUS TEMPLATING</b>	<b>45</b>
3.2.1 PREPARAZIONE DI SCAFFOLD DI PCL A PARTIRE DA MISCELE CO-CONTINUE PCL/TG	48
(1) Preparazione delle miscele PCL/TG e PCL/HAP/TG	48
(2) Espansione delle miscele PCL/TG e PCL/HAP/TG	48
(3) Estrazione dell'agente templante	49
3.2.2 CARATTERIZZAZIONE DELLA TG E DEGLI SCAFFOLD DI PCL OTTENUTI MEDIANTE LA TECNICA DEL GAS FOAMING/CONTINUOUS TEMPLATING	51
(1) Caratterizzazione della TG	51
➤ <i>Proprietà termiche</i>	51
➤ <i>Proprietà di assorbimento in dH<sub>2</sub>O</i>	52
➤ <i>Proprietà di schiumatura</i>	52
➤ <i>Proprietà di miscibilità con il PCL</i>	53
(2) Caratterizzazione delle miscele espanse	53
(3) Caratterizzazione degli scaffold	53
➤ <i>Estrazione dell'agente templante</i>	53
➤ <i>Porosità e proprietà microstrutturali</i>	54
➤ <i>Biocompatibilità</i>	54
<b>4 RISULTATI</b>	<b>58</b>
<b>4.1 SCAFFOLD DI PCL A POROSITÀ CONTROLLATA OTTENUTI A PARTIRE DA SISTEMI COMPOSITI PCL/NaCl CON SALE MICRONIZZATO</b>	<b>59</b>

4.1.1	PROPRIETÀ VISCOELASTICHE DEI MATERIALI COMPOSITI	59
4.1.2	ESTRAZIONE DELL'NACL DAI COMPOSITI PRIMA E DOPO LA FASE DI ESPANSIONE	62
4.1.3	ESPANSIONE DEI SISTEMI COMPOSITI	64
4.1.4	REALIZZAZIONE DI SCAFFOLD DI PCL A POROSITÀ CONTROLLATA	66
	➤ <i>Effetto della composizione</i>	66
	➤ <i>Effetto della <math>T_F</math></i>	68
	➤ <i>Effetto del PDR</i>	70
	➤ <i>Effetto della concentrazione spaziale di NaCl</i>	72
<b>4.2</b>	<b>SCAFFOLD DI PCL A POROSITÀ CONTROLLATA OTTENUTI A PARTIRE DA SISTEMI COMPOSITI PCL/NACL CON SALE DI DIMENSIONI 300-500<math>\mu</math>m</b>	<b>75</b>
4.2.1	ANALISI TERMOGRAVIMETRICA DEI SISTEMI PCL TAL QUALE E PCL/nHAP	75
4.2.2	ESPANSIONE DEI SISTEMI COMPOSITI	76
	➤ <i>Effetto della percentuale di agente templante</i>	76
	➤ <i>Effetto dell'agente espandente</i>	78
	➤ <i>Effetto dell'nHAP</i>	81
<b>4.3</b>	<b>SCAFFOLD DI PCL A POROSITÀ CONTROLLATA OTTENUTI A PARTIRE DA MISCELE ETEROGENEE PCL/TG</b>	<b>84</b>
4.3.1	PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLA TG	85
	➤ <i>Termoplasticizzazione</i>	85
	➤ <i>Proprietà termiche</i>	87
	➤ <i>Proprietà di swelling e dissoluzione in H<sub>2</sub>O</i>	88
	➤ <i>Proprietà di schiumatura</i>	90
4.3.2	MISCELE PCL/TG	92
	➤ <i>Proprietà viscoelastiche</i>	93
	➤ <i>Estrazione selettiva della TG</i>	94
4.3.3	ESPANSIONE DELLE MISCELE PCL/TG	97
	➤ <i>Effetto della composizione</i>	97
	➤ <i>Effetto della <math>T_F</math></i>	100
4.3.4	PREPARAZIONE DEGLI SCAFFOLD PER ESTRAZIONE SELETTIVA DELLA TG DALLE MISCELE ESPANSE	102
	➤ <i>Estrazione della TG</i>	102
	➤ <i>Morfologia</i>	104
	➤ <i>Porosità e proprietà meccaniche</i>	109
	➤ <i>Biocompatibilità</i>	111

<b>5</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	<b>120</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI</b>	<b>131</b>
<b>6.1</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>131</b>
<b>6.2</b>	<b>SVILUPPU FUTURI</b>	<b>136</b>
	<b>APPENDICE: GAS FOAMING</b>	<b>140</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>154</b>



## SOMMARIO

Il design di scaffolds biocompatibili e biodegradabili capaci di guidare i processi di rigenerazione tissutale rappresenta uno dei più importanti obiettivi dell'ingegneria dei tessuti. Il controllo delle proprietà microstrutturali degli scaffolds, in particolare porosità, dimensione ed orientazione dei pori, grado di interconnessione e distribuzione spaziale è infatti necessario per la realizzazione di tessuti biologici funzionali, *in vitro* o *in vivo*.

Questo lavoro di tesi è stato quindi finalizzato al design di materiali espansi a porosità controllata mediante la combinazione delle tecniche del gas foaming e del reverse templating. In particolare, due differenti tipologie di agente templante, microparticellare e continuo, sono state selezionate per controllare le proprietà di schiumatura del gas e realizzare scaffolds di PCL con proprietà microstrutturali idonee per la rigenerazione dei tessuti biologici.

Lo studio dei processi di espansione di materiali compositi PCL/NaCl, a differenti distribuzioni dimensionali di microparticelle templanti (5 $\mu$ m e 300-500 $\mu$ m), ha permesso la realizzazione di scaffolds di PCL a porosità controllata. Il controllo della porosità totale, nel range 78-93% e, della dimensione dei pori, fra 10 e 500 $\mu$ m, è stato ottenuto variando la percentuale e la dimensione di agente templante, la composizione dell'agente espandente e la temperatura di foaming. Elevate velocità di caduta di pressione sono inoltre indispensabili per l'ottenimento di porosità altamente interconnesse. Controllando infine la distribuzione spaziale di agente templante è stato possibile realizzare scaffolds caratterizzati da gradienti spaziali di porosità e dimensione dei pori.

Rispetto ai templanti microparticellari, l'impiego di agenti templanti continui, ha permesso la realizzazione di scaffolds di PCL a porosità controllata con proprietà meccaniche superiori. Le basse concentrazioni di agente templante (40%v) e, l'ottimizzazione del processo di foaming ha portato alla realizzazione di scaffolds di PCL con porosità totale (variabile nel range 60-90%) e proprietà meccaniche ( $E_{CS}$  nel range 1.7 a 10MPa) ottimali anche per la rigenerazione dei tessuti duri. Le proprietà di biocompatibilità *in vitro* di questi scaffolds, valutate impiegando cellule staminali mesenchimali, hanno inoltre evidenziato la capacità di questi substrati di promuovere i processi di adesione, proliferazione e migrazione cellulare.

Il lavoro sviluppato in questi tre anni di dottorato di ricerca ha messo in luce le grandi potenzialità della tecnica di gas foaming applicata a sistemi multifasici, nel design di scaffolds biodegradabili con proprietà microstrutturali e di biocompatibilità idonee alla rigenerazione dei tessuti biologici.

## ABSTRACT

One of the great challenges in tissue engineering is to design biocompatible and biodegradable scaffold to tailor the regenerating tissue process *in vitro* and/or *in vivo*. With this aim, the porous network of the scaffolds and, in particular, the overall porosity, the pore size, shape and direction and spatial distribution, need to be fine controlled and designed to optimize the functionalities of the new engineered tissue.

The aim of this study was to prepare poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) scaffolds, with well defined porous networks, by combining gas foaming and reverse templating techniques.

Microparticulate PCL/NaCl composites or co-continuous PCL/TG blends were prepared and gas foamed by using physical blowing agents. The templating porogens were subsequently removed by soaking the foamed samples in water.

Results obtained from PCL/NaCl composites show that foams with open-pore networks can be obtained and that porosity, pore size and interconnectivity may be finely modulated by optimizing the processing parameters. In particular, the control of porosity (in the range 78–93%) and pore size (from 10 to 500  $\mu\text{m}$ ) have been mostly achieved by varying microparticles concentration and  $T_F$ . Besides, high PDR are required to obtain highly interconnected porosities. Furthermore, the possibility to extend the results to obtain spatial gradient of porosity embossed within the 3D polymer structure was exploited by using a heterogeneous microparticles filling. Results indicated that by foaming composites with microparticles concentration gradients it was also possible to control the porosity and the pore size spatial distribution of the PCL scaffolds.

The scaffolds prepared via gas foaming/continuous templating are characterized by well controlled interconnected porous networks and higher mechanical properties with respect to those prepared by using NaCl microparticles as templating agent. By selecting the blend composition and gas foaming process parameters it has been possible to tailor the macroporosity/microporosity fraction and the degree of interconnection of the scaffolds. In addition, the biocompatibility of the scaffolds prepared has been verified by performing *in vitro* static culture of mesenchymal stem cells, up to 28 days. The results confirmed that the cells adhere on the surface of the scaffolds, proliferate and also migrate into the inner region of the porous network.

All these results demonstrate that the techniques developed in this three year PhD are valuable tools to design the micro-architecture of highly interconnected biodegradable scaffolds for new-tissue regeneration.

## RESUMEN

El diseño de *scaffold* (matrices tridimensionales) biocompatibles y biodegradables capaces de guiar los procesos de regeneración de tejidos representa uno de los principales objetivos de la ingeniería de tejidos. El control de las propiedades microestructurales de los *scaffold*, como la porosidad, la dimensión y orientación de los poros, el grado de interconectividad y la distribución espacial, son realmente necesarios para la realización de tejidos biológicos funcionales *in vitro* o *in vivo*.

El principal objetivo de la tesis doctoral que aquí se presenta ha sido el diseño de materiales expansionados de porosidad controlada mediante la combinación de las técnicas del *gas foaming* y del *reverse templating*. En concreto, se han seleccionado dos tipos de agente templante, microparticulado y continuo, para controlar las propiedades de espumación del gas y realizar *scaffold* de PCL con propiedades microestructurales aptas para la regeneración de tejidos biológicos.

El estudio de los procesos de expansión de materiales compuestos PCL/NaCl, con diferente distribución dimensional de micropartículas templantes (5 $\mu$ m y 300-500 $\mu$ m), conlleva a la realización de *scaffold* de PCL de porosidad controlada. El control total de la porosidad, en el rango de 78-93% y de dimensión del poro, entre 10 y 500 $\mu$ m se ha obtenido variando el porcentaje y la dimensión del agente templante, la composición del agente expansionante y la temperatura de espumación. Además elevadas velocidades de caída de presión son indispensables para obtener una porosidad altamente interconectada. Por último, controlando la distribución espacial del agente templante se han realizado *scaffold* con un gradiente espacial de porosidad y dimensión de poro.

El uso de agentes templantes continuos lleva a la realización de *scaffold* de PCL de porosidad controlada con propiedades mecánicas superiores a los templantes microparticulados. Bajas concentraciones de agente templante (40%v) y la optimización del proceso de espumación resultan en la obtención de *scaffold* de PCL con porosidad total (variable entre 60-90%) y propiedades mecánicas ( $E_{cs}$  entre 1.7 y 10MPa) óptimas para la regeneración de tejidos duros. Las propiedades de biocompatibilidad *in vitro* de estos *scaffold*, calculadas con el uso de células estaminales mesenquimales, evidencian la capacidad de estos sustratos de promover los procesos de adhesión, proliferación y migración celular.

El trabajo realizado durante los tres años de doctorado ha puesto de manifiesto la grande potencialidad de la técnica del *gas foaming* aplicada a sistemas multifásicos, en el diseño de *scaffold* biodegradables con propiedades microestructurales y de biocompatibilidad aptas para la regeneración de tejidos biológicos.



# Capitolo 1

## **Introduzione e scopo della tesi**

## 1.1 INTRODUZIONE

Nell'ultimo decennio l'ingegneria dei tessuti ha acquisito un'enorme importanza in ambito scientifico, in relazione ai notevoli successi ottenuti nella rigenerazione di tessuti biologici *in vitro*. I risultati raggiunti per la rigenerazione di tessuti come la pelle artificiale, che rappresenta il primo tessuto ingegnerizzato disponibile in commercio (alcuni esempi sono il Dermagraft™ e lo Skin<sup>2</sup>™ prodotti da Advanced Tissue Science) hanno, infatti, permesso di comprendere le grandi potenzialità di questa nuova scienza nel trattamento di quelle patologie che rappresentano ad oggi un limite della medicina tradizionale. La possibilità di ottenere tessuti sostitutivi o di riparo *in vitro* e/o *in vivo* veicolando i processi di biosintesi cellulare, rappresenta una delle maggiori scommesse dell'ingegneria dei tessuti. [1] Tale obiettivo fonda le sue basi scientifiche sull'evidenza sperimentale che cellule isolate dall'organismo e trapiantate su opportuni substrati di coltura si riorganizzano a formare costrutti cellulari (neo-tessuti), caratterizzati da proprietà morfologico/strutturali simili a quelle del tessuto da cui le cellule sono state prelevate. Gli eccezionali risultati ottenuti nella rigenerazione di tessuti a "due" dimensioni come la pelle artificiale hanno tuttavia portato l'attenzione verso la necessità di individuare e sperimentare strategie innovative per permettere anche la rigenerazione di tessuti "tridimensionali" ed altamente complessi a livello biologico/strutturale, come ad esempio la cartilagine e l'osso. Una delle strategie ad oggi maggiormente valide ed impiegate a tale scopo si basa sull'impiego di matrici porose biodegradabili, gli **scaffold**, il cui obiettivo principale è quello di fornire un supporto temporaneo capace di sostenere le cellule e guidarne i processi biosintetici *in vitro* e *in vivo*. [2] In tal senso, la presenza di un network poroso è essenziale per fornire un elevato rapporto superficie/volume e quindi la presenza di una elevata superficie di adesione per le cellule, ma anche per permettere la deposizione della matrice extracellulare (ECM) e la formazione di un neo-tessuto in 3D. [3] Il ruolo di "supporto per le cellule" a cui lo scaffold è deputato si è evoluto negli ultimi anni verso funzionalità molto più ampie rispetto a quella del mero sostegno per le cellule. La comprensione di alcuni meccanismi che intervengono nei processi di rigenerazione tissutale a livello cellulare ed extracellulare, come ad esempio gli effetti di stimolazioni biochimiche e biomeccaniche prodotte dall'ambiente esterno sulla sintesi della ECM, ha posto l'attenzione sulla necessità di una interazione attiva fra lo scaffold e le cellule. Lo scaffold diventa quindi l'elemento guida nel processo di rigenerazione del neo-tessuto e la sua progettazione rappresenta un aspetto chiave nell'ingegneria dei tessuti.

Ad oggi non è ancora stato possibile definire con precisione i requisiti che uno scaffold per l'ingegneria dei tessuti deve soddisfare. Questa difficoltà è legata sia alla complessità delle proprietà chimico/fisiche dei differenti tessuti biologici, sia alle attuali difficoltà della scienza moderna di comprendere a fondo i meccanismi che

regolano la risposta cellule agli stimoli esterni. Tuttavia, di recente sono state individuate le proprietà fondamentali che uno scaffold deve possedere per poter essere impiegato in ingegneria dei tessuti: [4]

- I. Biocompatibilità e biodegradabilità con cinetiche di degradazione e di riassorbimento che siano comparabili con i tempi richiesti alla completa rigenerazione del neo-tessuto.
- II. Porosità tridimensionale altamente interconnessa, con una elevata superficie specifica per l'adesione la proliferazione e la migrazione cellulare in 3D. Le proprietà microstrutturali devono inoltre garantire un sufficiente trasporto dei nutrienti e dei prodotti del metabolismo cellulare in tutto lo scaffold.
- III. Proprietà meccaniche confrontabili con quelle del tessuto da rigenerare e sufficienti a sostenere le cellule e la ECM fino al raggiungimento dell'integrità strutturale del neo-tessuto.
- IV. Proprietà chimiche e morfologiche superficiali opportunamente controllate per promuovere i processi di adesione, migrazione e differenziazione cellulare.

La funzionalità di uno scaffold risulta, quindi legata ad un insieme di proprietà chimiche, morfologiche e strutturali, che necessitano di essere finemente controllate ed ingegnerizzate in relazione alla natura del neo-tessuto. La stretta interdipendenza fra le proprietà di uno scaffold richiede una grande attenzione in fase progettuale. Ad esempio, il controllo dei processi di degradazione non dipende esclusivamente dalla selezione del materiale con cui si realizza lo scaffold, ma è assoggettata anche alle sue proprietà microstrutturali. Numerosi studi hanno infatti evidenziato che, proprietà quali il rapporto superficie/volume, il trasporto di fluidi e prodotti di degradazione influenzano fortemente i processi di biodegradazione, sia *in vitro* che *in vivo*. [5] Pertanto, nel design di uno scaffold, la selezione dei materiali e la definizione delle proprietà morfologico/strutturali di uno scaffold sono i due punti chiave di tale strategia. [6]

### 1.1.1 SCAFFOLD DESIGN: MATERIALI

La selezione dei materiali rappresenta il primo passo nell'ingegnerizzazione di uno scaffold. Come precedentemente illustrato, affinché un materiale possa essere impiegato a tale scopo, esso deve essere dotato di due proprietà fondamentali: la *biocompatibilità* e la *biodegradabilità*. La proprietà di biocompatibilità richiede che, in seguito al suo impiego in ambiente biologico, tale materiale sia capace di ripristinare o comunque migliorare la funzionalità di un tessuto o un organo danneggiato, senza però indurre alterazioni negative sull'attività fisiologica e meccanica dei sistemi con cui si interfaccia. [6] La biocompatibilità si riferisce quindi ad interazioni chimico-fisiche tra il materiale e l'organismo e pertanto, è strettamente legata all'applicazione

per cui il materiale è stato progettato. In aggiunta, un materiale deve essere anche capace di degradare una volta inserito in un ambiente biologico senza che i prodotti della degradazione inducano reazioni tossiche per le cellule ed i tessuti. [2, 4]

I materiali biocompatibili e biodegradabili attualmente impiegati per la preparazione degli scaffold possono essere classificati in due grandi gruppi: organici e inorganici. In entrambi i gruppi è inoltre possibile fare una ulteriore distinzione fra sintetici e naturali.

➤ *Materiali organici di origine naturale*

I materiali organici di origine naturale, tra cui i principali sono il *collagene*, la *gelatina*, l'*amido* ed il *chiosano*, hanno trovato largo impiego per applicazioni di riparo di un gran numero di tessuti ed in particolare l'osso, la cartilagine, la pelle ed il tessuto nervoso. [7-11] Il grande vantaggio che risulta dall'impiego di questi materiali per la preparazione degli scaffold è legato alla loro struttura chimica, simile a quella della matrice extracellulare, capace, quindi, di promuovere i processi di adesione, proliferazione e biosintesi cellulare. [7] Tali materiali possono inoltre essere facilmente modificati nella struttura chimica al fine di controllarne i processi degradativi in relazione alle differenti applicazioni. La particolare struttura chimica rende tuttavia i materiali organici di origine naturale particolarmente sensibili ad aspetti quali le tecniche di estrazione, i processi di preparazione e le condizioni di impiego, limitandone molto la processabilità e, di conseguenza, le potenzialità di utilizzo in ambito biomedico. [12] Gli scaffold ottenuti a partire da questa classe di materiali polimerici offrono inoltre l'ulteriore limitazione legata a proprietà meccaniche spesso insufficienti a fornire un supporto strutturale comparabile con quello di tessuti nativi duri, in particolare l'osso e la cartilagine.

➤ *Materiali organici di sintesi*

I materiali organici di sintesi rappresentano circa il 45% del totale dei materiali impiegati in ambito biomedico, in virtù delle ottime proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità e processabilità. In particolare, i poliesteri alifatici come il *polilattico* (PLA), il *poliglicolico* (PGA), il *policaprolattone* (PCL) ed i loro copolimeri, è la classe di materiali organici di origine sintetica maggiormente impiegati in ingegneria dei tessuti. [5, 13-15] Tali polimeri hanno infatti ottenuto l'approvazione della U.S. Food and Drug Administration (FDA) per un elevato numero di applicazioni biomediche e vengono, in particolare, impiegati come fili per suture e placche per la riduzione di fratture ossee. I processi di riassorbimento dei poliesteri coinvolgono meccanismi di idrolisi o degradazione enzimatica che portano alla formazione di prodotti a basso peso molecolare facilmente eliminabili dall'organismo. [5] Tra i grandi vantaggi relativi all'impiego dei poliesteri alifatici vi è la possibilità di processarli con le più moderne tecnologie di processo sviluppate per i polimeri termoplastici, dati gli enormi sviluppi delle tecnologie di

trattamento dei materiali polimerici ad uso industriale. [5] Oltre ai poliesteri alifatici, anche altre tipologie di polimeri sintetici hanno trovato ampio utilizzo per applicazioni in ambito biomedico. Tra questi ricordiamo le *polianidridi*, i *poliortoesteri*, il *polipropilene fumarato* (PPF), il *policarbonato* (PC) ed il *poliesteruretano* (PEUU). Nella tabella 1 sono riportati i materiali polimerici maggiormente impiegati in ingegneria dei tessuti, con particolare riferimento alle proprietà termomeccaniche e di degradazione ed anche alle principali applicazioni in ambito biomedico.

Tabella 1 - Principali proprietà e attuali campi di applicazione dei polimeri biocompatibili e biodegradabili maggiormente impiegati in ingegneria dei tessuti. [4, 5, 6, 16]

Polimero	$\Delta T_g$ [°C]	$\Delta T_m$ [°C]	$E_{traz.}$ [GPa]	Degradazione [mesi]	Applicazione
PGA	35 - 40	225 - 230	7	6 - 12	Chirurgia ortopedica
PLA	60 - 65	170 - 178	2.7	> 24	Osso
PDLA	amorfo	55 - 60	1.9	12 - 16	Suture Chirurgia Osso
PDLGA 85/15	amorfo	50 - 55	2	5 - 6	Suture Chirurgia Osso
PCL	- 65	58 - 63	0.4	> 24	Osso Rilascio controllato
PPF	/	/	0.02 - 0.3	3 - 5	Osso
Poliortoesteri	20-100	/	/	12 - 18	Rilascio controllato
Polianidridi	/	/	/	12 - 18	Rilascio controllato
PEUU	/	/	0.13	4 - 6	Tessuti soffici

È importante comunque evidenziare una serie di limitazioni dei materiali organici di sintesi nell'applicazione di interesse in quest'ambito. I polimeri sintetici, infatti, possono degradare rilasciando prodotti di degradazione ad attività acida che, in elevate concentrazioni, portano alla formazione di processi infiammatori nell'organismo ospite [17, 18] Questo problema è particolarmente delicato in applicazioni dove la scarsa vascolarizzazione del tessuto impedisce un rapido

ripristino delle normali condizioni fisiologiche. Tali materiali sono inoltre sprovvisti di una struttura molecolare bioattiva in termini di interazione cellulare ed è quindi necessario promuovere l'adesione cellulare alla superficie impiegando molecole biologicamente attive che, aderendo alla matrice polimerica, promuovano i processi di adesione, proliferazione e biosintesi cellulare.

➤ *Materiali inorganici*

I materiali inorganici, a differenza dei polimeri, hanno il grande vantaggio di possedere una elevata rigidità e resistenza alle sollecitazioni meccaniche. Bioceramici come l'idrossiapatite (sia di origine sintetica che naturale), [19, 20] il vetro bioattivo, [21] i fosfati di calcio ceramici [22] hanno notevoli proprietà di biocompatibilità e biodegradazione che li hanno resi uno dei maggiori candidati per il riparo di tessuti rigidi e, in particolare, per la rigenerazione del tessuto osseo. A partire da tale classe di materiali sono stati sviluppati un gran numero di sistemi commerciali per impianti ossei, alcuni dei quali sono riportati nella tabella 2.

Tabella 2 - Impianti ossei a base di materiali inorganici disponibili in commercio. [23]

Prodotto	Compagnia	Materiale	Applicazione
<i>Pro Osteon 200 &amp; 500</i>	<i>Interpore International, Inc.</i>	<i>Idrossiapatite corallina</i>	<i>Impianti ossei (orali, maxillofacciali) Elementi di fusione di vertebre cervicali</i>
<i>Collagraft</i>	<i>Collagen Corp.</i>	<i>Matrice di collagene, acido ialuronico e TCP</i>	<i>Fratture di ossa lunghe Difetti ossei</i>
<i>OSTEOSET</i>	<i>Wright Medical Technology, Inc.</i>	<i>Solfati di calcio</i>	<i>Riempitivi di cavità ossee</i>

I materiali bioceramici vengono classificati in tre grandi gruppi: 1) materiali bioinerti come l'allumina e la zirconia; 2) materiali bioattivi, tra cui l'idrossiapatite sinterizzata ed il vetro bioattivo e, 3) materiali biorisorbibili come l'idrossiapatite non sinterizzata ed i fosfati di calcio (TCP). Dal punto di vista delle applicazioni biomediche, la terza classe risulta quella di gran lunga preferita in quanto biodegradabile. In realtà, come evidenziato nel caso del Collagraft in tabella 2, i materiali ceramici vengono spesso impiegati come filler per la realizzazione di materiali

compositi organico/inorganico per la rigenerazione del tessuto osseo. Tali sistemi infatti sono caratterizzati da una combinazione di proprietà meccaniche e proprietà di biocompatibilità/biodegradazione maggiormente idonea ad alcune applicazioni di rigenerazione tissutale, rispetto ai materiali tal quali. Scaffold ottenuti a partire da materiali compositi PLA o PCL caricati con idrossiapatite, bioglass o fosfati di calcio vengono per tale motivo ampiamente impiegati per la rigenerazione del tessuto osseo/cartilagineo. [24, 25]

### 1.1.2 SCAFFOLD DESIGN: PROPRIETÀ MICROSTRUTTURALI

L'ingegnerizzazione delle proprietà microstrutturali dello scaffold è l'altro aspetto chiave del design di matrici porose per la rigenerazione tissutale. Da un punto di vista ingegneristico, infatti, i tessuti biologici possono essere considerati come compositi cellulari multifasici in cui le due componenti fondamentali sono le cellule, organizzate in unità funzionali e la matrice extracellulare. La rigenerazione di un tessuto biologico funzionale è, quindi, legata al ruolo guida dello scaffold nei processi cellulari (adesione, crescita e proliferazione) e nella deposizione della matrice extracellulare (attività biosintetica). Pur non essendo ancora completa la comprensione dell'interazione cellula/materiale, è oramai universalmente riconosciuto che la rigenerazione, mediante l'impiego di uno scaffold, di tessuti biologici dalle funzionalità specifiche è, strettamente legata alle proprietà microstrutturali dello scaffold.

#### ➤ *Proprietà morfologiche*

La porosità totale, la dimensione, l'orientazione ed il grado di interconnessione dei pori, la distribuzione spaziale della porosità rappresentano tutti aspetti progettuali fondamentali alla base dell'ingegnerizzazione di uno scaffold. [3, 6, 26-29] Una elevata superficie specifica promuove infatti l'adesione e la crescita cellulare e può essere controllata modulando la densità e la dimensione media dei pori. Scaffold caratterizzati da una elevata porosità totale promuovono la formazione di tessuti ad elevata densità cellulare e permettono un sufficiente trasporto di fluidi quali ossigeno e nutrienti per le cellule e rifiuti metabolici verso l'esterno. La dimensione dei pori dello scaffold deve essere sufficientemente grande da garantire la penetrazione e la migrazione cellulare ma allo stesso tempo deve evitare una eccessiva distanza fra le cellule che ne impedirebbe la comunicazione. Per tale motivo, la selezione della dimensione ottimale della porosità è strettamente legata alla tipologia di cellule e quindi di tessuto che si vuole rigenerare. L'effetto della dimensione dei pori sulla rigenerazione tissutale è stato ampiamente investigato sia *in vitro* che *in vivo* e tali studi hanno portato alla definizione di una dimensione ottimale dei pori in relazione allo specifico tessuto da rigenerare (tabella 3).

Tabella 3 – Dimensione dei pori ottimale per la rigenerazione dei principali tessuti biologici. [4, 6, 12, 30-32]

Dimensione dei pori [µm]	5	5 - 15	20	20 - 125	100 - 400	500
Tessuto	Formazione di neovasi	Fibroblasti	Epatociti	Pelle	Osso	Tessuto fibrovascolare

I valori della dimensione media dei pori in relazione al campo di applicazione riportati nella tabella 3 forniscono delle linee guida importanti nel design di uno scaffold. Tuttavia, il gran numero di parametri che intervengono nei processi cellulari rende difficile separare gli effetti delle differenti caratteristiche morfologiche sui processi rigenerativi. Ciò è ancor più vero quando le proprietà microstrutturali del tessuto da rigenerare sono altamente complesse, come nel caso dell'osso e della cartilagine.

Un altro aspetto progettuale importante nello scaffold design è l'interconnessione della porosità. Elementi chiave come l'invasione e la migrazione cellulare o come il trasporto di fluidi nell'intera struttura porosa possono risultare insufficienti qualora la porosità non sia sufficientemente interconnessa. [33] Il trasporto di massa sia nella fase iniziale che durante tutto il processo di rigenerazione tissutale rappresenta ancora oggi una delle maggiori limitazioni dello scaffold design. La maggiore difficoltà nell'ingegnerizzazione di tessuti tridimensionali è legata infatti alle differenti condizioni biologiche in cui si vengono a trovare le cellule nelle regioni profonde dello scaffold rispetto a quelle che invece sono adese alle sue superfici esterne. In effetti, le cellule situate all'interno dello scaffold si trovano generalmente in una condizione di deficienza di ossigeno e nutrienti che porta inevitabilmente alla formazione di tessuti necrotici. Viceversa, l'interazione diretta con l'ambiente biologico fornisce le condizioni ottimali per le cellule che si trovano nelle regioni esterne, le quali possono proliferare e depositare la ECM necessaria alla formazione di un tessuto vitale e funzionale. Per tali motivi, il trapianto di un elevato numero di cellule nello scaffold, necessario in tale tipologia di approccio per la realizzazione di tessuti ad elevata densità cellulare, è attualmente limitato dall'inadeguato trasporto dei nutrienti all'interno della struttura porosa. [33] Il trasporto di massa rappresenta quindi uno dei maggiori vincoli dello scaffold design. [34] Ad esempio, la criticità del problema risiede nella intrinseca difficoltà di risoluzione, ma anche nel contrasto tra i possibili accorgimenti e le altre proprietà che, inevitabilmente, ne sono affette. La soluzione al problema del trasporto può essere ricercata nell'aumento della porosità dello scaffold, fino a valori del 96-97 %, così da aumentarne le proprietà di permeabilità e favorire i processi diffusivi

anche nelle regioni più interne dello scaffold. L'inevitabile svantaggio connesso alla realizzazione di scaffold con porosità totali molto elevate è però la drastica riduzione delle proprietà meccaniche che ne consegue e che ha l'effetto di limitare l'impiego di questi scaffold ad applicazioni per le quali non è richiesta una elevata resistenza alle sollecitazioni meccaniche. [34] In aggiunta, anche nel caso dei processi di rigenerazione dei tessuti molli, l'incremento di porosità è una soluzione che non tiene in considerazione il processo di rigenerazione del tessuto. Durante la fase di coltura, infatti, le cellule proliferano e producono ECM, con una conseguente inevitabile riduzione della porosità all'aumentare del tempo di coltura. Il problema del trasporto richiede quindi soluzioni alternative che non vincolino gli aspetti progettuali e che permettano la diffusione di ossigeno e nutrienti in tutto lo scaffold. La ricerca in ambito biomedico si sta ad esempio, indirizzando verso la realizzazione di scaffold capaci di promuovere la formazione di vasi durante il processo di rigenerazione tissutale e permettere, quindi, la crescita di tessuti biologici di dimensioni applicative. [1, 35, 36]

Oltre ad aspetti quali porosità totale dimensione dei pori e grado di interconnessione, anche l'orientazione dei pori [37, 38] e la rugosità della superficie di adesione [39, 40] contribuiscono a guidare i processi rigenerativi in quanto influenzano l'adesione, la migrazione e la biosintesi cellulare. Si pensi ad esempio all'anisotropia morfologico/strutturale di molti tessuti, quali ad esempio denti e nervi, le cui proprietà anisotropiche richiedono l'impiego di scaffold caratterizzati da porosità altamente orientata capace di guidare le cellule in opportune direzioni e distribuzioni spaziali. [37, 38]

#### ➤ *Proprietà meccaniche*

Come evidenziato in precedenza, una delle proprietà fondamentali di uno scaffold per l'ingegneria dei tessuti è rappresentata dalla biocompatibilità. Tale proprietà richiede che le proprietà chimico-fisiche del substrato siano funzionali alla specifica applicazione per cui è progettato. Oltre alle funzionalità precedentemente descritte, l'ingegnerizzazione delle proprietà microstrutturali dello scaffold deve quindi prendere in considerazione i vincoli imposti dalle proprietà strutturali. Al fine di evitare il danneggiamento del tessuto biologico in seguito alla presenza di un carico applicato, è necessario che lo scaffold sia in grado di sostenere le sollecitazioni meccaniche a cui il tessuto maturo è sottoposto. Questo aspetto diventa particolarmente critico qualora lo scaffold sia progettato per la rigenerazione di tessuti strutturali come l'osso e la cartilagine, i quali sono caratterizzati da elevate proprietà di rigidità ed elasticità. Le proprietà meccaniche dei tessuti umani, di cui si riportano alcuni valori nella tabella 4, sono quindi uno degli obiettivi di progetto.

Tabella 3 - Proprietà meccaniche dei tessuti umani. [6, 41, 42]

Tessuto	Sforzo a rottura per trazione [MPa]	Sforzo a rottura per compressione [Mpa]	Modulo elastico [Gpa]
<i>Osso trabecolare</i>	/	4 - 12	0.02 - 0.5
<i>Osso corticale</i>	60 - 160	130 - 180	3 - 30
<i>Cartilagine</i>	3.7 - 10.5	/	0.001 - 0.015
<i>Legamento</i>	13 - 46	/	0.065 - 0.541
<i>Tendine</i>	24 - 112	/	0.143 - 2.31

Il design di uno scaffold deve quindi tenere in considerazione il materiale e le proprietà microstrutturali con cui lo scaffold deve essere realizzato. Entrambi questi aspetti sono strettamente legati fra di loro in quanto la selezione del materiale non può prescindere dalle proprietà microstrutturali che si vogliono ottenere e che sono dipendenti dalle tecnologie di fabbricazione.

### 1.1.3 TECNICHE DI FABBRICAZIONE DEGLI SCAFFOLD

Esistono numerose tecnologie di processo per realizzare materiali porosi da impiegare come scaffold per l'ingegneria dei tessuti. Tra le più importanti tecniche ricordiamo:

- reverse templating
- gas foaming
- phase separation
- rapid prototyping
- elettrospinning

Di seguito sono illustrati brevemente i principi alla base delle differenti tecnologie di processo.

#### ➤ *Reverse templating*

La tecnologia del reverse templating si basa sull'impiego di elementi templanti i quali, dispersi nella matrice biocompatibile, vengono successivamente rimossi inscrivendo un network poroso interconnesso. La grande flessibilità di utilizzo accoppiata ad una buona modulazione delle proprietà microstrutturali rende tale tecnica una delle più diffuse nella realizzazione degli scaffold. In relazione alle caratteristiche dell'elemento porogeno impiegato, tale tecnica può essere suddivisa in due grandi categorie: il *particulate leaching* ed il *selective polymer*

*extraction*. Nel caso del particulate leaching, l'elemento porogeno è costituito tipicamente da cristalli di NaCl o zucchero oppure particelle di paraffina o gelatina di dimensioni opportune e dispersi all'interno della matrice in concentrazioni sufficienti a garantirne la completa percolazione. [43-47] La tecnica del selective polymer extraction sfrutta, invece, sistemi polimerici multifasici in cui le due fasi costituiscono due networks interpenetrati. L'immersione del campione in un solvente che sia selettivo per l'agente templante permette, quindi, di creare la porosità. [48, 49] Il controllo delle proprietà microstrutturali dello scaffold viene ottenuto mediante il controllo delle proprietà morfologiche della fase dispersa. In particolare, la porosità totale è definita dalla percentuale volumetrica di fase dispersa, mentre la dimensione e la forma dei pori risulta controllabile mediante l'opportuna selezione della dimensione e della forma della fase dispersa. Entrambe le tecniche offrono il grande vantaggio di poter essere impiegate con la maggior parte dei biomateriali attualmente conosciuti. Scaffold biodegradabili ottenuti a partire da un gran numero di materiali organici (tra cui PLA, PGA, PCL e gelatina) [43-47] ed inorganici (HAP) [50] sono stati ottenuti mediante l'utilizzo di templanti microparticellari o continui. Le proprietà finali degli scaffold sono comunque strettamente legate alla tipologia di elemento templante impiegato. Attraverso l'impiego di templanti microparticellari è possibile tipicamente ottenere porosità variabili in un range compreso fra 70 e 98% ca. e dimensione dei pori da pochi micron ad alcune centinaia di micron. Nel caso dei templanti continui invece, la porosità totale è significativamente inferiore, nel range 40-60%, in quanto è legata alla formazione di una miscela polimerica eterogenea con una microstruttura co-continua. La tecnica del reverse templating mostra comunque alcune importanti limitazioni nel controllo della microstruttura degli scaffold. Infatti, percentuali residue di porogeno e difficoltà di ottenere elevati livelli di interconnessione dei pori senza ridurre significativamente le proprietà strutturali degli scaffold, rappresentano le maggiori limitazioni all'impiego di templanti microparticellari. Viceversa, il ristretto range di porosità ottenibile con templanti continui, legato all'ottenimento di una morfologia co-continua, accoppiato al limitato numero di materiali utilizzabili, ha in qualche modo rallentato l'impiego di tali scaffold per la rigenerazione tissutale.

#### ➤ *Gas foaming*

La tecnica del gas foaming, per il cui approfondimento si rimanda all'appendice dedicata, impiega agenti espandenti, tipicamente gas o fluidi supercritici, per la formazione della porosità all'interno del biomateriale. Tale tecnica, ampiamente utilizzata sui materiali polimerici [33, 51, 52] ma ultimamente ingegnerizzata anche su materiali inorganici, [53] consiste nell'espansione di gas nella matrice. L'agente espandente viene generalmente solubilizzato ad alte pressioni e temperature. Una volta raggiunto l'equilibrio termodinamico, stabilito

dai parametri agente espandente-temperatura e pressione di solubilizzazione, si induce una instabilità termodinamica nel sistema mediante una variazione di temperatura (*temperature induced phase separation*) o pressione (*pressure induced phase separation*). Tale instabilità riduce istantaneamente la solubilità dell'agente espandente e porta alla smiscelazione delle due fasi mediante la nucleazione e crescita di bolle di gas all'interno della matrice. Mediante l'opportuno controllo dei parametri di processo, in particolare il tipo e la concentrazione di agente espandente, la temperatura di espansione e la velocità con cui viene fatta variare la temperatura o la pressione di espansione, è possibile modulare le proprietà microstrutturali dello scaffold. Uno dei grandi vantaggi di questa tecnica è rappresentato dalla totale assenza di solventi organici che, rimanendo all'interno della matrice, possono danneggiare le cellule ed i tessuti biologici circostanti, o inattivare eventuali fattori di crescita incorporati nella matrice. [33] Tra le principali limitazioni del gas foaming vi è la difficoltà di ottenere scaffold con il 100% di porosità interconnessa e, la presenza di una superficie esterna tipicamente non porosa. [33]

➤ *Phase separation*

La separazione di fase è una tecnica abitualmente impiegata per preparare scaffold provvisti di porosità di dimensioni che vanno da quelle microcellulari (inferiori ai 10 micron) fino ad una dimensione massima che tipicamente non supera i 100 micron. Tale tecnica, impiegata principalmente con i polimeri di origine sintetica (PLA, PCL)[13, 54, 55] offre il grande vantaggio di poter realizzare scaffold con porosità altamente direzionali e, quindi idonei per la rigenerazione di tessuti quali i nervi e i vasi. Il principio su cui si basa la tecnica della separazione di fase consiste nella trasformazione di una soluzione polimerica omogenea bicomponente in due domini separati, costituiti da una fase ricca ed una fase povera di polimero. Tale smiscelazione è generalmente indotta dalla riduzione della temperatura del sistema (*thermal induced phase separation*) oppure in seguito all'azione di un terzo componente che risulta molto affine ad uno dei due componenti e immiscibile nell'altro (*chemically induced phase separation*). Il congelamento della struttura e l'estrazione del solvente porta alla formazione di uno scaffold provvisto di una struttura porosa. Variando i parametri di processo quali concentrazione del polimero o condizioni di estrazione del solvente, è possibile modulare la forma e la dimensione della porosità. L'utilizzo di solventi organici e la difficoltà di ottenere pori di dimensioni superiori ai 100 micron, rappresentano i principali limiti di questa tecnica nello scaffold design.

➤ *Rapid prototyping*

Le tecniche di prototipazione rapida hanno suscitato notevole interesse negli ultimi anni per via della loro elevata flessibilità di utilizzo, sia dal punto di vista della selezione dei materiali che, per quanto concerne il

controllo delle proprietà microstrutturali dello scaffold. Infatti, lo scaffold è ottenuto mediante deposizioni successive di strati di materiale, secondo una distribuzione spaziale controllata da remoto. [56-58] Il processo di deposizione viene realizzato a partire da una ricostruzione tridimensionale del tessuto da rigenerare, offrendo quindi un controllo ottimale della struttura macroscopica dello scaffold. Una delle tecniche di prototipazione maggiormente impiegate in ingegneria dei tessuti è il *fused deposition modeling*. Il principio su cui si basa questa tecnica consiste nella deposizione di fusi polimerici estrusi sotto forma di fibre attraverso un ugello di diametro controllato. Le fibre vengono quindi disposte su un piano secondo una opportuna configurazione ed orientazione. Attraverso la deposizione successiva di più strati si ottiene lo scaffold finale in cui la porosità e la dimensione dei pori possono essere finemente controllate variando la dimensione e la distanza fra le fibre e la loro configurazione spaziale. [56] Tale tecnologia risulta di grande utilità nel processo di polimeri termoplastici sintetici, mentre il suo impiego con i polimeri naturali risulta molto limitato in relazione alla difficile processabilità di tali materiali alle alte temperature. In tali casi infatti è necessario partire dal polimero in soluzione e la solidificazione delle fibre si ottiene per l'evaporazione del solvente.

#### ➤ *Elettrospinning*

L'ultima tecnica presa in considerazione in questa descrizione generale dei principali processi di fabbricazione degli scaffold è l'elettrospinning. Il principio di funzionamento dell'elettrospinning si basa sull'applicazione di una elevata differenza di potenziale tra due elettrodi costituiti rispettivamente da un capillare metallico (catodo) contenente il polimero fuso o in soluzione e, un piatto metallico di raccolta (anodo). Per effetto della differenza di potenziale, la fase polimerica si polarizza e viene spinta fuori dal capillare, con la conseguenza di solidificare sotto forma di una fibra polimerica, in conseguenza del raffreddamento o dell'evaporazione del solvente. [59] La deposizione successiva delle fibre e il loro intreccio, porta alla formazione dello scaffold. Mediante il controllo di parametri quali la differenza di potenziale, le caratteristiche viscoelastiche e di polarizzazione della soluzione e la distanza fra gli elettrodi, è possibile ottenere un controllo fine della lunghezza e del diametro delle fibre, così come delle caratteristiche di deposizione (densità delle fibre e loro orientazione). Tra i maggiori vantaggi di tale tecnica vi è la completa interconnessione dei pori e la possibilità di realizzare fibre anche su scala dimensionale sub-micrometrica. [60-62] Di contro, un controllo fine della geometria e della dimensione dei pori è ostacolato dalla difficoltà di controllare la distribuzione spaziale delle fibre.

Le tecnologie illustrate rappresentano solamente una parte delle tecniche di processo impiegate per la realizzazione degli scaffold,

tuttavia risultano tra quelle che maggiormente garantiscono un controllo accurato delle loro proprietà microstrutturali, pur presentando alcune limitazioni nello scaffold design.

Nell'ultimo decennio sono state sviluppate strategie mirate alla possibilità di superare i limiti intrinseci connessi alle singole tecniche, mediante la combinazione di processi tecnologici differenti. Scaffold preparati combinando la tecnica del particulate leaching con quelle del phase separation, [63] gas foaming [64, 65] o selective polymer extraction [66] hanno mostrato le enormi potenzialità offerte da questo approccio nel guidare i processi di rigenerazione tissutale. La combinazione di differenti tecnologie garantisce infatti un maggior controllo di proprietà microstrutturali quali la dimensione dei pori (anche su scale dimensionali e/o di forma differenti), il grado di interconnessione e la distribuzione spaziale della porosità. Ad esempio, è stato osservato che, la combinazione delle tecniche del gas foaming e del particulate leaching, permette di migliorare il grado di interconnessione della porosità, rispetto a quello ottenibile con le singole tecniche. [64, 65] La presenza dell'NaCl nella matrice polimerica permette infatti di raggiungere una elevata percentuale di porosità interconnessa sia all'interno che sulla superficie esterna dello scaffold, caratteristica che risulta difficile ottenere col solo ausilio del gas foaming. Naturalmente, la complessità di un approccio di questo tipo è legato alla inevitabile interdipendenza che lega le due tecniche qualora vengano combinate assieme per realizzare lo scaffold. Per questo motivo, è necessario un elevato controllo delle proprietà materiali del sistema e dei parametri di processo. Tuttavia, in virtù della elevata complessità biomeccanica della gran parte dei tessuti biologici, tale approccio sembra essere tra i più indicati per il design di scaffold con microstrutture altamente complesse, necessari ad ottimizzare le proprietà finali dei neo-tessuti ingegnerizzati.

## 1.2 SCOPO DELLA TESI

Lo sviluppo e l'ingegnerizzazione di scaffold per la rigenerazione dei tessuti biologici ha permesso di individuare, in relazione allo specifico campo di applicazione, un insieme di proprietà chimico/fisiche del materiale e microstrutturali del substrato necessarie a favorire e guidare i processi cellulari, sia *in vitro* che *in vivo*. Nonostante gli enormi progressi effettuati dalla scienza in merito alla comprensione dei processi biologici, i complessi meccanismi che sono alla base dell'interazione tra le cellule e l'ambiente di coltura rappresentano ancora un punto di grande incertezza e risulta difficile definire una relazione univoca tra le proprietà dello scaffold e quelle del neo-tessuto. Per tale motivo, l'implementazione di strategie alternative che permettano un maggiore controllo delle proprietà microstrutturali, rappresenta un aspetto chiave dello scaffold design. Problematiche quali il trasporto di nutrienti e rifiuti metabolici anche all'interno dello scaffold e durante tutta la fase di sviluppo del neo-tessuto, necessitano di essere affrontate con approcci nuovi e risolutivi.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è finalizzato al design di scaffold a matrice polimerica sintetica, con proprietà microstrutturali altamente controllate in termini di porosità totale, forma e dimensione dei pori, grado di interconnessione e distribuzione spaziale. Il materiale polimerico selezionato a tale scopo è il PCL in virtù delle sue ottime proprietà di biocompatibilità e biodegradazione, associate alla elevata processabilità. Come tecnologia principale di processo è stato selezionato il gas foaming, in quanto permette un accurato controllo dalla microstruttura dello scaffold evitando l'utilizzo di solventi organici e processando il polimero da fuso. In virtù dei limiti intrinseci di cui tale tecnologia di processo risulta caratterizzata e, in considerazione dei grandi vantaggi che la combinazione di diverse tecnologie offre nel controllo delle proprietà dello scaffold, il gas foaming è stato combinato con la tecnica del reverse templating. In particolare, l'attività di ricerca si è sviluppata in due direzioni distinte, legate alla tipologia di template impiegato.

Una prima linea di ricerca è stata indirizzata verso la preparazione di scaffold di PCL a partire da materiali compositi contenenti un agente template microparticellare, l'NaCl, impiegato in differenti concentrazioni e granulometria. Lo studio effettuato su questi sistemi è stato mirato alla comprensione dei meccanismi di espansione di differenti tipologie di agente espandente (miscele CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> a concentrazione variabile) nel PCL, in presenza dell'agente template. L'effetto della concentrazione e della dimensione delle microparticelle è stato investigato in relazione alle proprietà viscoelastiche dei compositi ed alle proprietà microstrutturali degli scaffold, in particolare porosità totale, dimensione dei pori e distribuzione spaziale. La combinazione delle due differenti tecniche di processo ha permesso inoltre di controllare finemente l'interconnessione dei pori e superare alcune importanti limitazioni connesse all'impiego delle singole tecniche.

La seconda linea di ricerca, basata sulla combinazione del gas foaming con templanti continui, è stata sviluppata per la prima volta in questo lavoro di tesi e, come verrà illustrato di seguito, permette la realizzazione di scaffold con proprietà morfologico-strutturali difficilmente ottenibili con le altre tecnologie di processo. Attraverso l'opportuna selezione della tipologia e della concentrazione di agente templante e, mediante un accurato controllo del processo di espansione, è infatti possibile la realizzazione di scaffold con differenti livelli di porosità totale, dimensione dei pori su più scale dimensionali e un elevato grado di interconnessione. L'elevata complessità dei sistemi materiali impiegati e delle tecnologie di processo ha tuttavia richiesto un accurato studio delle singole fasi di preparazione degli scaffold. In particolare, la selezione dell'agente templante e la caratterizzazione delle sue proprietà chimico/fisiche e di schiumatura, la preparazione delle miscele eterogenee e l'ottimizzazione del processo di foaming sono tutti aspetti di processo fondamentali nel design degli scaffold.

Lo studio sviluppato in questo lavoro di tesi si pone quindi come obiettivo di mostrare le grandi potenzialità della tecnica del gas foaming/reverse templating nel design di scaffold biodegradabili per l'ingegneria dei tessuti e di individuare possibili linee di sviluppo nel miglioramento delle proprietà di biocompatibilità dei sistemi preparati.



# Capitolo 2

## **Materiali**

La selezione dei materiali da impiegare per la preparazione degli scaffolds risulta uno degli aspetti chiave dello scaffold design ma, come evidenziato in precedenza, non può comunque prescindere dalle proprietà microstrutturali che si vogliono ottenere e, quindi, dalla tecnologia di fabbricazione. Il PCL è stato selezionato come materiale strutturale per la realizzazione degli scaffolds in virtù delle sue ottime proprietà di biocompatibilità e di biodegradazione ed alla possibilità di essere processato con le più moderne tecnologie di processo dei polimeri termoplastici. In considerazione dei principali campi di applicazione degli scaffolds di PCL, ed in particolare per la rigenerazione dei tessuti duri (osso e cartilagine) il processo di preparazione ha previsto l'incorporazione di filler inorganici capaci di promuovere i processi osteorigenerativi (HAP sintetica). Per quanto concerne le tipologie di agenti templanti impiegate, sono state impiegate microparticelle di cloruro di sodio aventi differenti forme e scale dimensionali e, come templante continuo è stato impiegato un polimero di origine naturale, la gelatina termoplastica, ottenuto mediante un processo di termoplastificazione della gelatina animale con l'impiego di un plasticizzante, il glicerolo. Tale polimero, come vedremo in seguito, risulta caratterizzato da una scarsa miscibilità con il PCL e, può essere facilmente estratto dalla miscela per immersione in H<sub>2</sub>O. Per la fase di foaming sono stati impiegate miscele CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> a differenti percentuali.

## 2.1 POLYCAPROLACTONE

Il polycaprolactone (PCL) è un polimero semicristallino appartenente alla categoria dei poliesteri alifatici di nuova generazione. Rispetto ai più classici PLA, PGA e loro copolimeri, il PCL è caratterizzato da lunghe catene alifatiche, la cui unità base è riportata nella figura 1, che contribuiscono a garantirne una stabilità termica superiore a quella delle altre tipologie di poliesteri biodegradabili.

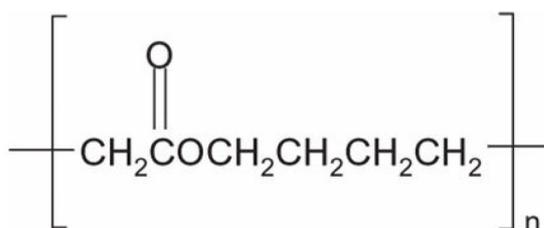


Figura 1 - Unità chimica di base del PCL.

Questa caratteristica ne permette la lavorazione anche a temperature sensibilmente superiori alla temperatura di fusione, senza l'insorgenza di processi di degradazione termica.

Le principali proprietà fisiche del PCL impiegato in questo lavoro (SIGMA-ALDRICH, codice 181609) sono riportate nella tabella 4.

Tabella 4 - Principali proprietà fisiche del PCL impiegato per la preparazione degli scaffolds.

MW [Da]	T <sub>g</sub> [°C]	T <sub>F</sub> [°C]	Grado di cristallinità	ρ [g/cm <sup>3</sup> ]
65.000	- 60	59 - 64	69%	1.145

La temperature di transizione vetrosa e l'intervallo di temperature di fusione relativamente basse, ne favoriscono inoltre la processabilità con i polimeri naturali, per i quali la temperatura risulta essere un aspetto fortemente limitante nella lavorazione. Per quanto concerne le proprietà di schiumatura, numerosi studi hanno evidenziato che le proprietà chimico-fisiche (stabilità termica, viscoelasticità, solubilità ai gas, cristallinità) rendono il PCL un ottimo polimero termoplastico da impiegare per la realizzazione di materiali espansi mediante la tecnica del gas foaming.[67-69]

Lo stato gommoso alla temperatura di utilizzo in ambito biomedico (37°C) caratterizza fortemente il comportamento meccanico degli scaffolds di PCL. Basti pensare infatti che il modulo elastico a compressione e la resistenza a trazione a 25°C del polimero bulk, rispettivamente pari a 1.6 e 20 - 40 MPa, risultano comunque inferiori a quelle dei tessuti duri (tabella 3).

Per la sua appartenenza alla classe dei poliesteri alifatici, il PCL è soggetto a biodegradazione per la suscettibilità del legame estere alifatico di idrolizzarsi. I prodotti di tale idrolisi sono metabolizzati o attraverso il ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA) oppure eliminati direttamente con le secrezioni renali. [70] Un gran numero di studi sono stati condotti al fine di valutarne l'effetto sull'organismo e, la ridotta citotossicità sia *in vitro* che *in vivo* ha portato all'approvazione da parte dell'US Food and Drug Administration dell'impiego del PCL in una vasta tipologia di dispositivi biomedico, come ad esempio sistemi a rilascio controllato di farmaci. A causa della sua struttura chimica, il PCL risulta altamente idrofobico e caratterizzato da tempi di degradazione, sia *in vitro* che *in vivo*, sensibilmente maggiori rispetto al PDLA ed al PGA (tabella 1). Nonostante quindi sia compatibile sia con tessuti soffici (muscoli, pelle, tessuto vascolare) che duri (osso cartilagine), l'utilizzo del PCL è limitato a questi ultimi dalla lentezza delle cinetiche di riassorbimento indotte, oltre che dall'idrofobicità, dall'elevata percentuale di cristallinità. [15, 57, 63]

## 2.2 GELATINA

La gelatina è un polipeptide con un peso molecolare che va da 15000 g/mol fino a valori superiori a 250000 g/mol, ed è ottenuta per idrolisi del collagene (ricavato, a sua volta, da pelle e da ossa animali) in condizioni acide o basiche a seconda del tipo di collagene adoperato. La

gelatina contiene tutti gli amminoacidi essenziali ad eccezione del triptofano, come illustrato nella tabella seguente.

Tabella 5 - Composizione percentuale della gelatina e dei suoi amminoacidi. [71]

Composizione chimica	% Amminoacidi	% ponderale
<i>Proteine</i>	<i>Glicina 27.2</i>	84 - 90%
	<i>Prolina 15.2</i>	
	<i>Idrossiprolina 13.3</i>	
	<i>Acido glutammico 11.6</i>	
	<i>Alanina 11.3</i>	
	<i>Arginino 9.0</i>	
	<i>Altro 12.4</i>	
<i>Sali</i>		1 - 2%
<i>Acqua</i>		8 - 15%

La struttura molecolare della gelatina, mostrata in figura 2, è costituita da una miscela eterogenea di polipeptidi a struttura singola o stratificata ognuno dei quali ottenuto da proline a conformazione ad elica sinistrorsa e contenente un numero di amminoacidi compreso tra 300 e 4000.

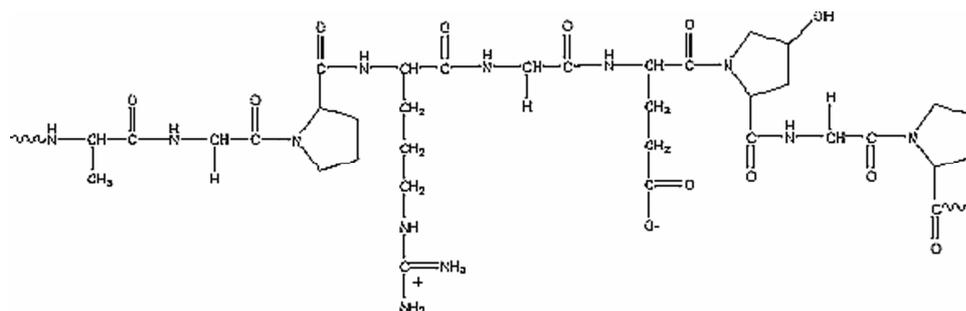


Figura 2 - Struttura molecolare della gelatina.

La gelatina impiegata in questo lavoro è gelatina estratta da pelle bovina mediante un processo in ambiente basico, tipo B (SIGMA-ALDRICH, codice G9391).

Essendo un prodotto di denaturazione del collagene, la gelatina presenta ottime proprietà di biocompatibilità al punto che, attualmente, è uno dei polimeri naturali maggiormente impiegati per applicazioni biomediche, soprattutto per quanto concerne la rigenerazione dei tessuti soffici [72]. Alcuni studi hanno comunque evidenziato la possibilità di

impiegare tale polimero anche per i processi di rigenerazione dei tessuti duri. [9]

L'elevata idrofilia che caratterizza la gelatina e che la rende altamente solubile in soluzione acquosa a temperature superiori a 35°C, richiede la stabilizzazione della sua struttura chimica mediante reticolazione dei residui lisinici e glutaminici, generalmente con transglutaminasi, oppure dei soli residui lisinici, tipicamente ottenuta con glutaraldeide [73].

Per la preparazione delle miscele eterogenee con il PCL, la gelatina è stata termoplastizzata a caldo con l'ausilio di un opportuno plasticizzante, il glicerolo anidro (Fluka, codice 49779). Il glicerolo infatti, essendo caratterizzato da un basso peso molecolare (MW = 92 g/mol) riesce facilmente a diffondere e ad interporsi fra le macromolecole della gelatina, con la conseguenza di aumentarne la mobilità e la capacità di scorrimento reciproco. [74] La gelatina termoplastica (TG) così ottenuta può quindi essere processata in maniera analoga ai polimeri termoplastici di origine sintetica e, nello specifico di questo lavoro, è stata impiegata come agente templante continuo. Il processo di termoplastizzazione e lo studio delle proprietà reologiche, termiche e di schiumatura della TG e delle miscele, fondamentali ai fini della preparazione degli scaffolds di PCL verranno approfonditamente discussi nel capitolo relativo all'attività sperimentale.

### 2.3 IDROSSIAPATITE SINTETICA

L'idrossiapatite sintetica rappresenta uno dei materiali inorganici maggiormente impiegati per la preparazione di scaffolds, sia come elemento principale, [75] sia come filler in matrici polimeriche [9, 65] per via delle ottime proprietà strutturali e di biocompatibilità.

In questo lavoro di tesi sono state selezionate due differenti tipologie di idrossiapatite sintetica (HAP), che differiscono in termini di composizione chimica e di proprietà microstrutturali, da impiegare come filler nella matrice polimerica di PCL.

In particolare, scaffolds compositi PCL-HAP sono stati ottenuti impiegando un filler di dimensioni nanometriche, *nHAP*, (Berkley advanced materials, codice BABI-HAP-N100) caratterizzato da una densità apparente pari a 3.2 g/cm<sup>3</sup> e da cristalli di forma allungata e dimensione media pari a 100nm. [65] La seconda tipologia di HAP selezionata è invece costituita da granuli di dimensioni micrometriche, *mHAP*, comprese fra 50 e 70µm (Finceramica, codice Fin-Granule).

Nella figura 3 sono riportate due micrografie al SEM dei materiali impiegati e la rispettiva composizione chimica ottenuta mediante EDS. Osservando le micrografie al SEM dei campioni di idrossiapatite si può osservare nel caso dell'*nHAP* una tendenza a formare cluster di dimensioni micrometriche probabilmente a causa delle forti interazioni superficiali che si generano tra le particelle di dimensioni sub-micrometriche. Tali cluster possono comunque essere disgregati durante il processo di miscelazione con il polimero, per effetto degli sforzi di taglio che agiscono sul sistema durante la miscelazione.

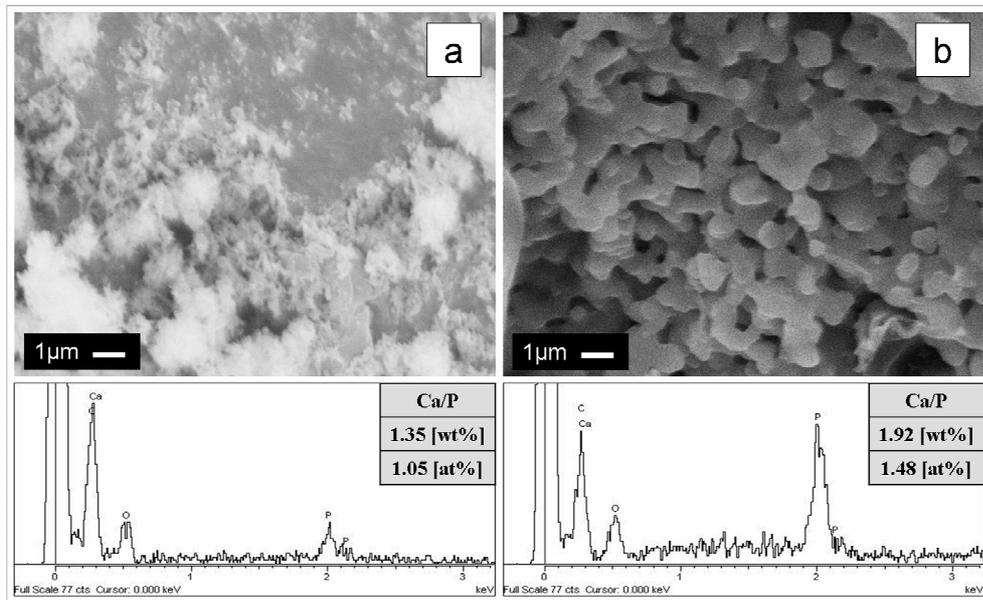


Figura 3 - Proprietà chimico/fisiche dell'idrossiapatite impiegata per la preparazione degli scaffolds compositi: a) polvere nanometrica; b) particolare della porosità dei granuli micrometrici.

Viceversa, dall'analisi della superficie dell'mHAP emerge la presenza di una porosità su scala micrometrica e sub-micrometrica all'interno dei singoli grani. Una ulteriore differenza fra le due tipologie di HAP selezionate emerge dall'analisi EDS degli elementi chimici costituenti il filler inorganico. In particolare, pur essendo entrambi caratterizzati da un rapporto calcio/fosforo superiore ad 1, nel caso dell'idrossiapatite in granuli, il rapporto ponderale risulta prossimo a 2 e, quindi si avvicina maggiormente alla struttura chimica dell'idrossiapatite presente nell'osso. [42]

L'effetto quindi dell'incorporazione dell'HAP nella matrice di PCL che costituisce lo scaffold può quindi essere notevolmente differente in relazione alle proprietà strutturali e di biocompatibilità. Dal punto di vista strutturale, l'incorporazione di un materiale ceramico all'interno della matrice polimerica ha come conseguenza l'incremento delle proprietà elastiche del materiale a cui si accompagna di contro una riduzione delle proprietà di deformazione a rottura. L'effetto di rinforzo dipende tuttavia fortemente dalla dimensione delle particelle e, a parità di concentrazione di filler, la rigidità generalmente aumenta al diminuire della dimensione delle particelle. Viceversa, la presenza della microporosità all'interno dei granuli può portare ad un significativo incremento della capacità dello scaffold di promuovere la rigenerazione del tessuto osseo. L'HAP è infatti un minerale naturalmente presente nell'osso e viene continuamente depositato/riassorbito dalle cellule durante il suo processo di rimodellamento mediante meccanismi di scambio ionico. Numerosi studi hanno dimostrato che la presenza di microporosità influisce sia sui questi processi di scambio ionico a livello cellulare, sia sulla capacità di assorbimento delle proteine da parte della

superficie. [3] L'attività biosintetica dell'HAP è inoltre legata alla sua composizione chimica, costituita sostanzialmente da fosfati di calcio, del tipo  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_{2-2x}O_x$ . Per tale motivo, composizioni chimiche differenti possono modificare i processi di dissoluzione/precipitazione e scambio ionico. [76]

## 2.4 CLORURO DI SODIO ED AGENTI ESPANDENTI

Come illustrato in precedenza, per controllare la porosità degli scaffolds sono state selezionate due tipologie di tecniche di processo: il reverse templating ed il gas foaming. Nel caso della tecnica del reverse templating, come elemento templante continuo si è utilizzata la TG, di cui si descriveranno le caratteristiche nel capitolo relativo all'attività sperimentale, mentre come agente porogeno microparticellare è stato selezionato il cloruro di sodio (J.T. Baker, codice 0278). La selezione dell'NaCl come agente porogeno per il PCL è ampiamente riportata nella letteratura scientifica per la preparazione di scaffolds biodegradabili. [43, 44, 46, 47] L'NaCl è infatti disponibile in commercio sotto forma di cristalli di dimensioni variabili da pochi micron fino ad alcuni millimetri ed è inoltre facilmente estraibile dalla matrice polimerica mediante immersione in H<sub>2</sub>O. In considerazione della necessità di controllare finemente le proprietà microstrutturali degli scaffolds, è stato opportuno selezionare due differenti range dimensionali di microparticelle. La prima classe dimensionale dei cristalli di NaCl, compresa fra 300 e 500 $\mu$ m, è stata ottenuta previa setacciatura dell'NaCl tal quale. Per la seconda tipologia di dimensioni di NaCl impiegata, il materiale inorganico è stato macinato con l'ausilio di un mulino a pale rotanti (RETSCH, Z100) equipaggiato con una griglia setacciatrice con fori di 80 $\mu$ m di diametro. In questo modo, è stato possibile ridurre la dimensione media dei cristalli di NaCl come illustrato in figura 4.

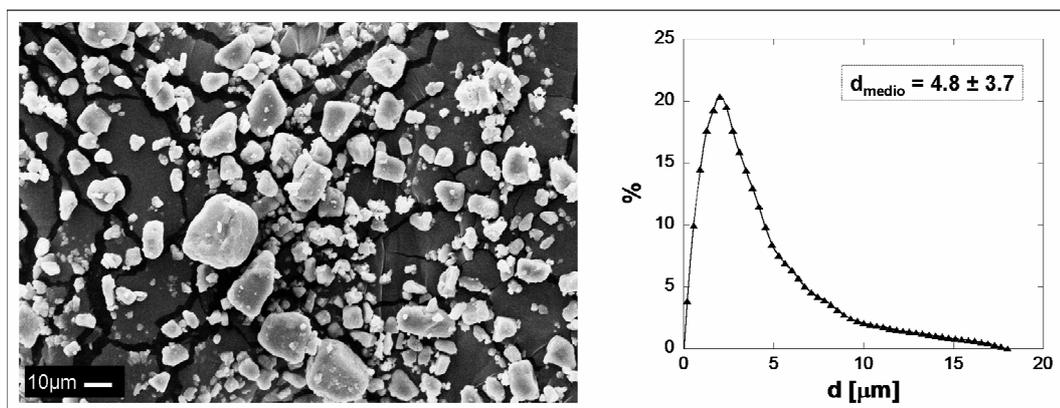


Figura 4 - Morfologia e distribuzione dimensionale dell'NaCl dopo il processo di macinazione.

A differenza del reverse templating in cui l'elemento porogeno è allo stato solido, nel gas foaming la porosità è indotta dal processo di

espansione di un porogeno allo stato fluido. Gli agenti espandenti che sono stati selezionati per la fase di foaming sono:

- CO<sub>2</sub>
- N<sub>2</sub>
- Miscele di CO<sub>2</sub> - N<sub>2</sub>

(Air liquide, grado di purezza superiore al 99.9%). La scelta di utilizzare queste tre tipologie di gas è stata presa in base alle conoscenze acquisite dalla letteratura sulle proprietà di solubilità di questi gas nel PCL e sulla capacità di produrre una struttura cellulare altamente controllata in seguito al processo di foaming. [67] Come verrà illustrato più approfonditamente nelle sezioni relative all'attività sperimentale e nell'appendice dedicata al gas foaming, la selezione tra queste tipologie di gas deve essere effettuata in relazione alla tipologia di sistema considerato (tipologia, dimensione e concentrazione dell'elemento templante) ed alle caratteristiche microstrutturali richieste. Ad esempio, l'impiego di una miscela con una elevata concentrazione di N<sub>2</sub> garantisce un maggior effetto di nucleazione delle bolle di gas rispetto a quanto ottenibile con una miscela ricca di CO<sub>2</sub> in quanto risulta possibile ottenere velocità di caduta di pressione significativamente più elevate. [67, 77] In condizioni non supercritiche infatti, la pressione a cui la CO<sub>2</sub> è disponibile è circa 1/3 rispetto a quella dell'azoto. Nel caso della CO<sub>2</sub>, per aumentare la pressione di solubilizzazione è necessario impiegare tale fluido in condizioni supercritiche, come rappresentato nel diagramma di figura 5. [78]

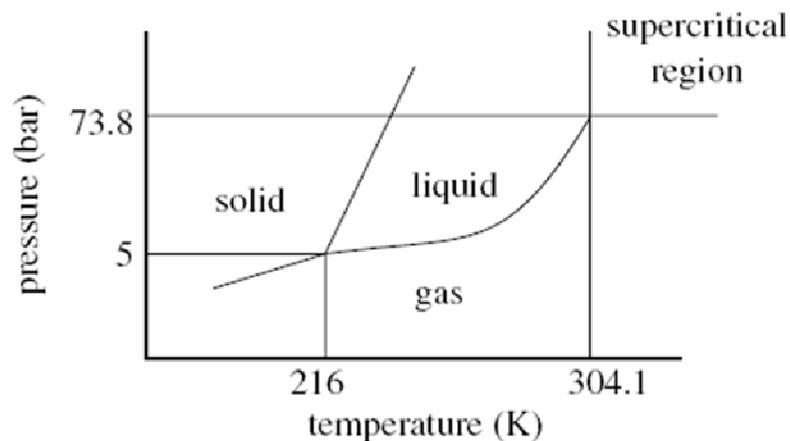


Figura 5 - Diagramma di fase per la CO<sub>2</sub> con evidenziati il punto critico e la regione supercritica.

L'impiego di miscele CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> in opportune concentrazioni può quindi rappresentare il giusto compromesso nel bilancio tra il processo di nucleazione e crescita delle bolle di gas nel polimero.



# Capitolo 3

## **Metodi**

La realizzazione degli scaffold di PCL è stata ottenuta mediante la tecnica di processo del gas foaming/reverse templating. La combinazione di queste due tecniche è mirata ad ottenere un controllo delle proprietà microstrutturali degli scaffold migliori rispetto a quanto possibile con l'impiego separato delle singole tecniche.

La tecnica del gas foaming, ampiamente impiegata in ambito industriale per la preparazione di schiume polimeriche a porosità controllata, [79] ha suscitato nell'ultimo decennio un grande interesse anche in ingegneria dei tessuti. Il grande sviluppo dei processi di espansione dei polimeri termoplastici tradizionali (polistirene, polietilene, policarbonato) [80-82] è stato di recente rivolto verso i materiali biodegradabili e biocompatibili (principalmente poliesteri e polisaccaridi) [33, 68, 74, 83-88] ed ha quindi aperto la porta alla realizzazione espansi da utilizzare come scaffold per la rigenerazione tissutale.

La tecnica del gas foaming è stata introdotta in ingegneria dei tessuti per la prima volta nel 1996 per la preparazione di schiume di copolimeri del PLGA da impiegare come scaffold per la rigenerazione tissutale. [33] Il grande vantaggio presentato da questo approccio è rappresentato dalla possibilità di preparare scaffold polimerici a partire da un gran numero di polimeri biodegradabili e senza l'impiego di solventi organici potenzialmente dannosi per le cellule e per i segnali biologici incorporati all'interno della matrice polimerica. Inoltre, al fine di evitare l'impiego di elevate temperature di processo, tali scaffold sono stati preparati "a freddo" mediante la schiumatura per *temperature induced phase separation*. Con questo approccio, il gas viene solubilizzato nel polimero a temperatura ambiente ed il successivo incremento di temperatura (comunque inferiore alla temperatura di fusione) fornisce la forza spingente alla nucleazione e crescita delle bolle di gas. Tali scaffold sono tuttavia caratterizzati da alcune importanti limitazioni. Come verrà approfondito nell'appendice relativa al gas foaming, tale tecnica è applicabile solo ad un ristretto numero di materiali polimerici e non è possibile ottenere una modulazione fine della microstruttura. L'impiego degli scaffold così ottenuti è inoltre fortemente limitato a causa dell'elevata percentuale di porosità chiusa sia all'interno che, soprattutto sulla superficie esterna. Di recente, numerosi studi hanno posto l'attenzione sulla possibilità di ottenere un maggior controllo delle proprietà microstrutturali degli scaffold solubilizzando il gas a temperature superiori a quella di fusione e facendo avvenire il processo di espansione per effetto della rapida riduzione della pressione, dopo aver preventivamente raffreddato il sistema (*pressure induced phase separation*). Tale tipologia di processo, applicabile alla quasi totalità dei polimeri termoplastici per applicazioni biomediche, garantisce infatti un miglior controllo delle proprietà microstrutturali attraverso la selezione dei parametri di processo. Tuttavia, il raggiungimento di un grado di interconnessione dei pori adeguato alle applicazioni biomediche, risulta ancora oggi difficilmente ottenibile col solo ausilio di questa tecnologia.

Per migliorare l'interconnessione della porosità e favorire la penetrazione cellulare e la diffusione dei fluidi in tutta la matrice, la tecnica di gas foaming è stata combinata con quella del reverse templating, basata sull'utilizzo di agenti templanti microparticellari (NaCl). [64] La presenza dell'NaCl in concentrazioni ponderali superiori alla soglia di percolazione (fino a valori del 95%) garantisce infatti un elevato grado di interconnessione soprattutto sulla superficie esterna degli scaffold. Tuttavia, proprio l'elevata concentrazione di agente templante rappresenta la principale limitazione nello scaffold design. Infatti, la ridotta percentuale di fase polimerica impiegata e l'elevata rigidità del sistema sono un forte ostacolo all'espansione delle bolle di gas e quindi all'effetto dei parametri di foaming sulla microstruttura.

A partire dai risultati ottenuti nello scaffold design con la tecnologia del gas foaming, l'attività svolta durante i tre anni di dottorato è stata suddivisa in due grandi linee di ricerca, finalizzate alla realizzazione di scaffold di PCL e PCL/HAP per la rigenerazione dei tessuti duri. Una parte del lavoro è stato indirizzato all'ottimizzazione della tecnica del *gas foaming/microparticulate templating*, approfondendo il legame processo/microstruttura. Parallelamente, l'attività svolta ha portato all'implementazione di una tecnologia alternativa di scaffold design: il *gas foaming/continuous templating*. Nel primo caso quindi, sono stati studiati i processi di espansione di compositi PCL/NaCl ottenuti impiegando concentrazioni variabili di microparticelle a differenti distribuzioni granulometriche. Nel secondo caso invece, sono stati studiati i processi di foaming di miscele eterogenee co-continue PCL/TG e successivamente, la TG è stata estratta dalla miscela espansa così da ottenere la morfologia finale degli scaffold.

### 3.1 GAS FOAMING/MICROPARTICULATE TEMPLATING

Il processo di preparazione degli scaffold di PCL mediante l'impiego della tecnica combinata del gas foaming/microparticulate templating è schematizzato nella Figura 6.

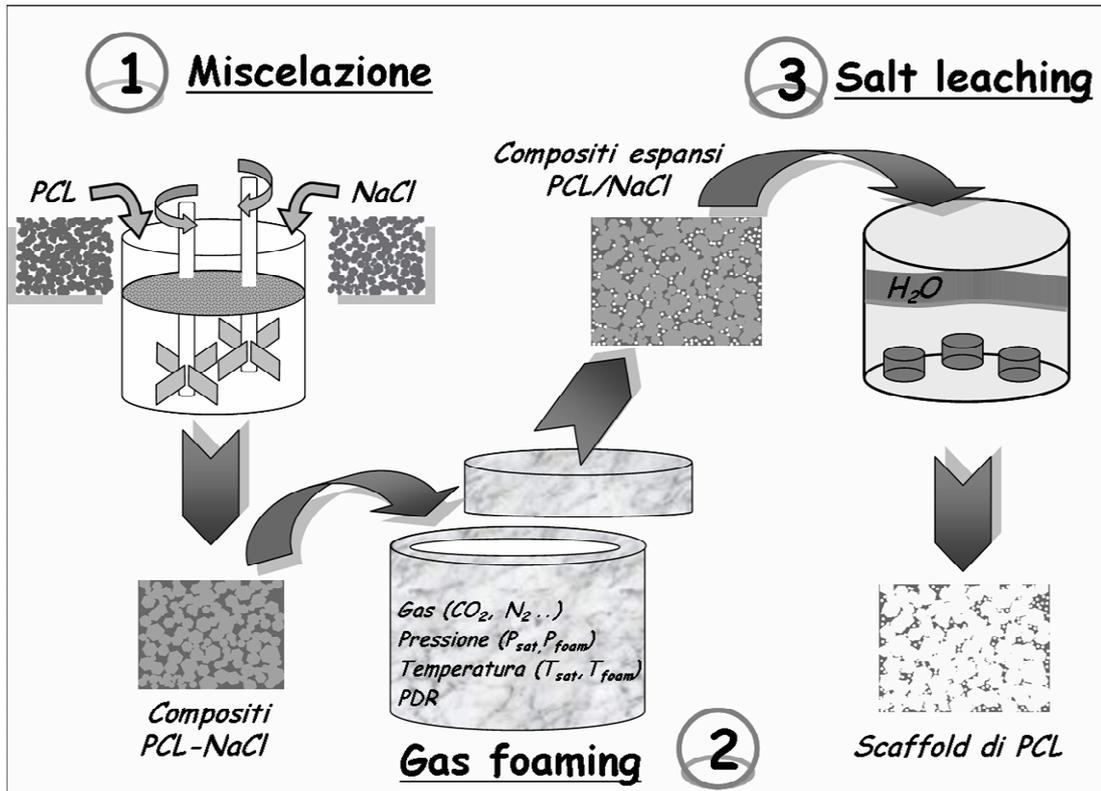


Figura 6 - Schema della tecnica di processo del gas foaming-microparticulate templating.

Tale processo si basa su tre differenti stadi:

- (1) Il PCL viene fuso e successivamente miscelato con l'NaCl secondo rapporti di miscelazione opportunamente selezionati. In questa fase risulta fondamentale il controllo di parametri di processo quali temperatura, velocità e tempo di miscelazione. Una volta estratti dal miscelatore si effettua una pressatura dei materiali compositi alla stessa temperatura di miscelazione, in maniera tale da ottenere lastre di spessore uniforme.
- (2) Campioni cilindrici vengono estratti dalle lastre ed inseriti in un reattore termostato e pressurizzato per la successiva fase di espansione. Il materiale composito viene quindi solubilizzato con l'agente espandente ad una temperatura superiore a quella di fusione del polimero e ad una opportuna pressione, per un tempo sufficiente ad ottenere la completa solubilizzazione del gas. La fase di espansione vera e propria prevede il rapido raffreddamento del materiale fino alla temperatura desiderata, alla quale viene

rapidamente rilasciata la pressione con la conseguente formazione di bolle di gas nella fase polimerica.

- (3) Il composito espanso viene infine immerso nel solvente per la fase templante ( $H_2O$ ) fino alla completa dissoluzione dell' $NaCl$ . Questa fase porta all'ottenimento della morfologia finale dello scaffold. I materiali vengono quindi essiccati sotto vuoto fino alla completa estrazione dell' $H_2O$ .

La morfologia finale degli scaffold può essere controllata attraverso la modulazione dei parametri di processo delle singole tecniche ma, tuttavia risulta maggiormente complicata dalla loro mutua interdipendenza. Nello specifico, la composizione del composito così come la forma e la dimensione dei cristalli di  $NaCl$  determinano le caratteristiche della porosità ottenuta in seguito al leaching. Questi parametri esercitano però una forte influenza anche sull'espansione del gas e, quindi, contribuiscono a definire anche le caratteristiche della porosità che si ottiene in seguito al processo di foaming. Se ad esempio prendiamo in esame la dimensione delle microparticelle di  $NaCl$  selezionate, è immediato comprendere che i compositi preparati a partire da cristalli micronizzati saranno caratterizzati da proprietà viscoelastiche e di schiumatura differenti rispetto a quelle relative ai compositi contenenti le particelle di granulometria compresa fra 300 e 500 $\mu m$ . Il processo di espansione dei sistemi micronizzati può essere studiato in relazione con le proprietà viscoelastiche del sistema, con un approccio analogo a quello dei sistemi polimerici contenenti filler inorganici. Nel secondo caso invece, il polimero e l'agente templante rappresentano due sistemi differenti, in cui il network percolativo delle particelle esercita una sorta di restrizione all'espansione dei domini polimerici.

Dal punto di vista del design degli scaffold, la selezione di elementi porogeni microparticellari di differenti dimensioni, risiede nell'obiettivo di ottenere scaffold di PCL con caratteristiche microstrutturali differenti. L'impiego di cristalli di  $NaCl$  di dimensioni comprese fra 300 e 500 $\mu m$  ha come obiettivo la creazione di sistemi porosi in cui la macroporosità è ottenuta in seguito all'estrazione del sale mentre la microporosità è indotta dall'espansione del gas. Viceversa, l'impiego di cristalli di  $NaCl$  di dimensione più fine è finalizzata a promuovere l'apertura delle pareti dei pori durante il processo di foaming. Nonostante tale approccio richieda lo studio di sistemi polimerici altamente complessi, fornisce il grande vantaggio di migliorare il controllo della microstruttura degli scaffold, rispetto a quanto possibile con solo impiego del gas foaming

Alla luce di queste considerazioni, risulta chiaro che il processo di schiumatura dei sistemi preparati impiegando  $NaCl$  di differente granulometria necessitano di essere trattati separatamente, al fine di poter individuare le condizioni di processo ottimali per la preparazione di scaffold a porosità controllata.

### 3.1.1 PREPARAZIONE DI SCAFFOLD DI PCL A PARTIRE DA SISTEMI COMPOSITI PCL/NaCl MICRONIZZATO

#### (1) Preparazione dei materiali compositi

Per la preparazione dei materiali compositi PCL/NaCl con sale micronizzato è stato impiegato un miscelatore a camera chiusa del tipo Haake Rheomix® 600 provvisto di una camera di miscelazione di 50cm<sup>3</sup> e di un sistema di controllo dei principali parametri di processo: temperatura, velocità di rotazione dei rotori e momento torcente. (Haake Rheocord® 9000). Di seguito sono elencate le differenti fasi del processo di miscelazione:

- Inserimento del PCL all'interno della camera di miscelazione alla temperatura di 65°C ed alla velocità di 20rpm per un tempo sufficiente a garantire la completa fusione del polimero (2 minuti ca).
- Aggiunta dell'NaCl all'interno della camera e miscelazione dei materiali ad una velocità di 100rpm per 10 minuti. L'aumento della velocità di miscelazione risulta necessaria al raggiungimento di un buono grado di omogeneità di dispersione dell'NaCl all'interno del polimero.
- Estrazione dei materiali compositi e pressatura a caldo a 90°C e 30bar in lastre di 3mm di spessore, mediante l'utilizzo di un sistema di compression moulding (Collin P 300 P).

Per la preparazione dei materiali compositi PCL/NaCl micronizzato sono stati impiegati i rapporti di miscelazione riportati nella tabella seguente.

Tabella 6 - Composizione percentuale ponderale dei compositi PCL-NaCl micronizzato.

PCL	70	60	50	40	30	20
NaCl	30	40	50	60	70	80

#### (2) Espansione dei materiali compositi

I materiali compositi preparati sono stati quindi espansi mediante la tecnica del gas foaming. Campioni cilindrici di 10 mm di diametro sono stati ottenuti dalle lastre precedentemente preparate, mediante l'impiego di una fustella. Un campione per ogni composizione è stato inserito nel sistema di solubilizzazione/espansione (HIP) per il successivo processo di gas foaming. Tale processo si articola nelle seguenti fasi:

- I campioni vengono solubilizzati con l'agente espandente, in questo caso CO<sub>2</sub>, alla temperatura di 70°C e ad una pressione di 65bar. Il processo di solubilizzazione viene effettuato per 3 ore al fine di

ottenere la completa solubilizzazione della CO<sub>2</sub> nel polimero, alla temperatura e pressione selezionate. La scelta di impiegare la CO<sub>2</sub> come agente espandente è stata effettuata in considerazione della necessità di ottenere un maggior controllo della microstruttura degli scaffold, rispetto a quanto ottenibile impiegando l'N<sub>2</sub>. In effetti, il maggior effetto plasticizzante sul PCL della CO<sub>2</sub> rispetto all'N<sub>2</sub>, promuove la formazione di espansi caratterizzati da una dimensione media dei pori significativamente più elevata. [67] In considerazione del processo di nucleazione eterogenea favorito dalla presenza dell'interfaccia tra le due fasi, la selezione di un agente espandente con minor potere nucleante risulta di conseguenza preferibile nel design degli scaffold.

- Una volta terminata la fase di solubilizzazione, il sistema viene raffreddato fino alla temperatura di espansione ( $T_F$ ) con una velocità di raffreddamento controllata. In particolare il profilo temporale della velocità di raffreddamento deve garantire un rapido raggiungimento della  $T_F$ , così da ridurre la desolubilizzazione gas indotta dalla corrispondente riduzione di pressione. A questa prima fase ne segue una stazionaria, necessaria a uniformare la temperatura in tutto il campione (1 minuto). Il tempo totale di raffreddamento è stato mantenuto costantemente pari a 16 minuti ca., così da evitare la cristallizzazione del polimero prima della fase di espansione. Una volta completata la fase di raffreddamento, è stata fatta avvenire la caduta di pressione, fino alla pressione atmosferica, attraverso un controllo accurato della velocità di caduta della pressione (PDR), così da indurre la formazione delle bolle di gas nel polimero.
- I campioni espansi sono stati quindi raffreddati fino alla temperatura ambiente al fine di completare il processo di stabilizzazione della struttura porosa ed estratti dalla camera di espansione.

In questa parte della trattazione, per questioni di fluidità di descrizione dell'attività, si è preferito tralasciare gli aspetti legati al processo di foaming (dispositivo di solubilizzazione/espansione ed effetto dei parametri di processo), per le quali si rimanda all'appendice A.

Al fine di valutare l'effetto della distribuzione spaziale di agente porogeno sulla morfologia degli espansi, dischi contenenti differenti percentuali di NaCl sono stati inseriti sovrapposti all'interno della camera di espansione. In tal modo infatti, durante il processo di solubilizzazione, il polimero all'interfaccia tra i due campioni si salda per effetto della temperatura e della elevata pressione esercitata dal gas, portando alla formazione di un unico materiale composito caratterizzato da un gradiente spaziale di agente templante.

I parametri di processo impiegati durante la fase di foaming sono riportati nella tabella 7.

Tabella 7 - Condizioni sperimentali impiegate durante il processo di foaming dei sistemi compositi PCL/NaCl micronizzato.

Prova	Concentrazione ponderale di NaCl	$T_F$ [°C]	PDR [bar/s]
1	30	28	200
2	30	30	200
3	30; 40; 60	32	200
4	30; 40; 50; 60; 70; 80	34	200
5	30	40	200
6	30; 60	32	40
7	30; 60	34	40
8	30/60; 40/60	32	200

I sistemi compositi impiegati per la realizzazione degli scaffold sono stati ottenuti selezionando una concentrazione ponderale di NaCl nel range 30–80%. Per quanto riguarda i sistemi contenenti gradienti spaziali di agente porogeno, questi sono stati preparati impiegando le seguenti concentrazioni: 30/60 e 40/60.

Il controllo delle proprietà finali degli scaffold mediante il processo di gas foaming è stato invece ottenuto facendo variare la temperatura di espansione nell'intervallo 28–40°C e selezionando un alto ed un basso valore di PDR, 200 e 40bar/s.

### (3) Estrazione dell'agente templante

In seguito al processo di espansione, i materiali sono stati immersi in H<sub>2</sub>O bidistillata per la successiva fase di rimozione dell'agente templante. I campioni sono stati messi in un becker e tenuti sospesi all'interno del solvente mediante una rete polimerica. Il becker è stato quindi messo su piastra magnetica e l'H<sub>2</sub>O è stata tenuta in agitazione con una ancorotta magnetica alla massima velocità (900 rpm), al fine di accelerare l'estrazione dell'agente templante. Successivamente alla fase di leaching, i campioni sono stati essiccati sotto vuoto per estrarre tutta l'H<sub>2</sub>O dagli scaffold.

### 3.1.2 CARATTERIZZAZIONE DEI MATERIALI COMPOSITI PCL/NaCl MICRONIZZATO TAL QUALI E DEGLI SCAFFOLD

L'ottimizzazione delle proprietà microstrutturali degli scaffold preparati mediante la tecnica del gas foaming/microparticulate templating con microparticelle micronizzate necessita di uno studio approfondito sia delle proprietà viscoelastiche dei sistemi compositi tal quali, sia dei processi di estrazione dell'NaCl dalla matrice polimerica, prima e dopo la fase di espansione. Infatti, come già evidenziato in precedenza e come verrà approfondito nell'appendice relativa al gas foaming, l'ottimizzazione delle proprietà viscoelastiche del sistema è un aspetto chiave nel controllo della morfologia degli espansi. In considerazione dell'effetto della fase dispersa micronizzata sui processi di foaming, in termini di controllo dei processi di nucleazione e delle proprietà viscoelastiche, è necessario selezionare opportunamente i parametri di foaming. A tal proposito, l'effetto dei differenti parametri di processo e, in particolare della % di NaCl, della  $T_F$  e del PDR sulle proprietà finali degli scaffold è stato valutato in termini di porosità totale e proprietà microstrutturali quali dimensione dei pori, grado di interconnessione e distribuzione spaziale.

#### (1) Proprietà viscoelastiche dei compositi tal quali

Le proprietà viscoelastiche dei materiali compositi tal quali sono state valutate mediante un reometro a controllo di deformazione (ARES L.S., Rheometric Scientific™) attraverso prove in regime dinamico ed impiegando una geometria a piatti paralleli (25mm). La deformazione è applicata grazie al motore, la coppia torcente è misurata dal trasduttore. In relazione alla elevata presenza di cariche all'interno della matrice polimerica, una prova in regime di funzionamento dinamico risulta essere maggiormente indicata rispetto a quella in regime stazionario per la possibilità di testare i materiali con piccole ampiezze di deformazione e, alterando il meno possibile la microstruttura dei compositi preparati. In tale prova, lo strumento misura la coppia torcente che il materiale esercita sul piatto superiore in seguito ad una opportuna velocità ed ampiezza di deformazione impostata attraverso il piatto inferiore dell'apparecchiatura. Prima di effettuare la prova è stato valutato l'intervallo di linearità delle proprietà viscoelastiche dei compositi e, in relazione alla concentrazione di NaCl, le ampiezze di deformazione sono state selezionate nell'intervallo [0.02, 1%]. I materiali sono stati quindi testati a 90°C e in un intervallo di frequenze compreso fra 0.1 e 100rad/s in atmosfera inerte al fine di prevenirne la degradazione.

- *Cenni sulle proprietà viscoelastiche di fusi polimerici puri e caricati*

La viscoelasticità dei polimeri appare evidente nella risposta del materiale ad una sollecitazione dinamica. Infatti, quando sollecitato da una deformazione del tipo  $\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t)$ , un fluido viscoelastico mostra una risposta, sfasata di un angolo  $\delta$  rispetto alla deformazione di partenza, rappresentabile da una equazione del tipo:

$$1) \quad \frac{\sigma}{\gamma_0} = G' \sin \omega t + G'' \cos \omega t$$

dove  $G'$  è rappresentativo della componente elastica del materiale, in fase con la deformazione, mentre  $G''$  è legato alla componente dissipativa, fuori fase con la forzante. Gli andamenti tipici dei due moduli per un polimero omodisperso allo stato fuso sono riportati nella figura 7:

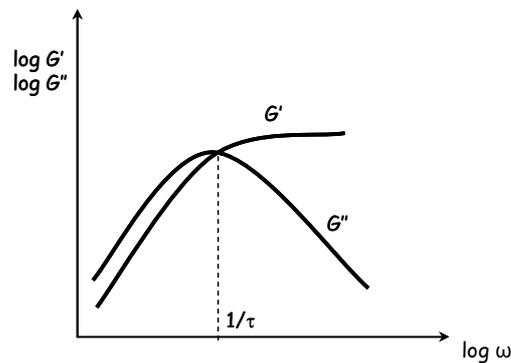


Figura 7 - Andamento con la frequenza di  $G'$  e  $G''$  per un polimero omodisperso.

La frequenza di intersezione dei due moduli (che viene detta frequenza di *cross-over*) è indicata come  $1/\tau$ , ovvero come l'inverso del tempo caratteristico di rilassamento delle macromolecole del polimero. Il parametro  $\tau$  delimita il comportamento principalmente viscoso a basse frequenze (ovvero per tempi superiori al tempo di rilassamento caratteristico) e quello elastico ad alte frequenze (ovvero per tempi inferiori a quello di rilassamento).

La maggior parte dei polimeri allo stato fuso esibisce una tipica funzione di viscosità in flusso di scorrimento caratterizzata dalla presenza di un plateau newtoniano a bassi gradienti di deformazione:

$$2) \quad \eta_0 = \lim_{\dot{\gamma} \rightarrow 0} \eta(\dot{\gamma})$$

dove  $\eta_0$  rappresenta il cosiddetto *limite newtoniano di viscosità*, caratteristico del materiale e della temperatura di prova. Tale parametro è generalmente relazionato al peso molecolare medio del polimero  $MW$  mediante una legge del tipo:

$$3) \quad \eta_0 \propto MW^b$$

in cui l'esponente  $b$  risulta sperimentalmente prossimo a 3,5. Il plateau newtoniano di viscosità è definito in relazione alla *regione di viscoelasticità lineare* e la sua scomparsa è una peculiarità della maggior parte dei sistemi caricati in cui la frazione volumetrica di carica sia

abbastanza alta da generare interazioni dirette o indirette fra le particelle. [89-91] La concentrazione di fase dispersa a cui si può osservare la scomparsa del plateau dipende da una serie di fattori, tra cui la tipologia di particelle impiegate (dimensione, forma) e le interazioni tra le fasi. In particolare, la percolazione della fase dispersa rappresenta una delle condizioni in cui si osserva tale effetto. Infatti, nei polimeri termoplastici puri il tipico comportamento è quello riportato in figura 7, con  $G'' > G'$  in tutto l'intervallo di frequenze di prova (il raggiungimento del punto di crossover avviene generalmente a frequenze molto elevate) e con le due curve che presentano un andamento lineare con pendenza pari rispettivamente a 1 e 2 a basse frequenze. Viceversa, la presenza del filler nella matrice polimerica produce un significativo incremento sia della componente elastica che di quella viscosa ed il comportamento viscoelastico cambia a seconda della concentrazione di filler. A concentrazioni di carica inferiori alla percolazione,  $G'$  rimane inferiore a  $G''$  ed entrambi i moduli risultano dipendenti fortemente dalla frequenza di analisi,  $\omega$ . Quando la concentrazione di carica promuove l'interazione diretta della fase dispersa, si osserva una discontinuità nell'incremento dei moduli, i quali mostrano una ridotta dipendenza dalla frequenza  $\omega$  e, la componente elastica  $G'$  diventa preponderante rispetto a quella viscosa,  $G''$ , in tutto l'intervallo di frequenze di prova. [92, 93] Il plateau che si osserva alle alte concentrazioni di carica è quindi rappresentativo di uno *sforzo di soglia*, ovvero di uno sforzo al di sotto del quale il materiale si comporta come un solido e non fluisce. Il comportamento tipico dei solidi che si osserva nei sistemi caricati può essere quindi attribuito a due fenomeni principali:

- La presenza della carica esercita un effetto di confinamento sulle catene polimeriche producendo un incremento dell'energia di attivazione necessaria al loro scorrimento.
- Il contatto fra le particelle e la loro frizione relativa rappresenta una energia aggiuntiva che si deve fornire al sistema per metterlo in moto. Tale effetto risulta fortemente dipendente dai punti di contatto e dall'impaccamento delle particelle, dipendenti dalla concentrazione e, caratterizza la risposta viscoelastica del sistema soprattutto a concentrazioni superiori alla soglia di percolazione.

Nei sistemi compositi impiegati in questo studio, la concentrazione di agente templante varia in un ampio range di composizioni, dal 30 all'80% in peso e ci si aspetta, quindi, una differenza significativa delle proprietà viscoelastiche tra i sistemi non percolanti e quelli percolanti.

## (2) Misure di dissoluzione dell'NaCl

La dissoluzione dell'NaCl dalla matrice polimerica tal quale ed espansa è stata valutata attraverso misure di tipo gravimetrico. Tale tecnica infatti presenta un elevato grado di accuratezza accoppiato ad una sufficiente semplicità di misura. Tre campioni per ogni tipologia (dischi di 10mm di

diametro) di compositi non espansi e le schiume preparate, sono stati pesati e successivamente immersi in dH<sub>2</sub>O fino al raggiungimento del peso di equilibrio. A questo punto si è proceduto all'essiccazione ed al successivo rilevamento del peso. La percentuale di NaCl estratta è stata valutata come rapporto percentuale fra la differenza tra il peso iniziale e quello finale ( $m_i - m_f$ ) ed  $m_i$ . Tale valore è stato poi rapportato alla composizione ponderale nominale presente nella miscela di partenza. Per le misure di peso è stata impiegata una bilancia con una accuratezza pari a  $10^{-3}$  g (Mettler Toledo, codice AB104-S).

### (3) Porosità e proprietà microstrutturali degli scaffold

La valutazione della porosità degli scaffold è stata effettuata a partire dai valori di densità apparente ( $\rho_{\text{FOAM}}$ ) degli espansi, ottenuti mediante misure di massa e volume, come indicato nella normativa ASTM D792. La porosità è stata quindi valutata secondo la formula seguente:

$$4) \quad \Phi = [1 - (\rho_{\text{FOAM}} / \rho_{\text{PCL}})] \times 100$$

Per la valutazione di  $\rho_{\text{FOAM}}$  il campione è stato pesato prima secco, ottenendo una misura della massa e successivamente è stato pesato in acqua in maniera tale da valutarne il volume mediante il principio della spinta di Archimede. Secondo tale principio, il volume di un corpo può essere determinato in relazione al peso del liquido che il corpo sposta in seguito alla sua immersione. Il principio della spinta di Archimede viene ampiamente impiegato per la determinazione della densità degli espansi ottenuti mediante il gas foaming, in quanto tale tecnica produce una superficie esterna non porosa che impedisce la diffusione del fluido di misura all'interno della porosità. Nel caso dei nostri scaffold, pur presentando una porosità aperta in superficie per effetto dell'agente templante, la penetrazione del fluido di misura (dH<sub>2</sub>O) è ostacolata dalla ridotta dimensione dei pori superficiali, legati alla dimensione dei cristalli di NaCl. Considerando il breve tempo necessario alla misura del volume (una decina di secondi) è quindi possibile trascurare questo effetto ed ottenere una valutazione accurata della porosità degli scaffold.

Le proprietà microstrutturali degli scaffold sono state valutate mediante analisi al microscopio elettronico a scansione, SEM (LEICA, codice S440). Gli scaffold sono stati inizialmente immersi in azoto liquido per irrigidirne la struttura e successivamente tagliati impiegando una lametta. La superficie di taglio è stata quindi metallizzata con oro ed analizzata al microscopio impiegando una tensione di accelerazione pari a 20kV, al fine di garantire una elevata risoluzione dell'immagine. L'ingrandimento dell'immagine è stato selezionato in relazione alle caratteristiche microstrutturali degli scaffold ed in particolare, dimensione e distribuzione spaziale dei pori.

Per la valutazione della dimensione dei pori è stata impiegata l'analisi delle immagini ottenute al SEM, secondo la normativa prevista dallo standard ASTM D3576. Le micrografie ottenute al SEM sono state

convertite in immagini binarie in cui i pori sono stati evidenziati in nero e la restante matrice in bianco, mediante l'utilizzo del software Image J<sup>®</sup>. La valutazione del diametro medio dei pori ( $D_c$ ) è stata effettuata tracciando un minimo di 100 pori per ciascun campione e correggendo il valore calcolato con l'ipotesi di forma sferica del poro, con il fattore  $4/\pi$ , che tiene conto della tridimensionalità della porosità.

### 3.1.3 PREPARAZIONE DEGLI SCAFFOLD DI PCL A PARTIRE DA SISTEMI COMPOSITI PCL/NaCl 300-500 $\mu$ m

Parallelamente all'impiego di NaCl micronizzato come agente templante, in questo lavoro sono stati approfonditi anche gli aspetti legati ai processi di espansione di materiali compositi contenenti NaCl di dimensioni comprese nel range 300-500 $\mu$ m ed in concentrazioni costantemente superiori alla soglia di percolazione. Come illustrato in precedenza, il processo di espansione della fase polimerica risulta fortemente dipendente dalla concentrazione di particelle di sale ed anche dalla loro dimensione caratteristica. Una dimensione maggiore della fase dispersa riduce ad esempio le superfici di interfaccia polimero-particella e di conseguenza i siti di nucleazione eterogenea. Per tale motivo risulta preferibile l'impiego come agente espandente di una miscela contenente CO<sub>2</sub> ed N<sub>2</sub> con maggior potere nucleante rispetto alla sola CO<sub>2</sub> impiegata in precedenza. Il design degli scaffold a partire da tali sistemi è quindi indirizzato all'ottenimento di una macroporosità, in seguito all'estrazione del templante e una microporosità dovuta al processo di foaming.

A partire da tali sistemi compositi si è anche valutata la possibilità di realizzare scaffold contenenti nHAP a differenti concentrazioni, miscelando la carica all'interno della matrice polimerica, come illustrato nella descrizione del processo di preparazione.

#### (1) Preparazione dei materiali compositi

Per la preparazione dei sistemi compositi con NaCl di dimensioni comprese fra 300 e 500 $\mu$ m è stato impiegato il dispositivo di miscelazione descritto in precedenza. Tuttavia, in tale caso, le condizioni di processo selezionate sono differenti, come illustrato di seguito.

- Per la realizzazione di scaffold compositi di PCL contenenti l'nHAP, il polimero è stato miscelato con la carica inorganica, in concentrazioni ponderali pari al 5 ed al 20%, alle seguenti condizioni: 65°C, 100rpm e 10 minuti.
- Nella preparazione delle miscele PCL/NaCl e PCL/nHAP/NaCl, la camera di miscelazione è stata riempita solo fino al 90% e la velocità di rotazione dei rotori ridotta a 20rpm, al fine di preservare la dimensione e la forma del templante durante la miscelazione. I cristalli di NaCl possono infatti facilmente frantumarsi per attrito durante la miscelazione. Per garantire una ottimale miscelazione dei componenti anche in queste condizioni, la viscosità del polimero è stata ridotta innalzando la temperatura della camera di miscelazione fino a 140°C. Il tempo di miscelazione è stato invece mantenuto costante e pari a 10 minuti.

Immediatamente dopo l'estrazione dalla camera di miscelazione, i compositi sono stati pressati in lastre di 3 mm di spessore ed alla stessa temperatura di miscelazione.

Nella tabella seguente sono riportate le composizioni dei materiali compositi preparati.

Tabella 8 - Composizione percentuale ponderale dei compositi PCL/NaCl e PCL/nHAP/NaCl 300 - 500 $\mu$ m.

PCL	15	10	5	14.5	13	4.75	4
NaCl	85	90	95	90	90	95	95
HAP	0	0	0	0.5	2	0.25	1

## (2) Espansione dei materiali compositi

Analogamente alla procedura utilizzata per i sistemi precedenti, anche per gli scaffold ottenuti a partire dai materiali compositi preparati impiegando NaCl di dimensioni nel range 300 e 500 $\mu$ m è stato impiegato un protocollo di gas foaming simile. Campioni cilindrici di 15mm di diametro sono stati ottenuti dalle lastre precedentemente preparate, mediante l'impiego di una fustella. Un campione per ogni composizione preparata è stato quindi inserito nel reattore per il successivo processo di gas foaming, come illustrato di seguito:

- I campioni sono stati solubilizzati selezionando l'opportuna miscela CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> come agente espandente e solubilizzando ad una temperatura di 70°C ed una pressione variabile in relazione alla tipologia di gas. La scelta di impiegare differenti miscele CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> come agente espandente è sostanzialmente legata alla necessità di ottenere una fase espansa nel PCL caratterizzata da pori di dimensioni dell'ordine di alcune decine di micron ed elevati gradi di interconnessione. Per tale motivo, l'impiego dell'N<sub>2</sub> risulta necessario in quanto permette di ottenere pressioni di solubilizzazione e PDR più elevati rispetto alla sola CO<sub>2</sub>, con la conseguenza di favorire maggiormente la nucleazione delle bolle di gas e ridurre la crescita. In relazione alla minore solubilità di tale gas, il tempo di saturazione è stato aumentato a 4 ore.
- Al termine della fase di solubilizzazione il sistema è stato raffreddato fino alla  $T_F$ , opportunamente regolata in relazione all'agente espandente, con un profilo di velocità di raffreddamento analogo a quello dei sistemi precedenti. A questo punto la pressione è stata ridotta fino alla pressione atmosferica, al massimo PDR ottenibile dal sistema, per meglio favorire il processo di nucleazione delle bolle nel PCL e limitarne la crescita.
- I campioni espansi sono stati quindi raffreddati rapidamente fino alla temperatura ambiente al fine di completare il processo di stabilizzazione della struttura porosa ed estratti dalla camera di espansione.

I parametri di processo impiegati durante la fase di foaming sono riportati nella tabella 9.

Tabella 9 - Condizioni sperimentali impiegate durante il processo di espansione.

Prova	Concentrazione ponderale di NaCl	Concentrazione ponderale di HAP	Agente espandente [CO <sub>2</sub> -N <sub>2</sub> vol%]	T <sub>F</sub> [°C]
1			20-80	35
2	85, 90, 95	0	40-60	35
3			20-80	38
4	90	5	20-80	35
5			40-60	35
6			20-80	35
7	90	20	40-60	35
8			60-40	35
9			100-0	35

Come si può osservare dalla tabella relativa alle condizioni di prova, i test sono stati condotti selezionando due temperature di espansione e facendo variare la composizione dell'agente espandente in relazione alla tipologia di sistema impiegato. Ad esempio, i sistemi contenenti elevate percentuali di NaCl e/o HAP necessitano di temperature di espansione più alte e gas aventi proprietà plasticizzanti maggiori in quanto la viscosità del sistema e quindi, la resistenza della matrice polimerica alla nucleazione, crescita ed apertura delle bolle è maggiore.

### (3) Estrazione dell'agente templante

Una volta espansi, i materiali sono stati immersi in dH<sub>2</sub>O per la successiva fase di rimozione dell'agente templante. Rispetto ai sistemi contenenti NaCl micronizzato, l'elevata percentuale di sale impiegato e i ridotti rapporti di espansione della fase polimerica per effetto del gas foaming, contribuiscono a rendere sensibilmente più rapida la fase di estrazione dell'agente templante. In effetti, se per i sistemi precedenti è necessario mantenere i campioni nel solvente fino a una durata di 60 giorni ca, in tale caso il processo di leaching termina dopo un tempo massimo di 10 giorni. Anche in questo caso, i campioni sono stati sospesi all'interno del solvente messo in agitazione su piastra magnetica. Successivamente alla fase di leaching, i campioni sono stati essiccati sotto vuoto per estrarre rapidamente il solvente dallo scaffold.

### 3.2.1 CARATTERIZZAZIONE DELLE MATRICI PCL/nHAP E DEGLI SCAFFOLD OTTENUTI IMPIEGANDO NaCl 300-500 $\mu$ m

L'ottimizzazione delle proprietà microstrutturali degli scaffold preparati impiegando un agente templante di dimensioni dell'ordine di centinaia di micron è stata ottenuta facendo variare la percentuale di agente templante e i parametri di gas foaming. Avendo impiegato concentrazioni di agente templante superiori alla soglia di percolazione, non si è ritenuto necessario valutare le proprietà viscoelastiche dei sistemi compositi e l'estrazione dell'NaCl. Per tali sistemi si è preferito infatti focalizzarsi sugli aspetti morfologici e sulle proprietà strutturali, in particolare porosità e proprietà meccaniche.

#### (1) Stabilità termica e composizione ponderale dei sistemi PCL/nHAP

La presenza di un filler inorganico all'interno di una matrice polimerica contribuisce generalmente a migliorare la stabilità termica del sistema rispetto al polimero tal quale. Al fine di valutare l'effetto dell'nHAP sulla stabilità termica dei sistemi caricati e di stimare la percentuale di filler all'interno del PCL, sui campioni preparati è stata effettuata una analisi termogravimetrica (TGA). Tale analisi permette di valutare la variazione di peso dei materiali all'aumentare della temperatura. Per tale motivo, risulta possibile evidenziare la temperatura di inizio degradazione e di stimare la percentuale di materiale inorganico all'interno della matrice organica dalla misura del peso residuo. I materiali sono stati quindi analizzati alla TGA (TA INSTRUMENTS, codice HI RES TGA 2950) in atmosfera inerte e in un intervallo di temperature compreso fra 30 e 600°C, ad una velocità di scansione di 10°C/min.

#### (2) Porosità e proprietà microstrutturali degli scaffold

La valutazione della porosità degli scaffold è stata effettuata in maniera analitica attraverso misure di massa e di volume degli scaffold. Le misure di peso sono state effettuate impiegando la bilancia descritta in precedenza. Per la valutazione del volume dei campioni è stato invece necessario effettuare una misura di tipo geometrico. Infatti, l'elevata percentuale di porosità e la maggiore dimensione dei pori di superficie rispetto ai sistemi precedenti, non permette la valutazione del volume tramite la spinta di Archimede. Tuttavia, la bassa percentuale di polimero presente nei sistemi compositi garantisce una sostanziale costanza della dimensione e della forma degli espansi rispetto a quella che possedevano prima dell'espansione. Questo aspetto garantisce una sufficiente accuratezza della misura di volume mediante analisi dimensionali. Il volume degli scaffold è stato valutato a partire dalle misure del diametro e dell'altezza degli scaffold, valutati impiegando un calibro ad elevata precisione (10<sup>-2</sup>mm). La porosità totale dei campioni è stata quindi calcolata impiegando l'equazione (4). Nel caso dei campioni contenenti HAP, la valutazione della porosità è stata fatta correggendo il valore della densità del polimero secondo l'equazione (5):

$$5) \quad \rho_{PCL/nHAP} = \frac{\rho_{PCL} \rho_{nHAP}}{\rho_{PCL} \chi_{nHAP} + \rho_{nHAP} \chi_{PCL}}$$

avendo indicato con  $\rho_{PCL}$  e  $\rho_{nHAP}$  le densità del PCL e dell'nHAP rispettivamente, con  $\rho_{PCL/nHAP}$  la densità dei sistemi PCL/nHAP e con  $\chi_{PCL}$  e  $\chi_{nHAP}$  le frazioni ponderali dei due componenti impiegate nella preparazione dei sistemi PCL/nHAP.

La microstruttura degli scaffold è stata valutata mediante analisi al SEM delle superfici di taglio dei campioni. Tale analisi ha permesso di stimare anche il grado di interconnessione della porosità legata al processo di foaming.

I campioni preparati sono stati inoltre caratterizzati per valutarne la risposta meccanica ad una sollecitazione di compressione statica. Non essendo disponibile una normativa adatta alle caratteristiche dimensionali degli scaffold è stata presa come riferimento quella relativa ai sistemi cellulari rigidi (ASTM D1621). Tale norma impone sostanzialmente due tipologie di vincoli in merito alle caratteristiche geometriche dei campioni ed in particolare, per campioni a geometria cilindrica, un diametro medio ( $d$ ) pari a 50mm ca ed una altezza ( $h$ ) non superiore a  $d/2$ . In virtù della difficoltà connessa alla preparazione di scaffold di dimensioni così elevate, si è preferito selezionare un valore di  $d$  inferiore, mantenendo però il rapporto  $d/h$  nelle specifiche previste da tale normativa. Campioni cilindrici di 15 mm di diametro e una altezza di 4 mm ca. sono stati testati mediante una apparecchiatura dinamometrica (Instrom, codice 4204) equipaggiata con una cella di carico di 1KN ed impostando una velocità di spostamento della traversa mobile pari a 1 mm/min. L'apparecchiatura infatti impone una velocità di compressione controllata e misura la forza che lo scaffold oppone a tale sollecitazione. Dalla curva  $\sigma$ - $\varepsilon$  risultante è stato determinato il modulo elastico ( $E$ ), individuato dalla pendenza della curva nel primissimo tratto iniziale di deformazione elastica. Tale valore risulta infatti indicativo della resistenza meccanica dello scaffold alla deformazione statica e permette di valutarne i possibili campi di applicazione. Al fine di ottenere una correlazione più significativa tra la porosità e le proprietà meccaniche, le misure sono state effettuate direttamente sui campioni su cui è stata valutata in precedenza la porosità.

### 3.2 GAS FOAMING/CONTINUOUS TEMPLATING

Parallelamente allo studio dei processi di preparazione degli scaffold mediante l'impiego di sistemi templanti microparticellari, in tale lavoro di tesi è stata implementata una tecnica alternativa per lo scaffold design. Tale tecnica si basa sulla combinazione del gas foaming con agenti templanti continui. Come descritto nel capitolo introduttivo, la preparazione di scaffold a partire da miscele eterogenee offre il grande vantaggio di poter impiegare ridotte concentrazioni di agente templante e realizzare, quindi, scaffold caratterizzati da elevate proprietà meccaniche, idonei quindi alla rigenerazione di tessuti duri. Attraverso tale tecnica la porosità è indotta in seguito all'estrazione selettiva di una fase polimerica da una miscela di due polimeri immiscibili co-continua ed è quindi legata alla percentuale volumetrica del polimero templante. Generalmente, il range di composizioni volumetriche che garantisce la co-continuità nella miscela è a cavallo del punto di inversione tra le fasi (50/50). [48, 49] Tuttavia, tale intervallo è legato ad un gran numero di parametri di processo, e può quindi essere modificato in fase di progettazione del sistema. In particolare, l'interazione tra le fasi e le condizioni di preparazione sono i parametri fondamentali nel determinare l'occorrenza di una miscela co-continua. [94-96] Risulta chiaro quindi che le elevate proprietà meccaniche sono sostanzialmente legate, oltre che alla forma allungata dei pori, alla ridotta porosità totale. In aggiunta a questo grande vantaggio, l'impiego di un elemento porogeno di natura polimerica permette di controllare finemente caratteristiche microstrutturali quali dimensione ed orientazione dei pori, in quanto le caratteristiche morfologiche dell'elemento porogeno non sono definite a priori ma possono essere controllate durante tutto il processo. La fase di miscelazione, la solubilizzazione/espansione ed eventuali trattamenti di deformazione sono tutti parametri di design che devono essere presi in considerazione.

Al fine di migliorare il controllo delle proprietà microstrutturali degli scaffold e superare le limitazioni intrinseche connesse all'impiego di agenti templanti microparticellari, in questo lavoro di tesi è stata quindi implementata la tecnica del gas foaming/continuous templating. L'approccio è quindi di creare uno scaffold capace di promuovere la rigenerazione tissutale senza necessariamente portare ad una drastica riduzione delle proprietà meccaniche. La microstruttura dello scaffold sarà inoltre caratterizzata da una macroporosità capace di favorire l'adesione, la migrazione e la biosintesi cellulare, ottenuta mediante il controllo della proprietà della fase templante continua. Viceversa, attraverso il processo di foaming si vuole creare una microporosità addizionale per favorire la diffusione ed il trasporto dei fluidi attraverso l'intero scaffold.

Lo schema di processo impiegato per la preparazione degli scaffold mediante la tecnica del gas foaming/continuous templating è illustrato in figura 8.

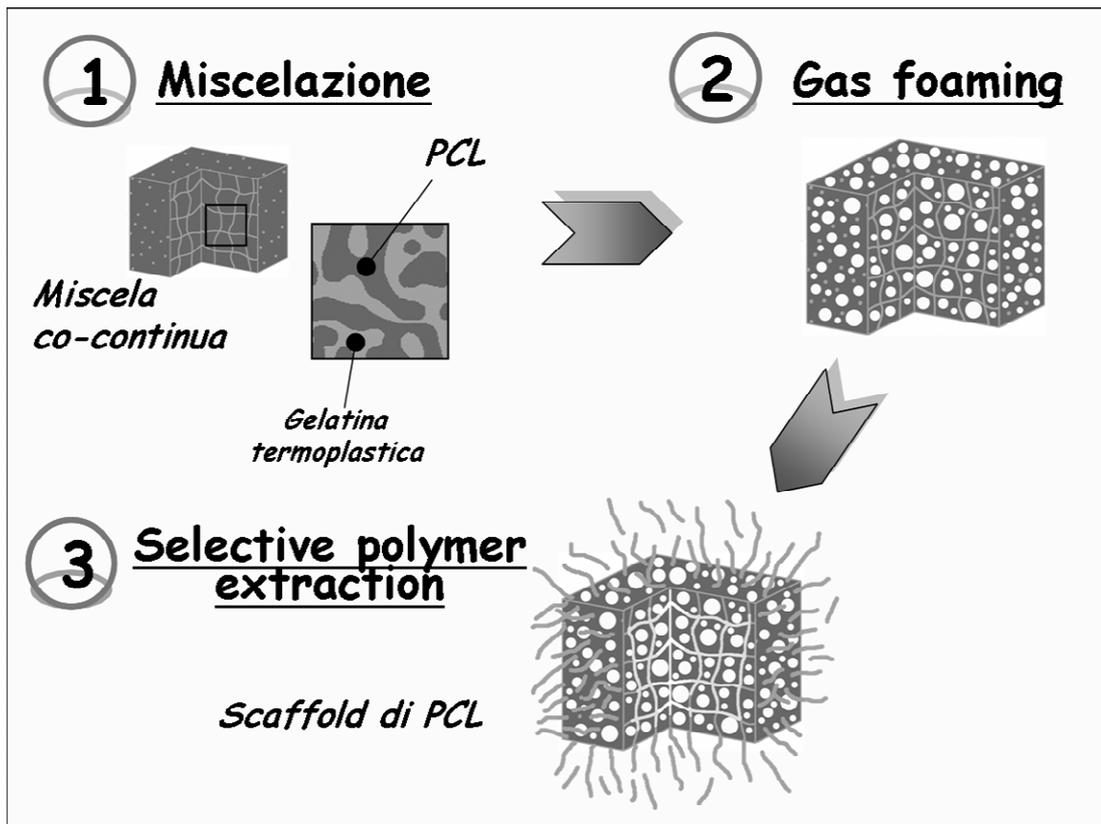


Figura 8 - Schema della tecnica di processo del gas foaming-continuous templating.

Anche per tale tecnologia di fabbricazione degli scaffold è possibile individuare tre fasi fondamentali:

- (1) Il PCL viene fuso e successivamente miscelato con il polimero templante, la gelatina termoplastica (TG) in concentrazioni e condizioni di miscelazione opportune, al fine di ottenere una miscela eterogenea co-continua. Una volta estratti dal miscelatore si effettua una pressatura delle miscele alla stessa temperatura di miscelazione, in maniera tale da ottenere lastre di spessore uniforme.
- (2) Campioni cilindrici vengono prelevati dalle lastre ed inseriti nel sistema di solubilizzazione/espansione. La miscela viene quindi solubilizzata con l'agente espandente ad una temperatura superiore a quella di fusione del PCL e ad una opportuna pressione, per un tempo sufficiente ad ottenere la completa solubilizzazione del gas nel polimero. Successivamente si procede ad un rapido raffreddamento del materiale che precede il processo di espansione indotto alla caduta di pressione. Tale processo porta alla formazione di bolle di gas nella fase polimerica. La selezione dei parametri di processo permette di espandere in maniera opportuna le due differenti fasi polimeriche.

- (3) La miscela espansa viene immersa nel solvente (H<sub>2</sub>O per la TG) al fine di estrarre il template ed indurre la formazione di una porosità addizionale all'interno dello scaffold. I materiali vengono quindi essiccati sotto vuoto.

Ognuna delle tre fasi di processo rappresenta uno stadio chiave nella definizione delle proprietà finali dello scaffold. Il processo di miscelazione ed in particolare, parametri quali il rapporto di miscelazione dei polimeri così come la temperatura, la velocità di rotazione dei rotori e il tempo di miscelazione influiscono sulla microstruttura della miscela. [94-96] Inoltre, le temperature in gioco nel processo di solubilizzazione/espansione e l'effetto della presenza del gas all'interno delle due fasi polimeriche, inducono profondi cambiamenti nella morfologia della miscela co-continua. Tale morfologia subisce poi ulteriori modificazioni in seguito all'espansione del gas ed alle deformazioni indotte dalla crescita delle bolle. Infine, l'estrazione selettiva del template porta alla formazione di una porosità che si va ad aggiungere a quella indotta dal gas e la microstruttura finale deve tener conto anche del possibile effetto del solvente sul PCL.

### 3.2.1 PREPARAZIONE DI SCAFFOLD DI PCL A PARTIRE DA MISCELE CO-CONTINUE PCL/TG

Affrontiamo ora gli aspetti connessi alla preparazione degli scaffold di PCL mediante la tecnica del gas foaming/continuous templating a partire da miscele PCL/TG.

La TG impiegata è stata ottenuta mediante un processo di termoplasticizzazione della gelatina animale, con l'impiego di un opportuno plasticizzante, il glicerolo. Tale processo è stato ottimizzato in un precedente lavoro di tesi. La proteina è stata inizialmente miscelata a mano con il plasticizzante, in rapporto ponderale 75/25, rispettivamente e la miscela è stata successivamente riprocessata a caldo per ottenere il polimero termoplastico. La miscelazione è stata effettuata a 60°C, 60rpm per 6 minuti. Il materiale ottenuto è stato quindi pellettizzato a mano prima di essere processato nuovamente. Il materiale ottenuto è stato caratterizzato per determinarne le proprietà chimico-fisiche fondamentali alla preparazione degli scaffold.

#### (1) Preparazione delle miscele PCL/TG e PCL/HAP/TG

La TG preparata è stata miscelata con il PCL a 65°C, 80rpm per 6 minuti. In considerazione della densità della TG, pari a 1.81g/cm<sup>3</sup> (ottenuto da misure di peso e da valutazioni geometriche di volume), i rapporti di miscelazione selezionati sono quelli riportati nella tabella 10.

Tabella 10 – Composizioni ponderali impiegate per la preparazione delle miscele PCL/TG.

PCL	60	55	50	40
TG	40	45	50	60

Le miscele sono state quindi pressate ad 80°C per 3 minuti, per ottenere lastre di spessore pari a 2 o 3mm, in relazione alla tipologia di caratterizzazione (per le analisi termiche e per la schiumatura, rispettivamente).

Per la preparazione degli scaffold di PCL contenenti HAP, sia di tipo nanometrico che micrometrico, il PCL è stato miscelato prima con il filler inorganico, in concentrazione ponderale 95/5 rispettivamente, a 65°C, 100rpm per 10 minuti. Successivamente, i compositi PCL/nHAP e PCH/mHAP sono stati miscelati con la TG fissando il rapporto di miscelazione compositi/TG a 60/40.

#### (2) Espansione delle miscele PCL/TG e PCL/HAP/TG

Le miscele sono state quindi espansive mediante la tecnica del gas foaming. Dischi cilindrici (d=10mm e h=3mm) sono stati inseriti nel reattore per il successivo processo di gas foaming. L'agente espandente è stato solubilizzato a 70°C per 4ore, dopodichè la temperatura è stata portata alla  $T_F$  per la fase di espansione del gas. In considerazione delle

differenti proprietà dei due materiali costituenti le miscele, le temperature sono state selezionate sia al di sopra che al di sotto della temperatura di saturazione. La pressione è stata ridotta alla pressione ambiente con un opportuno PDR e il sistema è stato raffreddato rapidamente per stabilizzarne la struttura cellulare. Le condizioni sperimentali impiegate durante il processo di foaming sono riportate nella tabella 11.

Tabella 11 - Condizioni sperimentali impiegate per la schiumatura delle miscele PCL/TG.

Prova	Composizione [PCL/TG]	Agente espandente [CO <sub>2</sub> -N <sub>2</sub> vol%]	$P_{\text{sat}}$ [bar]	$T_{\text{F}}$ [°C]	PDR [bar/s]
1	60/40	20-80	180	38	700
2	60/40; 55/45; 50/50; 40/60			40	
3	60/40			42	
4	60/40			44	
5	60/40			45	
6	60/40			50	
7	60/40			70	
8	60/40			100	
9	60/40			110	
10	60/40	50-50	150	44	500
11		70-30	120		400
12		100-0	90		250
13	60/40	20-80	700	44	500
14					70

Come si osserva dalla tabella delle condizioni sperimentali di prova, l'ottimizzazione della morfologia degli espansi è stata effettuata facendo variare la composizione della miscela PCL/TG, la tipologia di agente espandente, la  $T_{\text{F}}$  ed il PDR.

### (3) Estrazione dell'agente templante

Una volta espansi, i materiali sono stati immersi in dH<sub>2</sub>O alla temperatura di 39°C per la successiva fase di rimozione della TG. In merito al processo di estrazione della TG è importante considerare che la temperatura di estrazione è stata selezionata in relazione ai risultati di estrazione ottenuti sulle miscele non espanse. Tale temperatura garantisce infatti una rapida dissoluzione della TG dalla miscela senza indurre modifiche sostanziali nel PCL sia dal punto di vista chimico

(degradazione) che fisico (rammollimento e fusione). In tali condizioni, il processo di dissoluzione è stato terminato in 96 ore ca. Successivamente alla fase di estrazione della TG, i campioni sono stati essiccati sotto vuoto per estrarre rapidamente l'H<sub>2</sub>O dallo scaffold.

### 3.2.2 CARATTERIZZAZIONE DELLA TG E DEGLI SCAFFOLD DI PCL OTTENUTI MEDIANTE LA TECNICA DEL GAS FOAMING/CONTINUOUS TEMPLATING

Le proprietà finali degli scaffold preparati mediante la tecnica del gas foaming/continuous templating risultano fortemente dipendenti da un gran numero di fattori. In effetti, la combinazione di differenti materiali e tecnologie finalizzata alla possibilità di ingegnerizzare matrici porose altamente strutturate, ha come principale svantaggio l'elevata complessità del processo. L'interazione fra differenti tipologie di sistemi (PCL, TG, HAP), la mutua interdipendenza delle tecnologie di processo, rappresentano aspetti da tenere in considerazione nel design di scaffold a porosità controllata mediante la tecnica sviluppata in questo lavoro. Le proprietà chimico-fisiche e di schiumatura dei differenti sistemi materiali impiegati, il processo di miscelazione e di solubilizzazione/schiumatura delle miscele, nonché l'estrazione della TG, contribuiscono infatti a definire la morfologia finale degli scaffold. Per tali motivi, questo studio è stato indirizzato inizialmente alla valutazione delle proprietà chimico-fisiche e di schiumatura della TG. Successivamente ci si è indirizzati verso l'ottimizzazione della morfologia delle miscele espanse, in termini di modulazione della frazione volumetrica di TG e della dimensione dei pori nella fase PCL. Infatti, dopo l'eliminazione della TG, la frazione di templante caratterizza la macroporosità dello scaffold mentre la porosità del PCL indotta dal gas foaming produce l'ulteriore microporosità.

Una volta selezionate la composizione della miscela più opportuna e le condizioni di espansione per ottenere il giusto controllo della macroporosità/microporosità, dai campioni espansi ritenuti maggiormente indicati alla preparazione degli scaffold, è stato estratto l'agente templante e sono state valutate le proprietà morfologico/strutturali e di biocompatibilità.

#### (1) Caratterizzazione della TG

La caratterizzazione delle proprietà della TG è finalizzata a valutarne le proprietà fondamentali per la realizzazione degli scaffold di PCL. In particolare, lo studio si è focalizzato sulla determinazione delle seguenti proprietà:

- *Proprietà termiche*
- *Proprietà di assorbimento in dH<sub>2</sub>O*
- *Proprietà di schiumatura*
- *Proprietà di miscibilità con il PCL*

#### ➤ *Proprietà termiche*

Le proprietà termiche della TG preparata sono state valutate mediante analisi TGA e calorimetria differenziale a scansione (DSC), al fine di determinare l'effetto del processo di termoplastificazione sulla proteina

ed individuare una possibile finestra di schiumatura. L'analisi TGA è stata condotta sul polimero tal quale dopo essiccazione sotto vuoto ed a temperatura ambiente per 48 ore. Il polimero termoplastico è stato invece analizzato immediatamente dopo la preparazione. L'analisi è stata condotta nell'intervallo di temperatura 30-800°C con una velocità di scansione di 10°C/min ed in atmosfera inerte. I parametri di prova per l'analisi DSC sono stati selezionati opportunamente in considerazione dell'H<sub>2</sub>O assorbita dal campione a causa dell'elevata idrofilia del polimero. Prima della prova, sul materiale è stata effettuata una scansione isoterma a 100°C per 3 minuti e, successivamente si è proceduto all'analisi nell'intervallo di temperature -90 a 200°C, ad una velocità di 10°C/min ed in atmosfera inerte.

➤ *Proprietà di assorbimento in dH<sub>2</sub>O*

Per le misure di assorbimento/dissoluzione in H<sub>2</sub>O, dischi di TG (d=10mm e h=2mm) sono stati immersi nel solvente a due differenti temperature: 30 e 37°C. Tali temperature sono state selezionate in considerazione della solubilità del polimero puro in acqua. La solubilità della gelatina pura aumenta infatti notevolmente per temperature superiori a 35°C e quindi risulta interessante valutare il comportamento del polimero termoplastico a temperature al di sopra ed al di sotto di tale valore. I campioni immersi sono stati quindi pesati ad intervalli opportuni, previa asciugatura dell'acqua superficiale, ed è stato valutato il rapporto di swelling (S<sub>w</sub>) definito come il rapporto fra la massa al tempo t (m<sub>t</sub>) e la massa iniziale (m<sub>i</sub>).

➤ *Proprietà di schiumatura*

Le proprietà di schiumatura della TG sono state valutate mediante prove di espansione su campioni cilindrici (d=10mm e h=2mm) e selezionando le condizioni di espansione come riportato nella tabella 12.

Tabella 12 - Condizioni sperimentali impiegate per la schiumatura della TG.

Prova	Agente espandente N <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> [vol %]	P <sub>sat</sub> [bar]	T <sub>F</sub> [°C]	PDR [bar/s]
1	0-100	60	50	250
2	0-100	60	60	250
3	0-100	60	70	250
4	50-50	150	100	250
5	80-20	180	44	700
6	80-20	180	70	700
7	80-20	180	80	700
8	80-20	180	87	700
9	80-20	180	100	700
10	80-20	180	120	700
11	80-20	180	140	700
12	80-20	180	100	250

La morfologia dei campioni espansi è stata determinata al SEM. Dalle micrografie è stato inoltre valutato il diametro medio dei pori ( $D_c$ ), mediante analisi delle immagini, secondo la procedura illustrata in precedenza per i sistemi con NaCl micronizzato.

➤ *Proprietà di miscibilità con il PCL*

La miscibilità di PCL e TG è stata valutata mediante analisi DMA e SEM sulle miscele tal quali e attraverso misure gravimetriche e morfologiche sui campioni ottenuti in seguito all'estrazione selettiva della TG. Per l'analisi DMA, campioni rettangolari (20x10x2mm) sono stati testati in single cantilever bending con una deformazione del 2%, a 2°C/min ed in un intervallo di temperatura compreso fra -130 e 60°C. Questa analisi permette la valutazione delle transizioni termiche che il materiale subisce e che si manifestano come variazione delle proprietà viscoelastiche. Le eventuali modifiche delle transizioni viscoelastiche caratteristiche dei polimeri puri sono infatti indicative di una miscibilità fra le due fasi. Per le analisi al SEM è stato impiegato il protocollo precedentemente illustrato. L'estrazione della TG è stata inoltre valutata gravimetricamente come differenza fra il peso dei campioni prima e dopo la dissoluzione e confrontando tale valore con la composizione nominale delle miscele.

(2) Caratterizzazione delle miscele espanse

Le miscele PCL/TG espanse sono state caratterizzate mediante analisi della microstruttura al SEM. Inoltre, l'analisi delle immagini è stata impiegata per valutare la dimensione media dei pori nelle due fasi e la frazione volumetrica di TG espansa. In particolare, per la determinazione della frazione volumetrica della fase TG si è proceduto evidenziando la fase espansa di TG rispetto a quella del PCL (infatti come vedremo, le due fasi espanse sono molto differenti) e valutandone la frazione relativa, rispetto al volume totale di espanso, tramite il software Image J®.

(3) Caratterizzazione degli scaffold

Le miscele espanse selezionate per la preparazione degli scaffold sono state quindi caratterizzate per individuarne le proprietà morfologico/strutturali e di biocompatibilità.

➤ *Estrazione dell'agente templante*

La dissoluzione dell'agente templante dalla miscele espanse è stata valutata gravimetricamente attraverso il confronto fra il peso dei campioni prima e dopo l'estrazione della TG. Bisogna infatti considerare che la continuità della TG all'interno della matrice espansa può essere significativamente alterata durante tutto il processo di solubilizzazione/schiumatura. Per tale motivo, è necessario verificare la completa estrazione del templante in relazione alla tipologia di condizioni di espansione impiegate. L'analisi gravimetrica è stata inoltre

impiegata per determinare la percentuale di HAP presente all'interno dello scaffold. Infatti, la miscelazione dell'HAP nel PCL non garantisce che, durante la preparazione delle miscele con la TG, l'HAP possa diffondere nella fase templante e poi fuoriuscire dallo scaffold durante l'estrazione del porogeno. Tale fenomeno, come vedremo, risulta fortemente dipendente dalle dimensioni del filler inorganico impiegato.

➤ *Porosità e proprietà microstrutturali*

La porosità degli scaffold è stata valutata analogamente a quanto fatto in precedenza per i sistemi PCL/NaCl 300-500 $\mu$ m. I campioni sono stati quindi pesati per valutarne la massa mentre il volume è stato determinato in maniera geometrica. La porosità è stata quindi calcolata impiegando l'equazione (4).

La microstruttura degli scaffold è stata valutata al SEM. Mediante tale analisi è stato possibile effettuare una stima dell'interconnessione dei pori, sia per la porosità indotta dall'estrazione del templante, sia per quella ottenuta mediante gas foaming. La valutazione della frazione volumetrica di macroporosità è stata effettuata a partire dai valori delle analisi delle immagini sulle miscele espanse. La macroporosità, infatti, coincide con la percentuale superficiale di TG espansa. La frazione di microporosità è stata invece determinata per differenza tra la porosità totale analitica e la percentuale di macroporosità. La dimensione dei micropori coincide infine con la porosità indotta nel PCL dal gas foaming.

Gli scaffold sono stati caratterizzati meccanicamente mediante prove di compressione statica. Anche per tali sistemi, come descritto per quelli ottenuti con l'NaCl, le dimensioni sono state selezionate in maniera tale da avere un rapporto d/h inferiore a 0.5. Campioni cilindrici di 10mm di diametro e una altezza di 3-4mm ca. sono stati testati nelle stesse condizioni di prova impiegate per i sistemi con l'NaCl. Da tali analisi è stato quindi valutato E.

➤ *Biocompatibilità*

Le proprietà di biocompatibilità dei sistemi sono state valutate attraverso prove di coltura cellulare *in vitro*. Per tali prove sono stati selezionati gli scaffold preparati a  $T_F=44^\circ\text{C}$ , in quanto ritenuti i più interessanti fra le varie tipologie di scaffold realizzati. Le cellule selezionate per questa caratterizzazione sono cellule staminali mesenchimali (MSC). Le cellule staminali sono cellule indifferenziate che possono rigenerare qualsiasi tipo di tessuto biologico. Le cellule sono state seminate sulla superficie degli scaffold, preventivamente sagomati in cilindri di 10mm di diametro e 4mm di altezza e sterilizzati mediante raggi gamma. 400.000 cellule per ogni campione sono state fatte aderire su una delle sue superfici principali e sono state cresciute in  $\alpha$ -MEM (Bio Wittaker), contenente 10% siero fetale bovino (FBS), antibiotici (100U/ml di penicillina e 100 $\mu$ g/ml di streptomina), glutammina 2 $\mu$ M. Il terreno è stato cambiato ogni 48h. Le colture cellulari sono state

incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub> (incubatore Forma Scientific, Inc) per un tempo complessivo di 28 giorni.

La capacità degli scaffold di PCL preparati di promuovere i processi di adesione, proliferazione e migrazione cellulare è stata valutata mediante saggi colorimetrici (**Alamar Blue**) ed analisi al microscopio confocale ed al SEM.

Il test dell'Alamar Blue si basa sull'impiego, nel terreno di coltura, di un indicatore redox che cambia di colore in risposta alla proliferazione cellulare. Se le cellule sotto indagine sono in fase di attiva proliferazione, come risultato della loro attività metabolica si ha una riduzione chimica dell'Alamar Blue che hanno assorbito. Viceversa, se la crescita è inibita l'ambiente è ossidativo e la riduzione dell'Alamar Blue non avviene. La specie chimica attiva dell'Alamar Blue è la *resazurina* (composto di colore blu). La riduzione chimica dovuta alla proliferazione cellulare porta la resazurina a passare dalla forma ossidata di colore blu alla forma ridotta di colore rosa, che prende il nome di *resofurina*. Oltre al fatto di permettere una valutazione quantitativa della proliferazione cellulare, il principale vantaggio del test dell'Alamar Blue risiede nella possibilità di poter essere effettuato più volte sulle stesse cellule a tempi diversi così da monitorare la proliferazione nel tempo. Le analisi sono state condotte a tempi differenti (1, 7, 14, 21 e 28 giorni).

Per la colorazione dei microfilamenti di actina, le cellule sono state fissate per 20 minuti in paraformaldeide tamponata al 4%, lavate con PBS 1X e permeabilizzate con Triton X-100 (Sigma) 0,1%. I siti aspecifici sono stati saturati con una soluzione di albumina sierica bovina (BSA) (Sigma) allo 0,5%. I campioni sono stati quindi incubati con **falloidina** rodaminata (Sigma) diluita 1:50 in PBS-BSA allo 0,5% per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione, la falloidina in eccesso è stata eliminata mediante tre lavaggi in PBS. Le cellule sono state successivamente incubate con una soluzione di **dapi** (Sigma) diluito 1:10000 in PBS per 15 minuti a 37°C. Infine, tutti i campioni sono stati lavati prima con PBS e poi con dH<sub>2</sub>O. I campioni colorati con falloidina e dapi sono stati osservati, a scadenze di 1, 7, 14, 21 e 28 giorni, per mezzo di un microscopio confocale (Zeiss, LSM 510), fornito di un laser ad argo, ad una lunghezza d'onda di 488nm e un obiettivo 4 e 20X. Nel microscopio confocale, la luce di un laser viene fatta convergere dalle lenti dell'obiettivo in un punto estremamente piccolo del campione osservato. Il punto stesso, attraverso un sistema di specchi oscillanti, viene spostato attraverso tutto il campo visivo dell'obiettivo così da effettuare una scansione completa di tutto il piano focale. Il laser eccita i soli fluorocromi appartenenti al piano focale, corrispondenti al punto di massima concentrazione del raggio. In questo modo solo il segnale luminoso relativo al piano focale contribuisce alla formazione dell'immagine finale. Le sezioni non appartenenti a tale piano non vengono eccitate e il risultato complessivo è una riduzione degli aloni e del rumore di fondo. Inoltre, spostando il campione lungo l'asse verticale dopo ogni scansione è possibile effettuare scansioni su differenti piani focali.

Per le analisi al **SEM**, i campioni sono stati lavati con PBS e fissati in 2,5% glutaraldeide per 2h a temperatura ambiente. Successivamente si è proceduto al lavaggio con PBS ed alla successiva disidratazione mediante immersione in soluzioni H<sub>2</sub>O-etanolo, a concentrazione crescente di etanolo (50, 70, 80, 90 e 100%). Una volta fatto evaporare l'etanolo assoluto in stufa, i campioni sono stati metallizzati con la procedura standard ed esaminati al SEM.



# Capitolo 4

## **Risultati**

#### **4.1 SCAFFOLD DI PCL A POROSITÀ CONTROLLATA OTTENUTI A PARTIRE DA SISTEMI COMPOSITI PCL/NaCl CON SALE MICRONIZZATO**

Il gas foaming è una tecnica che permette di ottenere scaffold biodegradabili a porosità controllata attraverso la modulazione dei parametri di processo. L'aggiunta dell'NaCl all'interno della matrice polimerica introduce una ulteriore variabile nello scaffold design, permettendo di ottenere un controllo ancora più accurato delle proprietà microstrutturali degli scaffold. Tuttavia, la presenza dell'NaCl induce importanti modificazioni sul processo di espansione del gas rendendo necessario l'approfondimento delle relazioni che legano l'effetto della composizione dei compositi PCL/NaCl sulle proprietà viscoelastiche e sulla dissoluzione dell'agente templante.

##### **4.1.1 PROPRIETÀ VISCOELASTICHE DEI MATERIALI COMPOSITI**

Le proprietà viscoelastiche di sistemi caricati risultano fortemente dipendenti dalle caratteristiche del sistema. In particolare, la distribuzione spaziale, la concentrazione, la dimensione e la forma della fase dispersa così come l'interazione fra le fasi sono gli aspetti microstrutturali determinanti nel definire il comportamento viscoelastico di un sistema composito. [97] Per poter valutare le caratteristiche viscoelastiche dei sistemi preparati, senza indurre significative alterazioni delle caratteristiche chimico-fisiche e, in relazione alla elevata percentuale di carica con cui tali sistemi sono stati preparati, le caratterizzazioni sono state effettuate mediante prove in regime dinamico.

Il primo passo nell'effettuare tale tipologia di analisi è rappresentato dalla misura dell'intervallo di ampiezze di deformazione in cui si può assumere lineare il comportamento del sistema analizzato. Considerando che all'aumentare della percentuale di carica ci si aspetta uno spostamento dell'intervallo di linearità verso ampiezze di deformazione inferiori, i sistemi che maggiormente possono presentare un comportamento viscoelastico dipendente dall'ampiezza di deformazione risultano essere quelli ad elevata % di carica. In figura 9 sono riportati gli andamenti di  $G'$  e  $G''$  con l'ampiezza di deformazione ottenuti mediante una prova di *strain sweep* effettuata sul campione al 70% di NaCl. Si può notare come l'elevata % di carica all'interno del campione ne condizioni fortemente il comportamento viscoelastico riducendo l'intervallo di linearità a tal punto che, solo per ampiezze di deformazione inferiori o uguali a  $10^{-2}$  è possibile notare la presenza di un comportamento viscoelastico sostanzialmente costante con l'ampiezza di deformazione. Alla luce di questo risultato e considerando che l'intervallo di linearità si estende verso ampiezze crescenti al diminuire della concentrazione di NaCl, i campioni caricati sono stati testati ad ampiezze di deformazione pari e  $10^{-2}$ . Per il PCL tal quale si è preferito invece impiegare una ampiezza di deformazione maggiore ( $10^0$ )

così da aumentare la sensibilità di misura e consentire l'acquisizione di  $G'$  e  $G''$  anche a basse frequenze.

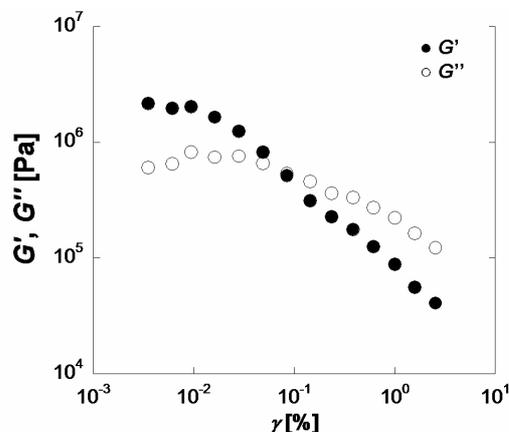


Figura 9 – Andamento di  $G'$  e  $G''$  in funzione dell'ampiezza di deformazione  $\gamma$ , valutati a 1 rad/s per il composito PCL/NaCl 30/70.

La scelta del campione da analizzare per tale tipologia di analisi è ricaduta sul composito al 70% di NaCl in quanto, la ridotta percentuale di polimero presente nel sistema PCL/NaCl 20/80 porta ad uno scorrimento relativo fra il campione e i piatti del reometro, impedendone la caratterizzazione reologica.

Una volta definite le ampiezze di deformazione idonee all'analisi reologica, sono state valutate le proprietà viscoelastiche dei sistemi al variare della frequenza  $\omega$ . In figura 10 sono riportati gli andamenti di  $G'$  e  $G''$  al variare della frequenza per i differenti compositi preparati.

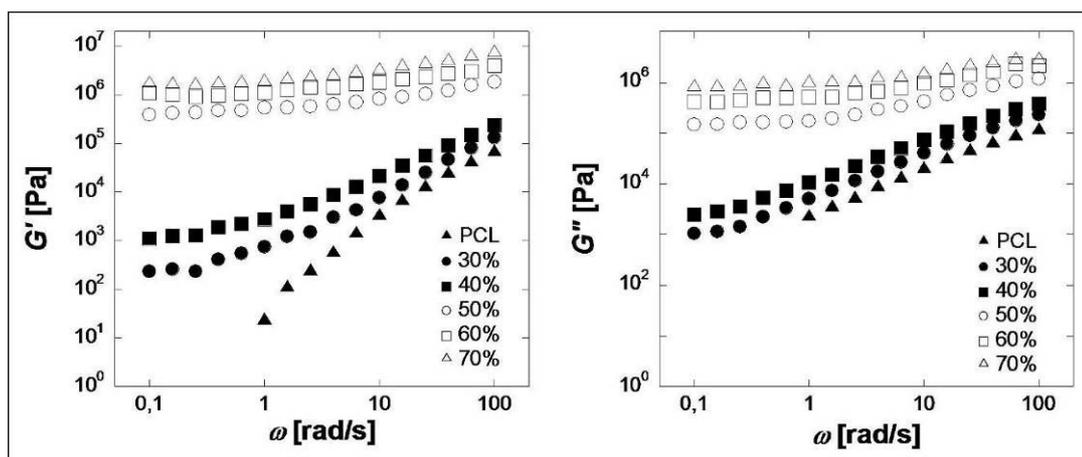


Figura 10 – Effetto della composizione sulle proprietà viscoelastiche dei sistemi compositi PCL/NaCl micronizzato.

Dall'analisi dei risultati delle prove reologiche emergono immediatamente alcuni aspetti importanti in merito alle proprietà viscoelastiche dei sistemi compositi PCL/NaCl:

1. Il PCL puro presenta il tipico andamento dei polimeri termoplastici. In particolare, si osserva che  $G'$  è inferiore a  $G''$  in tutto l'intervallo di  $\omega$  analizzato e che, alle basse frequenze, i due moduli tendono ad avere il tipico comportamento dei fusi polimerici, con  $G'$  proporzionale a  $\omega^2$  e  $G''$  proporzionale a  $\omega$ .
2. Come si osserva comunemente nella maggior parte dei sistemi polimerici contenenti un filler inorganico, [97] la presenza dell'NaCl nella matrice polimerica produce un significativo incremento di entrambi i moduli in tutto l'intervallo di frequenze e tale incremento aumenta all'aumentare della concentrazione di NaCl. Tuttavia, è possibile notare un significativo cambiamento delle proprietà viscoelastiche nel passaggio dai sistemi a bassa percentuale di porogeno (30 e 40%) a quelli ad alta percentuale di porogeno (superiore o uguale al 50%). Infatti, nei primi,  $G'$  rimane inferiore a  $G''$  in tutto l'intervallo di frequenze e si osserva la presenza di un plateau alle basse frequenze dovuto alle restrizioni di flusso prodotte sulle macromolecole polimeriche dalle microparticelle. [89-91] Questo vincolo allo scorrimento si manifesta con uno *sforzo di soglia* a basse  $\omega$ , ovvero di uno sforzo al di sotto del quale il materiale si comporta come un solido e non fluisce. Quando la concentrazione ponderale di NaCl raggiunge e supera il 50%, entrambi i moduli subiscono un repentino incremento verso l'alto ed si osserva un significativo cambiamento delle proprietà viscoelastiche del sistema rispetto ai sistemi a bassa concentrazione di templante. Infatti, i valori di  $G'$  risultano maggiori di quelli di  $G''$  in tutto l'intervallo di frequenze e la dipendenza dei moduli da  $\omega$  risulta molto meno marcata ed evidenziabile solo alle alte frequenze. I sistemi ad elevate concentrazioni di carica tendono ad assumere infatti il tipico comportamento dei solidi elastici. Questo fenomeno è tipico dei sistemi percolanti in cui, la diretta interazione delle particelle porta alla formazione di un network tridimensionale che rende preponderante la componente di risposta elastica del sistema rispetto a quella viscosa. [92, 93]

Le proprietà viscoelastiche dei sistemi compositi suggeriscono che la percolazione delle particelle avvenga per una concentrazione di NaCl compresa fra il 40 ed il 50%. Questa conclusione risulta ulteriormente rafforzata se si analizzano gli andamenti di  $G'$  e  $G''$  con la concentrazione di NaCl, alle basse ed alte frequenze, riportati in figura 11. Come precedentemente descritto, indipendentemente dalla frequenza di analisi, alle basse concentrazioni di NaCl prevale la componente viscosa e  $G''$  è maggiore di  $G'$ . Viceversa, alle concentrazioni in cui si ha la percolazione delle microparticelle, si può osservare una inversione tra i due moduli, in quanto il sistema composito si comporta prevalentemente da solido elastico. Questa transizione nel comportamento viscoelastico è, come atteso,

maggiormente evidente alle basse frequenze dove il contributo della componente viscosa del sistema è più rilevante.

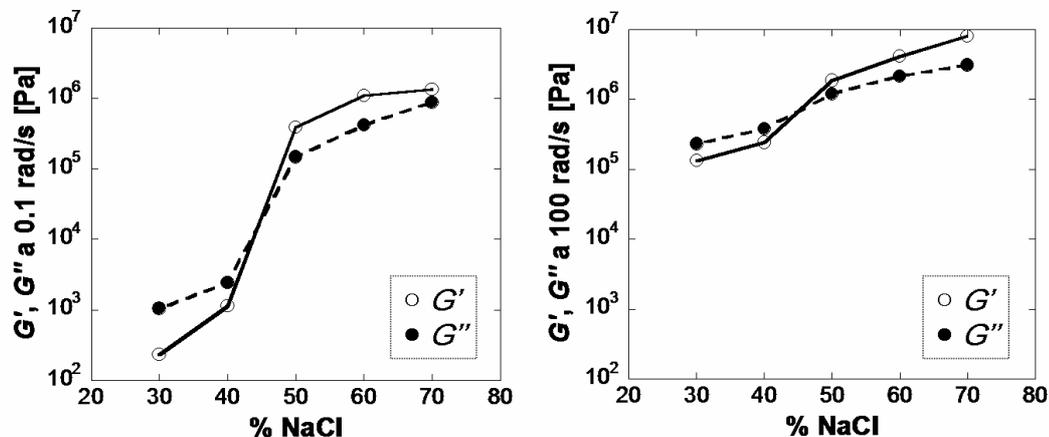


Figura 11 – Effetto della composizione sui moduli  $G'$  e  $G''$  a basse ed alte frequenze.

#### 4.1.2 ESTRAZIONE DELL'NaCl DAI COMPOSITI PRIMA E DOPO LA FASE DI ESPANSIONE

In figura 12 sono riportati gli andamenti relativi alla dissoluzione dell'NaCl dai materiali compositi al variare del tempo di immersione in  $H_2O$ . Si può osservare che all'aumentare della concentrazione di NaCl aumentano i punti di contatto fra le microparticelle e di conseguenza la diffusione del solvente nella matrice. Per tale motivo, il processo di dissoluzione del templante è più rapido. Questo aspetto risulta evidente se si osserva che dopo meno di 10 ore, il campione con l'80% di NaCl ha un peso residuo pari al 25% del peso iniziale del composito e prossimo a quello relativo al solo PCL.

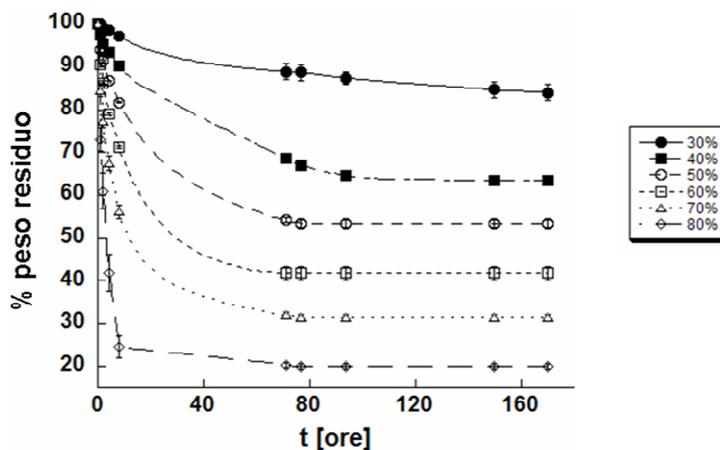


Figura 12 – Effetto della composizione dei compositi sul processo di estrazione dell'agente templante microparticellare.

La dissoluzione dell'NaCl dai compositi coinvolge un serie di meccanismi legati alla penetrazione del solvente all'interno della matrice polimerica, cui segue la dissoluzione dell'NaCl e la successiva diffusione attraverso i pori lasciati dal sale. [98] Tanto minore è la concentrazione di particelle tanto più questi processi risultano ostacolati ed è quindi necessario attendere un tempo maggiore per il raggiungimento del peso di equilibrio. Inoltre, alle basse concentrazioni, la non completa percolazione del templante non garantisce la sua totale estrazione, neanche a tempi lunghissimi, come osservato in figura 12. Questo effetto è ulteriormente evidente dall'analisi dei risultati riportati nella figura 13, in cui è evidenziato l'effetto della composizione della miscela sulla percentuale di NaCl disciolto dai compositi tal quali ed espansi (a) e la morfologia della sezione del composito al 30% di NaCl (b).

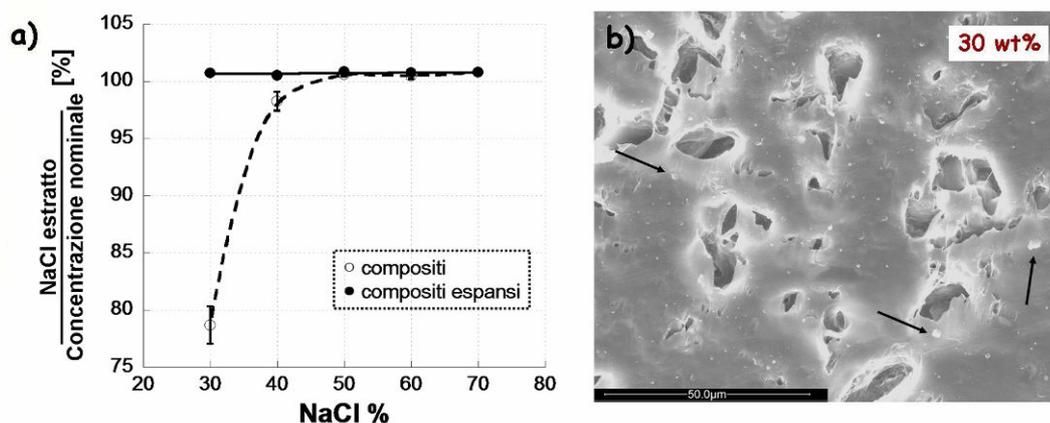


Figura 13 – (a) Percentuale di NaCl estratto dai compositi prima e dopo il processo di espansione; (b) morfologia della sezione del composito al 30% di NaCl dopo l'estrazione.

Osservando i risultati delle prove di estrazione dell'NaCl dalle matrici composite, riportati in figura 13a, si può notare come la corrispondenza fra la percentuale nominale di porogeno presente nella miscela e quella estratta risultino fortemente dipendenti dalla composizione. Infatti, a basse concentrazioni, 30 e 40%, si osserva uno scarto significativo tra la concentrazione nominale e la percentuale di perdita di peso. Tale discrepanza risulta inoltre tanto più evidente quanto minore è la % di NaCl. In particolare, i compositi contenenti il 30% di NaCl mostrano un residuo percentuale di estrazione di NaCl, rispetto alla composizione nominale di miscelazione, superiore al 20%. Tale differenza si riduce a poco meno del 2% per il composito contenente il 40% di microparticelle. Questo aspetto è sostanzialmente legato al grado di percolazione della fase dispersa all'interno del polimero. In effetti, nel processo di dissoluzione dell'NaCl da parte dell'H<sub>2</sub>O, è necessario che le particelle siano distribuite in maniera tale da formare un network continuo che permetta al solvente di penetrare in tutta la matrice e portare in soluzione tutta la fase inorganica. [98] All'aumentare della

concentrazione di NaCl aumenta la possibilità che le particelle siano in contatto fra loro e, per concentrazioni a partire dal 50% si osserva la percolazione dell'NaCl.

La morfologia del campione al 30% di templante dopo la fase di leaching, riportata in figura 13b, conferma quanto evidenziato dalle misure di estrazione. All'interno del campione è infatti possibile osservare la presenza di una elevata percentuale di NaCl rimasta all'interno della matrice di PCL (evidenziata dalle frecce) perché completamente circondata dalla matrice polimerica. I compositi con percentuali di NaCl maggiore o uguale al 50% in peso mostrano invece una perdita di peso corrispondente alla percentuale nominale di filler della miscela, a dimostrazione che la percolazione delle particelle nei sistemi preparati avviene ad una concentrazione ponderale compresa fra il 40 ed il 50%.

Per quanto riguarda i sistemi compositi espansi, i risultati delle misure di estrazione mostrano il raggiungimento della completa dissoluzione dell'NaCl, indipendentemente dalla composizione del composito e dalle condizioni di espansione impiegate (tabella 7). La discussione di questi risultati è illustrata di seguito.

#### 4.1.3 ESPANSIONE DEI SISTEMI COMPOSITI

La presenza di un filler inorganico all'interno di una matrice polimerica contribuisce notevolmente ad influenzarne il processo di espansione mediante gas foaming. La dimensione e la concentrazione delle particelle rappresentano due parametri chiave nel definire la morfologia finale degli espansi. I risultati ottenuti dalle misure di dissoluzione dell'agente templante dai compositi espansi possono essere compresi se si prende in considerazione l'effetto del filler sui meccanismi di apertura delle pareti dei pori durante il foaming. Studi recenti hanno infatti posto l'attenzione sulla possibilità di ottenere un elevato grado di interconnessione dei pori disperdendo all'interno della matrice una fase di dimensioni di alcuni micron con proprietà meccaniche differenti. [99, 100] Il meccanismo di apertura delle pareti dei pori è illustrato nella figura 14. In particolare, se la fase dispersa è più soffice della matrice, figura 14a, l'apertura delle pareti dei pori è favorita dall'aumento del rapporto di espansione e dalla riduzione della resistenza delle pareti dei pori durante la nucleazione e crescita delle bolle di gas. Come illustrato in figura 14b, una fase dispersa più rigida favorisce l'apertura delle pareti dei pori per effetto della rottura preferenziale delle stesse all'interfaccia fra le due fasi (debonding). La presenza di una fase dispersa più rigida della matrice, ha l'ulteriore vantaggio di irrigidire la matrice e limitare la coalescenza della porosità che generalmente segue la rottura delle pareti dei pori.

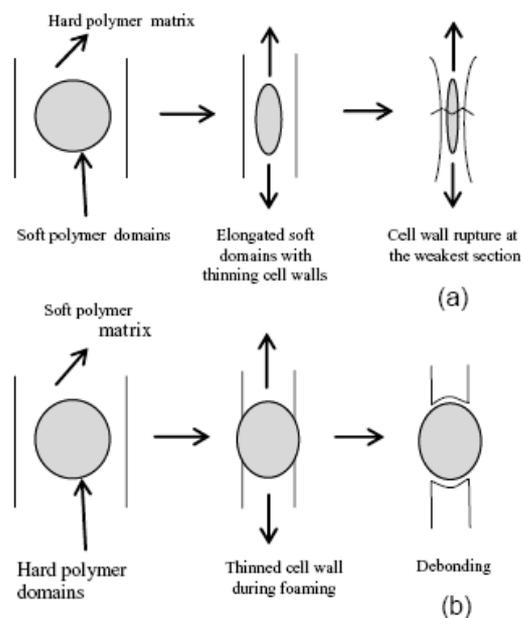


Figura 14 – Possibili meccanismi di apertura delle pareti dei pori in sistemi multifasici: (a) fase dispersa soffice; (b) fase dispersa rigida. [99]

I sistemi impiegati in questo lavoro appartengono alla seconda categoria di materiali multifasici di figura 14. Inoltre, in tali sistemi l'interconnessione della porosità è ulteriormente favorita dalla successiva estrazione della fase.

Il meccanismo di apertura delle celle veicolato dal fenomeno di debonding tra le due fasi può far quindi comprendere i risultati delle misure di estrazione dell'agente templante dai compositi espansi. In effetti, la presenza di una porosità interconnessa anche prima del processo di leaching promuoverebbe la diffusione del solvente nella matrice e la dissoluzione del templante, indipendentemente dalla sua percolazione diretta. Ad ulteriore conferma di ciò, in figura 15 è mostrata la micrografia al SEM di un espanso prima della fase di leaching.

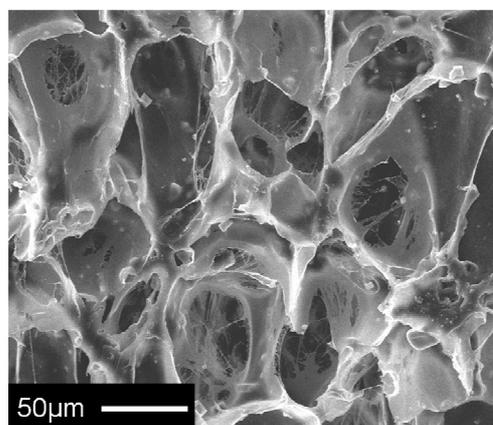


Figura 15 – Morfologia degli espansi prima della fase di leaching: 30% di NaCl (prova #3).

Dall'analisi della morfologia degli espansi prima della fase di leaching emerge chiaramente la presenza di una struttura interconnessa anche prima dell'estrazione dell'NaCl. Inoltre, osservando la distribuzione delle particelle di templante si evince che:

- Le microparticelle sono distribuite nelle zone di interconnessione dei pori e si evidenzia chiaramente il fenomeno di debonding all'interfaccia tra le due fasi.
- Le microparticelle sono uniformemente distribuite all'interno del polimero, con la conseguenza di incrementare la rigidità della matrice ed impedirne il collasso.
- L'esposizione delle microparticelle sulle pareti interne dei pori ne permette la dissoluzione in seguito alla penetrazione del solvente e contribuisce alla formazione di una interconnessione addizionale dopo il leaching.

Tutti questi aspetti risultano molto importanti nel processo di formazione dello scaffold. In effetti, è importante sottolineare che, per applicazioni biomediche, la dissoluzione dell'NaCl dalla matrice polimerica rappresenta un aspetto importante in quanto tale materiale non è biocompatibile e può modificare le condizioni biologiche in cui si vengono a trovare le cellule, pur se presente in limitate percentuali. Le misure di estrazione effettuate hanno evidenziato la completa estrazione dell'NaCl dagli scaffold preparati, mostrando quindi che tale problematica risulta sostanzialmente risolta. Tuttavia, il grado di precisione delle misure gravimetriche non permette di escludere la presenza di una, pur piccola, percentuale residua di templante all'interno degli scaffold, per cui ulteriori e più approfondite valutazioni della percentuale residua di porogeno necessitano di essere effettuate prima dell'impiego di tali sistemi in ambito biomedico.

#### 4.1.4 REALIZZAZIONE DI SCAFFOLD DI PCL A POROSITÀ CONTROLLATA

Lo studio dei processi di espansione dei sistemi PCL/NaCl micronizzato è stato finalizzato alla realizzazione di scaffold a porosità controllata. In particolare, lo studio è stato indirizzato all'individuazione dell'effetto dei principali parametri di processo, concentrazione di agente templante,  $T_F$  e PDR, sulle proprietà microstrutturali degli scaffold.

##### ➤ *Effetto della composizione*

Nelle figure 16 e 17 sono riportati rispettivamente gli effetti della percentuale di agente templante sulla morfologia e sugli andamenti della porosità ( $\Phi$ ) e del diametro medio dei pori ( $D_C$ ) degli scaffold di PCL.

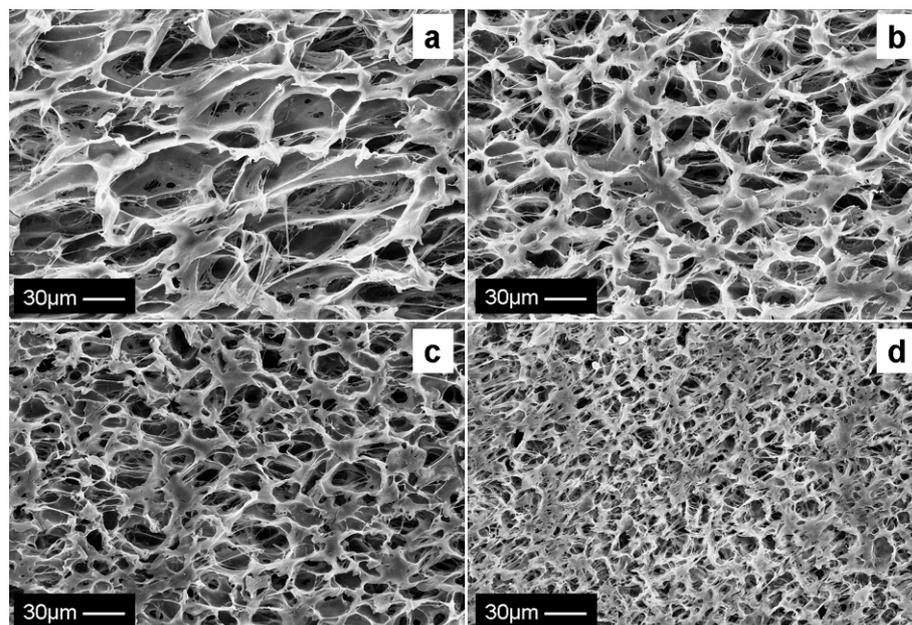


Figura 16 – Micrografie al SEM di scaffold di PCL ottenuti nelle condizioni di espansione della prova #4 (tabella 7) al variare del rapporto ponderale PCL/NaCl: (a) 70/30; (b) 60/40; (c) 50/50 e (d) 30/70.

Come si può osservare, per tutte le composizioni selezionate è stato possibile ottenere scaffold caratterizzati da una porosità altamente interconnessa. Tuttavia, le proprietà degli scaffold variano sensibilmente al variare della concentrazione ponderale di agente templante nei materiali compositi. Infatti, alle basse percentuali di microparticelle (figura 16a) si nota la presenza di pori con la tipica morfologia poliedrica che si genera per effetto dell'impacchettamento delle bolle di gas. All'aumentare della percentuale di NaCl (figure 16b e c), gli scaffold sono caratterizzati da pori di dimensioni inferiori finché, alle percentuali più elevate (70%, figura 16d), non è più possibile distinguere fra la porosità dovuta al processo di espansione del gas e quella creata in seguito all'estrazione dell'agente templante microparticellare.

L'effetto della percentuale di agente templante sulle proprietà microstrutturali degli scaffold è maggiormente evidente dall'analisi dei valori di  $\Phi$  e  $D_c$  riportati in figura 17. Come si può osservare,  $D_c$  assume il valore massimo, pari a  $70\mu\text{m}$ , al 30% in peso di NaCl e diminuisce in maniera monotona all'aumentare della concentrazione di agente templante, fino a raggiungere il valore di  $10\mu\text{m}$ , prossimo alla dimensione media dei cristalli di sale, quando la concentrazione di NaCl raggiunge l'80% in peso. L'effetto della percentuale di agente templante sulla porosità degli scaffold presenta invece alcune differenze sostanziali rispetto a quanto osservato sulla dimensione media dei pori. Infatti, si può osservare un iniziale diminuzione di  $\Phi$ , che passa da un valore di 87% ad uno di 80%, all'aumentare della concentrazione ponderale di NaCl dal 30 al 60%. Questo effetto è attribuibile a due

fenomeni concomitanti. In primo luogo, l'aumento della percentuale di agente templante si associa ad un corrispondente incremento della rigidità della matrice composita, come illustrato precedentemente nelle figure 10 e 11, che limita il processo di espansione del gas. La maggior quantità di filler nella matrice produce un incremento dell'effetto di nucleazione eterogenea all'interfaccia fra le due fasi, e quindi la quantità di gas a disposizione della crescita delle bolle diminuisce.

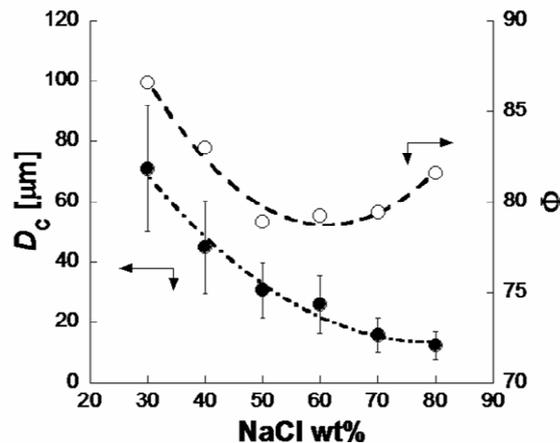


Figura 17 – Effetto della percentuale di agente templante su  $\Phi$  e  $D_c$  degli scaffold di PCL.

L'ulteriore aumento della percentuale di NaCl, fino ad un valore ponderale pari all'80%, produce un'inversione di tendenza su  $\Phi$ , per cui la porosità aumenta fino ad un valore di 82%. Questo fenomeno è sostanzialmente legato alla combinazione delle due differenti tecnologie di processo. Infatti, alle basse composizioni, le proprietà viscoelastiche permettono elevati rapporti di espansione della matrice per cui il processo di foaming risulta predominante nel determinare la porosità degli scaffold. All'aumentare della percentuale di templante aumenta la porosità prodotta per il reverse templating mentre diminuisce la porosità prodotta dal processo di foaming a causa dell'aumento di rigidità della matrice. Di conseguenza, alle elevate composizioni è il reverse templating che controlla la porosità dello scaffold. Queste considerazioni risultano in accordo anche con i valori di dimensione media dei pori degli scaffold, che diminuiscono all'aumentare della concentrazione di templante, fino ad approssimare la dimensione media dei cristalli di NaCl (come riportato in figura 4).

#### ➤ Effetto della $T_F$

Un altro dei parametri di processo che permette di controllare le proprietà morfologico/strutturali degli scaffold è la temperatura di espansione. [79] Per la valutazione dell'effetto di tale parametro di processo sulle proprietà degli scaffold è stata fissata la concentrazione di agente templante e mantenuti costanti gli altri parametri di foaming.

In particolare, in virtù dei risultati precedenti dai quali è emerso che elevate % di NaCl riducono l'effetto del gas foaming sul controllo della microstruttura degli scaffold, è stato selezionato il composito PCL/NaCl 30-70. In figura 18 è riportata la morfologia degli scaffold ottenuti impiegando una bassa (30°C) ed una alta (40°C)  $T_F$  (prove #2 e #5 di tabella 7).

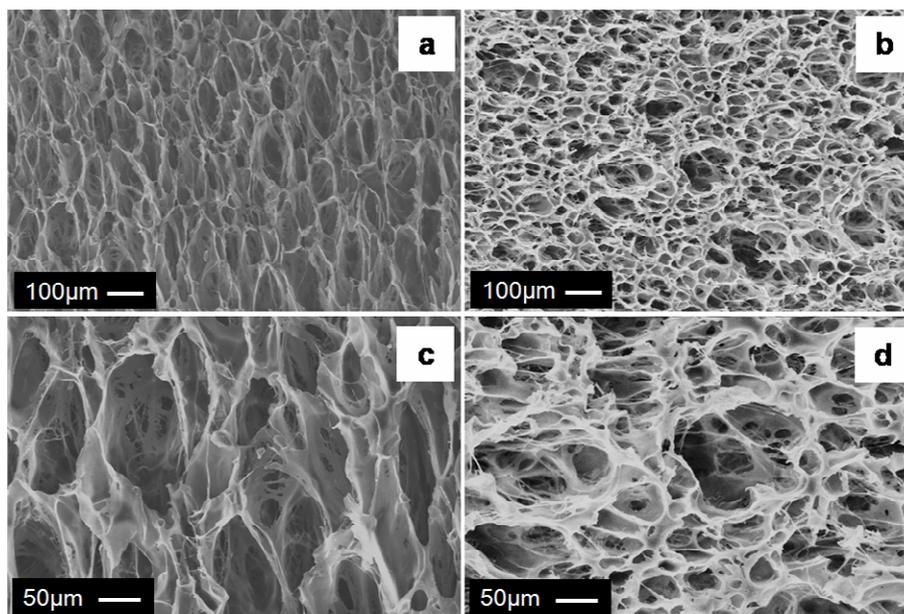


Figura 18 – Micrografie al SEM di scaffold di PCL preparati nelle condizioni di prova #2 e #5 di tabella 7: (a,c)  $T_F = 30^\circ\text{C}$ ; (b,d)  $T_F = 40^\circ\text{C}$ .

Anche in questo caso è possibile osservare la presenza di una porosità altamente aperta ed interconnessa. Tuttavia, mentre alle basse temperature (figure 18a e c), la porosità è sostanzialmente omogenea, l'aumento di  $T_F$  a 40°C produce la formazione di una struttura disomogenea e caratterizzata da pori di dimensione inferiore (figure 18b e d). Questo effetto è sostanzialmente legato al processo di espansione/stabilizzazione della matrice. Infatti, alle basse temperature, la struttura porosa che si crea per l'espansione del gas presenta una rigidità sufficiente alla sua stabilizzazione e, non si osservano significativi fenomeni di collasso dei pori. Quando invece la  $T_F$  raggiunge i 40°C, i processi di cristallizzazione delle macromolecole polimeriche sono più lenti e la viscosità del sistema è troppo bassa per permettere la stabilizzazione della struttura porosa. Di conseguenza, la morfologia appare parzialmente collassata e molto più disomogenea. [67] Questo effetto è particolarmente evidente dall'analisi delle micrografie al SEM ad alto ingrandimento riportate nelle figure 18c e d, in cui si può chiaramente osservare la disomogeneità microstrutturale ed il significativo incremento delle pareti dei pori, indice del parziale collasso della struttura, connesso all'aumento di temperatura da 30 a 40°C.

In figura 19 sono riportati gli andamenti di  $\Phi$  e  $D_c$  al variare della  $T_F$ .

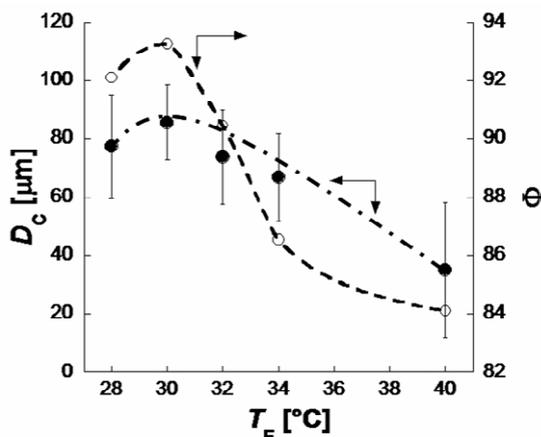


Figura 19 – Effetto della  $T_F$  su  $\Phi$  e  $D_C$  degli scaffold di PCL (prove #2-#5, tabella 7).

Come si può osservare,  $\Phi$  aumenta da 92 a 93% quando  $T_F$  passa da 28 a 30°C, in quanto l'incremento di temperatura favorisce il processo di espansione della matrice senza tuttavia produrre il collasso della struttura. Come osservato anche dall'analisi morfologica al SEM, l'aumento di  $T_F$  fino a 40°C rende la struttura porosa incapace di stabilizzarsi durante la fase di foaming e  $\Phi$  si riduce fino ad un valore di 84% a causa dell'insorgere del collasso della porosità. La riduzione di  $\Phi$  è inoltre accompagnata dalla riduzione di  $D_C$  che passa da 90 $\mu\text{m}$  a  $T_F=30^\circ\text{C}$  fino a 40 $\mu\text{m}$  quando  $T_F$  raggiunge i 40°C. La maggiore disomogeneità microstrutturale si manifesta anche in un incremento della deviazione standard relativa alla misura di  $D_C$ .

Alla luce di questi risultati, la preparazione degli scaffold richiede la selezione di una  $T_F$  nell'intervallo compreso fra 28 e 34°C.

#### ➤ Effetto del PDR

L'ulteriore parametro di gas foaming impiegato per modulare le proprietà microstrutturali degli scaffold di PCL è il PDR. Tale parametro svolge infatti un ruolo fondamentale nel controllare i processi di nucleazione e crescita delle bolle di gas [77] e rappresenta quindi un parametro molto importante nello scaffold design.

In figura 20 è riportato l'effetto prodotto da un basso (figure 20a e c) ed un alto PDR (figure 20b e d) sulla morfologia degli scaffold ottenuti a partire da un composito contenente il 30 ed il 60 % di agente templante.

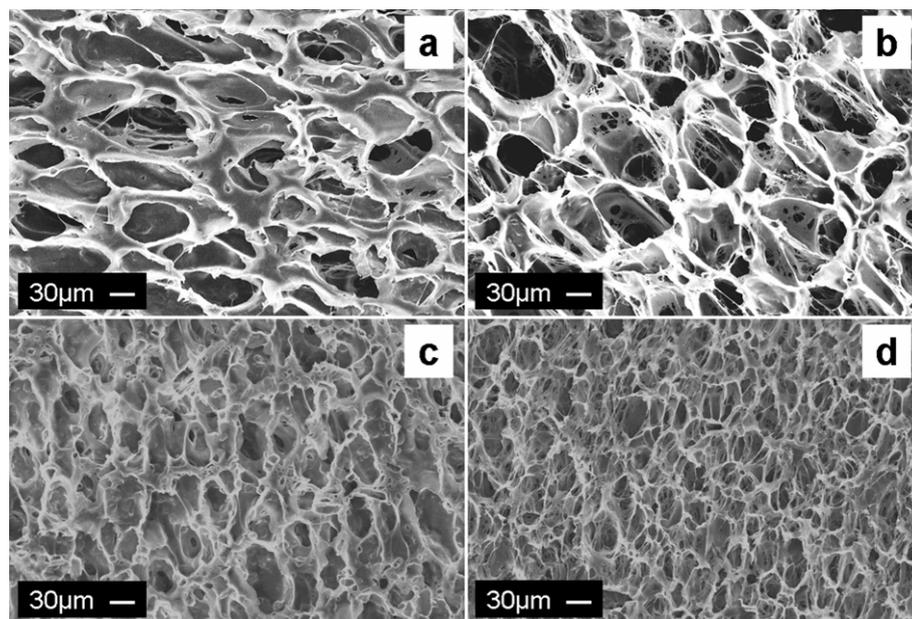


Figura 20 – Effetto del PDR sulla morfologia degli espansi: 30% NaCl e 40bar/s (a) o 200bar/s (b) (prove #3 e #6, rispettivamente); 60% NaCl e 40bar/s (c) o 200bar/s (d) (prove #3 e #6, rispettivamente).

Come si può evidenziare, l'effetto del PDR sulla morfologia degli scaffold è molto rilevante, anche se dipende dalla percentuale di agente templante impiegato. Le micrografie al SEM degli scaffold ottenuti impiegando una bassa percentuale di agente templante (figure 20a e b) mostrano che la riduzione di PDR è accompagnata da una forte riduzione dell'interconnessione dei pori, pur essendoci un leggero incremento della loro dimensione. Numerosi studi hanno infatti evidenziato che la riduzione della velocità di caduta di pressione si manifesta attraverso una riduzione della nucleazione delle bolle di gas a favore di una maggiore fase di crescita. [77] Di conseguenza, gli scaffold sono caratterizzati da una porosità totale inferiore a causa dell'incremento di spessore delle pareti dei pori e da una riduzione del grado di interconnessione, al diminuire del PDR. All'aumentare della concentrazione ponderale di templante fino al 60%, figure 20c e d, questo effetto è meno evidente a causa del minor grado di foaming della matrice (analogamente a quanto visto in figura 17) e per via del maggior effetto nucleante delle particelle di NaCl.

In figura 21 sono riportati gli andamenti di  $\Phi$  e  $D_c$  al variare del PDR, per le due differenti composizioni dei compositi.

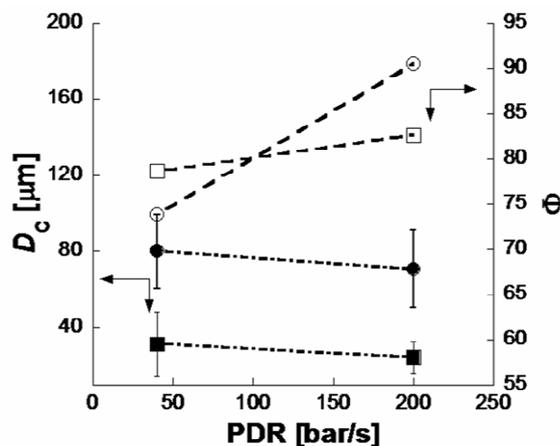


Figura 21 – Effetto del PDR su  $\Phi$  e  $D_c$  degli scaffold ottenuti alla  $T_F = 32^\circ\text{C}$ : 30% NaCl ( $\circ$ ,  $\bullet$ ); 60% NaCl ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ).

In entrambi i sistemi compositi considerati, la riduzione di PDR produce una significativa riduzione della porosità degli scaffold ed un moderato incremento del diametro medio dei pori. Inoltre, questo effetto diminuisce all'aumentare della percentuale di agente templante, in accordo a quanto detto in precedenza. Infatti, per il composito al 30% in peso di NaCl, si osserva una significativa riduzione di  $\Phi$  dal 91 al 74%, mentre per quello al 60% di NaCl, la riduzione di  $\Phi$  è significativamente inferiore (dall'84 all'80%). In considerazione della necessità di realizzare scaffold capaci di promuovere la penetrazione e la migrazione cellulare e garantire il necessario trasporto dei fluidi, elevate velocità di caduta di pressione sono fortemente raccomandate nel design degli scaffold mediante tale tecnica di processo.

#### ➤ *Effetto della concentrazione spaziale di NaCl*

Nell'ingegnerizzazione di scaffold per la rigenerazione dei tessuti, le proprietà microstrutturali rivestono un ruolo fondamentale. Come ampiamente descritto nel capitolo introduttivo di questo lavoro, la microstruttura dello scaffold deve essere ottimizzata in relazione allo specifico tessuto da rigenerare. In particolare, il controllo della porosità, della dimensione dei pori e del grado di interconnessione rappresenta un aspetto chiave dello scaffold design. Studi recenti hanno inoltre evidenziato che l'impiego di matrici porose caratterizzate da strutture anisotrope permette di ottimizzare il processo di rigenerazione tissutale. [29, 101] In particolare, dal punto di vista dell'approccio biomimetico, una struttura anisotropica simile a quella del tessuto nativo, come nel caso dell'osso e della cartilagine, permette di ricreare le condizioni ideali per la rigenerazione di tessuti funzionali. A questo aspetto si aggiunge anche le potenzialità che tali microstrutture offrono nello studio dei processi di interazione cellula-materiale, a partire dall'impiego di un singolo scaffold.

Alla luce di tali considerazioni e per via dell'elevata flessibilità della tecnica implementata in questo lavoro, una parte dell'attività si è

indirizzata verso la realizzazione di scaffold di PCL caratterizzati da proprietà microstrutturali anisotrope. Per fare ciò si è partiti dai risultati ottenuti durante lo studio dell'effetto dei singoli parametri di processo sulle proprietà morfologico/strutturali degli scaffold e sono state individuate le condizioni per la realizzazione di scaffold caratterizzati da gradienti spaziali di porosità e dimensione dei pori. Questo obiettivo è stato raggiunto creando dei sistemi compositi caratterizzati da gradienti spaziali di composizione di agente templante. L'espansione di tali sistemi porta infatti alla formazione di due strutture porose differenti, in relazione al gradiente spaziale di microparticelle, come riportato nella figura 22.

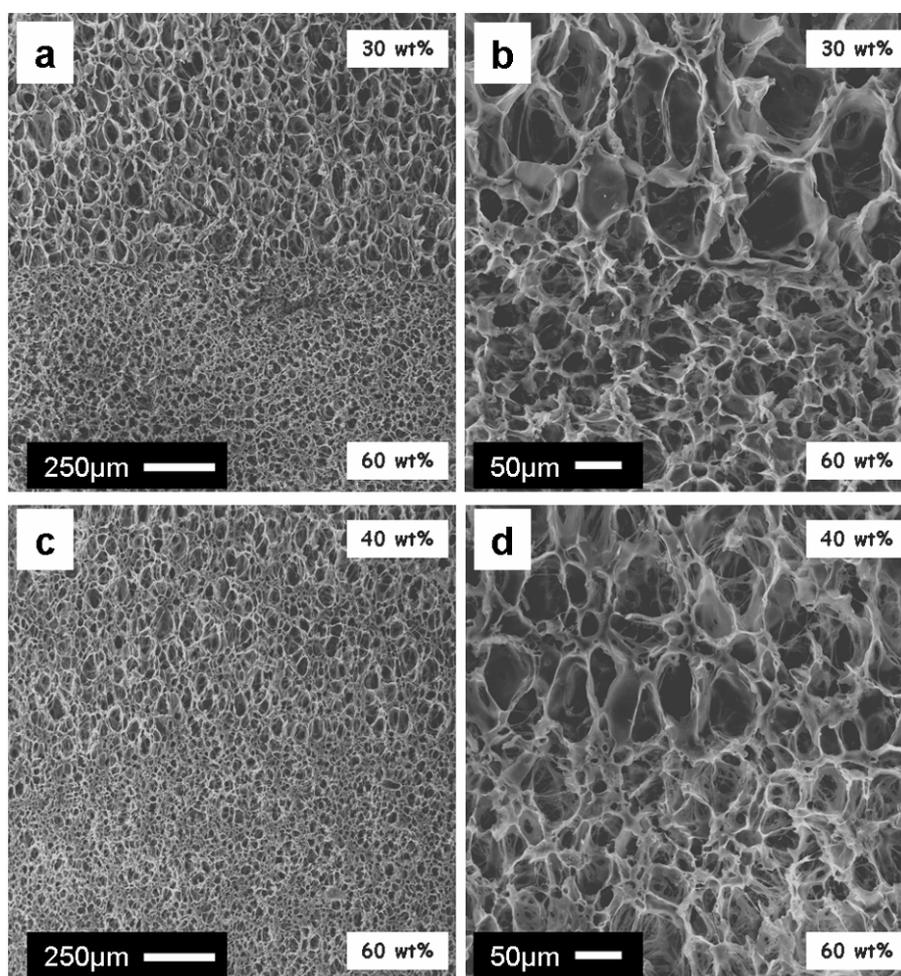


Figura 22 – Micrografie al SEM di scaffold di PCL ottenuti mediante gradienti spaziali di agente templante (prova #8, tabella 7): (a, b) 30/60; (c, d) 40/60.

Dall'analisi delle morfologie degli scaffold riportate in figura 22 si può notare la presenza di microstrutture fortemente anisotrope e caratterizzate da gradienti spaziali di porosità e dimensione media dei pori. In particolare, gli scaffold ottenuti impiegando un gradiente di composizione 30/60, figure 22a e b, mostrano la presenza di un

gradiente spaziale di porosità e dimensione dei pori più spinto rispetto a quello ottenuto impiegando un gradiente di composizione 40/60 (figure 22c e d). Come descritto in precedenza, l'aumento della concentrazione ponderale di templante nell'intervallo 30-60%, produce una riduzione concomitante di  $\Phi$  e  $D_c$  degli scaffold. Di conseguenza, l'impiego di gradienti spaziali di NaCl nel composito permette la realizzazione di gradienti spaziali di  $\Phi$  e  $D_c$ . Prendendo in considerazione i risultati precedenti è possibile determinare quindi le proprietà microstrutturali di tali scaffold. Nei sistemi ottenuti con gradienti di NaCl 30/60, figure 22a e b, i gradienti di  $\Phi$  e  $D_c$  sono rispettivamente pari a 91/83% e 71/24 $\mu$ m. Viceversa, nel caso dei sistemi 40/60, figure 22c e d, tali gradienti si riducono rispettivamente a 88/83% e 58/24 $\mu$ m.

I risultati ottenuti dalle differenti tipologie di prove effettuate, hanno quindi messo in evidenza la possibilità di controllare accuratamente le proprietà morfologico/strutturali degli scaffold di PCL, mediante l'opportuna modulazione dei parametri di processo. Inoltre, tale tecnica si è dimostrata un ottimo mezzo per la realizzazione di scaffold con proprietà microstrutturali altamente complesse e idonei quindi alla rigenerazione di tessuti con architetture multiformi.

## 4.2 SCAFFOLD DI PCL A POROSITÀ CONTROLLATA OTTENUTI A PARTIRE DA SISTEMI COMPOSITI PCL/NaCl CON SALE DI DIMENSIONI 300-500 $\mu$ m

Parallelamente allo sviluppo dei processi di espansione dei sistemi compositi con NaCl micronizzato, è stata studiata la realizzazione di scaffold di PCL impiegando come agente templante microparticellare cristalli di NaCl di dimensione compresa fra 300 e 500 $\mu$ m. L'obiettivo di tale studio è la preparazione di scaffold di PCL dotati di una distribuzione dimensionale della dimensione dei pori su due scale differenti. In particolare, alla macroporosità ottenuta in seguito all'estrazione del templante microparticellare si va ad aggiungere una microporosità prodotta in seguito alla fase di foaming e ottimizzata per migliorare l'interconnessione dei pori e le proprietà di trasporto degli scaffold.

In aggiunta, si è ritenuto importante valutare la possibilità di incorporare all'interno degli scaffold l'nHAP descritta nel capitolo 2, così da incrementarne le proprietà di biocompatibilità, soprattutto per le applicazioni di rigenerazione del tessuto osseo. Come osservato nei sistemi precedentemente studiati, la presenza di un materiale inorganico all'interno della fase polimerica produce importanti effetti anche per quanto concerne il processo di espansione del gas. Per tale motivo, nel design degli scaffold contenenti l'nHAP, bisognerà prendere in considerazione l'effetto combinato che le due differenti fasi inorganiche, l'nHAP e l'NaCl, inducono sul processo di foaming.

### 4.2.1 ANALISI TERMOGRAVIMETRICA DEI SISTEMI PCL TAL QUALE E PCL/nHAP

I sistemi PCL-nHAP preparati sono stati caratterizzati mediante analisi termo gravimetrica, al fine di individuare le proprietà termiche della matrice e la percentuale di carica dispersa al suo interno. I risultati di tale caratterizzazione sono riportati nella figura 23.

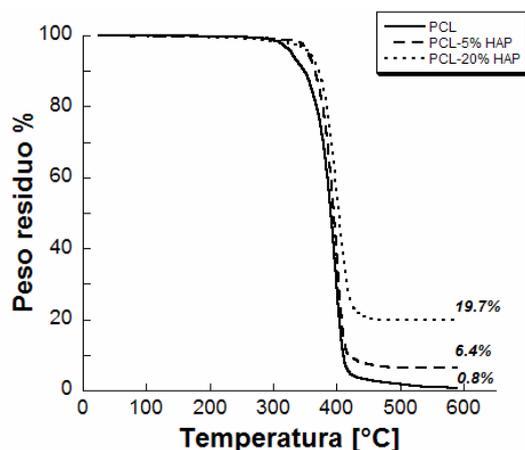


Figura 23 – Analisi termogravimetrica del PCL tal quale e dei sistemi PCL-nHAP.

L'analisi termogravimetrica effettuata sui sistemi compositi PCL/nHAP fornisce due importanti risultati:

- La concentrazione di nHAP all'interno della matrice polimerica, valutata attraverso il peso residuo percentuale a 600°C è in accordo con le composizioni ponderali nominali impiegate, a conferma del buon esito del protocollo di miscelazione impiegato. Infatti, i sistemi preparati impiegando una composizione ponderale di nHAP pari al 5 ed al 20%, presentano un peso residuo a 600°C pari al 6.4 ed al 19.7%, rispettivamente, mentre per il PCL tale valore si riduce a 0.8%.
- Come si osserva comunemente nei sistemi compositi organico/inorganico, [102] la presenza dell'nHAP all'interno della matrice polimerica ne migliora significativamente le proprietà di stabilità termica. La temperatura di inizio degradazione,  $T_{deg}$ , si sposta infatti verso valori più elevati rispetto a quello del polimero puro. In particolare, mentre per il PCL la  $T_{deg} = 353.7^{\circ}\text{C}$ , per i sistemi PCL/nHAP con il 5 ed il 20% in peso di filler, tale temperatura aumenta rispettivamente a 361.5 e 365.3°C.

#### 4.2.2 ESPANSIONE DEI SISTEMI COMPOSITI

I sistemi compositi preparati a partire dalle differenti composizioni PCL/nHAP/NaCl sono stati quindi espansi mediante la tecnica del gas foaming al fine di ottenere scaffold caratterizzati da proprietà microstrutturali opportunamente controllate. Per garantire la diretta interconnessione della macroporosità creata dall'estrazione del templante, necessaria alla penetrazione cellulare, è stato necessario l'impiego di concentrazioni di NaCl al di sopra della soglia di percolazione. I parametri di foaming sono stati quindi selezionati in maniera tale da promuovere la formazione di una microporosità addizionale all'interno delle pareti dei macropori. In particolare, come agente espandente è stata impiegata una miscela  $\text{CO}_2\text{-N}_2$  con differenti rapporti volumetrici e la  $T_F$  è stata ottimizzata in relazione alla percentuale di templante ed all'effetto plasticizzante del gas impiegato. Il PDR infine, è stato mantenuto il più alto possibile, per promuovere la nucleazione e l'interconnessione della microporosità.

Anche per questi sistemi si è voluto valutare l'effetto dei principali parametri di processo sulle proprietà morfologico/strutturali degli scaffold ed ottimizzare quindi le differenti combinazioni composizione/parametri di foaming, per ottenere scaffold con proprietà morfologiche, porosità e proprietà meccaniche controllate.

##### ➤ *Effetto della percentuale di agente templante*

Come proceduto per i sistemi PCL-NaCl micronizzato, anche per questi sistemi è stato inizialmente valutato l'effetto della percentuale di agente templante sulla morfologia degli scaffold, prima e dopo la fase di foaming. In Figura 24 è riportata la morfologia degli scaffold ottenuti al

variare della % di NaCl fra l'85 ed il 95%, prima e dopo il processo di foaming (prova #3, tabella 9).

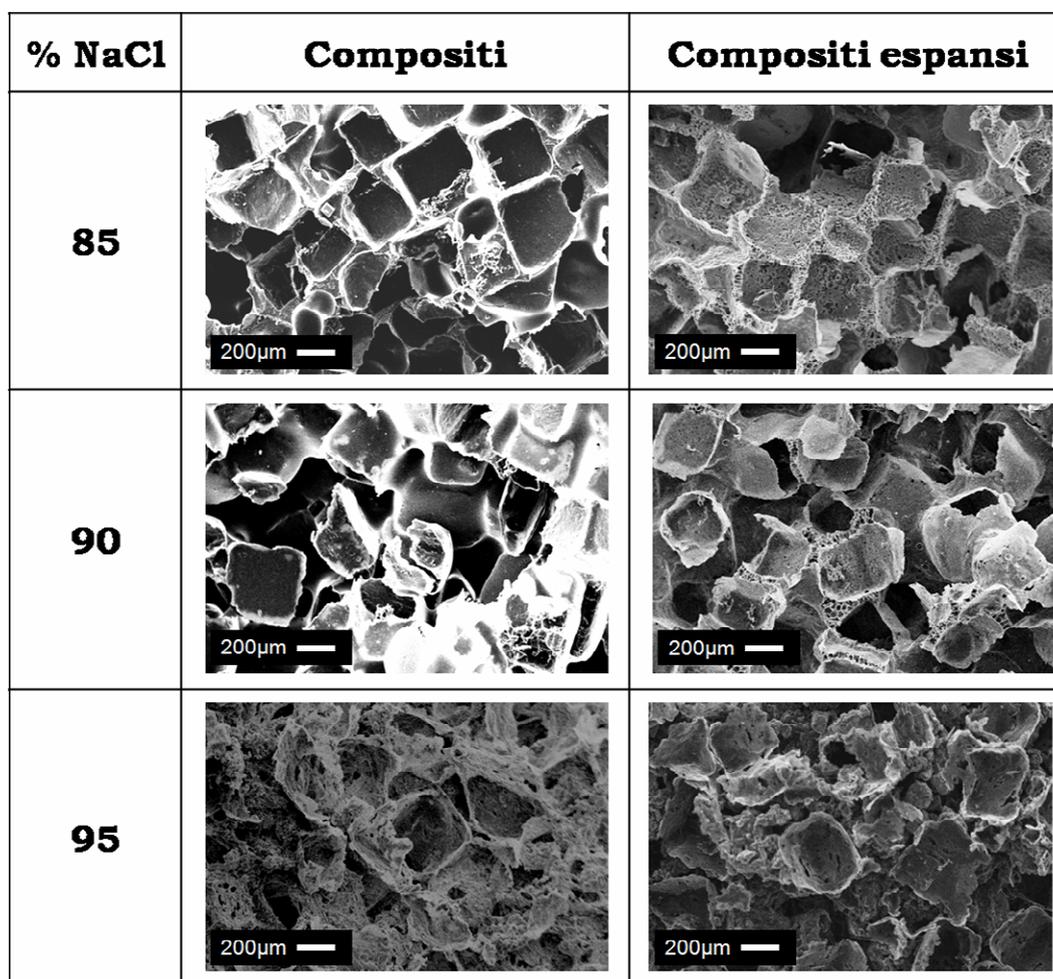


Figura 24 – Effetto della % di NaCl sulla morfologia degli scaffold prima e dopo la fase di gas foaming.

Osservando le micrografie al SEM dei campioni preparati estraendo l'agente templante prima del processo di foaming, si può notare che l'ottimizzazione della fase di miscelazione ha permesso di realizzare scaffold caratterizzati da pori che rispecchiano fedelmente la forma e la dimensione dell'agente porogeno. All'aumentare della % di NaCl si osserva un corrispondente aumento di vuoti nel sistema ed alla percentuale ponderale del 95%, la concentrazione di agente porogeno è talmente elevata da rendere difficile distinguere i confini dei singoli pori. Come si evidenzia osservando la morfologia degli scaffold ottenuti combinando le due tecniche, il processo di foaming porta alla formazione di una porosità addizionale all'interno della matrice polimerica (figura 24). Tale porosità è tuttavia individuabile solamente negli scaffold preparati a partire da una percentuale ponderale di NaCl pari all'85 ed al 90%. Se infatti si confronta la morfologia degli scaffold preparati a partire da una percentuale ponderale di NaCl del 95% non è

possibile individuare nessuna differenza sostanziale. Il motivo di ciò è da ricercarsi nella ridotta percentuale di PCL e nell'elevato effetto di "confinamento" che i cristalli di NaCl inducono sul processo di espansione del polimero. Analogamente a quanto osservato per i sistemi ottenuti a partire da NaCl micronizzato, il network di microparticelle ostacola il processo di foaming impedendo al polimero una espansione libera. Questo effetto si manifesta anche sulla porosità e sulle proprietà meccaniche degli scaffold, come evidenziato negli andamenti riportati in figura 25.

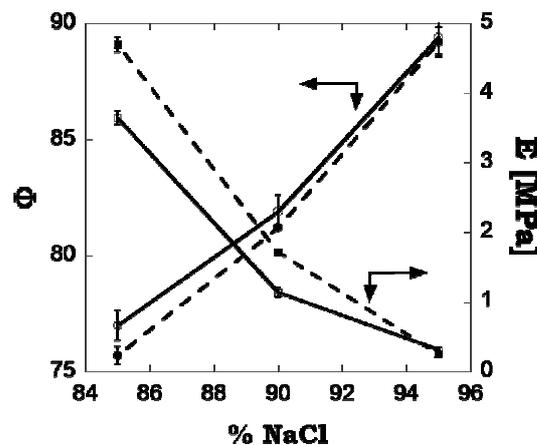


Figura 25 – Effetto della % di NaCl sulla porosità e sulle proprietà meccaniche degli scaffold prima (---) e dopo (—) la fase di foaming.

In generale, l'effetto del processo di gas foaming si manifesta come un incremento di  $\Phi$ , rispetto ai sistemi non espansi. Tuttavia questo effetto risulta fortemente dipendente dalla percentuale di agente templante impiegata. I sistemi ottenuti a partire da una percentuale di NaCl dell'85% mostrano una netta differenza in termini di porosità totale, prima e dopo il processo di foaming. Tale differenza, quantificabile in un 1% ( $\Phi$  aumenta dal 75.5 al 76.5%) si riduce a meno dello 0.5% quando il rapporto ponderale percentuale PCL/NaCl diventa 10/90, annullandosi completamente per un rapporto 5/95, in quanto la porosità totale degli scaffold è costantemente pari ad 89.5%. A causa del generale aumento di  $\Phi$  in seguito al processo di gas foaming, si osserva una corrispondente riduzione delle proprietà meccaniche degli scaffold, rispetto al solo processo di reverse templating, come evidenziato dai valori del modulo elastico riportati in figura 25. Infatti, alle basse % di NaCl,  $E$  si riduce del 25% in seguito alla fase di foaming (passando da 4.78 a 3.67MPa, rispettivamente). All'aumentare della % di NaCl, tale differenza diminuisce fino ad annullarsi alla massima concentrazione di agente templante.

#### ➤ *Effetto dell'agente espandente*

L'obiettivo di ottenere scaffold caratterizzati da una dimensione dei pori su scale dimensionali differenti ed un incremento del loro grado di

interconnessione, necessita di un controllo fine del processo di espansione del gas. Come osservato nella figura 25, rispetto agli scaffold preparati impiegando il solo agente templante, la combinazione delle due tecniche di processo permette l'ottenimento di una doppia scala di porosità. La microporosità tuttavia è fortemente condizionata dalla concentrazione di agente templante. Inoltre, è necessario che il grado di interconnessione di tale microporosità sia sufficientemente elevato da migliorare le proprietà di trasporto degli scaffold. Al fine di controllare le caratteristiche della microporosità, i sistemi compositi sono stati espansi impiegando una miscela  $\text{CO}_2\text{-N}_2$  a due differenti rapporti volumetrici. [67] La morfologia degli scaffold ottenuti a partire da una percentuale ponderale di agente templante dell'85% e impiegando una miscela  $\text{CO}_2\text{-N}_2$  in rapporti volumetrici pari a 20-80 e 40-60 (prove #1 e #2, tabella 9), è mostrata in figura 26.

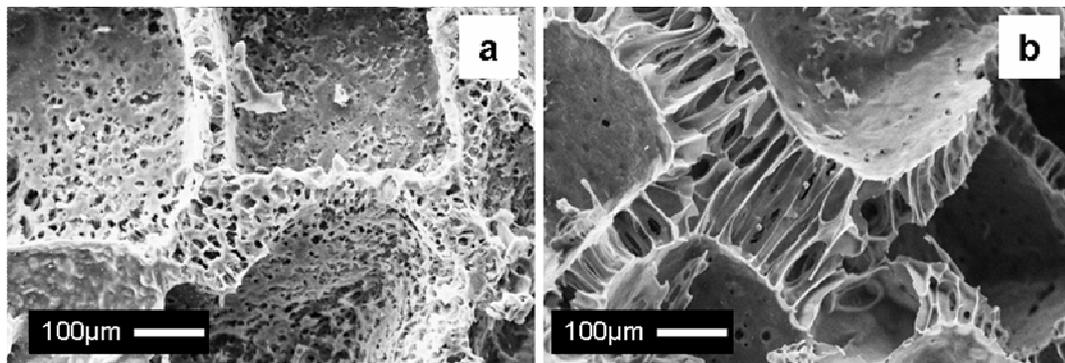


Figura 26 – Effetto dell'agente espandente sulla morfologia degli scaffold ottenuti impiegando una percentuale ponderale di NaCl dell'85%: a)  $\text{CO}_2\text{-N}_2$  20-80 (#1).; b)  $\text{CO}_2\text{-N}_2$  40-60 (#2).

Come si può notare osservando le morfologie degli espansi riportate in figura 26, la microporosità indotta dal processo di foaming varia sensibilmente al variare della percentuale volumetrica di  $\text{CO}_2$  nell'agente espandente dal 20 al 40%. Infatti, il maggior effetto plasticizzante di tale gas si manifesta come una riduzione della temperatura di transizione vetrosa e quindi della viscosità del sistema polimero/gas. [67] A parità quindi di  $T_F$ , che nel caso in esame è stata fissata a  $35^\circ\text{C}$ , la resistenza della matrice polimerica alla deformazione indotta dalla nucleazione e crescita delle bolle di gas si riduce all'aumentare della concentrazione di  $\text{CO}_2$  nell'agente espandente. Questo effetto spiega il significativo incremento della dimensione della microporosità nel passaggio dal 20 al 40% di  $\text{CO}_2$ , che passa da  $30\mu\text{m}$  a valori superiori ai  $100\mu\text{m}$  (figure 26a e b, rispettivamente). La maggiore deformazione indotta dall'aumento della percentuale di  $\text{CO}_2$ , sembra inoltre garantire un superiore grado di interconnessione della microporosità. In entrambi i casi comunque, la microporosità si affaccia all'interno dei pori lasciati dall'agente templante. Un effetto simile è stato osservato anche per gli scaffold preparati a partire da una concentrazione ponderale di agente templante del 90%. Tuttavia, anche

in questo caso, l'effetto di "confinamento" prodotto dalle microparticelle di NaCl limita fortemente la possibilità di controllo della microporosità, a tal punto che al 95% continuano a non esserci differenze sostanziali, per entrambe le tipologie di gas impiegate, rispetto ai sistemi non espansi.

L'aumento della percentuale di CO<sub>2</sub> nell'agente espandente, produce significative variazioni anche per quanto riguarda i valori di  $\Phi$  ed E degli scaffold, come evidenziato nella figura 27.

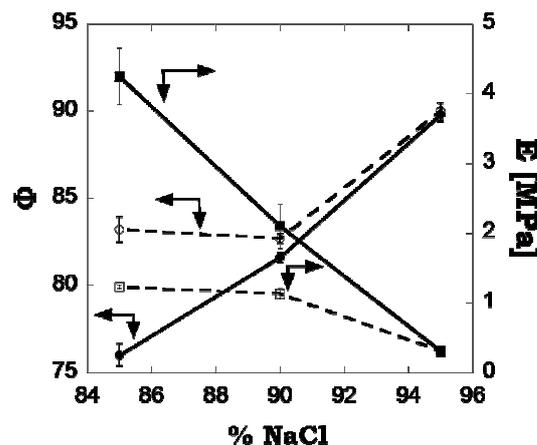


Figura 27 – Effetto dell'agente espandente su  $\Phi$  ed E degli scaffold: CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> 20-80 (—); CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> 40-60 (---).

Come si può osservare, la porosità degli scaffold aumenta all'aumentare della concentrazione di CO<sub>2</sub> nella miscela espandente, in accordo con quanto evidenziato dall'analisi morfologica di figura 26. Tuttavia, l'incremento ottenibile risulta fortemente dipendente dalla composizione della matrice. Per una percentuale di NaCl pari all'85%, l'incremento di porosità è del 4% ca. e si riduce a meno dell'1% quando la % di NaCl raggiunge il 90%. Nei casi di concentrazione di agente templante pari al 95% in peso, si osserva una analogia rispetto ai sistemi precedentemente illustrati, per cui  $\Phi$  rimane praticamente costante. L'effetto della composizione della miscela espandente su  $\Phi$  produce una corrispondente variazione anche nei valori del modulo elastico E. Infatti, l'aumento di porosità indotto dall'effetto plasticizzante del gas comporta una riduzione di E fino ad 1/4 del valore iniziale, nel caso degli scaffold ottenuti a partire da una concentrazione ponderale di NaCl pari all'85%. Differenze minime nel valore di E sono invece presenti nel caso della altre due differenti composizioni di agente templante.

È comunque importante puntualizzare un aspetto emerso dai risultati appena descritti. Se si confrontano i valori di  $\Phi$  dei sistemi ottenuti impiegando una miscela CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> 40-60 e concentrazioni di NaCl pari ad 85 e 90%, si può notare che le due tipologie di scaffold sono caratterizzate da valori simili di porosità totale (e modulo elastico), ma differenti rapporti volumetrici tra macroporosità e microporosità. Al

diminuire infatti della concentrazione di templante è possibile ottenere una percentuale di microporosità maggiore, pur mantenendo costante  $\Phi$  ed E. Dal punto di vista del design degli scaffold, questo risultato offre infatti la possibilità di valutare direttamente l'effetto della microporosità sulla rigenerazione tissutale.

➤ *Effetto dell'nHAP*

La possibilità di incorporare all'interno dello scaffold un filler ceramico bioattivo, come l'nHAP, offre il grande vantaggio di migliorarne le proprietà di biocompatibilità, soprattutto per quanto concerne le applicazioni di rigenerazione dell'osso. Inoltre, la biocompatibilità dello scaffold può essere modulata controllando la percentuale di nHAP nella matrice polimerica. Tuttavia, risulta necessario prendere in considerazione l'effetto che tale carica induce sul processo di espansione. Infatti, analogamente a quanto osservato nel caso del sale micronizzato, all'aumentare della % di nHAP ci si aspetta un incremento della rigidità della matrice polimerica con la conseguente riduzione del processo di espansione. Dal punto di vista delle proprietà viscoelastiche, un ruolo fondamentale è svolto dalla dimensione della fase inorganica dispersa nel polimero. Si deve infatti tenere in considerazione che, nel passaggio da una fase micrometrica ad una sub-micrometrica, l'effetto della concentrazione sulle proprietà viscoelastiche risulta più marcato. Questo aspetto è sostanzialmente legato all'aumento della superficie di interfaccia tra le due fasi, ma può dipendere anche dall'interazione fra il polimero e la fase dispersa. Nella figura 27 è riportata la morfologia degli scaffold ottenuti impiegando una percentuale ponderale di NaCl pari al 90%, una miscela CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> 40-60 e differenti percentuali di nHAP (prove #2, #5 e #7, tabella 9).

Come si può osservare, la concentrazione di nHAP influenza fortemente la microporosità indotta mediante gas foaming. Infatti, nel caso del PCL puro e del PCL caricato con il 5% in peso di nHAP, figure 27a e b, la presenza di nHAP non influisce significativamente sulla dimensione e sull'interconnessione della microporosità. Anzi, dall'analisi della figura 27b si può notare la presenza di una struttura con pareti dei pori fibrillari, tipiche di strutture altamente aperte. Questo effetto è probabilmente legato all'effetto della presenza della carica sul fenomeno di apertura e stabilizzazione delle pareti dei pori durante il processo di foaming, analogamente a quanto osservato nei sistemi con NaCl micronizzato. Nel caso degli scaffold ottenuti impiegando una concentrazione di nHAP pari al 20%, figura 27c, l'espansione della fase polimerica è significativamente ostacolata dall'elevata rigidità della matrice, per cui la dimensione e l'interconnessione dei pori indotti dal gas foaming risulta inferiore. Di contro, osservando attentamente la parete interna dei pori lasciati dal sale, si nota la presenza di una distribuzione omogenea ed estesa del filler, cosa che viceversa non accade nel caso dello scaffold ottenuto impiegando una concentrazione di nHAP del 5%.

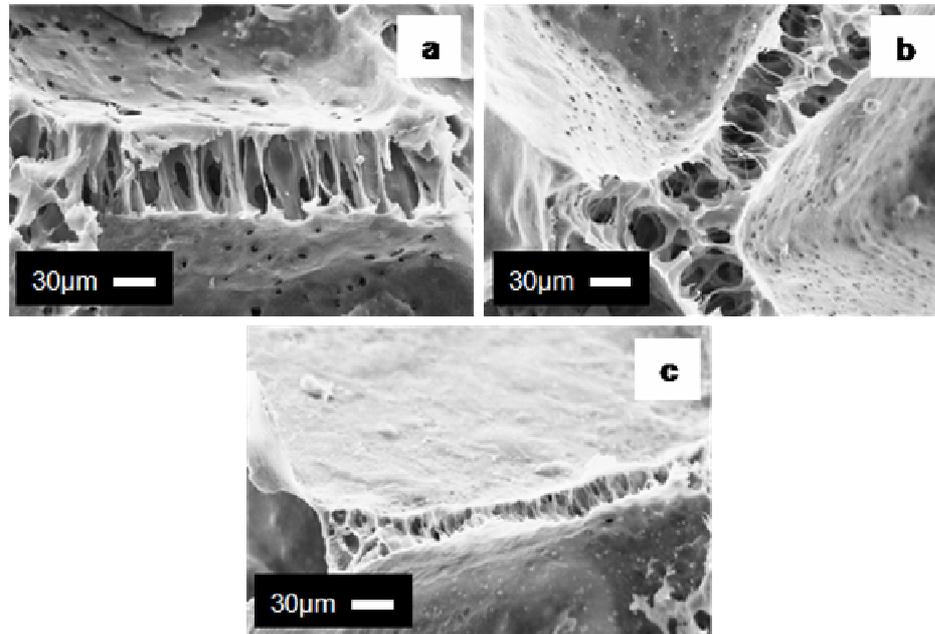


Figura 27 – Effetto della percentuale di HAP sulla morfologia degli scaffold ottenuti a partire da una percentuale ponderale di NaCl del 90%: a) PCL puro (#2); b) 5% nHAP (#5); c) 20% nHAP (#8).

In virtù di questa evidenza, sono state condotte altre prove finalizzate ad incrementare il grado di interconnessione della microporosità negli scaffold preparati con il 20% di nHAP. Le prove sono state condotte facendo variare la percentuale volumetrica di CO<sub>2</sub> nella miscela espandente fino al 60 ed al 100% (prove #8 e #9, tabella 9, rispettivamente). Tuttavia, non è stato possibile evidenziare alcun miglioramento rispetto a quanto già ottenuto nelle prove precedenti.

Interessanti risultati sono invece emersi dall'analisi dell'effetto della concentrazione di nHAP su  $\Phi$  ed E degli scaffold, come riportato in figura 28.

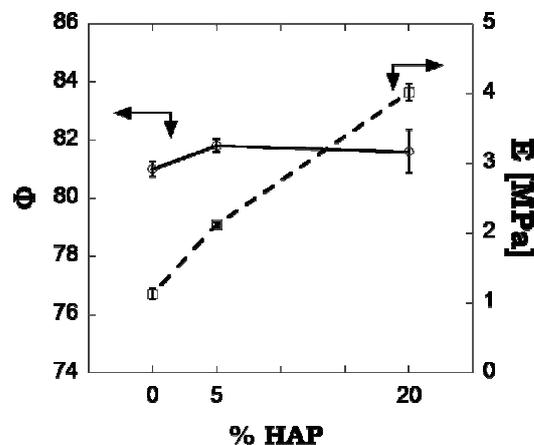


Figura 28 – Effetto della percentuale di nHAP su  $\Phi$  ed E degli scaffold di PCL ottenuti a partire da una percentuale ponderale di NaCl del 90% e una miscela CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> 40-60 come agente espandente.

Come si può osservare,  $\Phi$  non subisce variazioni significative all'aumentare della percentuale di nHAP nella fase polimerica, ma si mantiene costante all'interno dell'intervallo 81-82%. Di contro,  $E$  aumenta in maniera rilevante per effetto della presenza del filler, a partire da un valore di poco superiore ad 1MPa nel caso degli scaffold preparati impiegando il polimero puro, fino ad un valore pari a 4MPa nel caso degli scaffold contenenti il 20% di nHAP.

I risultati ottenuti mostrano le grandi potenzialità della tecnica del gas foaming combinata con templanti microparticellari di dimensioni comprese fra 300 e 500 $\mu$ m nell'ottica dello scaffold design. Tuttavia, sono emerse anche alcune importanti limitazioni. In primo luogo, la necessità di ottenere elevati livelli di interconnessione richiede l'impiego di percentuali di agente templante al di sopra della soglia di percolazione, con la conseguenza di realizzare scaffold caratterizzati da limitate proprietà meccaniche. Inoltre, l'incremento delle proprietà di biocompatibilità degli scaffold, ottenuto attraverso l'impiego dell'nHAP, risulta parzialmente ostacolato dalla inevitabile riduzione dell'interconnessione della microporosità alle alte concentrazioni di filler.

### **4.3 SCAFFOLD DI PCL A POROSITÀ CONTROLLATA OTTENUTI A PARTIRE DA MISCELE ETEROGENEE PCL/TG**

La preparazione di scaffold biodegradabili mediante gas foaming di sistemi polimerici eterogenei è stato ulteriormente approfondito implementando una tecnologia innovativa basata sull'utilizzo di agenti templanti continui. I risultati ottenuti sui sistemi PCL/NaCl a differenti distribuzioni dimensionali hanno infatti mostrato grandi potenzialità dal punto di vista dello scaffold design ma, tuttavia, hanno messo in evidenza una serie di limitazioni connesse all'utilizzo di agenti porogeni microparticellari. In particolare, la necessità di ottenere un buon grado di interconnessione dei pori ha richiesto l'impiego di alte concentrazioni di porogeno, al di sopra della soglia di percolazione, oppure l'ottimizzazione del processo di foaming per ottenere rapporti di espansione sufficientemente elevati da garantire un ottimale grado di interconnessione. Come diretta conseguenza dell'elevata porosità totale degli scaffold preparati si è avuta una eccessiva riduzione delle proprietà meccaniche, che rendono questi scaffold inadeguati per applicazioni di rigenerazione dei tessuti duri. In effetti, la diretta correlazione tra interconnessione e porosità totale rappresenta ad oggi la maggiore limitazione all'impiego degli scaffold ottenuti a partire da agenti templanti microparticellari.

Alla luce di queste limitazioni, pur non trascurando le grandi potenzialità dei sistemi precedentemente ingegnerizzati, una parte dell'attività di ricerca è stata finalizzata allo sviluppo di scaffold biodegradabili mediante la tecnica del gas foaming/continuous templating. A differenza dei sistemi contenenti elementi templanti microparticellari, in tale tecnica di processo si utilizzano miscele polimeriche eterogenee in cui una delle due fasi può a scelta, essere estratta selettivamente dalla matrice. L'agente porogeno è quindi un elemento attivo del sistema, nel senso che le sue caratteristiche possono essere controllate durante il processo e non risultano necessariamente definite a priori. Questo aspetto rappresenta un grande vantaggio nello scaffold design in quanto con questa tecnica è possibile controllare accuratamente la dimensione e l'orientazione della porosità attraverso la modulazione della morfologia delle fasi costituenti la miscela di partenza. Un ulteriore vantaggio connesso a tale tipo di tecnica è rappresentato dal fatto che la percentuale volumetrica di agente templante necessaria a garantire la formazione di una fase continua è notevolmente inferiore a quella richiesta nel caso di templanti micro particellari. Di conseguenza, è possibile disaccoppiare la porosità totale dall'interconnessione dei pori e realizzare scaffold altamente interconnessi anche con ottime proprietà meccaniche.

La preparazione degli scaffold mediante questa tecnica di processo è stata effettuata selezionando come agente templante la gelatina termoplastica (TG). Tale polimero, ottenuto in laboratorio attraverso un processo di termoplastificazione di gelatina di origine animale, è stato inizialmente caratterizzato per valutarne le proprietà fondamentali al

suo impiego come templante continuo per il PCL. Successivamente si è proceduto all'analisi del processo di espansione delle miscele PCL/TG, con il fine ultimo di individuare le condizioni di processo ottimali per la realizzazione degli scaffold. Infine, gli scaffold ritenuti maggiormente indicati per le applicazioni di rigenerazione tissutale, sono stati caratterizzati in termini di proprietà morfologico/strutturali e di risposta alle prove di coltura cellulare *in vitro*.

#### 4.3.1 PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLA TG

Come descritto in precedenza, la TG non è un polimero di natura commerciale ma è stato sviluppato nei nostri laboratori di ricerca. La preparazione di tale materiale è stata ottimizzata durante un precedente lavoro di tesi ed in questo ambito verranno solamente descritti brevemente le fasi del processo di termoplastificazione. Maggior peso invece è stato dato alla caratterizzazione di questo materiale e in particolare alla determinazione delle proprietà chimico/fisiche fondamentali per la preparazione degli scaffold di PCL, attraverso la tecnica del gas foaming/continuous templating. In particolare, ci si è focalizzati sulle proprietà termiche della TG, valutate mediante analisi TGA e DSC, sulla solubilità del polimero in H<sub>2</sub>O, solvente selezionato per l'estrazione selettiva della TG dalle miscele PCL/TG espanse e sulle proprietà di schiumatura e sulla miscibilità con il PCL.

##### ➤ *Termoplastificazione*

Il processo di termoplastificazione è un processo che viene comunemente impiegato per i polimeri di origine naturale, in particolare per le proteine e per i polisaccaridi. Lo scopo principale di questo processo è la realizzazione di un materiale termoplastico che possa essere processato con le tecnologie sviluppate per i polimeri termoplastici di origine sintetica. [74] Per quanto concerne la gelatina, tale polimero viene comunemente processato a partire da soluzioni acquose, in tal caso si parla di *wet denaturation*, [103] mentre non sono riportati in letteratura studi di denaturazione in ambiente privo di H<sub>2</sub>O (*dry denaturation*). Il processo di termoplastificazione prevede la destrutturazione della struttura macromolecolare secondaria, terziaria, e quaternaria del polimero, senza però intervenire sui legami covalenti con cui sono legati gli amminoacidi che la compongono, portando così ad uno "spiegamento" della proteina, come schematizzato in figura 29.

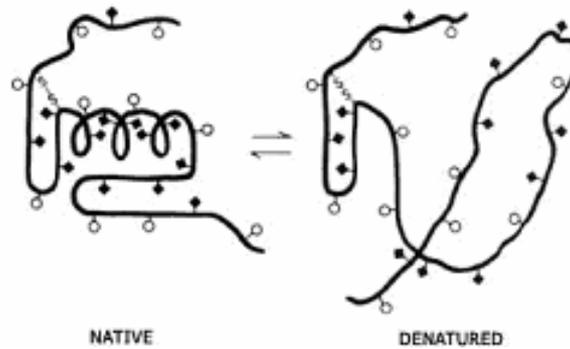


Figura 29 – Illustrazione del processo di denaturazione dei polimeri naturali.

Tale processo viene effettuato mediante l’opportuna combinazione di sforzi di shear, temperatura ed agenti plasticizzanti, e porta alla redistribuzione delle macromolecole, secondo una configurazione che ne facilita lo scorrimento reciproco e, quindi la processabilità. [104] Infatti, a causa dell’alta cristallinità e delle forti interazioni intermolecolari presenti nella gelatina, la semplice applicazione del calore conduce a una degradazione termica del materiale senza mai realizzare un flusso macromolecolare. Mentre nel caso della *wet denaturation*, la mobilità delle catene polimeriche è garantita dalle molecole di H<sub>2</sub>O, nel processo di *dry denaturation* è necessario utilizzare unitamente al calore un plasticizzante adatto. Il plasticizzante, essendo costituito da sostanze a basso peso molecolare, penetra tra le catene proteiche, separandole favorendone lo scorrimento reciproco e di conseguenza, permettendone la lavorabilità. Nel caso della gelatina impiegata in tale lavoro di tesi, la termoplasticizzazione è stata effettuata a caldo impiegando come plasticizzante il glicerolo, in concentrazione ponderale 75/25, rispettivamente. I materiali sono stati quindi miscelati nel miscelatore a camera chiusa descritto in precedenza, a 60°C, 60rpm per 6 minuti. L’andamento del momento torcente e della temperatura durante la miscelazione è riportato nella figura 30.

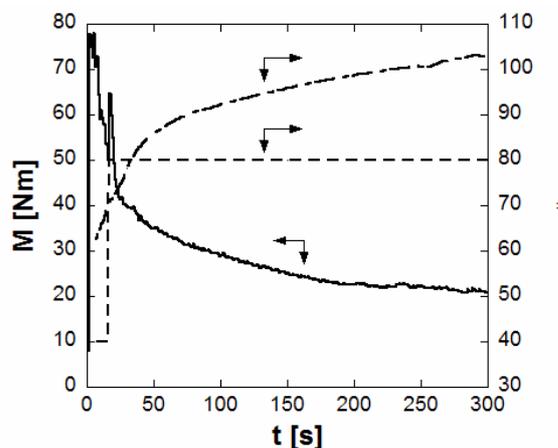


Figura 30 – Andamento della torques e della temperatura durante il processo di preparazione della TG.

In generale, l'evoluzione della torque durante il processo di termoplastificazione a caldo delle proteine consta di tre fasi fondamentali: [105]

- Fase di induzione caratterizzata da un plateau
- Rapido incremento fino ad un valore massimo
- Decremento progressivo fino al raggiungimento di uno stato stazionario

Nel caso in esame, il tempo di induzione è talmente breve che si osserva direttamente l'impennata della torque legata alla destrutturazione della proteina ed alla interposizione delle molecole di plasticizzante fra le macromolecole. La successiva riduzione della torque fino allo stato stazionario garantisce il raggiungimento di un ottimale grado di termoplastificazione.

#### ➤ *Proprietà termiche*

La caratterizzazione delle proprietà termiche della TG è un aspetto fondamentale ai fini dell'ottimizzazione del processo di preparazione degli scaffold. Infatti, le condizioni di miscelazione di PCL e TG ed il processo di schiumatura delle miscele sono fortemente legati alle proprietà termiche dei due polimeri. In particolare, l'intervallo di temperature di lavorabilità dei materiali deve necessariamente essere individuato al fine di ottimizzare le differenti fasi di processo. In tal senso, nel caso della TG l'attenzione si è focalizzata sull'effetto del processo di termoplastificazione sulla temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) e sulla massima temperatura di lavorabilità del materiale. In figura 31 è riportato il diagramma relativo all'analisi TGA-DSC effettuata sulla gelatina, prima e dopo il processo di termoplastificazione.

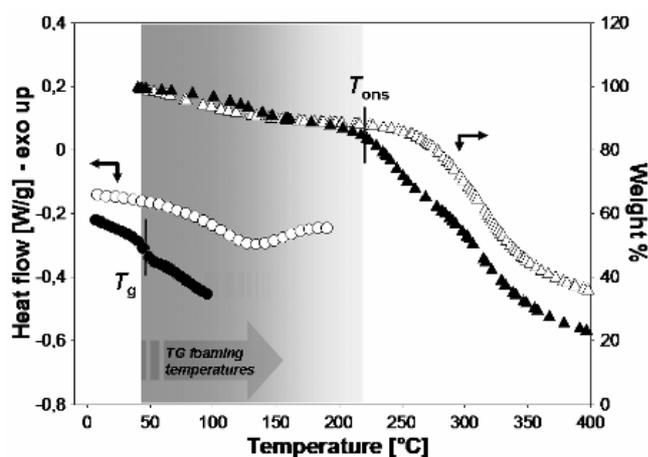


Figura 31 – TGA e DSC della gelatina prima (simboli bianchi) e dopo (simboli neri) il processo di termoplastificazione.

Dal confronto delle caratteristiche della gelatina tal quale e della gelatina termoplastificata è possibile osservare alcuni effetti importanti

del processo di termoplastificazione. In primo luogo, l'analisi TGA fornisce informazioni utili in merito alla temperatura massima di processabilità della TG, individuata dalla temperatura di inizio degradazione ( $T_{\text{ons}}$ ). Infatti, pur non essendoci differenze significative tra i due polimeri nell'intervallo di temperature 30-150°C, in cui si manifesta solo una sostanziale diminuzione di peso relativa all'evaporazione dell'H<sub>2</sub>O assorbita, la temperatura a cui inizia la perdita di peso più rilevante si sposta da circa 270°C per la gelatina pura fino a 220°C per la TG. Il motivo di ciò può essere ricondotto a due fenomeni concomitanti: in primo luogo, la TG perde parte del plasticizzante contenuto al suo interno (la temperatura di ebollizione del glicerolo allo stato puro è pari ad 182°C circa). In aggiunta, il processo di termoplastificazione può indurre una minore stabilità termica delle catene polimeriche, con la conseguente riduzione della  $T_{\text{ons}}$ . L'effetto del processo di termoplastificazione si manifesta anche nell'analisi dei tracciati ottenuti al DSC. Infatti, in entrambi i polimeri è stata osservata la presenza di un picco endotermico nell'intervallo di temperature 90 e 180°C, attribuibile ad un cambiamento di configurazione delle macromolecole. [106] Tuttavia, nel caso del polimero termoplastico questa transizione ad alte temperature è preceduta da una  $T_g$  che si posiziona a cavallo dei 40°C, non osservata invece nella curva relativa alla gelatina tal quale. Nel caso del polimero termoplastico, la presenza di una  $T_g$  al di sotto della temperatura di degradazione ne garantisce una certa processabilità con le tecniche di miscelazione/schiumatura necessarie alla preparazione degli scaffold di PCL. Inoltre, tale temperatura può essere presa come riferimento per il processo di schiumatura della TG, in quanto rappresenta la temperatura di passaggio da un comportamento vetroso ad uno gommoso, indispensabile alla nucleazione e crescita delle bolle di gas. La temperatura massima di processo della TG deve essere significativamente inferiore alla  $T_{\text{ons}}$ , al fine di evitare la possibile perdita di plasticizzante e la degradazione della struttura polimerica del materiale termoplastico.

➤ *Proprietà di swelling e dissoluzione in H<sub>2</sub>O*

L'impiego della TG come agente templante per il PCL è strettamente legato alla possibilità di estrarre selettivamente tale polimero dalle miscele co-continue PCL/TG. Per tale motivo ed in considerazione della solubilità della gelatina pura in H<sub>2</sub>O a temperature superiori o uguali a 37°C, è stato valutato il grado di swelling della TG in H<sub>2</sub>O a due differenti temperature: 30 e 37°C. In figura 32 è riportato l'andamento nel tempo del rapporto di swelling ( $S_w$ ) della TG in H<sub>2</sub>O.

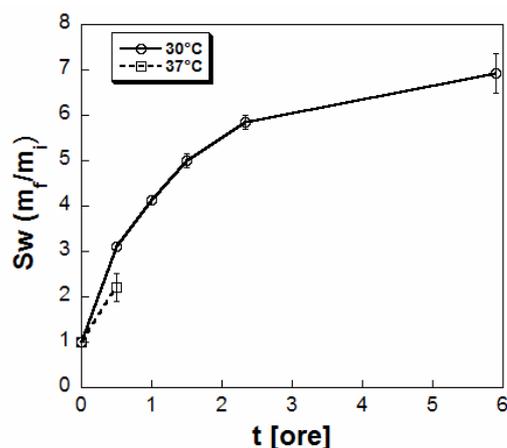


Figura 32 – Rapporto di swelling della gelatina termoplastica in H<sub>2</sub>O, alle temperature di 30 e 37°C.

Come si può osservare dall'analisi di  $S_w$ , la temperatura svolge un ruolo fondamentale nell'equilibrio tra l'assorbimento del solvente e la dissoluzione della TG. In effetti, la TG può essere considerata come un gel non reticolato che una volta immerso in H<sub>2</sub>O, subisce un processo di rigonfiamento ed una concomitante fase di dissoluzione, come schematizzato in figura 33.

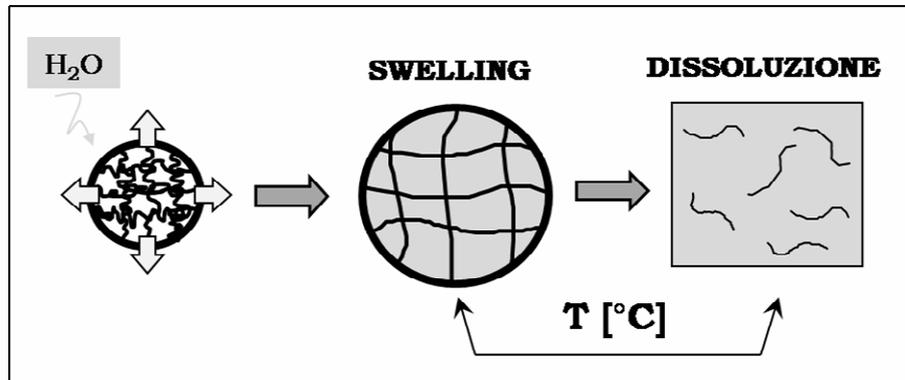


Figura 33 – Schema del processo di swelling/dissoluzione della TG in H<sub>2</sub>O veicolato dalla temperatura del solvente.

L'equilibrio tra questi due processi risulta strettamente veicolato dalla temperatura. In particolare, alla temperatura di 30°C, la solubilità del polimero nel solvente è sfavorita rispetto alle swelling per cui si osserva un progressivo aumento di peso fino a valori che, dopo 6 ore circa, hanno raggiunto 7 volte il peso di partenza (figura 32). All'aumentare della temperatura, il processo di dissoluzione acquista una rilevanza maggiore, come mostrato dai risultati delle misure di  $S_w$  effettuate a 37°C, per cui la curva si mantiene sempre al di sotto di quella relativa allo  $S_w$  a 30°C. Inoltre, già dopo 1 ora non è più possibile valutare il grado di rigonfiamento del polimero a causa della completa perdita di consistenza del campione che ne impedisce la manipolazione.

Parallelamente a tali misure è stato anche valutato l'effetto dell'immersione del PCL in H<sub>2</sub>O alle due temperature prese in esame. I risultati di tali misure, non riportati graficamente per brevità di trattazione, mostrano che il PCL non subisce alcuna variazione di peso durante tutto il tempo impiegato per le misure.

I risultati ottenuti dalle misure di  $S_w$  effettuate sui due polimeri hanno quindi permesso di definire le condizioni necessarie per l'estrazione della TG dalle miscele PCL/TG. In particolare, al fine di rendere il più rapido possibile il processo di estrazione dell'agente templante continuo dalle miscele espanse, senza però indurre alterazioni nella microstruttura della fase PCL, si è scelto di selezionare una temperatura di 39°C per la fase di estrazione selettiva.

#### ➤ *Proprietà di schiumatura*

L'individuazione delle condizioni di processo di schiumatura per le miscele PCL/TG richiede la conoscenza delle condizioni di espansione dei polimeri puri. Per quanto concerne il PCL, numerosi studi hanno messo in relazione le proprietà microstrutturali degli espansi ottenuti per gas foaming, con i parametri di processo selezionati. [67-69] In particolare, l'effetto della tipologia di agente espandente (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, miscele di questi due gas) sulla solubilizzazione e sulla diffusione nella matrice polimerica e le implicazioni sulla morfologia degli espansi è stato ampiamente discusso. Analogamente, studi finalizzati alla valutazione dell'effetto di parametri di processo quali la  $P_{sat}$ , la  $T_F$  ed il PDR hanno messo in evidenza la possibilità di ottenere un controllo molto accurato della microstruttura degli espansi di PCL, attraverso la loro opportuna combinazione. In questo lavoro, si è quindi ritenuto necessario andare ad approfondire i processi di gas foaming solo della TG, al fine di poter successivamente ottimizzare la fase di schiumatura delle miscele con il PCL e quindi la morfologia finale degli scaffold. In considerazione delle conoscenze acquisite sul processo di schiumatura del PCL, si è investigato l'effetto dei principali parametri di gas foaming, sulle proprietà morfologiche della TG. In particolare, si è proceduto alla valutazione della finestra di temperature di espansione della TG ed a definire l'influenza della composizione dell'agente espandente sulle proprietà microstrutturali degli espansi.

In figura 34 è riportato l'effetto della  $T_F$  sulla morfologia degli espansi ottenuti impiegando una miscela CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> 20-80 come agente espandente ed un PDR = 700bar/s, mentre in figura 35 sono riportati i corrispondenti valori di  $D_c$  ottenuti.

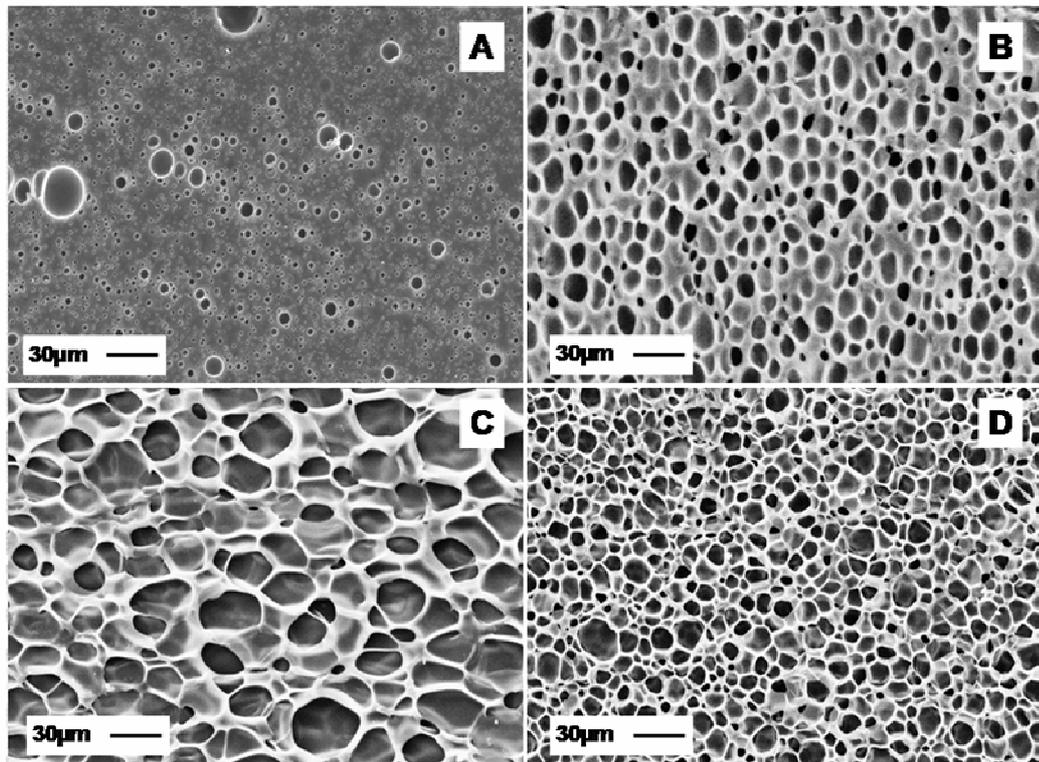


Figura 34 – Micrografie al SEM della sezione degli espansi di TG ottenuti impiegando una miscela  $N_2$ - $CO_2$  80-20 come agente espandente, un PDR = 700 bar/s e differenti  $T_F$  (prove #5-#11, tabella 12): (a) 44°C, (b) 80°C, (c) 120°C e (d) 140°C.

La figura 34a mostra che, a temperature vicine alla  $T_g$  del polimero termoplastico (vedi figura 31), la viscosità della matrice risulta troppo elevata per permettere la formazione di una struttura cellulare uniforme e caratterizzata da un buon grado di espansione. Quando la  $T_F$  aumenta fino ad 80 e 120°C (figure 34b e c), la viscosità della matrice polimerica si riduce ed è possibile osservare la formazione di una struttura cellulare uniforme e con pori di dimensioni maggiori. Una inversione di tendenza si osserva invece in seguito all'ulteriore incremento di  $T_F$  a 140°C (figura 34d). Tali schiume sono infatti caratterizzate da una significativa riduzione del diametro medio dei pori e, ad un esame visivo, è stato possibile notare un importante fenomeno degradativo caratterizzato dalla estesa presenza di macchie di colore scuro sulla superficie del campione. Una possibile spiegazione della riduzione del grado di espansione della TG, corrispondente ad un aumento della  $T_F$  fino a 140°C, è la diffusione dell'agente espandente dai pori al termina della fase di espansione, anche in presenza di una struttura porosa chiusa. Infatti, nel caso in cui la struttura polimerica espansa non possieda una rigidità sufficiente a bilanciare la mancanza della pressione all'interno dei pori, si può avere un totale o parziale collasso della porosità per effetto della diffusione del gas dalle bolle. La diffusione del gas ed il collasso strutturale, fenomeni osservati anche nel caso dei

polimeri termoplastici di origine sintetica, [67] è sostanzialmente legata alle proprietà della matrice polimerica che permette all'agente espandente di diffondere al di fuori sotto la spinta della differenza di pressione fra l'interno e l'esterno del poro e del gradiente di concentrazione del gas. Questo fenomeno caratterizza anche la curva relativa a  $D_C$  riportata in figura 35.

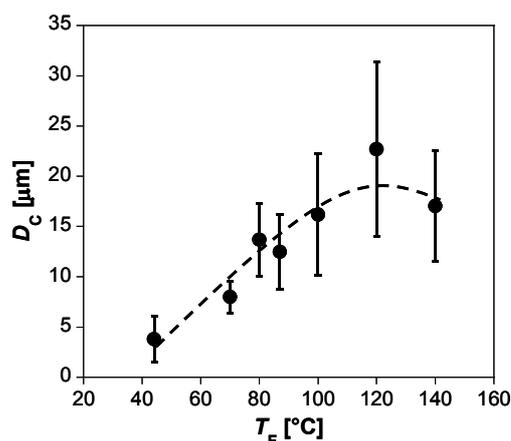


Figura 35 – Andamento di  $D_C$  per la TG, al variare della  $T_F$  nell'intervallo 44-140°C.

Come si osserva,  $D_C$  assume il valore minimo, pari a 4μm, alla  $T_F$  di 44°C ed aumenta progressivamente fino a raggiungere il valore massimo di 23μm alla  $T_F = 120^\circ\text{C}$ . L'ulteriore incremento di temperatura fino a 140°C, produce il fenomeno di collasso strutturale descritto in precedenza che porta quindi ad una riduzione apparente del diametro dei pori delle schiume, pari a 15μm. Dall'analisi della microstruttura degli espansi di TG risulta chiaro che le proprietà di schiumatura dei polimeri naturali sono profondamente differenti da quanto si osserva nel caso dei polimeri sintetici. In effetti, pur impiegando un ampio intervallo di  $T_F$ , il grado di espansione della TG risulta comunque significativamente ridotto, tale polimero presentando una scarsa sensibilità alla variazione della  $T_F$ . Questo aspetto risulterà molto importante nello studio dei processi di espansione delle miscele con il PCL, in quanto l'interdipendenza dell'espansione dei due polimeri influisce fortemente sul controllo della microstruttura dello scaffold. Significative variazioni della struttura degli espansi di TG sono invece state osservate al variare della composizione dell'agente espandente. Le prove sono state condotte a  $T_F=100^\circ\text{C}$  ed hanno mostrato un evidente effetto plasticizzante della  $\text{CO}_2$  sul polimero ed un conseguente incremento di  $D_C$  fino a 55μm per una composizione  $\text{CO}_2\text{-N}_2$  pari al 50-50 (prove #1-#4, tabella 12).

#### 4.3.2 MISCELE PCL/TG

Per completare la caratterizzazione delle proprietà della TG e definirne un possibile impiego come template per il PCL, l'attività di ricerca si è

indirizzata sulla preparazione delle miscele PCL/TG e sulla loro caratterizzazione. In particolare, l'attenzione si è rivolta a verificare l'effettiva immiscibilità dei due polimeri attraverso misure alla DMA ed analisi dell'estrazione della TG con misure gravimetriche e morfologiche.

Come descritto nel capitolo 3, le miscele PCL/TG sono state preparate impiegando rapporti volumetrici a cavallo del punto di inversione. Le curve relative all'andamento della velocità di rotazione dei rotori ( $n$ ), della temperatura del fuso ( $T$ ) e del momento torcente ( $M$ ) durante il processo di preparazione della miscela PCL/TG<sub>40/60</sub> sono mostrate in figura 36.

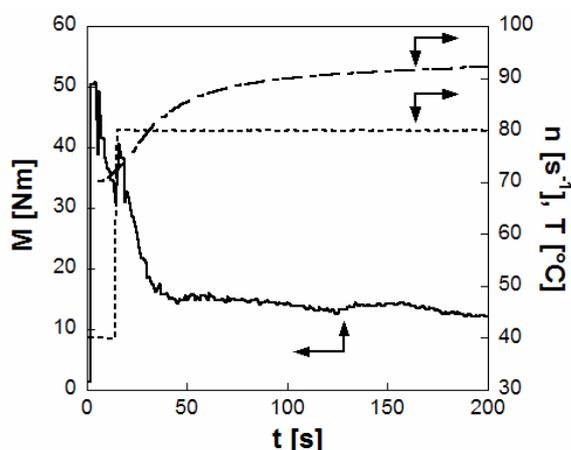


Figura 36 – Andamento della torque ( $M$ ), della velocità di rotazione dei rotori ( $n$ ) e della temperatura del fuso ( $T$ ) per il campione PCL/TG<sub>40/60</sub>.

L'andamento delle tre differenti caratteristiche può essere compreso tenendo presente che la procedura di preparazione delle miscele è stata effettuata inserendo nella camera di miscelazione prima il PCL e una volta raggiunta la sua completa fusione, la TG. A questo punto la velocità è stata portata ad 80rpm e mantenuta costante per tutto il periodo di miscelazione. Quindi, il primo picco di  $M$  è legato alla fase di carico dei due polimeri, mentre il secondo picco di  $M$  dipende dalla miscelazione delle due fasi polimeriche a cui poi segue la progressiva riduzione della torque fino allo stazionario. L'andamento della temperatura durante la miscelazione è invece sempre crescente a causa della dissipazione viscosa. L'evoluzione del momento torcente durante il processo di miscelazione fornisce utili indicazioni in merito all'ottimizzazione delle proprietà finali delle miscele. In particolare, l'iniziale incremento di viscosità ed il progressivo raggiungimento di uno stato stazionario di temperatura e torque fanno pensare, così come descritto per la termoplastificazione della gelatina, all'ottenimento di una buona dispersione delle fasi polimeriche.

#### ➤ *Proprietà viscoelastiche*

Al fine di valutare l'ottenimento di una miscela polimerica eterogenea, sui campioni preparati sono state effettuate misure dinamico-

meccaniche. Tale analisi permette infatti di valutare le transizioni termiche all'interno del materiale e nel nostro caso, l'eventuale miscibilità dei due polimeri. Il risultato di tale caratterizzazione è illustrato in figura 37.

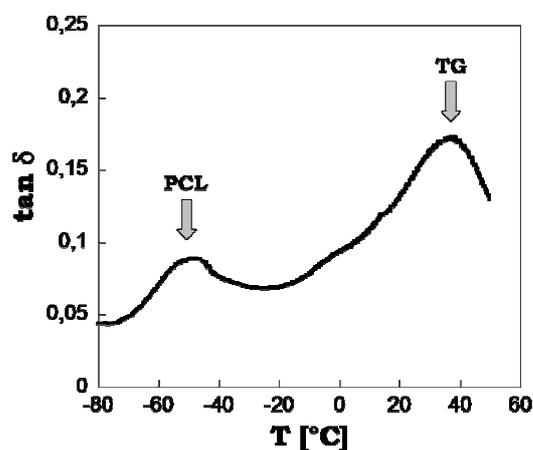


Figura 37 – Andamento di  $\tan \delta$  con la temperatura per la miscela PCL/TG<sub>60/40</sub>.

Dall'analisi delle proprietà viscoelastiche della miscela PCL/ TG<sub>60/40</sub> si può notare la completa immiscibilità fra le due fasi polimeriche e la conseguente formazione di una miscela eterogenea. In effetti, proprietà viscoelastiche della miscela mostrano la presenza di due ben definiti picchi di  $\tan \delta$ . [107] Considerando che tale parametro è una misura del rapporto fra il modulo dissipativo e quello conservativo del materiale, in corrispondenza dei picchi si verifica un incremento della caratteristica dissipativa. In particolare, come evidenziato in figura 37, la prima transizione, il cui massimo è a -50°C circa, è relativa alla transizione vetrosa del PCL. Il secondo picco di  $\tan \delta$ , situato a cavallo dei 40°C, è invece relativo alla transizione vetrosa della TG. Come infatti evidenziato dalla caratterizzazione DSC effettuata sulla TG, tale polimero presenta una  $T_g$  intorno ai 40°C. Questi risultati forniscono quindi una prima importante informazione in merito alla sostanziale immiscibilità del PCL e della TG.

#### ➤ Estrazione selettiva della TG

L'effettiva possibilità di estrarre selettivamente la TG dalle miscele PCL/TG preparate è stata valutata immergendo i campioni in H<sub>2</sub>O alla temperatura di 37°C. Come illustrato in precedenza, tale temperatura non induce significative modifiche nel PCL, mentre permette di portare in soluzione la TG rendendo trascurabile il suo rigonfiamento. Nella figura 38 è riportato l'andamento del rapporto di swelling delle miscele PCL/TG al variare della composizione ponderale dei due polimeri.

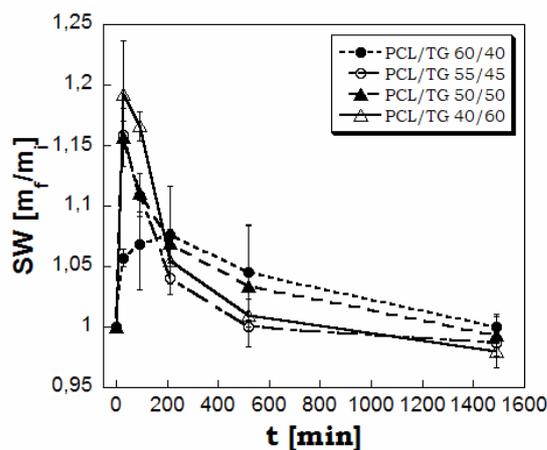


Figura 38 – Effetto della composizione sul grado di swelling delle miscele PCL/TG a 37°C.

L'andamento di  $S_w$  durante la fase di immersione mostra un leggero incremento del peso dei campioni nella fase iniziale, seguito da una progressiva riduzione e dal raggiungimento di un valore costante. Come osservato per la TG tal quale, l'iniziale aumento di peso delle miscele risulta legato ad un leggero rigonfiamento del polimero a causa della penetrazione dell' $H_2O$  all'interno delle macromolecole. Inoltre, tale incremento risulta proporzionale alla concentrazione di TG nella miscela, sia a causa del maggiore quantitativo di polimero presente, sia per la maggiore deformabilità del network di PCL. Successivamente, la fase TG viene progressivamente sostituita dal solvente che, penetrando all'interno prosegue il processo di estrazione selettiva. Il valore finale di  $S_w$  delle miscele diminuisce inoltre all'aumentare della percentuale di templante in quanto la TG ha una densità superiore a quella del solvente.

Al termine del processo di dissoluzione della TG, definito dal raggiungimento del peso di equilibrio delle miscele, è stata valutata la percentuale di TG estratta mediante analisi gravimetrica. I campioni sono stati pesati allo stato secco prima e dopo l'immersione nel solvente ed è stato possibile determinare la percentuale di TG estratta. I risultati di tali misure sono riportati in figura 39. Come si può notare, la percentuale di templante continuo estratta dalle miscele corrisponde con buona approssimazione con la percentuale nominale impiegata. Questo risultato risulta in accordo con quanto valutato mediante l'analisi dinamico-meccanica, a conferma della sostanziale immiscibilità delle due fasi polimeriche.

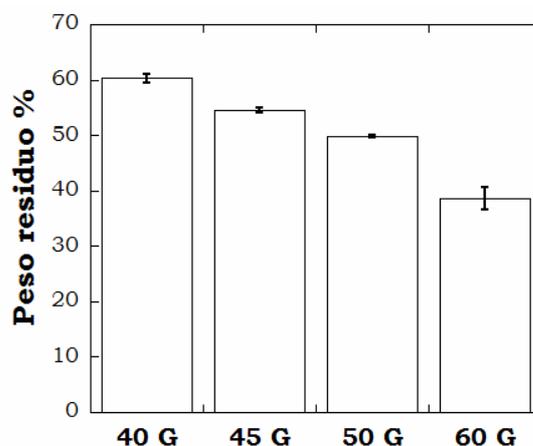


Figura 39 – Effetto della % di TG sul peso residuo delle miscele dopo estrazione della TG a 37°C.

I campioni ottenuti alla fine del processo di estrazione della TG dalle miscele PCL/TG, sono stati successivamente analizzati al SEM, per poter avere utili informazioni in merito alla morfologia delle fasi costituenti le miscele ed alla estrazione selettiva della TG. Le micrografie ottenute al SEM delle superfici di taglio dei campioni sono riportate nella figura 40.

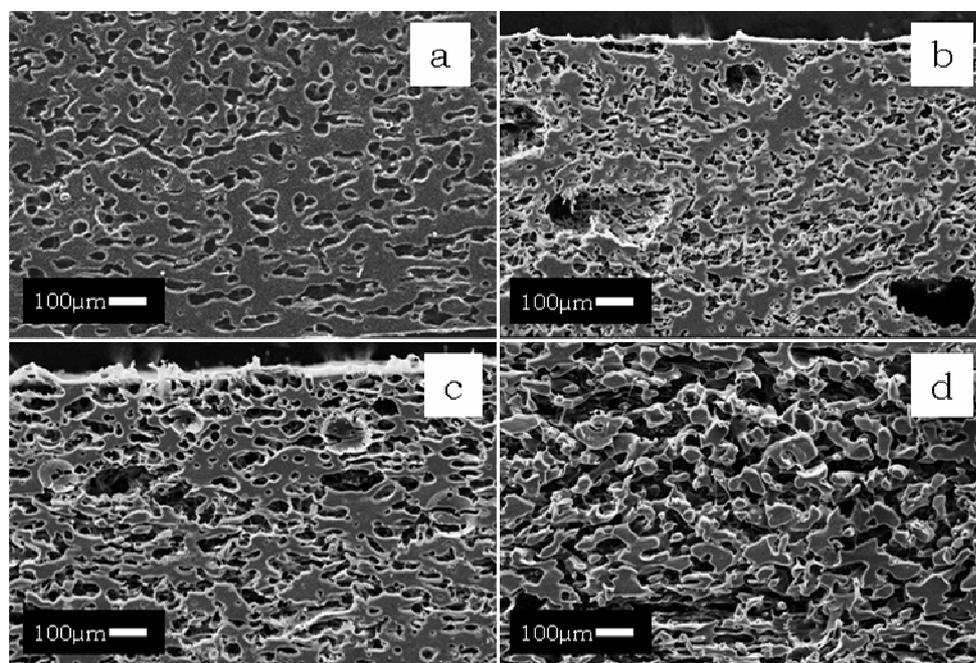


Figura 40 – Immagini al SEM delle superfici di taglio delle miscele PCL/TG dopo estrazione selettiva della TG a 37°C: (a) PCL/TG<sub>60/40</sub>; (b) PCL/TG<sub>55/45</sub>; (c) PCL/TG<sub>50/50</sub> e (d) PCL/TG<sub>40/60</sub>.

L'analisi morfologica mostra chiaramente l'effetto dell'estrazione selettiva della TG dalle miscele non espanse. Come si può osservare, i campioni sono caratterizzati dalle presenza di porosità laddove vi era la

fase di TG. Inoltre, la morfologia della porosità, di forma allungata ed interconnessa, è tipica dei sistemi co-continui. [48, 49] La porosità finale dei sistemi è inoltre fortemente dipendente dalla composizione. Nel passaggio dal sistema PCL/TG<sub>60/40</sub> (figura 40a) al sistema PCL/TG<sub>40/60</sub>, la frazione di vuoti presente all'interno dei materiali aumenta in accordo con i dati delle misure di figura 39.

I risultati ottenuti dalla caratterizzazione delle proprietà viscoelastiche delle miscele e dal processo di estrazione selettiva della TG ci permettono quindi di confermare la possibilità di estrarre selettivamente l'agente templante continuo e quindi, di proseguire l'attività di ricerca ed indirizzarla verso lo studio dei processi di espansione delle miscele PCL/TG preparate.

#### 4.3.3 ESPANSIONE DELLE MISCELE PCL/TG

L'obiettivo di questa fase di ricerca è legato all'ingegnerizzazione di scaffold di PCL caratterizzati da una struttura porosa su due scale dimensionali differenti. In particolare, attraverso la combinazione delle tecniche del gas foaming e del selective polymer extraction, si vuole indurre la formazione di uno scaffold caratterizzato da una macroporosità, ottenuta dall'estrazione dell'agente templante continuo e una microporosità ottimizzata mediante la fase di foaming. Per tale motivo, lo studio dei processi di espansione delle miscele PCL/TG è stato indirizzato all'ottimizzazione delle condizioni di processo per ottenere una percentuale di fase TG espansa ed una porosità interconnessa nella fase PCL, idonee alla realizzazione degli scaffold. È comunque importante tenere in considerazione che l'effetto del processo di foaming sulle proprietà microstrutturali della TG risulta rilevante solo in merito alla frazione finale di TG espansa, che caratterizza infatti la percentuale volumetrica di macroporosità. La struttura cellulare della TG non rappresenta quindi un aspetto importante nel design degli scaffold, in quanto tale polimero verrà poi estratto dalla miscela espansa. La valutazione dell'effetto dei parametri di processo sull'espansione delle miscele è stata quindi basata sull'analisi della morfologia degli espansi mediante SEM ed analisi delle immagini.

##### ➤ *Effetto della composizione*

Inizialmente, si è ritenuto necessario investigare il processo di espansione delle miscele multifasiche, valutando l'effetto della percentuale di agente templante sulla morfologia. Le condizioni di espansione sono state selezionate in relazione alla necessità di ottenere una microporosità aperta nella fase PCL. In particolare, come agente espandente è stata selezionata una miscela CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> 20-80 così da promuovere una elevata nucleazione di bolle di gas all'interno del PCL. La  $T_F$  ed il PDR selezionati sono rispettivamente 40°C e 700bar/s. La morfologia delle miscele espanse ottenute a partire da una percentuale ponderale di agente templante del 40 e del 60% è illustrata in figura 41.

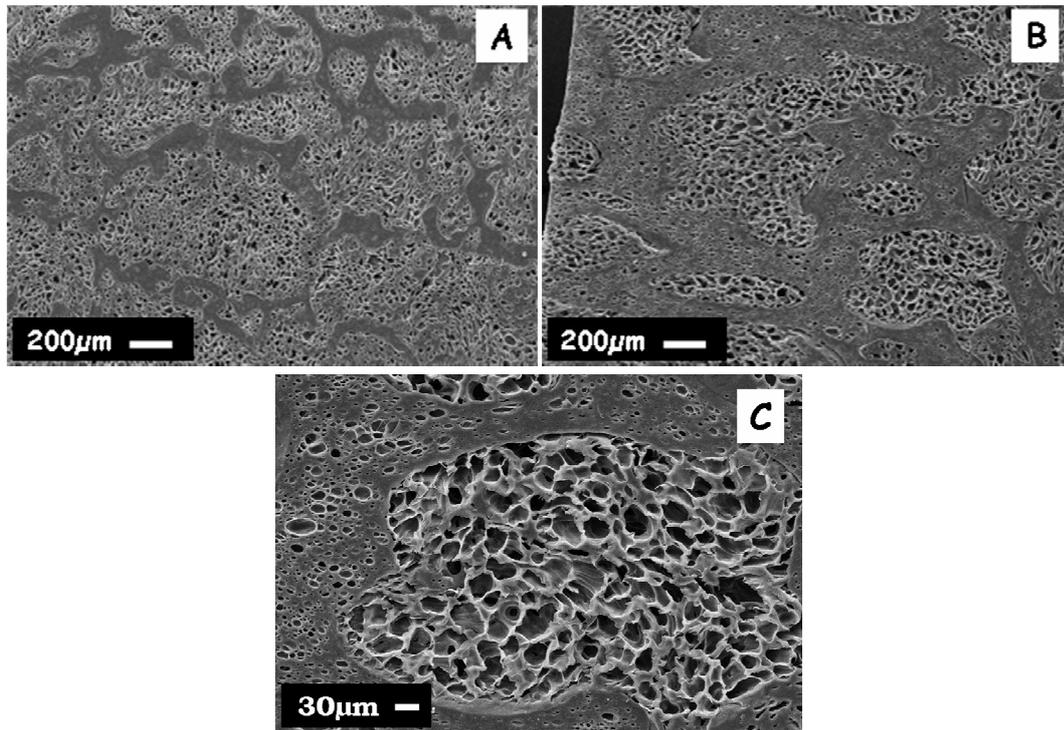


Figura 41 – Effetto della percentuale ponderale di agente templante sulla morfologia degli espansi: (a) PCL/TG<sub>60/40</sub>; (b) PCL/TG<sub>40/60</sub> e (C) alto ingrandimento del campione PCL/TG<sub>40/60</sub>.

Dall'analisi delle micrografie al SEM delle miscele espansive emergono immediatamente le seguenti considerazioni:

1. La morfologia degli espansi risulta caratterizzata dalla presenza di due fasi espansive con una struttura cellulare profondamente differente e separate da una interfaccia ben definita.
2. Come evidenziato nell'alto ingrandimento di figura 41c, la fase PCL risulta caratterizzata da una porosità uniforme con pori di 40µm circa. Tuttavia, tale porosità presenta un grado di interconnessione insufficiente a garantire un ottimale trasporto dei fluidi nell'intero scaffold.
3. A differenza del PCL, la TG presenta un grado di espansione sensibilmente inferiore al PCL. Come infatti descritto durante la trattazione del processo di espansione della TG, a temperature intorno ai 40°C ed impiegando come miscela espandente una miscela CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> 20-80, tale polimero è caratterizzato dalla presenza di una ridottissima percentuale di vuoti.
4. La percentuale di fase TG presente nella miscela espansa aumenta sensibilmente all'aumentare della composizione ponderale di TG nella miscela di partenza dal 40 (figura 41a) al 60% (figura 41b), senza produrre significative variazioni nella fase PCL. Di conseguenza, la macroporosità ottenibile in seguito all'estrazione dell'agente templante può essere opportunamente modulata con la composizione della miscela.

Al fine di poter quantificare le percentuali volumetriche delle due fasi e definire quindi il contributo alla porosità dei due differenti processi, le micrografie al SEM sono state analizzate mediante il software image J.. Attraverso tale programma è infatti possibile determinare la percentuale superficiale della fase TG espansa a partire dalla definizione dei domini delle due fasi. La procedura impiegata si basa sulla conversione dell'immagine al SEM in una immagine binaria, come illustrato nella figura 42, relativa ai campioni di figura 41a e b.

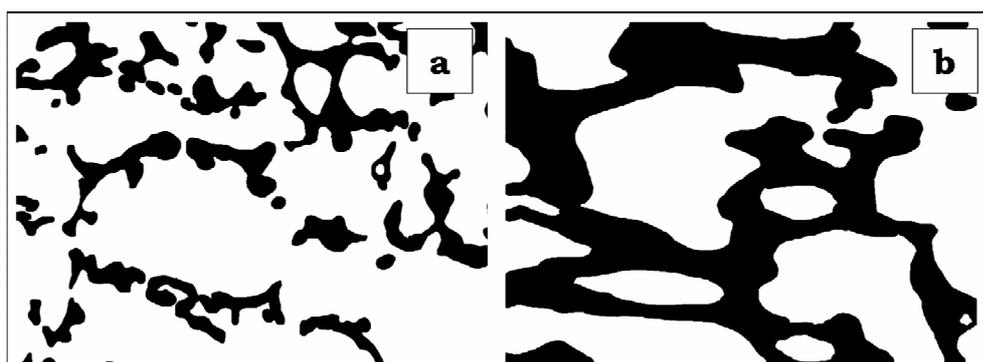


Figura 42 – Immagini binarie ottenute a partire dalle micrografie al SEM di figura 41a e b ed impiegate per la determinazione delle percentuali volumetriche delle due fasi espanse.

L'impiego di tale tipologia di analisi è comunque strettamente vincolata dalla tipologia di campioni da analizzare. [108, 109] Nel caso dei sistemi presi in esame, le due fasi espanse risultano infatti ben distinguibili ed è quindi possibile definirne con precisione i contorni. Inoltre, l'ingrandimento dell'immagine deve essere selezionato opportunamente in relazione al giusto compromesso fra la risoluzione dei contorni delle due fasi e la dimensione media delle fasi stesse. Per poter considerare la frazione superficiale di TG espansa coincidente con la sua percentuale volumetrica, è infatti necessario che la superficie di analisi sia sufficientemente maggiore della dimensione media delle fasi. [108, 109] L'analisi delle immagini è stata inoltre impiegata anche per la valutazione della porosità presente nella fase PCL espansa. Nella tabella 13 sono riportati i risultati delle misure effettuate sui due campioni di figura 41, sia in termini di frazione volumetrica di TG espansa, sia in termini di dimensione media dei pori delle due fasi.

Tabella 13 - Condizioni di espansione e risultati dell'analisi delle immagini dei campioni di figura 41.

Camp.	%wt di TG	Agente espandente [vol%]	$T_F$ [°C]	PDR [bar/s]	%vol di TG espansa	$D_c$ PCL [ $\mu\text{m}$ ]	$D_c$ TG [ $\mu\text{m}$ ]
A	40	20-80 CO <sub>2</sub> -N <sub>2</sub>	40	700	0.22	38 ± 11.9	7 ± 5.1
B	60	20-80 CO <sub>2</sub> -N <sub>2</sub>	40	700	0.48	40 ± 12.5	14 ± 8.8

I risultati dell'analisi delle immagini effettuata sulle miscele PCL/TG espanse, riportati in tabella 13 (prova #2 tabella 11) mostrano che nel passaggio da una concentrazione ponderale di TG dal 40 al 60%, la frazione volumetrica di TG aumenta proporzionalmente più del doppio. Questo risultato è molto importante in quanto la porosità totale dello scaffold è pari alla somma della macroporosità prodotta dall'estrazione del templante e della microporosità indotta dal processo di foaming. Una percentuale ponderale di agente templante del 60% produce infatti una frazione di macroporosità pari a 0.48, troppo elevata quindi per garantire la preparazione di scaffold con proprietà meccaniche idonee alla rigenerazione dei tessuti duri.

In considerazione della sostanziale invarianza della microstruttura ottenuta nel PCL al variare della composizione della miscela ( $D_c \sim 40\mu\text{m}$ ), l'ottimizzazione delle condizioni di gas foaming per la preparazione degli scaffold è stata effettuata a partire dalle miscele PCL/TG<sub>60/40</sub>.

➤ *Effetto della  $T_F$*

Al fine di ottimizzare l'interconnessione della microporosità prodotta dal gas foaming, lo studio del processo di foaming delle miscele PCL/TG è proseguito nella valutazione dell'effetto della  $T_F$  sulle proprietà microstrutturali delle miscele polimeriche espanse.

In figura 43 sono riportate le micrografie al SEM delle miscele PCL/TG espanse ad una temperatura inferiore (figure a e c) e superiore alla temperatura di fusione del PCL (figura b).

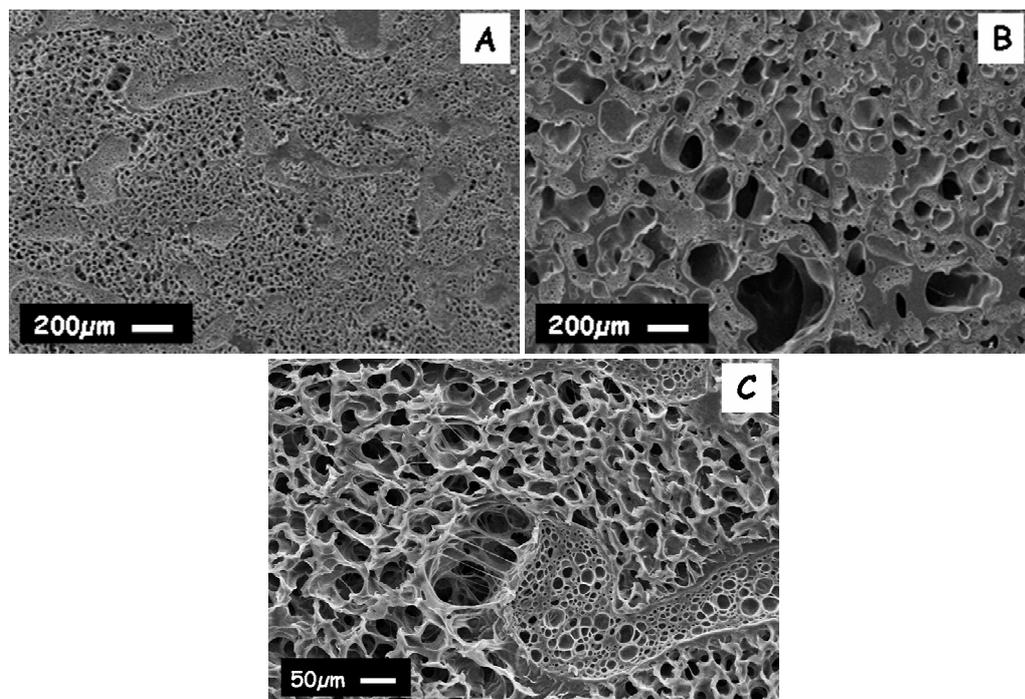


Figura 43 – Morfologia della miscela PCL/TG<sub>60/40</sub> espansa due differenti  $T_F$ : (a) 44°C (prova #4, tabella 10); (b) 70°C (prova #7) e (c) alto ingrandimento del campione (a).

Osservando le micrografie al SEM riportate in figura 43 è possibile notare immediatamente l'importante effetto della  $T_F$  sulla microstruttura delle miscele espanse. Come osservato anche in figura 41, quando la  $T_F$  è inferiore alla temperatura di fusione del PCL (figura 43a), è possibile distinguere la presenza di due fasi espanse caratterizzate da una morfologia cellulare omogenea. Inoltre, l'incremento della  $T_F$  a 44°C ha portato all'ottenimento di un elevato grado di interconnessione della microporosità nella fase di PCL espansa. Questo aspetto è ancor più evidente dall'analisi dell'alto ingrandimento di figura 43c. Infatti, in tali condizioni di espansione è stato possibile ottenere una ottimale interconnessione dei pori del PCL, favorita anche dall'interfaccia fra le due fasi che agisce da elemento di nucleazione eterogenea, promuovendo l'apertura delle pareti dei pori. [99] La morfologia delle miscele preparate ad una  $T_F$  superiore alla temperatura di fusione del PCL (70°C, figura 43b), risulta invece profondamente differente. Infatti, a tale temperatura, la TG è in grado di espandere e stabilizzare la struttura porosa (vedi paragrafo relativo allo studio dei processi di espansione della TG), mentre il PCL espande e immediatamente collassa all'interfaccia fra le due fasi. Questo fenomeno è legato al fatto che la  $T_F$  è troppo elevata per permettere stabilizzazione della struttura cellulare durante l'espansione e di conseguenza il PCL espanso collassa senza cristallizzare. La morfologia della fase PCL è quindi caratterizzata dalla presenza di pori di dimensioni paragonabili a quelle dei domini del polimero non espanso. I risultati dell'analisi delle immagini effettuata sui campioni ottenuti alle due differenti temperature sono riportati nella tabella 14.

Tabella 14 - Condizioni di espansione e risultati dell'analisi delle immagini dei campioni di figura 43.

Camp.	%wt di TG	Agente espandente [vol%]	$T_F$ [°C]	PDR [bar/s]	%vol di TG espansa	$D_c$ PCL [ $\mu$ m]	$D_c$ TG [ $\mu$ m]
A	40	20-80 CO <sub>2</sub> -N <sub>2</sub>	44	700	0.26	44 ± 11.1	14 ± 5.2
B	60	20-80 CO <sub>2</sub> -N <sub>2</sub>	70	700	0.33	203 ± 99	12 ± 6.7

I risultati dell'analisi delle immagini mostrano che l'aumento di  $T_F$  induce un aumento della frazione volumetrica di TG espansa, in quanto la TG presenta temperature di foaming sensibilmente più elevate di quelle relative al PCL. Inoltre, l'effetto del collasso della struttura cellulare del PCL porta alla formazione pori nella fase PCL di dimensioni medie molto elevate (203 ± 99) e caratterizzati da una distribuzione dimensionale molto ampia. Tuttavia, anche nel caso di  $T_F$  superiori alla temperatura di fusione del PCL è possibile ottenere in tale polimero una

porosità interconnessa. L'effetto della tipologia di agente espandente e della velocità di caduta di pressione è stato investigato ed analizzato secondo la medesima procedura impiegata per la composizione della miscela polimerica e la  $T_F$ . Tuttavia, non avendo fornito risultati particolarmente interessanti nell'ottica della realizzazione degli scaffold di PCL, è stata tralasciata in questa sede e rimandata alla trattazione riportata nella pubblicazione relativa. [110]

#### 4.3.4 PREPARAZIONE DEGLI SCAFFOLD PER ESTRAZIONE SELETTIVA DELLA TG DALLE MISCELE ESPANSE

Lo studio del processo di espansione delle miscele PCL/TG ha permesso di ottimizzare le condizioni di miscelazione prima e di espansione poi, per controllare opportunamente le proprietà microstrutturali degli scaffold. In particolare, dei campioni preparati sono stati selezionati quelli ritenuti maggiormente idonei all'estrazione selettiva della TG dalle miscele espanse per la preparazione degli scaffold.

##### ➤ *Estrazione della TG*

Il protocollo ottimizzato per l'estrazione della TG dalle miscele PCL/TG non espanse è stato impiegato anche per l'estrazione del templante continuo dalle miscele espanse. Tuttavia, risulta importante considerare che il processo di solubilizzazione-espansione induce profonde modifiche nella microstruttura della miscela polimerica e tale effetto può modificare il range di composizione di co-continuità dei campioni espansi. Al fine, quindi, di verificare la completa estrazione del templante continuo anche dalle miscele espanse, sono state effettuate misure gravimetriche sugli espansi. I risultati di tali misure sono riportati in figura 44.

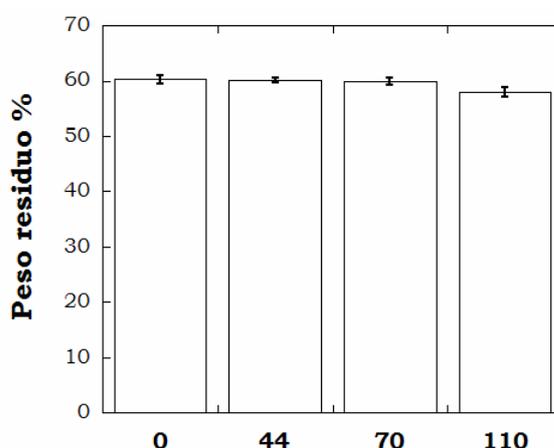


Figura 44 – Misure di estrazione della TG dalle miscele PCL/TG espanse a differenti  $T_F$ .

Le misure di dissoluzione dell'agente templante mostrano che il processo di estrazione selettiva della TG non subisce significative variazioni in seguito alla fase di foaming. In effetti, come riportato dalle

misure di peso residuo degli espansi, per tutte le condizioni di espansione selezionate è possibile ottenere un peso residuo percentuale corrispondente con la percentuale di PCL all'interno della miscela di partenza. Questo aspetto è stato verificato sia per gli espansi ottenuti impiegando una  $T_F$  inferiore alla temperatura di fusione del PCL, sia per  $T_F$  nell'intervallo 70-110°C. Tali temperature di espansione sono infatti quelle selezionate per la preparazione degli scaffold di PCL. Un ulteriore aspetto che è stato valutato è quello relativo all'estrazione della TG dalle miscele contenenti le due differenti tipologie di HAP selezionate per la preparazione degli scaffold PCL-HAP. In figura 45 è riportato il risultato ottenuto dalle misure di estrazione effettuate sulle miscele composite PCL/nHAP e PCL/mHAP.

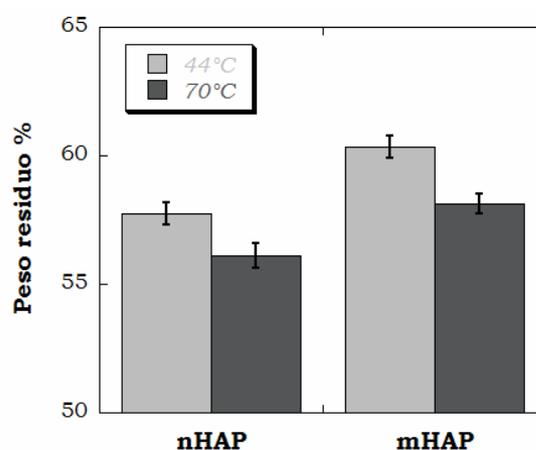


Figura 45 – Estrazione selettiva della TG dalle miscele PCL/TG contenenti le due differenti tipologie di HAP, espanso alla  $T_F$  di 44 e 70°C.

Le misure di dissoluzione delle miscele mostrano alcuni risultati importanti:

1. Considerando che le miscele sono state ottenute miscelando l'HAP prima con il PCL (in una concentrazione ponderale pari al 5%) e poi il composito con il 40% in peso di TG, ci si aspetterebbe un peso residuo pari al 60%. Come si può osservare dalla figura 45, tale valore si ottiene solamente nel caso degli scaffold ottenuti a  $T_F=44^\circ\text{C}$  e con l'impiego di HAP di dimensioni micrometriche. Questo risultato dipende dalla tendenza del filler a migrare all'interno della fase TG. Di conseguenza, in seguito all'estrazione dell'agente templante, parte dell'HAP viene inevitabilmente estratta dagli scaffold.
2. La differente dimensione delle particelle di HAP influenza la sua incorporazione negli scaffold. Per l'nHAP infatti, gran parte del materiale inorganico diffuso nella fase TG viene rimosso dagli scaffold durante la fase di estrazione del templante. Nel caso dell'mHAP invece, la maggiore dimensione del filler ne ostacola la diffusione dalla struttura porosa.

3. La percentuale di HAP all'interno degli scaffold è dipendente anche dalle condizioni di preparazione. Infatti, le strutture ottenute a  $T_F=44^\circ\text{C}$ , come vedremo più in dettaglio fra poco, risultano caratterizzate da una elevata percentuale di microporosità che limita la diffusione del filler inorganico all'esterno. Viceversa, i sistemi ottenuti a  $T_F=70^\circ\text{C}$  presentano una porosità di dimensioni maggiori e quindi permettono una maggiore fuoriuscita dell'HAP via dallo scaffold.

In relazione alla complessità dei sistemi preparati impiegando le due differenti tipologie di HAP, si è ritenuto utile confermare i risultati delle misure gravimetriche attraverso una analisi alla TGA. I risultati di tale analisi, effettuata sui sistemi ottenuti a  $T_F=44^\circ\text{C}$  ed al termine del processo di estrazione della TG, sono riportati nella tabella 15.

Tabella 15 – Peso residuo ricavato a  $750^\circ\text{C}$  mediante analisi TGA effettuate sugli scaffold ottenuti a  $T_F = 44^\circ\text{C}$  ed impiegando le due differenti tipologie di HAP selezionate.

Sample ( $T_F=44^\circ\text{C}$ )	Residual weight %
PCL/TG	0.245±0.151
PCL/TG/mHAP	5.607±0.692
PCL/TG/nHAP	1.661±0.191

In considerazione del fatto che le due tipologie di HAP non subiscono variazioni di peso significative alla temperatura di valutazione del peso residuo, la percentuale riportata nella tabella 15 è un indice della percentuale ponderale di HAP nello scaffold, a meno del residuo prodotto in seguito alla degradazione termica del PCL. I dati riportati in tabella 15 sono in accordo con i valori delle misure gravimetriche di figura 45 e mostrano chiaramente l'effetto della dimensione delle particelle sulla capacità di incorporazione del filler nello scaffold. Nel caso dell'nHAP, l'efficienza di incorporazione, definita come il rapporto percentuale fra la quantità rimasta e quella iniziale, risulta pari al 30% circa. Per i sistemi ottenuti a partire dai granuli di HAP, l'efficienza di incorporazione risulta invece pari al 100%. Nel caso quindi della preparazione di scaffold contenenti filler osteoinduttivi mediante la tecnica del gas foaming/continuous templating, l'impiego di un elemento ceramico di dimensioni micrometriche risulta preferibile.

#### ➤ *Morfologia*

Una volta individuate le condizioni di processo idonee alla preparazione di scaffold di PCL per applicazioni di rigenerazione tissutale e verificata la possibilità di ottenere la completa estrazione dell'agente templante, l'attività di ricerca è stata indirizzata alla caratterizzazione delle proprietà morfologico/strutturali degli scaffold. In

particolare, da quanto emerso nello studio dei processi di espansione delle miscele, sono state individuate due differenti classi di scaffold, in relazione alle caratteristiche della porosità ottenuta nella fase PCL. Alla prima classe appartengono gli scaffold preparati selezionando una  $T_F$  inferiore alla temperatura di fusione del PCL e in particolare pari a  $44^\circ\text{C}$ . Alla seconda classe, invece, appartengono tutti gli scaffold preparati espandendo le miscele ad una temperatura superiore alla temperatura di fusione del PCL, nello specifico selezionata nell'intervallo  $70\text{-}110^\circ\text{C}$ . La trattazione delle proprietà degli scaffold verrà quindi effettuata parallelamente per le due differenti tipologie preparate.

In figura 46 sono riportati tre differenti ingrandimenti al SEM della superficie di taglio degli scaffold di PCL preparati impiegando una  $T_F = 44^\circ\text{C}$ .

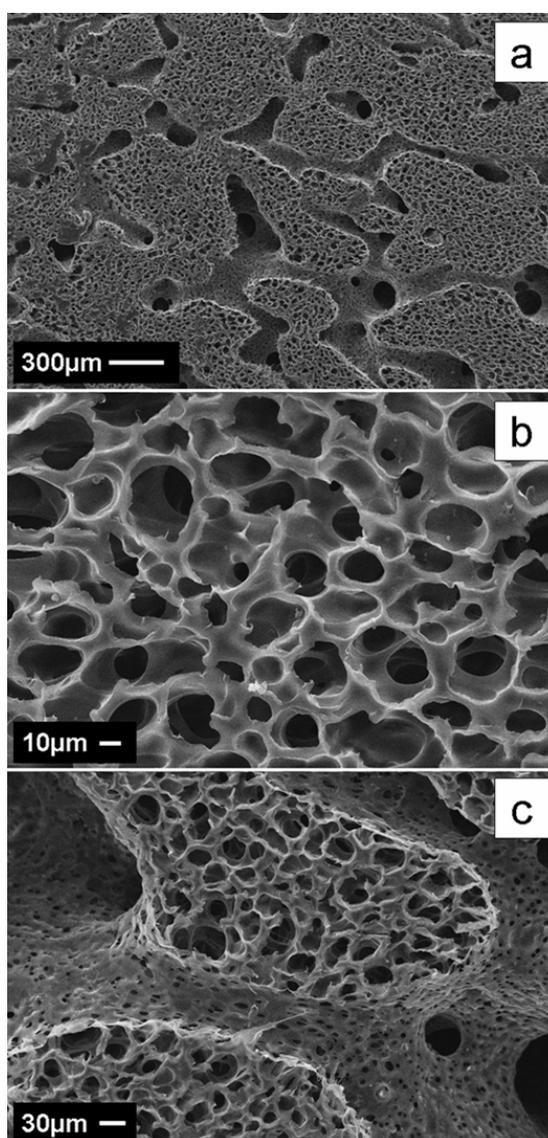


Figura 46 – Micrografie al SEM degli scaffold di PCL ottenuti impiegando una  $T_F = 44^\circ\text{C}$ : (a) 100X; (b) 1100X; (c) 400X.

Dall'analisi della morfologia degli scaffold è possibile evidenziare che:

1. Attraverso la tecnica del gas foaming/continuous templating è possibile realizzare scaffold di PCL caratterizzati da una struttura porosa su scale dimensionali e di forma differenti. In particolare, mediante l'estrazione selettiva dell'agente templante continuo si ottiene una macroporosità altamente interconnessa e di forma sostanzialmente allungata, che rispecchia la morfologia della fase TG espansa (figura 46a). La macroporosità risulta inoltre uniformemente distribuita all'interno dello scaffold ed interpenetrata con la microporosità creatasi per effetto del processo di foaming (figura 46b).
2. La microporosità indotta dall'espansione del gas è caratterizzata da un diametro medio dei pori pari a  $40\mu\text{m}$  ca. (come fornito dai risultati dell'analisi delle immagini riportati in tabella 14) e dotata di un ottimo grado di interconnessione, aspetto evidenziato in figura 46b.
3. La macroporosità e la microporosità ottenute costituiscono un unico network poroso interconnesso da una distribuzione omogenea di pori di piccole dimensioni ( $10\mu\text{m}$ ) all'interfaccia fra le due fasi (figura 46c). Tale porosità aggiuntiva è probabilmente prodotta a causa della rottura preferenziale delle pareti dei pori che si generano in seguito all'espansione del gas all'interfaccia fra le due fasi polimeriche.

L'analisi morfologica degli scaffold preparati in queste condizioni di processo fornisce delle informazioni importantissime in merito alle proprietà microstrutturali ottenibili con questa innovativa tecnologia di processo. In effetti, l'idea di partenza di tale studio è la possibilità di realizzare scaffold capaci di fornire un adeguato substrato per l'adesione, la proliferazione e la biosintesi cellulare, ed al contempo garantire il necessario apporto di nutrienti per le cellule e la diffusione dei rifiuti metabolici, durante tutto il periodo di coltura cellulare. Uno scaffold provvisto di una morfologia come quella riportata in figura 46 può effettivamente rispondere a queste esigenze in quanto la macroporosità è idonea ai processi di adesione cellulare, mentre la microporosità può rappresentare una via preferenziale per la diffusione dei fluidi. Infatti, le dimensioni medie dei pori prodotti dall'espansione del gas e l'elevata tortuosità della microporosità possono ostacolare la penetrazione cellulare e di conseguenza garantire la presenza continua di un network poroso per il trasporto dei fluidi. Infine, l'interconnessione tra queste due differenti scale di porosità garantisce la diffusione di ossigeno e nutrienti verso le cellule e la diffusione dei rifiuti metabolici all'esterno, anche nelle fasi avanzate dello sviluppo del neo-tessuto.

La morfologia degli scaffold ottenuti impiegando una  $T_F$  al di sopra della temperatura di fusione del PCL è invece riportata nella figura 47.

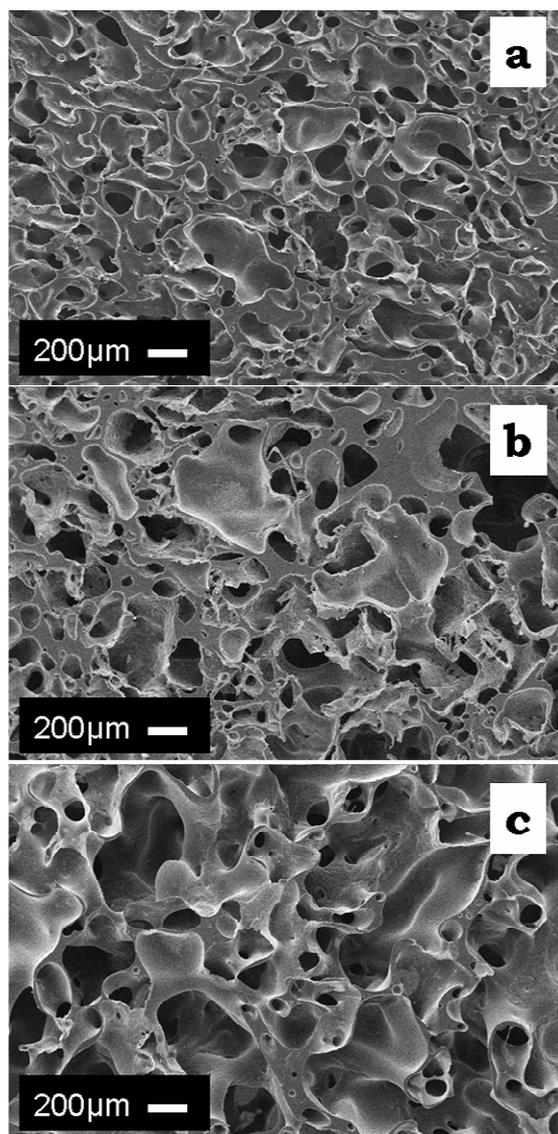


Figura 47 – Micrografie al SEM degli scaffold ottenuti impiegando una  $T_F$  superiore alla temperatura di fusione del PCL: (a) 70°C; (b) 106°C; (c) 110°C.

Come descritto nell'analisi della morfologia delle miscele PCL/TG in cui il processo di espansione del gas è effettuato mentre il PCL è allo stato fuso, in tali condizioni tale polimero si espande e immediatamente si contrae all'interfaccia con la TG, la quale è invece in grado di stabilizzare la struttura porosa. Per tale motivo, la porosità nella fase PCL assume dimensioni dello stesso ordine di grandezza della macroporosità che si ottiene in seguito all'estrazione della TG. Inoltre, la forma dei pori rispecchia quella dell'interfaccia fra le fasi e, appare quindi allungata e non più sferica. Questo aspetto è chiaramente evidente nelle micrografie al SEM di figura 47. Tuttavia, si può osservare che la variazione della  $T_F$  produce scaffold caratterizzati da una microstruttura differente. Se si confrontano ad esempio le figure 47a, b e c relative a scaffold preparati impiegando temperature di espansione crescenti, si può notare che al

crescere della  $T_F$  cresce anche la frazione e la dimensione dei vuoti all'interno degli scaffold. In effetti, in seguito all'espansione del gas, il PCL è allo stato fuso e collassa sulla fase TG. Tuttavia, la caduta di pressione indotta nel sistema, esercita una importante deformazione anche del network dell'agente templante. Questa deformazione dipende in maniera rilevante dalla  $T_F$  ed aumenta all'aumentare della temperatura poiché diminuisce la rigidezza della fase TG. Gli espansi preparati a temperature più elevate risultano quindi caratterizzati da una porosità e una dimensione media dei pori maggiori. Inoltre, per tutte le condizioni di processo selezionate è possibile evidenziare la formazione di scaffold con una unica scala dimensionale dei pori e un buon grado di interconnessione, come evidenziato nelle micrografie di Figura 47.

Le analisi morfologiche hanno quindi evidenziato la grande flessibilità di tale tecnica di processo nell'ingegnerizzazione di scaffold di PCL con proprietà morfologiche altamente controllate anche su scale dimensionali differenti. Nell'ottica di una sempre maggiore biocompatibilità di tali sistemi, si è ritenuto importante valutare la possibilità di incorporare all'interno degli scaffold le due differenti tipologie di HAP selezionate. In figura 48 sono riportate le micrografie al SEM dei sistemi preparati impiegando una percentuale ponderale di HAP pari al 5% in peso rispetto al PCL, per le due differenti tipologie e per una  $T_F$  pari a 44 e 70°C.

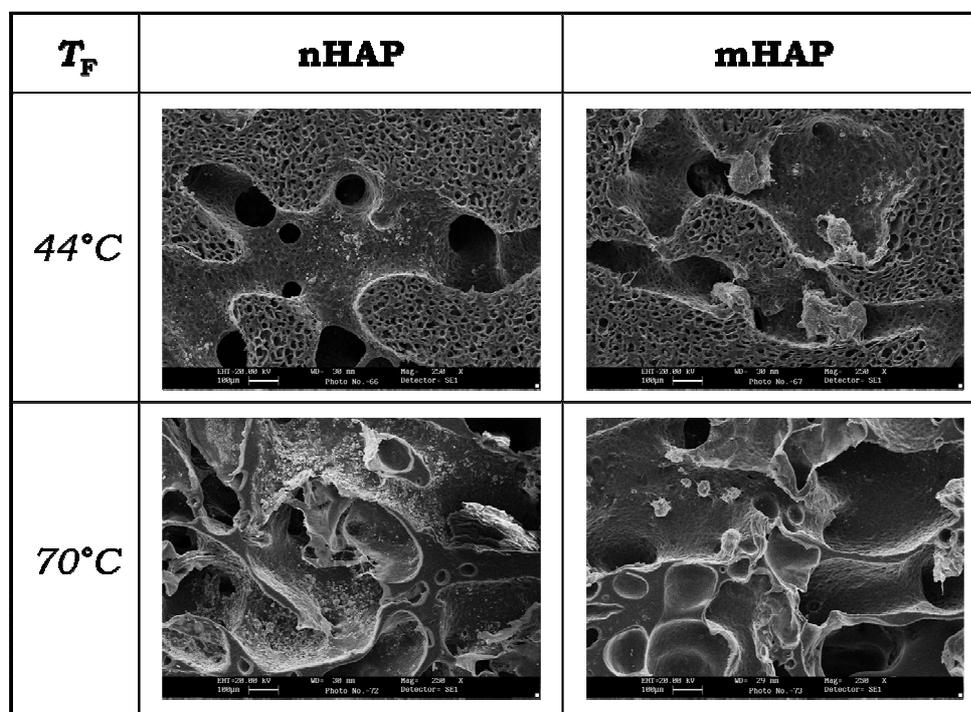


Figura 48 – Micrografie al SEM degli scaffold ottenuti impiegando le due differenti tipologie di HAP ed ottenuti alle temperature di espansione di 44 e 70°C.

Le immagini al SEM mostrano chiaramente la presenza del filler inorganico all'interno degli scaffold. Tuttavia, come evidenziato dalle misure gravimetriche, l'nHAP tende maggiormente a diffondere fuori dallo scaffold rispetto all'mHAP. Questo aspetto è evidente per i sistemi ottenuti a  $T_F=44^\circ\text{C}$ , mentre nel caso dei sistemi espansi a  $T_F=70^\circ\text{C}$ , si osserva la presenza di un buon quantitativo di nHAP all'interno dei pori. In realtà, l'immagine riportata è rappresentativa di una piccola regione dello scaffold e dall'analisi delle altre zone, si è osservata una scarsa o quasi nulla presenza di nHAP nello scaffold. Le morfologie riportate nella Figura 48, evidenziano comunque che la tecnologia implementata permette anche la realizzazione di scaffold compositi contenenti filler inorganici.

➤ *Porosità e proprietà meccaniche*

Successivamente alla caratterizzazione delle proprietà morfologiche degli scaffold, l'attività di ricerca è proseguita con la valutazione della porosità e delle proprietà meccaniche dei sistemi preparati. Anche in questo caso verranno illustrate prima le proprietà relative ai sistemi ottenuti a  $T_F=44^\circ\text{C}$  e successivamente verranno analizzati i sistemi preparati a temperature superiori alla temperatura di fusione del PCL. Nella tabella 16 sono indicate le caratteristiche della porosità ottenuta a  $T_F=44^\circ\text{C}$ .

Tabella 16 - Porosità totale e distribuzione dimensionale dei pori per gli scaffold di PCL ottenuti a  $T_F=44^\circ\text{C}$

% porosità totale	% porosità 40 $\mu\text{m}$ (gas foaming)	% porosità >100 $\mu\text{m}$ (estrazione della TG)
$61 \pm 1.5$	56	43

I valori riportati nella tabella 16 mostrano che gli scaffold preparati a  $T_F=44^\circ\text{C}$  sono caratterizzati da una porosità totale pari a 61%. Tale valore di porosità è significativamente inferiore ai valori che comunemente vengono riportati per gli scaffold preparati con le altre tecniche di processo, generalmente dell'ordine del 90–95%. Nel capitolo introduttivo è stato già discusso che la porosità totale non rappresenta di per sé un parametro chiave nello scaffold design. In effetti, gli elevati valori di porosità che generalmente vengono richiesti per gli scaffold sono sostanzialmente legati alle problematiche di trasporto e di interconnessione della porosità. Come evidenziato dall'analisi morfologica, gli scaffold preparati a  $T_F=44^\circ\text{C}$  risultano caratterizzati da una porosità su due differenti scale dimensionali e dotata di un elevato grado di interconnessione. Alla base di questa tecnica vi è infatti l'obiettivo di realizzare uno scaffold in cui il trasporto dei fluidi necessari per le cellule viene garantito costantemente dalla microporosità, che impedisce una massiva invasione cellulare. I valori riportati nella tabella

16 evidenziano inoltre che la distribuzione volumetrica percentuale delle due differenti scale di porosità risulta paragonabile, a conferma del fatto che il network microporoso non rappresenta una semplice porosità di interconnessione ma garantisce in ogni istante del processo di rigenerazione del neo-tessuto la presenza di vie preferenziali di diffusione per i nutrienti, l'ossigeno ed i rifiuti metabolici.

Nella figura 49 è riportata la curva sforzo-deformazione relativa ad una prova di compressione statica effettuata sugli scaffold preparati alla  $T_F=44^\circ\text{C}$ . Dall'analisi dell'andamento della caratteristica sforzo-deformazione di questi sistemi è possibile osservare il positivo effetto della ridotta porosità sulle proprietà meccaniche. In particolare, tali scaffold risultano caratterizzati da un primo tratto elastico-lineare in cui il modulo elastico  $E$  ha un valore medio pari a 9.6 MPa. Una volta superato il limite di elasticità del sistema, la caratteristica non presenta il tipico plateau legato al collasso delle pareti dei pori per l'instabilità flessionale, [70] ma lo sforzo ( $\sigma$ ) continua a crescere, solo con una pendenza minore. Il motivo di ciò è da ricercarsi nel basso valore di porosità totale degli scaffold i quali rispondono meglio alla sollecitazione meccanica indotta. Il tratto finale della curva, che inizia a deformazioni ( $\epsilon$ ) dell'ordine del 50% ca., è rappresentativo invece della densificazione del sistema in cui, lo schiacciamento delle celle porta alla sollecitazione diretta del materiale costituente lo scaffold.

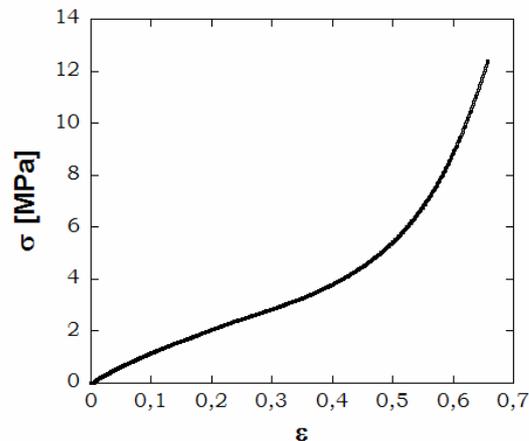


Figura 49 – Curva  $\sigma$ - $\epsilon$  per una prova di compressione statica degli scaffold ottenuti a  $T_F=44^\circ\text{C}$ .

Nella figura 50, sono riportati i risultati delle misure di porosità e proprietà meccaniche degli scaffold preparati ad una  $T_F$  superiore alla temperatura di fusione del PCL. A conferma di quanto evidenziato dalle analisi morfologiche, le misure di porosità (figura 50a) mostrano che è possibile controllare la porosità totale  $\Phi$  degli scaffold attraverso la selezione di differenti temperature di espansione. In particolare,  $\Phi$  aumenta dal 60 al 90% quando la  $T_F$  passa da 70 a 110°C, con una curva di crescita di tipo parabolico.

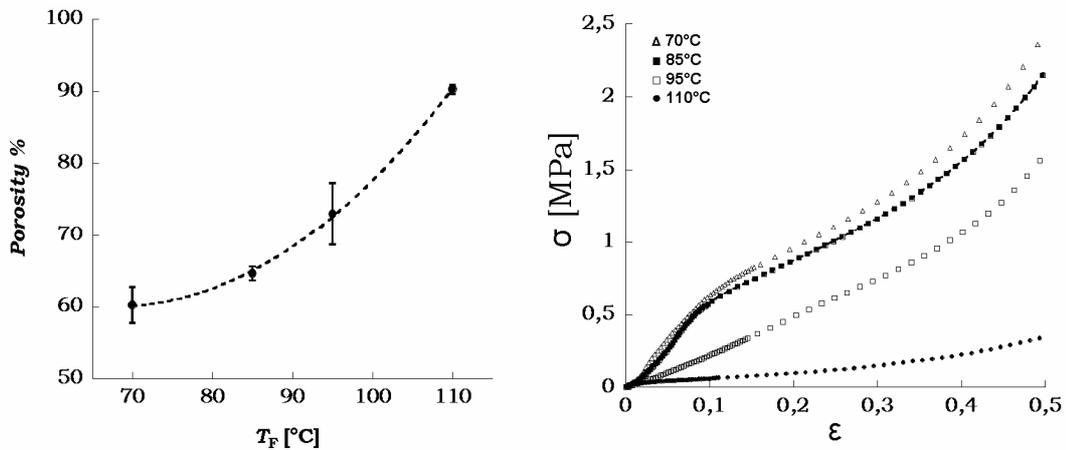


Figura 50 – Porosità e proprietà meccaniche degli scaffold ottenuti per  $T_F$  nell'intervallo 70 -110°C.

L'effetto della  $T_F$  si manifesta in maniera inversa sulle proprietà meccaniche, come evidenziato dalle curve  $\sigma$ - $\epsilon$  di figura 50b. Si può infatti osservare una progressiva traslazione verso il basso della caratteristica  $\sigma$ - $\epsilon$  quando la temperatura di espansione aumenta, con  $E$  che passa da 10 a 1.7Mpa rispettivamente. Inoltre, gli scaffold ottenuti a  $T_F=110^\circ\text{C}$ , per cui la porosità totale è dell'ordine del 90%, evidenziano la presenza del plateau tra la regione di elasticità lineare e quella relativa alla densificazione. Per tali scaffold inoltre la fase di densificazione inizia a valori di deformazione molto più elevati (superiori al 50%), rispetto alle altre tipologie di scaffold.

#### ➤ *Biocompatibilità*

La caratterizzazione degli scaffold preparati è stata completata mediante la valutazione della capacità di tali sistemi di promuovere i processi di adesione e proliferazione cellulare e per valutare inoltre la capacità degli scaffold di favorire la penetrazione delle cellule all'interno del network poroso. Come tipologia di scaffold da impiegare per tale caratterizzazione è stato selezionato quello ottenuto ad una  $T_F=44^\circ\text{C}$  in quanto ritenuto maggiormente idoneo per le applicazioni di rigenerazione tissutale. La caratterizzazione è stata effettuata impiegando cellule staminali mesenchimali (msc) che sono state seminate sulla superficie dello scaffold e coltivate in maniera statica per un tempo complessivo pari 4 settimane.

La valutazione della capacità proliferativa delle cellule è stata effettuata mediante un saggio colorimetrico, l'Alamar blu. I dati di proliferazione sono stati valutati inizialmente a 24 ore dalla semina e successivamente ad intervalli settimanali. In figura 51 sono mostrati i risultati della proliferazione cellulare sugli scaffold.

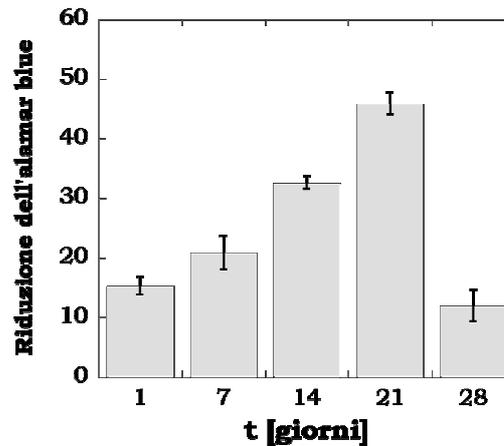


Figura 51 – Curva di proliferazione delle msc sugli scaffold di PCL ottenuti a  $T_F=44^\circ\text{C}$ .

I risultati dei test di proliferazione cellulare mostrano alcune proprietà importanti degli scaffold preparati:

1. La tecnologia di processo implementata permette di realizzare scaffold biodegradabili capaci di promuovere i processi di adesione e proliferazione cellulare anche per tempi di coltura cellulare relativamente lunghi.
2. Rispetto al numero di cellule aderite sullo scaffold, individuato dal valore ad 1 giorno, si osserva un progressivo incremento della proliferazione cellulare, fino ad un valore pari a tre volte quello iniziale, dopo 21 giorni di coltura. Quando tuttavia la fase di coltura arriva a 28 giorni, la proliferazione cellulare diminuisce fortemente.
3. La riduzione della capacità proliferativa delle cellule può essere legata a due aspetti fondamentali. In primo luogo, l'elevato numero di cellule impiegate rispetto alla superficie di adesione disponibile porta alla confluenza dopo tre settimane di coltura. Di conseguenza, la capacità proliferativa diminuisce. Inoltre, le cellule tendono a penetrare maggiormente all'interno della struttura porosa, con la conseguenza di una riduzione del contributo di tali cellule alla misura.

Le prove di proliferazione cellulare hanno quindi fornito importanti risultati quantitativi in merito alla capacità degli scaffold preparati di essere impiegati per la rigenerazione tissutale. Per avere informazioni sulle caratteristiche morfologiche delle cellule adese sugli scaffold, sui campioni in coltura sono state effettuate delle analisi al microscopio confocale ed al SEM.

Nelle figure 52 e 53 sono riportate le immagini al microscopio confocale dei campioni, ottenute per i differenti tempi di coltura analizzati.

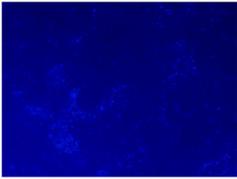
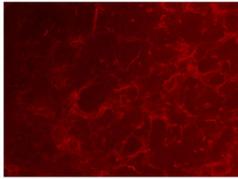
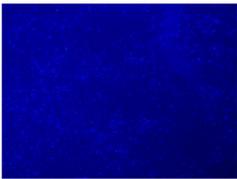
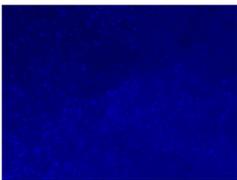
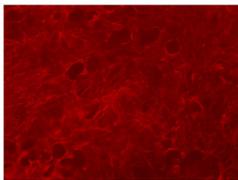
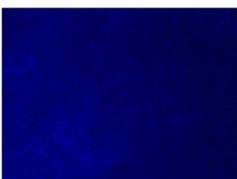
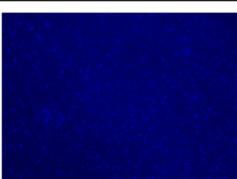
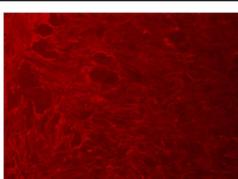
Tempo di coltura	Nuclei (4X)	Citoscheletro (4X)
1 giorno		
7 giorni		
14 giorni		
21 giorni		
28 giorni		

Figura 52 – Immagini al microscopio confocale dei nuclei (blu) e del citoscheletro (rosso) delle msc coltivate su scaffold di PCL a differenti tempi di coltura: basso ingrandimento (4X).

I risultati delle analisi al microscopio confocale risultano in buon accordo con quanto osservato dalle analisi di proliferazione cellulare. In effetti, osservando le immagini a basso ingrandimento di figura 52 si nota un significativo incremento del numero di nuclei delle cellule nel passaggio ad esempio dal tempo zero (1 giorno) progressivamente fino al tempo di 28 giorni. Allo stesso modo, anche la fluorescenza indotta dalla colorazione del citoscheletro aumenta, fino a che risulta sempre più difficile distinguere la superficie opaca dello scaffold sottostante le cellule. Informazioni interessanti sulla morfologia cellulare emergono anche dall'analisi degli alti ingrandimenti (20X) riportati in figura 53.

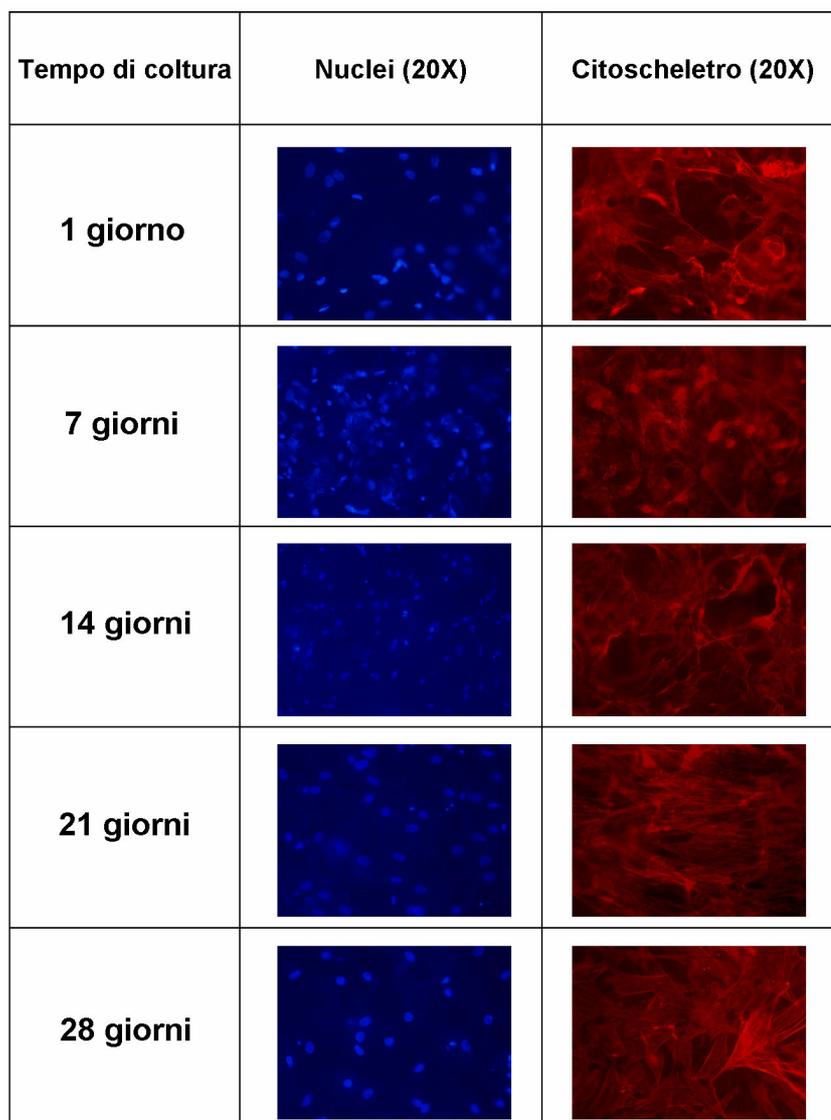


Figura 53 – Immagini al microscopio confocale dei nuclei (blu) e del citoscheletro (rosso) delle msc coltivate su scaffold bimodali di PCL a differenti tempi di coltura: alto ingrandimento (20X).

Già dopo 1 giorno di semina è possibile notare che le cellule tendono ad occupare tutto lo spazio a loro disposizione, sia nelle regioni superficiali che in quelle più interne. Inoltre, mentre fino a 14 giorni le cellule non mostrano alcuna orientazione nel disporsi sulla matrice porosa, già a partire da tre settimane è possibile osservare una tendenza delle cellule ad assumere una configurazione ordinata, tipica del raggiungimento della confluenza. Dopo 28 giorni di coltura cellulare, si osserva un netto cambiamento della morfologia cellulare: il citoscheletro infatti risulta maggiormente disteso e tra le cellule si manifestano maggiori punti di interazione-interpenetrazione. Il raggiungimento della confluenza cellulare dopo tre settimane di coltura è in accordo con i risultati ottenuti dalle analisi di proliferazione (figura 51).

Come ulteriore valutazione della distribuzione delle cellule sullo scaffold, le immagini acquisite al microscopio confocale del citoscheletro sono state elaborate mediante un software del microscopio, al fine di ottenere una ricostruzione tridimensionale delle cellule sullo scaffold. Tale ricostruzione viene effettuata per sovrapposizione di immagini acquisite ad una distanza relativa molto bassa, in questo caso pari  $5\mu\text{m}$ , rispetto alla superficie di esame. Dall'acquisizione quindi delle immagini a partire dalla superficie di semina verso l'interno dello scaffold è possibile valutare meglio l'adesione delle cellule all'interno dei pori che si affacciano sulla superficie. Il risultato della ricostruzione 3D è riportato in figura 54.

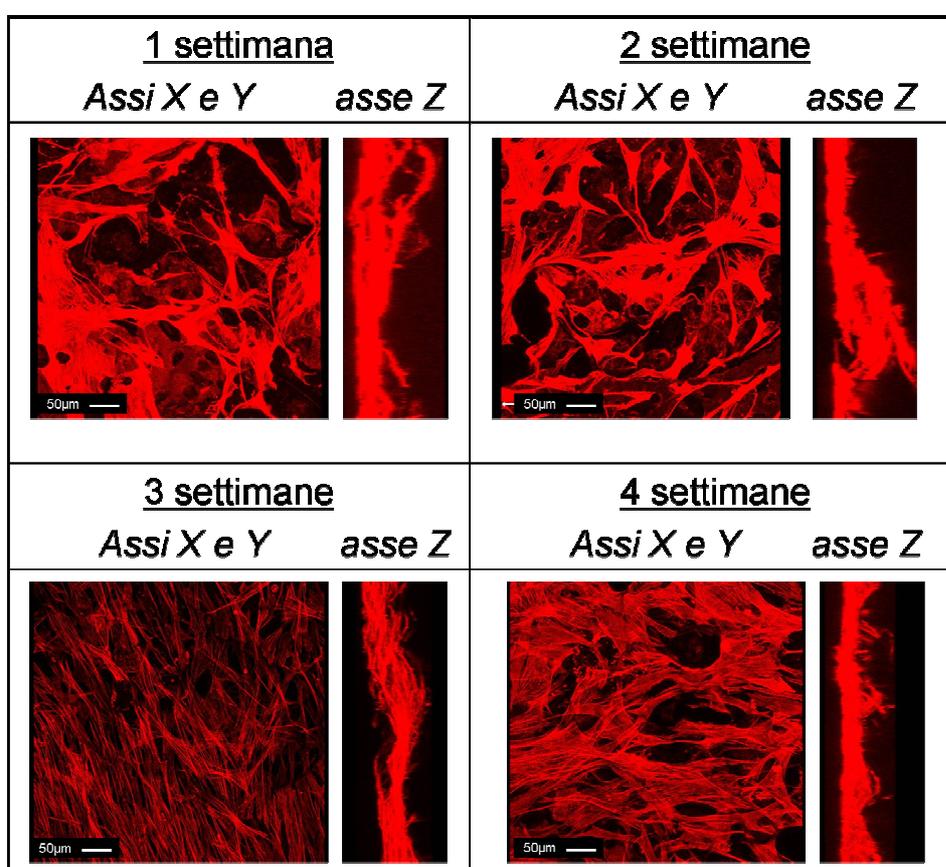


Figura 54 – Ricostruzioni 3D della distribuzione cellulare (citoscheletro) sullo scaffold a differenti tempi di coltura.

La ricostruzione in 3D del citoscheletro delle cellule evidenzia un progressivo incremento della densità cellulare con il tempo di coltura. La confluenza cellulare osservata dopo 21 giorni di coltura risulta anche in questo caso ben visibile. A quattro settimane si evidenzia inoltre il maggior appiattimento delle cellule, rappresentativo di una ottima adesione sulla superficie dei pori. Inoltre, dalla ricostruzione della distribuzione cellulare nella direzione ortogonale alla superficie di semina si può notare come le cellule abbiano aderito anche nella parte più interna della macroporosità che si espone sulla superficie.

Come ulteriore analisi del processo di proliferazione cellulare durante la fase di coltura, i campioni con le cellule sono stati analizzati mediante microscopio SEM. Tali analisi permette infatti di valutare la distribuzione delle cellule sullo scaffold, evidenziando meglio la morfologia del substrato su cui le cellule hanno aderito. In figura 55 sono riportati i risultati ottenuti a differenti tempi di coltura cellulare.

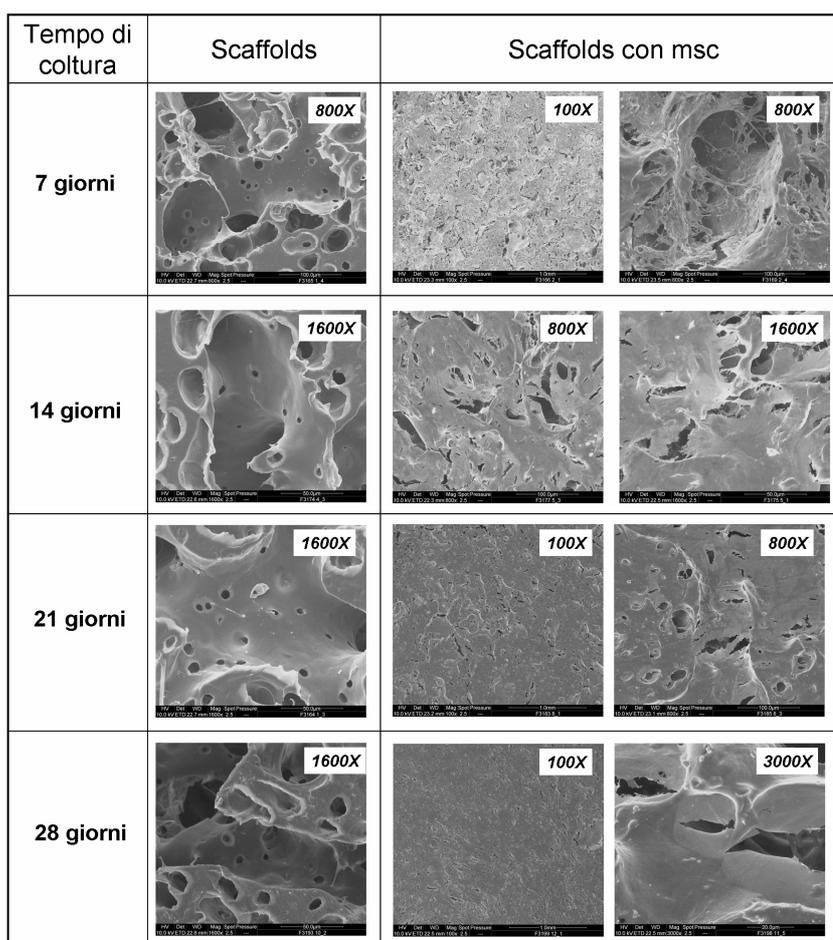


Figura 55 – Immagini al SEM delle msc sugli scaffold bimodali ai differenti intervalli di coltura cellulare in vitro.

Come si può osservare, la morfologia degli scaffold senza cellule rimane inalterata durante tutto il periodo di coltura cellulare. Osservando invece i campioni seminati, emergono interessanti risultati in merito alla adesione, morfologia e distribuzione cellulare. In primo luogo, il numero e la distribuzione delle cellule sugli scaffold cambia notevolmente fra i primi due intervalli di coltura (7 e 14 giorni) e quelli relativi al lungo termine (21 e 28 giorni). Le micrografie al SEM dei campioni dopo una settimana di coltura mostrano che le msc hanno aderito alle superfici dei pori dello scaffold, disponendosi sia sulla microporosità che all'interno della macroporosità. In merito alla distribuzione delle cellule all'interno della macroporosità, si osserva l'adesione sia lungo i bordi dei macropori che sulla loro superficie interna. Inoltre, le cellule tendono ad

allungarsi ed estendere i filopodi necessari alla migrazione ed alla trasmissione dei segnali di contatto con la superficie e con le altre cellule. All'aumentare del tempo di coltura, la proliferazione cellulare porta alla formazione di un neo-tessuto tende sempre più esteso che tende ad occupare tutta la superficie dello scaffold. L'analisi morfologica mostra infatti una progressiva scomparsa della porosità superficiale, fino a che a quattro settimane la porosità è completamente invasa dalle cellule e dalla matrice extracellulare. Le immagini ad alto ingrandimento evidenziano inoltre una profonda differenza nelle caratteristiche morfologiche del neo-tessuto formatosi. Se infatti nelle prime fasi della coltura le cellule sono sostanzialmente separate, pur mostrando la tendenza ad allungarsi e a stabilire punti di contatto, già a partire da 14 giorni si vengono a formare dei veri e propri manti cellulari. A 28 giorni, inoltre, il neo-tessuto risulta molto compatto anche se è possibile osservare al suo interno la presenza di alcune cellule, individuabili per via del nucleo sferico.

Per valutare la capacità dello scaffold di favorire la penetrazione cellulare, è stata analizzata una sezione dei campioni seminati con le cellule e tenuti in coltura per tempi lunghi. Nella figura 56 è riportata la micrografia al SEM della superficie-sezione del campione dopo 21 giorni di coltura cellulare *in vitro*.

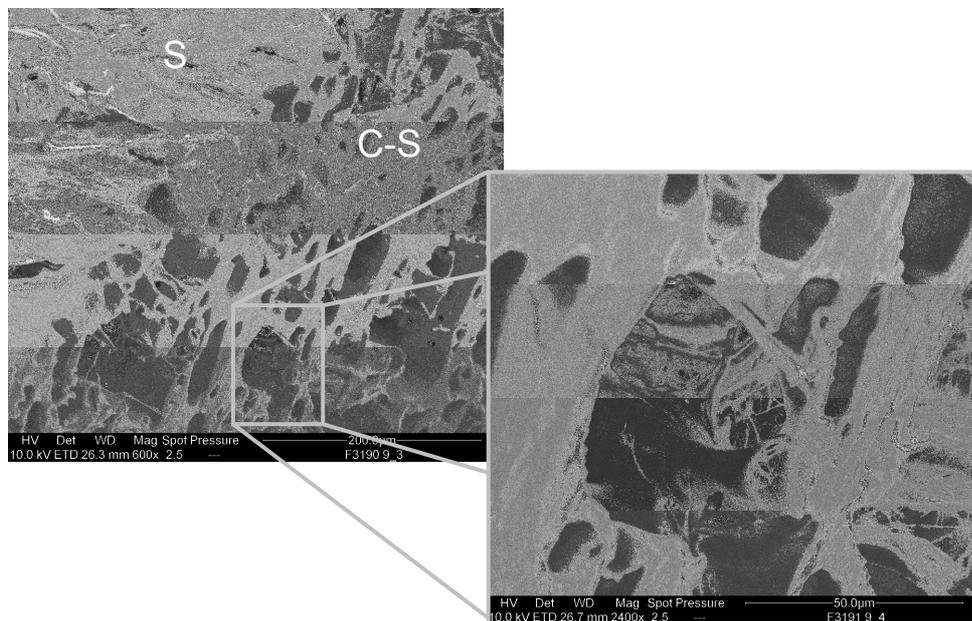


Figura 56 – Immagini al SEM della superficie-sezione di uno scaffold cellula rizzato, dopo 21 giorni di coltura statica *in vitro*.

Come illustrato nella figura 56, dopo 21 giorni di coltura la superficie dello scaffold (S) è caratterizzata dalla presenza di un tessuto cellulare che ricopre totalmente la porosità. Dall'analisi della sezione (C-S) dello scaffold si osserva inoltre la presenza di strutture cellulari simili a quelle osservate in superficie, anche a profondità significativamente elevate rispetto alla superficie di semina. Tali tessuti cellulari ricordano

dal punto di vista morfologico, quelli osservati sulla superficie dopo 7 giorni di coltura, caratterizzati dalla presenza di cellule altamente allungate e con molteplici punti di ancoraggio all'interno dei pori. Tale analisi conferma quindi la capacità degli scaffold preparati di favorire la migrazione cellulare anche nelle regioni più profonde, rispetto alla superficie di semina. In aggiunta, le cellule sono in grado di mantenersi vitali anche dopo 21 e 28 giorni di coltura cellulare statica *in vitro*.



# Capitolo 5

## **Discussione**

Lo scaffold design rappresenta una delle strategie chiave dell'ingegneria dei tessuti per la realizzazione di tessuti biologici *in vitro* e/o *in vivo*. In questo approccio lo scaffold ha un ruolo centrale nel guidare i processi di rigenerazione tissutale e definire quindi la funzionalità del neo-tessuto. Proprietà del materiale quali biocompatibilità, biodegradazione ed interazione specifica con le cellule sono fondamentali nel definire la funzionalità del neo-tessuto ingegnerizzato. Numerosi studi hanno infatti messo in luce l'importanza della microstruttura dello scaffold nel veicolare i processi biologici. In particolare, la realizzazione di scaffold caratterizzati da elevati rapporti superficie/volume, microstrutture opportunamente controllate e proprietà meccaniche adeguate al tessuto da rigenerare, rappresentano uno dei principali obiettivi dello scaffold design. [4, 6, 12, 30-32]

In questo lavoro di tesi, l'attenzione è stata focalizzata sull'individuazione di tecnologie atte a garantire un controllo fine delle proprietà morfologico/strutturali degli scaffold ed all'ottimizzazione delle condizioni di processo in relazione ai specifici sistemi impiegati. Come materiale principale per la realizzazione degli scaffold è stato selezionato il PCL, in virtù delle sue ottime proprietà di biocompatibilità accoppiate ad ottime caratteristiche di processabilità. [15, 57, 63] La tecnologia chiave selezionata per il controllo della microstruttura degli scaffold è invece il gas foaming, in virtù delle enormi potenzialità che tale tecnica di processo ha messo in luce nelle applicazioni dell'ingegneria dei tessuti. [33, 64]

A partire da quanto già ottenuto in ambito scientifico e, in considerazione della sempre crescente richiesta di scaffold caratterizzati da architetture porose altamente complesse, lo studio si è sviluppato nella direzione di un sempre maggior controllo delle proprietà microstrutturali degli scaffold. A tal fine, il gas foaming è stato combinato con la tecnica del reverse templating, basata sull'utilizzo di agenti templanti microparticellari (NaCl) o continui (TG). La tecnica del gas foaming infatti, pur garantendo una elevata capacità di modulare le proprietà microstrutturali degli scaffold, da sola non garantisce un sufficiente controllo del grado di interconnessione dei pori, sia all'interno dello scaffold sia, soprattutto, sulla sua superficie esterna. Queste grandi limitazioni, legate sostanzialmente alla termodinamica del processo di espansione del gas ed alle proprietà della matrice polimerica, possono infatti essere superate controllando i processi di nucleazione e crescita delle bolle di gas e di apertura delle pareti dei pori, mediante l'impiego di una fase templante dispersa all'interno della matrice polimerica. [99, 100]

In figura 57 sono riportate tre differenti morfologie degli scaffold, rappresentative delle potenzialità delle tecnologie di processo implementate in questo lavoro di tesi.

Nel caso di agenti templanti microparticellari, la selezione opportuna della dimensione e della forma delle particelle fornisce un efficace supporto all'ottimizzazione delle proprietà morfologico/strutturali dello scaffold. L'interfaccia fra le due fasi promuove infatti i processi di nucleazione eterogenea e agisce da zona preferenziale di apertura delle pareti dei pori.

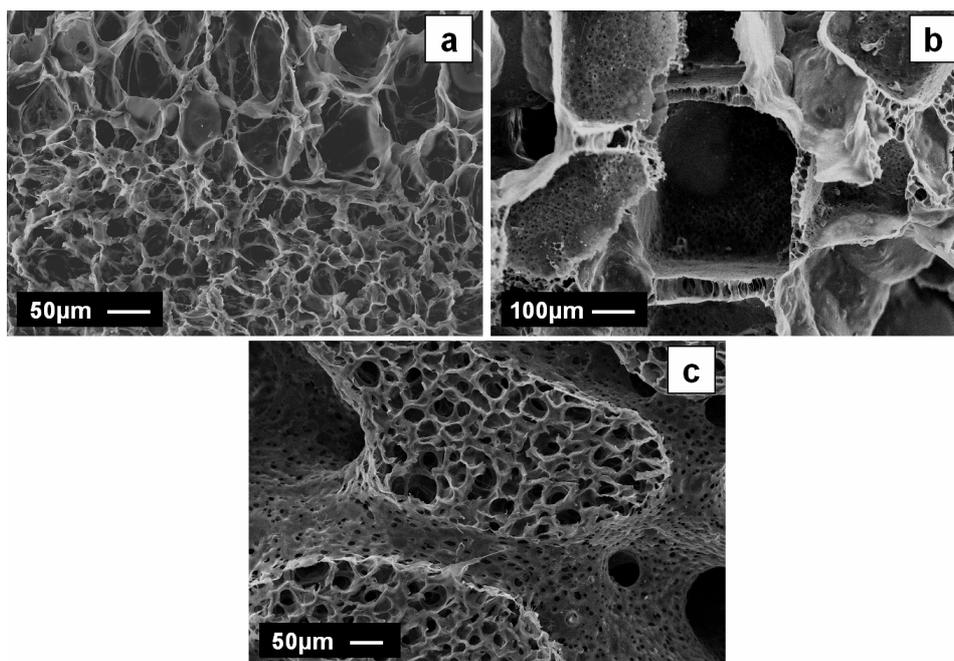


Figura 57 – Proprietà morfologiche degli scaffold ottenuti mediante la combinazione delle tecniche del gas foaming e del reverse templating: (a e b) templanti microparticellari; (c) templanti continui.

La selezione della dimensione e della forma delle microparticelle di agente templante garantisce infatti un ulteriore parametro di processo nel design della microstruttura degli scaffold. L'impiego di NaCl di dimensioni dell'ordine di pochi micron (figura 57a) permette ad esempio di controllare le proprietà viscoelastiche del sistema composito e quindi il processo di espansione del gas. La dimensione fine della fase dispersa favorisce inoltre il processo di apertura delle pareti dei pori portando alla formazione di microstrutture altamente interconnesse. Come evidenziato in figura 57a, tale tecnica permette anche la realizzazione di scaffold caratterizzati da gradienti spaziali di porosità e dimensione dei pori. Una microstruttura di questo tipo, ottenibile controllando la distribuzione spaziale di agente templante, presenta enormi potenzialità nello studio dei processi cellulari in 3D e nella rigenerazione di tessuti biologici altamente complessi, come l'osso e la cartilagine. [29] Infatti, l'approccio biomimetico alla base dell'ingegneria dei tessuti richiede il design di scaffold capaci di ricreare un

ambiente fisiologico il più possibile simile a quello del tessuto originale. Tessuti altamente strutturati come la cartilagine articolare (figura 58),

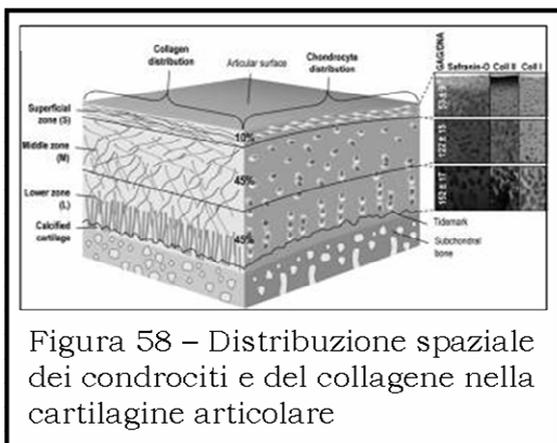


Figura 58 – Distribuzione spaziale dei condrociti e del collagene nella cartilagine articolare

sono caratterizzati da microstrutture complesse ed organizzate in relazione alla funzionalità biomeccanica del tessuto. La struttura anisotropa di tale tessuto è necessaria al fine di garantire allo stesso tempo elevate resistenze superficiali agli sforzi di taglio e una adeguata resistenza ai carichi normali. Queste proprietà sono garantite dalle fibre di collagene, le quali passano progressivamente da una orientazione parallela alla

superficie ad una ortogonale man mano che ci si avvicina all'interfaccia con l'osso. [29] Queste caratteristiche si riflettono anche nella distribuzione spaziale dei condrociti, la cui attività metabolica cambia in funzione della regione in cui sono locati. Infatti, le cellule della cartilagine devono essere capaci di sintetizzare una matrice extracellulare idonea a garantire le molteplici funzionalità del tessuto. Numerosi studi hanno evidenziato l'influenza della porosità totale e della dimensione dei pori dello scaffold sull'attività biosintetica dei condrociti. [29, 111] In particolare, è stato osservato che pori di piccole dimensioni (20μm) favoriscono l'interazione diretta tra le cellule, mentre nel caso di pori di grandi dimensioni (alcune centinaia di micron), promuovono una morfologia appiattita dei condrociti, in relazione alla maggiore superficie di adesione disponibile. Come diretta conseguenza della dimensione dei pori sul metabolismo cellulare, le caratteristiche della matrice extracellulare saranno differenti nei due casi. L'effetto della dimensione dei pori sull'attività biosintetica delle cellule è ampiamente riportato anche per altre tipologie cellulari, quali osteoblasti, fibroblasti ed epatociti, per cui è stato possibile tracciare alcune linee guida nelle proprietà dello scaffold in relazione allo specifico tessuto da rigenerare (vedi tabella 2). Uno scaffold del tipo riportato in figura 57a risulta in prospettiva molto promettente per lo studio dell'effetto della microstruttura sull'attività biosintetica e per la rigenerazione di tessuti biologici *in vitro* e/o *in vivo*. Tuttavia, nel caso in cui l'applicazione richieda una dimensione dei pori più elevata e una differente distribuzione spaziale della porosità, l'impiego di una agente templante di dimensioni ad esempio comprese fra 300 e 500μm, risulta una possibile alternativa (figura 57b). In tal caso, il processo di foaming è ottimizzato al fine di indurre la formazione di una microporosità all'interno

delle pareti dei pori creati in seguito all'estrazione dei cristalli di NaCl. Tale microporosità incrementa l'interconnessione tra i macropori promuovendo il trasporto di fluidi anche nelle regioni più interne dello scaffold.

Il trasporto dei nutrienti e dei rifiuti metabolici anche all'interno dello scaffold rappresenta ad oggi uno dei maggiori obiettivi dello scaffold design e necessita di una particolare attenzione in fase di progettazione. L'obiettivo del trasporto legato al rilascio di ossigeno e nutrienti, alla rimozione dei rifiuti metabolici, al trasporto di proteine ed alla migrazione cellulare è ottenibile solo attraverso il controllo della microstruttura dello scaffold. La dimensione, la geometria, l'orientazione, l'interconnessione e le superfici dei pori influenzano direttamente l'estensione e la natura della diffusione dei nutrienti e la crescita del tessuto all'interno della struttura porosa. [34] Nella maggior parte delle applicazioni biomediche, sia *in vitro* che *in vivo*, è stato infatti osservato che le caratteristiche del neo-tessuto dipendono fortemente dalle proprietà di trasporto. Scaffold incapaci di garantire una sufficiente diffusione anche nelle regioni più interne della porosità tendono a sviluppare un neo-tessuto vitale nelle zone a diretto contatto con l'ambiente esterno e un neo-tessuto altamente necrotico nelle regioni più interne. Questo effetto è aggravato anche dal fatto che, a causa della deficienza di nutrienti, le cellule adese alle superfici interne dei pori proliferano molto più lentamente di quelle situate in superficie. Di conseguenza, si viene a formare uno strato esterno di cellule/matrice extracellulare che occlude ulteriormente la porosità, aggravando ancor di più lo stato fisiologico delle cellule all'interno dello scaffold. Per ovviare a tale problema, spesso si ricorre alla realizzazione di scaffold caratterizzati da una elevata porosità totale. L'incremento delle proprietà di diffusione indotto dall'aumento della porosità dello scaffold rappresenta tuttavia una soluzione insoddisfacente e solamente temporanea al problema del trasporto. [34] Inoltre, l'aumento di porosità dello scaffold porta inevitabilmente ad una riduzione drastica delle sue proprietà meccaniche e di conseguenza ne limita fortemente l'impiego ad applicazioni in cui non sono richieste proprietà di supporto meccanico. Risultati più soddisfacenti, anche se non risolutivi di tale problema, sono stati ottenuti implementando tecnologie di coltura cellulare alternative, rispetto alla semplice coltura statica. L'impiego ad esempio di dispositivi di coltura dinamica *in vitro*, quali bioreattori e spinner flask, ha permesso un miglioramento della funzionalità del neo-tessuto rigenerato. Tali dispositivi incrementano infatti la diffusione del mezzo di coltura all'interno dello scaffold, mediante convezione indiretta (spinner flask) o forzata (bioreattori a perfusione). [34] Pur migliorando il trasporto dei fluidi all'interno dello scaffold, tali sistemi non risolvono completamente il problema della rigenerazione di tessuti biologici in 3D, i quali sono quindi limitati dal ridotto spessore ottenibile (alcune centinaia di micron). Queste limitazioni

coinvolgono anche gli scaffold sviluppati in questo lavoro impiegando agenti templanti microparticellari. Pur volendo tralasciare le proprietà di trasporto, è importante considerare anche un'altra limitazione di tali sistemi. L'impiego dell'NaCl garantisce la realizzazione di una microstruttura porosa altamente interconnessa solamente impiegando elevate percentuali di agente templante (al di sopra della percolazione) o realizzando elevati rapporti di espansione. Come diretta conseguenza di ciò, la porosità finale degli scaffold sarà molto elevata, a discapito delle proprietà meccaniche.

Per tale motivo, in questo lavoro di tesi è stata sviluppata una tecnologia alternativa per la preparazione di scaffold porosi a porosità controllata. Tale tecnologia si basa sulla combinazione delle tecniche del gas foaming con agenti templanti continui. Il grande vantaggio che risiede in tale tecnica di processo è la possibilità di disaccoppiare la porosità totale ed il grado di interconnessione, riducendo la percentuale di agente templante necessaria alla percolazione. La morfologia di uno dello scaffold ottenuto con tale tecnica di processo è riportata nella figura 57c. Come si può notare, la microstruttura è caratterizzata da pori su due scale dimensionali differenti: una macroporosità creata per l'adesione, la proliferazione e la biosintesi cellulare, attraverso l'estrazione dell'agente templante; una microporosità dell'ordine di poche decine di micron, difficilmente accessibile alle cellule, che può quindi rappresentare una via preferenziale per la diffusione dei fluidi. Una caratteristica molto importante di tali sistemi è quella relativa alla percentuale delle due differenti scale di porosità. Infatti, le frazioni

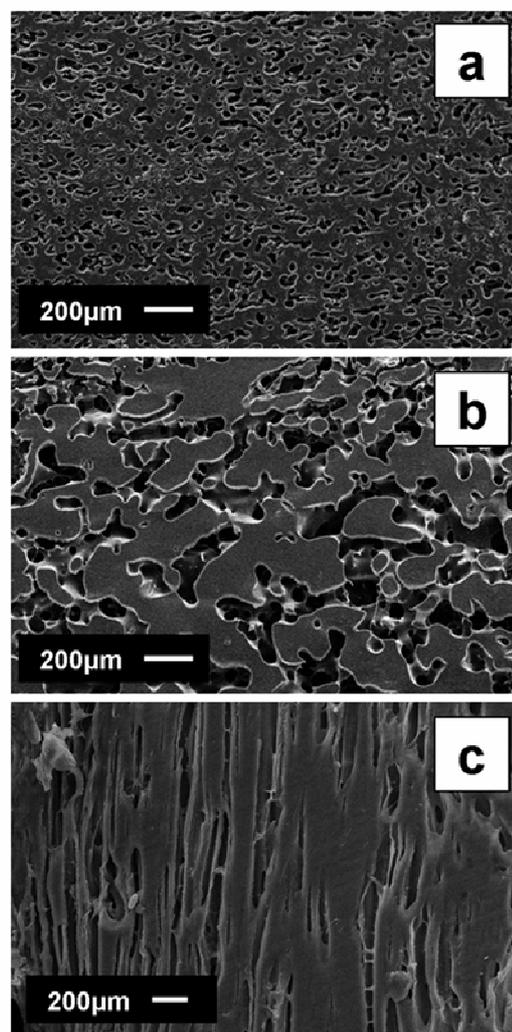


Figura 59 – Effetto del trattamento termico (b) e della deformazione di shear © sulla morfologia della miscela PCL/TG<sub>60/40</sub> (a) dopo estrazione della TG.

volumetriche della macroporosità e della microporosità sono all'incirca le stesse garantendo una ottimale distribuzione dei pori tra quelli adibiti alle cellule e quelli preferenziali per il trasporto. L'impiego di un templante continuo offre inoltre la grande possibilità di ottenere un controllo ancora più accurato della microstruttura. Come illustrato in figura 59, a partire da una miscela polimerica eterogenea co-continua, è possibile realizzare strutture porose altamente controllate modulando la morfologia della fase templante. Trattamenti di annealing termico (100°C per 4 ore, figura 59b) o gradienti di deformazione unidirezionali (estrusione in reometro a capillare a 80°C e 20mm/min, figura 59c) effettuati su miscele PCL/TG permettono ad esempio di realizzare scaffold con una differente dimensione o orientazione dei pori. Un ulteriore vantaggio connesso all'impiego di agenti templanti continui è rappresentato dalla possibilità di estrarre selettivamente una delle due fasi. Nel lavoro sviluppato durante questo dottorato di ricerca, l'attenzione è stata indirizzata alla realizzazione di scaffold di PCL a porosità controllata, da poter essere impiegati per la rigenerazione di tessuti duri, come l'osso e la cartilagine. Tuttavia, nel caso in cui si vogliano realizzare scaffold porosi con proprietà microstrutturali e di biocompatibilità/degradazione differenti, è possibile effettuare l'estrazione selettiva del PCL ed ottenere così scaffold di TG. Il grande vantaggio dei polimeri naturali rispetto ai polimeri sintetici è quello di possedere cinetiche di degradazione controllabili e una struttura chimica provvista di molecole capaci di interagire specificamente con le cellule. [7] Nella figura 60 è illustrato il risultato dell'estrazione del PCL sia dalla miscela tal quale che da quella espansa, mediante immersione dei campioni in un solvente clorurato (cloroformio).

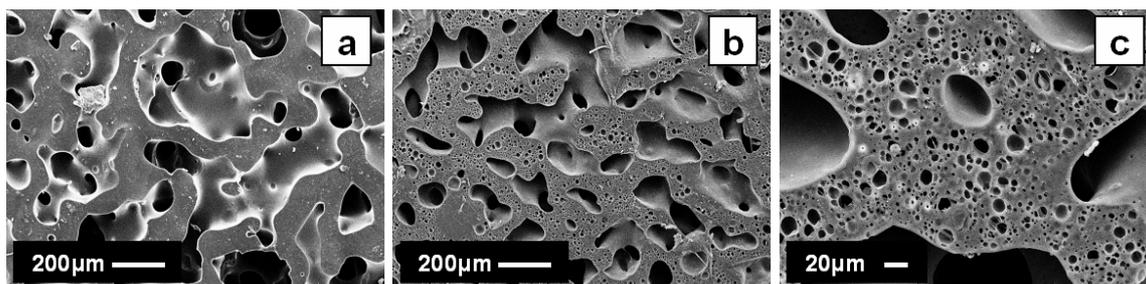


Figura 60 – Scaffold di gelatina termoplastica dopo estrazione del PCL dalle miscele PCL/TG40/60 tal quali (a) ed espansa ad 80°C (b e c).

La morfologia degli scaffold di TG ottenuti mediante estrazione del PCL prima e dopo il processo di foaming evidenzia le enormi potenzialità della tecnologia implementata in tale lavoro di tesi dal punto di vista dello scaffold design. Come si può osservare dalle micrografie al SEM di figura 60, è possibile ottenere scaffold di TG con porosità su una unica scala

dimensionale estraendo il PCL dalle miscele non espanse (figura 60a), oppure caratterizzati da una porosità su due scale dimensionali differenti, estraendo il templante dalle miscele espanse, in analogia a quanto fatto per il PCL (figure 60b e c). In merito a questa tipologia di scaffold è necessario fare alcune considerazioni: Come osservato nel processo di estrazione selettiva della TG dalle matrici di PCL, tale polimero è altamente solubile in soluzioni acquose alla temperatura di 37°C a cui si impiegano gli scaffold per la rigenerazione tissutale. Per tale motivo, l'utilizzo di questi sistemi necessita di una fase di stabilizzazione della matrice polimerica che può essere effettuata impiegando gli agenti reticolanti comunemente usati per la gelatina tal quale. Tuttavia, la presenza del plasticizzante può ridurre l'effetto dell'agente reticolante, la cui efficacia deve quindi essere verificata.

2. La micrografia al SEM di figura 60c evidenzia che la microporosità indotta dal processo di foaming è sostanzialmente chiusa. Questo naturalmente non permette il trasporto diretto dei fluidi necessari alle cellule, anche se è possibile una diffusione indiretta in seguito ad un processo di swelling del polimero. Per la realizzazione di una microporosità aperta è necessario implementare tale tecnica con un processo addizionale, come vedremo tra i possibili sviluppi futuri di tale lavoro di ricerca.

Ritornando agli aspetti legati alla preparazione di scaffold di PCL, si può concludere che l'impiego di un templante continuo in sostituzione di uno microparticellare rende possibile preparare scaffold altamente interconnessi, con porosità su scale dimensionali differenti e in aggiunta, aventi proprietà meccaniche superiori. Per evidenziare questo ultimo aspetto, in figura 61 è riportato un confronto fra i moduli elastici degli scaffold ottenuti mediante l'impiego delle due differenti tipologie di agenti templanti. Il confronto delle proprietà meccaniche degli scaffold permette di capire immediatamente le grandi potenzialità della tecnologia basata sull'impiego di templanti continui. La porosità significativamente inferiore garantisce infatti un valore del modulo elastico superiore di un ordine di grandezza rispetto a quello ottenibile con l'utilizzo di templanti microparticellari. Inoltre, mentre nel caso degli scaffold ottenuti impiegando l'NaCl come porogeno, sia prima che dopo la fase di foaming, l'interconnessione diretta dei macropori è limitata ai punti di contatto fra i cristalli di NaCl, nel caso degli scaffold ottenuti con l'impiego della TG, i macropori e i canali di interconnessione sono dello stesso ordine di grandezza.

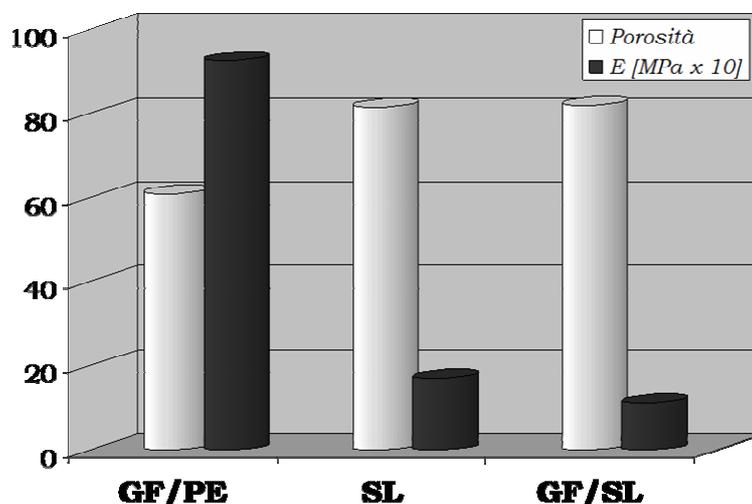


Figura 61 – Confronto fra la porosità e le proprietà meccaniche degli scaffold ottenuti impiegando le tecniche del SL, GF/SL e GF/PE.

La caratterizzazione biologica degli scaffold di PCL ottenuti a partire dalle miscele co-continue PCL/TG ha confermato che il processo di preparazione degli scaffold fornisce substrati biodegradabili compatibili con le applicazioni di rigenerazione tissutale. Come evidenziato nella figura 62, tali scaffold sono in grado di promuovere i processi di adesione e proliferazione cellulare, anche per tempi di coltura *in vitro* relativamente lunghi (28 giorni). La morfologia del citoscheletro mostra infatti che le cellule sono ben distribuite sulla superficie e caratterizzate da una forma distesa, indicativa della presenza di numerosi punti di ancoraggio alla superficie dei pori. Inoltre, le cellule hanno colonizzato anche i pori che, pur affacciandosi alla superficie di semina, si trovano ad una profondità compresa fra i 150 ed i 200 $\mu\text{m}$ , come illustrato nella ricostruzione laterale relativa alla direzione ortogonale alla superficie. Osservando la penetrazione cellulare è inoltre evidente che le cellule non sono penetrate in maniera uniforme ma si trovano in profondità preferenzialmente sulle superfici in corrispondenza dei macropori (evidenziati dalle frecce bianche). Questo risultato fornisce importanti informazioni in merito alla capacità dei tali tipologie di scaffold di favorire una penetrazione delle cellule all'interno della macroporosità, lasciando quindi la microporosità sostanzialmente libera per la diffusione dei fluidi.

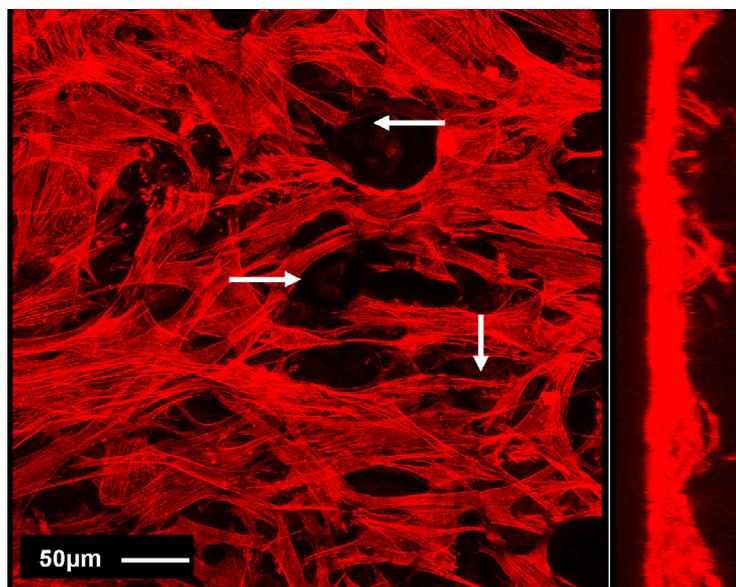


Figura 62 – Cellule staminali mesenchimali su scaffold di PCL ottenuti per GF/PE, dopo 28 giorni di coltura statica *in vitro*.



# Capitolo 6

## **Conclusioni e sviluppi futuri**

## CONCLUSIONI

L'attività svolta in questo lavoro di tesi di dottorato è stata finalizzata alla realizzazione di scaffolds biodegradabili a matrice sintetica di PCL, con proprietà microstrutturali e di biocompatibilità idonee per le applicazioni dell'ingegneria dei tessuti. Per migliorare le proprietà meccaniche e di interazione cellulare degli scaffolds è stata inoltre impiegata dell'idrossiapatite sintetica appartenente a due differenti classi dimensionali e chimiche (nHAP e mHAP). La selezione di un polimero sintetico come principale costituente degli scaffolds è stata effettuata in considerazione delle tecnologie di processo selezionate al fine di ottenere strutture porose tridimensionali con proprietà microstrutturali controllate.

La tecnologia di processo con cui si è voluto preparare gli scaffolds di PCL è il gas foaming. Tale tecnica permette di controllare accuratamente le proprietà degli scaffolds mediante un controllo fine dei parametri di processo. L'assenza di solventi organici potenzialmente tossici per le cellule ed i tessuti e la possibilità di processare i materiali polimerici da fuso rappresentano un grande vantaggio nel design degli scaffold. Tuttavia, al fine di superare alcune limitazioni connesse all'impiego del gas foaming tale tecnica è stata combinata con il reverse templating. Il lavoro è stato quindi suddiviso in due grandi linee di ricerca in base alla tipologia di templante impiegato.

Una parte dell'attività si è indirizzata allo studio dei processi di espansione delle matrici polimeriche in combinazione con l'impiego di templanti microparticellari. In particolare, il PCL è stata miscelato con microparticelle di NaCl di due differenti dimensioni (diametro medio pari a  $5\mu\text{m}$  o compreso fra  $300$  e  $500\mu\text{m}$ ). Successivamente sono state individuate le condizioni di processo ottimali per la realizzazione di scaffolds di PCL con proprietà microstrutturali controllate.

Per gli scaffolds ottenuti impiegando una dimensione fine di templante microparticellare in concentrazioni ponderali comprese fra il 30 ed l'80%, l'ottimizzazione delle proprietà microstrutturali è stata ottenuta controllando le proprietà viscoelastiche dei sistemi compositi e individuando di conseguenza le condizioni di espansione più opportune. La caratterizzazione reologica dei compositi non espansi ha messo in evidenza un incremento progressivo dei moduli  $G'$  e  $G''$  all'aumentare della concentrazione di agente templante e l'esistenza di una soglia di percolazione delle particelle ad una concentrazione ponderale di NaCl compresa fra il 40 ed il 50%. Questo dato è stato inoltre confermato dalle misure di estrazione dell'agente templante, le quali hanno viceversa messo in evidenza la possibilità di estrarre completamente l'NaCl dalle matrici espanse, indipendentemente dalla loro concentrazione e dalle condizioni di espansione impiegate in questo lavoro. Le caratterizzazioni effettuate sugli scaffolds ottenuti nelle differenti condizioni di processo hanno confermato

che la tecnica impiegata ed ottimizzata in questo lavoro permette un controllo fine della porosità, della dimensione dei pori e del grado di interconnessione. In particolare, il controllo della porosità (nell'intervallo 78–93%) e della dimensione dei pori (compresa fra 90 e 10 $\mu$ m ca.) è stato ottenuto controllando la concentrazione di agente templante e la  $T_F$ . Inoltre, l'impiego di elevate velocità di caduta di pressione risulta necessario ai fini del raggiungimento di elevati livelli di interconnessione. Un aspetto chiave di tale tecnica nell'ottica dello scaffold design è inoltre rappresentato dalla possibilità di realizzare scaffolds con strutture porose altamente anisotropiche. Infatti, impiegando sistemi compositi contenenti gradienti spaziali di concentrazione di agente templante è possibile indurre la presenza di gradienti spaziali di porosità e dimensione dei pori.

Il design degli scaffolds mediante l'impiego di elementi templanti microparticellari è fortemente legato alla dimensione delle particelle di templante. Differentemente da quanto osservato nei sistemi precedenti, il processo di foaming e le proprietà microstrutturali degli scaffolds cambiano significativamente in seguito all'impiego di cristalli di NaCl di dimensioni comprese fra 300 e 500  $\mu$ m. In tal caso infatti, la necessità di raggiungere una percolazione diretta delle microparticelle richiede l'impiego di concentrazioni ponderali di NaCl sensibilmente più elevate (nel nostro caso comprese fra l'85 ed il 95%). Come diretta conseguenza, l'effetto del processo di foaming è limitato ed è sostanzialmente finalizzato alla creazione di una microporosità addizionale nelle pareti dei pori lasciati dal sale. Attraverso tale tecnica sono stati realizzati scaffolds di PCL puro e di PCL con nHAP a differenti concentrazioni. Come osservato dalle misure termogravimetriche, la presenza del filler ceramico contribuisce a migliorare le proprietà di stabilità termica della matrice polimerica, in quanto la temperatura di degradazione aumenta da 353.7°C per il PCL tal quale a 365.3°C per il PCL caricato con il 20% in peso di nHAP. Una volta individuate le condizioni di temperatura di espansione atte a creare una microporosità all'interno della fase polimerica, la morfologia degli scaffolds è stata modulata controllando tre parametri di processo: percentuale di agente templante, composizione dell'agente espandente e percentuale di nHAP all'interno della matrice polimerica. Rispetto agli scaffolds ottenuti per sola estrazione dell'agente porogeno, il processo di espansione induce la formazione di una microporosità addizionale che, tuttavia, è fortemente dipendente dalla concentrazione di agente templante. Infatti, solo alle concentrazioni più basse è possibile controllare finemente la dimensione e l'interconnessione dei micropori. Scaffolds con differenti rapporti macroporosità/microporosità sono stati ottenuti variando la percentuale di CO<sub>2</sub> all'interno dell'agente espandente. Una concentrazione ponderale di nHAP del 5% risulta inoltre ottimale in termini di bilanciamento fra le proprietà di interconnessione e di bioattivazione. La percentuale ponderale

di nHAP del 20%, pur migliorando significativamente le proprietà meccaniche degli scaffolds e l'esposizione del filler all'interno dei pori, aumenta eccessivamente la rigidità della matrice, limitando il grado di apertura dei pori. Inoltre, concentrazioni ponderali di agente templante superiori al 90% riducono drasticamente la quantità di polimero del sistema e limitano l'effetto del processo di foaming. In tali sistemi infatti non si notano significative differenze nelle proprietà morfologico/strutturali in seguito al processo di foaming, pur essendo possibile ottenere scaffolds con una elevata porosità totale.

Si può quindi concludere che l'impiego di agenti templanti microparticellari in abbinamento alla tecnica del gas foaming ha permesso di ottenere un elevato controllo della microstruttura degli scaffolds, in particolare per quanto concerne la porosità totale, la dimensione, forma e distribuzione spaziale dei pori ed il grado di interconnessione. Tuttavia, il processo di apertura delle pareti dei pori e la necessità di una completa estrazione dell'agente templante richiedono elevati rapporti di espansione o concentrazioni di porogeno e portano inevitabilmente all'ottenimento di scaffolds altamente porosi e con ridotte proprietà meccaniche.

Un approccio alternativo per la realizzazione di scaffolds caratterizzati da un elevato controllo delle proprietà microstrutturali, senza necessariamente raggiungere elevate porosità, è stato sviluppato a partire dall'impiego di agenti templanti continui. In particolare, la possibilità di ottenere livelli di percolazione del templante anche a basse concentrazioni volumetriche (40%), ha permesso di realizzare scaffolds altamente interconnessi anche a ridotti valori di porosità totale (60%). Il controllo fine delle proprietà microstrutturali degli scaffolds è stato quindi ottenuto selezionando opportunamente i parametri di foaming. La realizzazione di scaffolds con dimensioni dei pori su scale dimensionali differenti è stata ottenuta selezionando una  $T_F$  inferiore alla temperatura di fusione del PCL (44°C) e impiegando come agente espandente una miscela CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> al 20% di CO<sub>2</sub> ed una elevata velocità di caduta di pressione (700bar/s).

In particolare, la microstruttura degli scaffolds risulta caratterizzata dalla presenza di una macroporosità di dimensioni dell'ordine di centinaia di micron, ottimale per un gran numero di applicazioni come la rigenerazione del tessuto osseo e cartilagineo, interconnessa ed omogeneamente distribuita all'interno di un network microporoso, con pori di 40 micron. Temperature di espansione superiori alla temperatura di fusione del PCL hanno permesso inoltre di ottenere scaffolds con porosità interconnessa (nell'intervallo 60-90%) e dimensioni dei pori dell'ordine di alcune centinaia di micron. I ridotti valori di porosità ottenibili con tale tecnica sono i principali artefici del raggiungimento di elevate proprietà meccaniche (nel caso del 60% di porosità totale il modulo elastico a compressione ha raggiunto valori di 10MPa), pur mantenendo un

eccellente grado di interconnessione dei pori. I risultati della caratterizzazione biologica dei sistemi con porosità bimodale ha inoltre confermato che il processo di preparazione garantisce la preparazione di substrati biocompatibili e capaci di favorire i processi di adesione, proliferazione e migrazione cellulare.

### SVILUPPI FUTURI

I risultati ottenuti in questo lavoro hanno evidenziato le grandi potenzialità degli scaffolds preparati mediante la tecnica del gas foaming/reverse templating per applicazioni di rigenerazione dei tessuti biologici. Tali risultati hanno inoltre aperto la strada a un gran numero di sviluppi dell'attività di ricerca, finalizzati a migliorare ulteriormente le proprietà microstrutturali, di biocompatibilità e degradazione e ad ottimizzare i processi di rigenerazione tissutale. A partire dall'idea sviluppata in questo lavoro per cui la realizzazione di scaffold sempre più multifunzionali necessita della combinazione di differenti tecnologie di processo, è possibile tracciare alcune possibili linee di sviluppo.

Per quanto riguarda i sistemi già sviluppati, l'attività sarà finalizzata all'ottimizzazione dei processi di semina delle cellule all'interno dello scaffold e di coltura cellulare *in vitro*. In particolare, l'impiego di sistemi di semina dinamica può permettere di ottenere una distribuzione uniforme delle cellule in tutta la struttura porosa e quindi di aumentare la densità cellulare e favorire i processi di deposizione di matrice extracellulare. In effetti, come osservato dai risultati della caratterizzazione biologica statica, le cellule tendono a raggiungere la confluenza sulla superficie dopo 21 giorni di coltura e non riescono a penetrare a sufficienza all'interno dello scaffold. A tale scopo, sarà utilizzato un dispositivo di semina dinamica a perfusione, come quello riportato in figura 63.

Nella progettazione del sistema di per fusione (figura 63a) si è tenuto conto della necessità di ottimizzare la penetrazione delle cellule all'interno dello scaffold. Il principio di tale sistema è infatti quello di forzare un fluido contenente le cellule a passare attraverso lo scaffold con una opportuna velocità che viene definita dalla differenza di pressione fra i due estremi del sistema. Regolando opportunamente la densità cellulare e la velocità del mezzo di perfusione è possibile controllare la densità cellulare all'interno dello scaffold. Uno dei problemi maggiormente incontrati nell'ingegnerizzazione di tali sistemi è rappresentato dalla difficoltà di garantire la tenuta necessaria ad evitare la diffusione del

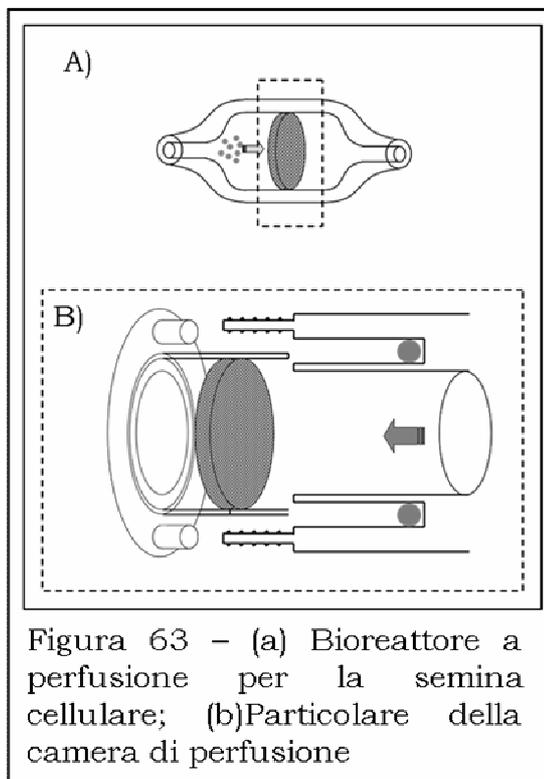


Figura 63 - (a) Bioreattore a perfusione per la semina cellulare; (b) Particolare della camera di perfusione

fluido all'esterno del campione, che porterebbe ad una scarsa efficienza della semina. Per risolvere tale problema, è stata progettata una camera di fusione particolare, illustrata in figura 63b. Tale camera prevede un sistema di battuta, simmetrico rispetto al campione, che agisce sulla corona esterna e che rappresenta il primo elemento di tenuta del sistema. L'ulteriore elemento esterno di battuta garantisce la completa tenuta del bioreattore dalla fuoriuscita del fluido verso l'esterno. Un sistema di questo tipo può garantire una perfusione completa del mezzo cellularizzato attraverso lo scaffold e quindi una ottimizzazione del processo di semina.

Parallelamente all'ottimizzazione del processo di coltura cellulare *in vitro*, l'attività di ricerca sarà improntata ad ottenere un maggiore controllo delle proprietà microstrutturali e di rilascio di sostanze bioattive degli scaffolds. In particolare, la possibilità di combinare le tecniche del gas foaming e dell'elettrospinning o del fused deposition modeling può fornire un ulteriore sviluppo nel processo di controllo delle proprietà microstrutturali degli scaffolds (figura 64). Nel caso dell'elettrospinning è possibile creare network costituiti da fibre di dimensioni micrometriche e sub-micrometriche (figura 64b). Tali network possono essere incorporati all'interno di una matrice polimerica e costituire quindi la fase templante continua. Analogamente, le tecniche di rapid prototyping permettono una distribuzione altamente orientata di una fase polimerica continua che può essere impiegata come templante in un sistema combinato gas foaming/continuous templating (figura 64c). La tecnologia di processo implementata in questo lavoro rappresenta quindi un primo passo nell'ingegnerizzazione di scaffolds biodegradabili in cui le proprietà microstrutturali possono essere accuratamente controllate in relazione agli obiettivi di progetto individuati dallo scaffold design.

L'impiego di miscele eterogenee sintetico/naturale nella preparazione degli scaffolds fornisce l'ulteriore vantaggio di poter meglio controllare le cinetiche di degradazione e l'interazione cellulare, attraverso l'opportuna combinazione dei materiali costituenti la miscela. La selezione della TG come agente templante continuo è stata effettuata anche in considerazione della eventualità di non estrarre completamente tale polimero dagli espansi, ma di creare due network porosi interpenetrati ed interconnessi capaci di degradare in tempi differenti e di favorire processi di proliferazione e differenziazione cellulare selettivi. Un esempio di tale

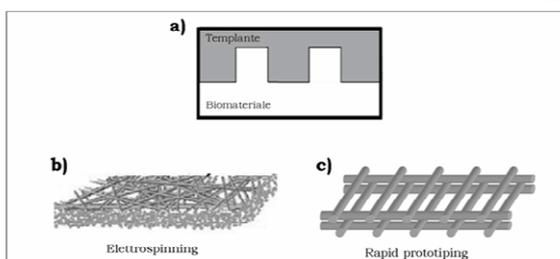


Figura 64 - (a) Principio del reverse templating; (b) network continuo nanometrico (elettrospinning) (c) network continuo micrometrico (FDM)

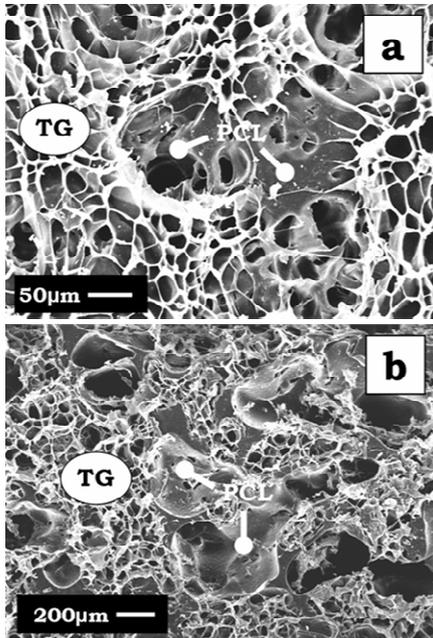


Figura 65 –scaffolds di PCL e gelatina ottenuto per GF/FD a differenti  $T_p$ : (a) 44°C, (b) 110°C

un polimero sintetico a lenta degradazione e un polimero naturale, il cui processo di degradazione può essere controllato mediante l'opportuna stabilizzazione con agenti reticolanti.

scaffold è riportato nella figura 65. Come si può osservare, la morfologia è caratterizzata da due network porosi realizzati nelle due differenti fasi polimeriche. Nel caso del PCL, la porosità è indotta dalla fase di foaming, effettuata a due differenti temperature di espansione: (a) 44°C e (b) 110°C. Nel caso della TG invece, la porosità è creata attraverso un processo di swelling/liofilizzazione del polimero espanso. In effetti, sfruttando le proprietà di rigonfiamento della TG in soluzione acquosa, controllabili come osservato mediante i parametri tempo/temperatura di immersione in H<sub>2</sub>O, è possibile far assorbire il solvente al polimero termoplastico espanso, limitandone la dissoluzione. Una successiva fase di liofilizzazione produrrà la sublimazione dell'H<sub>2</sub>O e la formazione di una porosità interconnessa nella TG. Lo scaffold così ottenuto risulterà provvisto di due fasi porose interconnesse costituite da



# Appendice

## **Gas foaming**

Il gas foaming è una tecnica di processo che permette di realizzare schiume termoplastiche a porosità controllata mediante l'utilizzo di gas ad alte pressioni. La realizzazione di materiali espansi mediante tale tecnica può essere ottenuta sia con un processo continuo che con uno discontinuo. Per semplicità di trattazione ed in considerazione delle applicazioni per cui tale tecnica è stata impiegata in questo lavoro di tesi, nel seguito ci si riferirà esclusivamente al processo discontinuo.

Il gas foaming si basa sulla solubilizzazione di un gas o un fluido supercritico (generalmente CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> o una miscela di questi due gas) all'interno della matrice polimerica, ad una opportuna pressione ( $P_{\text{sat}}$ ) e temperatura ( $T_{\text{sat}}$ ). Una volta raggiunta la completa solubilizzazione dell'agente espandente nella matrice polimerica, la soluzione polimero/gas è portata rapidamente in una condizione di instabilità termodinamica per effetto di un incremento di temperatura (*temperature induced phase separation*) oppure riducendo la pressione del sistema (*pressure induced phase separation*). Come conseguenza di ciò, la solubilità del gas nel polimero si riduce istantaneamente e si ha la smiscelazione delle due fasi. A causa della velocità con cui avviene tale processo e, per effetto dell'elevata viscosità della matrice polimerica, la smiscelazione delle due fasi porta alla nucleazione e crescita di bolle di gas. Il processo di crescita delle bolle avrà termine allorché le forze di pressione che tendono a far espandere le bolle saranno equilibrate dalle forze che invece si oppongono a tale processo. Tali forze sono il richiamo elastico del polimero, il quale aumenta a causa dell'incremento della deformazione, per l'incremento della viscosità indotto dal raffreddamento e per l'eventuale formazione di fasi cristalline nel fuso polimerico.

Il processo di foaming per separazione di fase indotta dall'aumento di temperatura viene generalmente impiegato nel caso in cui siano richieste temperature di processo ridotte. Esempi di questo tipo sono la realizzazione di scaffolds ottenuti incorporando all'interno della matrice polimerica sostanze bioattive, [33] o materiali polimerici sensibili a processi di degradazione termica come il PLA. [112] Tale tecnica si basa infatti sulla solubilizzazione dell'agente Espandente ad una  $T_{\text{sat}}$  prossima alla temperatura ambiente e non è quindi necessario raggiungere la fusione del polimero. In relazione al processo di espansione/solubilizzazione, la *temperature induced phase separation* presenta una serie di limitazioni, sia dal punto di vista della selezione dei materiali, sia in relazione al controllo delle proprietà microstrutturali degli espansi. La selezione dei materiali deve essere fatta in considerazione della necessità di una sufficiente solubilizzazione dell'agente espandente nel polimero. Per tale motivo, materiali con temperature di transizione vetrosa molto maggiori della temperatura ambiente o caratterizzati da una elevata percentuale di cristallinità, pongono importanti limitazioni tecnologiche durante i processi di schiumatura con tale tecnica. In aggiunta, la possibilità di ottenere un controllo fine della microstruttura degli espansi è ostacolata anche dalla difficoltà ad esempio, di uniformare la temperatura nel processo di

riscaldamento che porta all'espansione del gas. Infine, per effetto della riduzione della solubilità dell'agente espandente con la temperatura, tale tecnica richiede tempi di solubilizzazione significativamente più elevati di quanto necessario nel caso del *pressure induced phase separation* (si passa infatti da alcune ore fino a 2-3 giorni).

Grande interesse in ambito scientifico è stato quindi posto nello studio dei processi di foaming mediante *pressure induced phase separation*. Per comprendere i vantaggi connessi all'utilizzo di tale approccio è importante analizzare in dettaglio le varie fasi del processo. In figura 66 è illustrato lo schema del processo di espansione per separazione di fase indotta dalla caduta di pressione, impiegato in questo lavoro di tesi, con particolare riferimento all'evoluzione temporale della temperatura e della pressione ed al conseguente stato fisico del sistema.

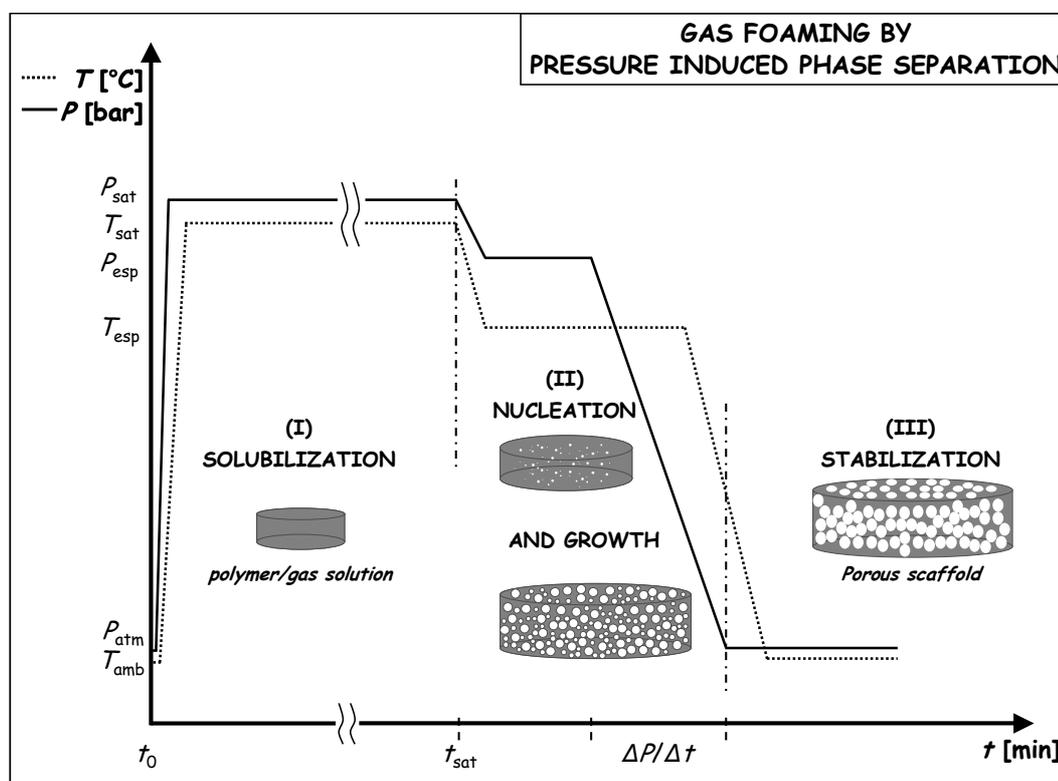


Figura 66 - Evoluzione temporale della temperatura e della pressione del sistema durante il processo di foaming per *pressure induced phase separation* e corrispondente stato fisico del sistema.

Nel processo di foaming per separazione di fase indotta dalla caduta di pressione, il polimero è inserito all'interno del dispositivo di pressurizzazione/espansione (che descriveremo in seguito), dove viene fuso e solubilizzato con l'agente espandente ad una  $P_{sat}$  tipicamente compresa nell'intervallo 150-250bar. La fase di solubilizzazione prosegue per un tempo sufficiente al raggiungimento della concentrazione di equilibrio del gas nel polimero ( $t_{sat}$ ). A questo punto, a seconda della tipologia di soluzione polimero/gas, il sistema viene

raffreddato o riscaldato fino alla  $T_F$  e mantenuto a tale temperatura per un tempo sufficiente ad evitare la presenza di gradienti termici nella matrice polimerica. Si procede quindi ad indurre l'espansione del gas per effetto della rapida riduzione della pressione del sistema fino alla pressione atmosferica. Questa fase, che porta alla nucleazione e crescita delle bolle di gas nel polimero, ha una durata che varia da alcuni secondi fino a 1-2 minuti ed è quindi molto breve se confrontata con la fase di solubilizzazione, tipicamente di una durata dell'ordine di alcune ore. Il processo di espansione del gas termina quando la concentrazione del gas nella matrice è troppo bassa per indurre ulteriore nucleazione o crescita delle bolle. In aggiunta, la fase di stabilizzazione è anche legata alla riduzione di temperatura durante l'espansione che produce un incremento della viscosità del sistema e l'irrigidimento della struttura.

Alla luce di quanto appena descritto in merito al processo di gas foaming, si può comprendere come l'ottimizzazione delle proprietà microstrutturali degli espansi ottenuti mediante questa tecnica è strettamente legata al controllo delle proprietà fisiche e reologiche del sistema polimero/gas. In particolare, le proprietà viscoelastiche, la tensione interfacciale, la solubilità e la diffusività dell'agente espandente nel polimero fuso, rappresentano le proprietà del sistema che governano il processo di nucleazione e crescita delle bolle di gas. Tali proprietà e, quindi la microstruttura degli espansi, sono strettamente collegate alle condizioni di processo, come illustrato nello schema di figura 67. [79]

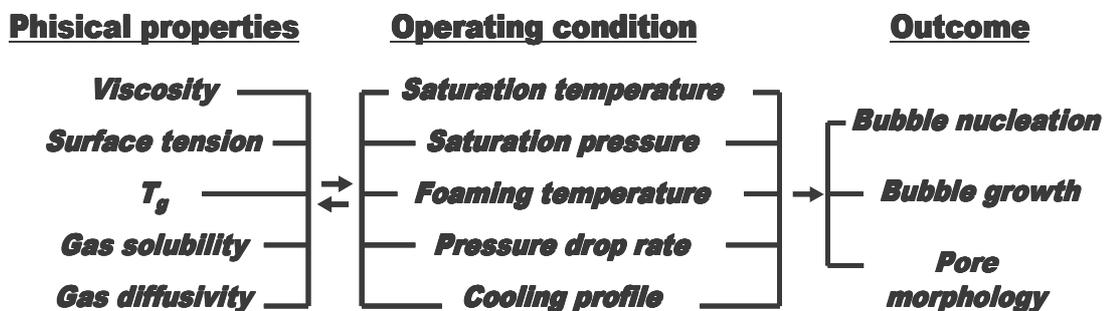


Figura 67 - Relazione fra le proprietà fisiche del sistema polimero/gas, i parametri di processo e la microstruttura degli espansi.

A causa della difficoltà di valutare sperimentalmente molti dei parametri che entrano in gioco durante il processo di foaming, una conoscenza della termodinamica del processo di nucleazione, crescita e stabilizzazione, risulta fondamentale nel controllo della microstruttura degli espansi.

Affinché sia possibile la realizzazione di un materiale polimerico espanso, è necessario che avvengano quindi tre differenti processi:

- Nucleazione delle bolle all'interno della matrice polimerica
- Crescita delle bolle precedentemente nucleate
- Stabilizzazione della struttura

A causa della complessità di queste tre fasi, non esistono modelli matematici che riescano a descrivere completamente l'effetto che i parametri di processo esercitano sull'espansione del gas. Tuttavia, la teoria classica della nucleazione omogenea fornisce dei risultati utili alla comprensione del processo di gas foaming.

Sulla base della teoria classica della nucleazione, proprietà macroscopiche del sistema quali solubilità (S), diffusività (D) concentrazione del gas (C), tensione interfacciale ( $\sigma$ ), temperatura (T) e soprassaturazione ( $\Delta P = P_V - P_L$ ) sono parametri fondamentali nel controllo della velocità di nucleazione (J). Pur essendo state proposte numerose espressioni per J, la forma più generale è quella fornita dall'equazione 6: [113]

$$(6) \quad J = MB \exp\left[-\frac{16\pi\sigma^3}{3k_B T(P_V - P_L)^2}\right]$$

dove i coefficienti M e B sono funzione della concentrazione C e della diffusività D del gas,  $k_B$  è la costante di Boltzmann,  $P_V$  e  $P_L$  sono rispettivamente la pressione nella fase gas e quella nella matrice polimerica.

Una volta nucleate, le bolle iniziano a crescere per effetto della diffusione delle molecole di gas presenti nella soluzione. Il fenomeno della crescita delle bolle è quindi governato dalle proprietà di trasporto del gas nel polimero fuso e dalla proprietà reologiche della soluzione polimerica attorno alle bolle. Dal punto di vista della modellazione del processo di crescita, le equazioni di bilancio che legano la crescita isoterma di una singola bolla è governata dal sistema di equazioni seguenti:

$$(7) \quad \begin{aligned} \frac{d}{dt}(\rho_G R^3) &= 3\rho D R^2 \left(\frac{\partial c}{\partial r}\right)_{r=R} \\ \frac{\partial c}{\partial t} + v_r \frac{\partial c}{\partial r} &= \frac{D}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial c}{\partial r}\right) \\ \rho \left(\frac{\partial v_r}{\partial t} + v_r \frac{\partial v_r}{\partial r}\right) &= -\frac{\partial P}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} (r \tau_{rr}) - \frac{\tau_{\theta\theta} + \tau_{\phi\phi}}{r} \end{aligned}$$

Tali equazioni rappresentano rispettivamente i bilanci di massa all'interno della bolla e nella soluzione polimerica e il bilancio di forze che agiscono attorno alla bolla. La soluzione di questo sistema di equazioni richiede la conoscenza della dipendenza di D, delle proprietà reologiche e di  $\sigma$  da C. Inoltre, a queste equazioni devono essere associate quelle relative alle proprietà reologiche, di trasporto e di superficie del sistema polimero/gas. Naturalmente, le equazioni di bilancio descritte non tengono in considerazione gli aspetti legati

all'interazione tra le differenti bolle di gas, sia in termini di diffusione, sia per quanto concerne la distribuzione tensionale. Per tale motivo, risulta complicato un approccio predittivo ottenuto a partire da tali sistemi di equazioni e, generalmente si procede con l'analisi sperimentale diretta dell'effetto dei parametri di processo sulla nucleazione e crescita delle bolle di gas.

In generale, la nucleazione è legata principalmente al grado di soprassaturazione  $\Delta P$  imposto al sistema mentre la crescita è controllata fondamentalmente dalla diffusione del gas dalla soluzione polimero/gas alla bolla e, dal sistema di forze viscoelastiche che agiscono nell'intorno della bolla. Attraverso il controllo dei processi di nucleazione e crescita è quindi possibile ottimizzare la morfologia degli espansi.

Da un punto di vista tecnologico, l'equilibrio tra i processi di nucleazione e crescita può essere controllato disperdendo all'interno della matrice polimerica opportuni agenti nucleanti. L'interfaccia fra le due fasi riduce l'energia di barriera associata alla nucleazione della bolla di gas, rendendo possibile la formazione di una struttura porosa caratterizzata da una elevata densità di pori. [114, 115]

Lo schema del dispositivo impiegato per la realizzazione degli espansi polimerici in un processo di tipo discontinuo è riportato in figura 68.

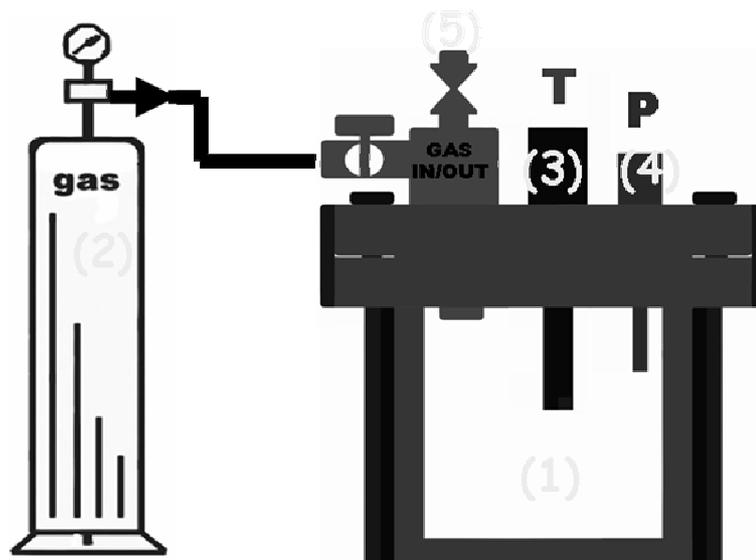


Figura 68 - Schema dell'impianto di gas foaming impiegato per la preparazione degli espansi mediante un processo discontinuo.

I principali elementi di un impianto batch da laboratorio, sono una cella ad alta pressione **(1)** dove viene posizionato il campione, un sistema di pressurizzazione del gas **(2)**, un sistema di controllo della temperatura **(3)**, della pressione **(4)** e della velocità di espansione **(5)**.

Come riportato in figura 66, dopo aver posizionato il campione nella cella di pressurizzazione vengono quindi condotte le seguenti fasi di processo:

1. Fusione del polimero
2. Solubilizzazione del gas nel fuso alla  $P_{\text{sat}}$  e  $T_{\text{sat}}$  selezionate
3. Raffreddamento del sistema fino alla  $T_F$
4. Realizzazione dell'instabilità termodinamica per effetto della riduzione di pressione alla pressione atmosferica
5. Raffreddamento e conseguente stabilizzazione della struttura

In considerazione di quanto illustrato in precedenza, approfondiamo ora gli aspetti legati all'effetto dei parametri di processo sulle proprietà microstrutturali degli espansi ottenuti mediante la tecnica del *pressure induced phase separation*.

I parametri di processo attraverso cui è possibile controllare la nucleazione e crescita della bolle di gas nella fase polimerica sono la tipologia e concentrazione di agente espandente, il  $\Delta P$ , la  $T_F$  ed il PDR.

- Effetto dell'agente espandente

La tipologia di agente espandente impiegato risulta di fondamentale importanza nel caratterizzare la microstruttura degli espansi, sia per quanto riguarda le proprietà di solubilità e diffusività, sia in relazione all'interazione chimico-fisica con il polimero. [116, 117, 67] La concentrazione di gas (C) all'interno del fuso polimerico dipende, una volta fissate le condizioni di temperatura e pressione, dalla sua solubilità. A titolo di esempio, in figura 69 sono riportate le curve di solubilità, valutate a 75°C, della CO<sub>2</sub>, dell'N<sub>2</sub> e della miscela CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> 50-50 in PCL, al variare della pressione di solubilizzazione. [67]

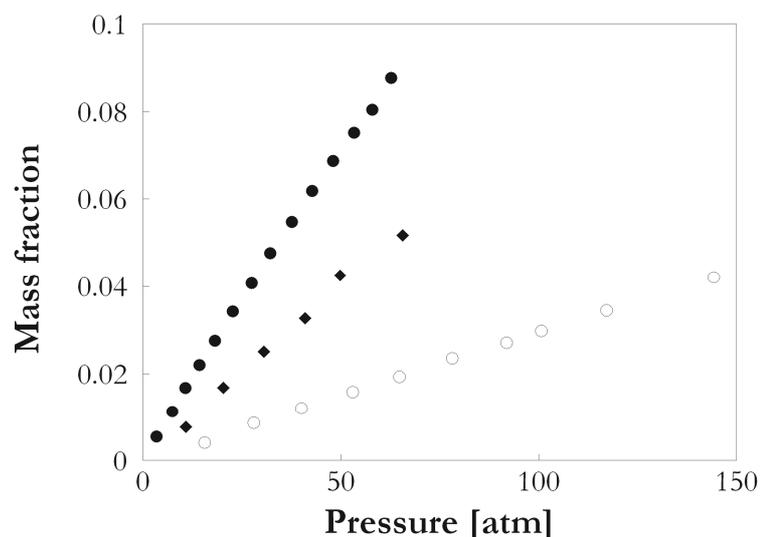


Figura 69 - Assorbimento isoterma a 75°C del PCL per CO<sub>2</sub> (●), N<sub>2</sub> (○) e miscela CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> 50-50 in peso (■).

Come si può osservare, la CO<sub>2</sub> presenta una capacità di solubilizzazione nel PCL molto maggiore di quella dell' N<sub>2</sub>. In considerazione del fatto che la dissoluzione di un gas all'interno di un polimero può contribuire ad

aumentarne il volume libero e, quindi la mobilità delle macromolecole, con la conseguenza di ridurre la viscosità della soluzione polimerica. Per tale motivo, le temperature di schiumatura dei sistemi PCL-CO<sub>2</sub> risultano significativamente inferiori a quelle dei sistemi PCL-N<sub>2</sub>. All'effetto legato alla solubilità del gas, si deve aggiungere quello relativo alla sua diffusione nella fase polimerica. Nel caso in esame, l'N<sub>2</sub> presenta una diffusività di un ordine di grandezza maggiore rispetto alla CO<sub>2</sub> e, come riportato nell'equazione 6, tale proprietà può portare ad nucleazione maggiore. Come inoltre evidenziato in figura 69, la miscela 50-50 di questi due gas può essere impiegata per ottimizzare l'effetto di nucleazione/crescita dell'agente espandente.

Un altro effetto importante dell'agente espandente è legato alle modifiche indotte sul processo di cristallizzazione. Le cinetiche di cristallizzazione di un polimero sono infatti un aspetto chiave nel definire le caratteristiche microstrutturali di un espanso ottenuto per gas foaming. In figura 70 è riportato l'effetto della CO<sub>2</sub> sulle cinetiche di cristallizzazione del polypropylene, valutate mediante analisi al DSC. [117]

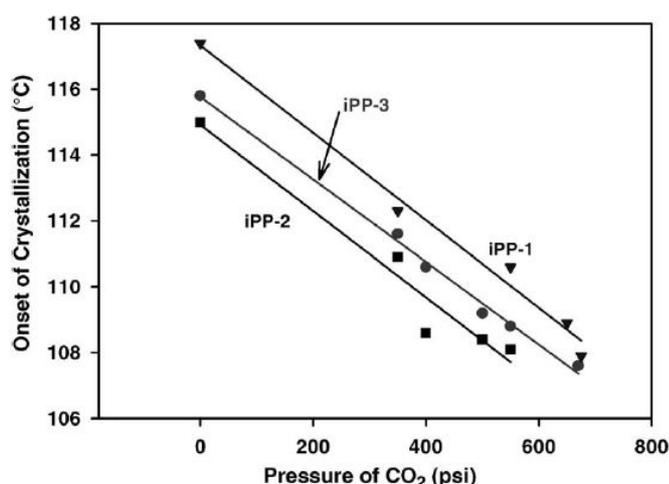


Figura 70 - Effetto della solubilizzazione di CO<sub>2</sub> sulla cristallizzazione del polypropylene.

Come mostrato in figura 70, la presenza della CO<sub>2</sub> riduce la temperatura di cristallizzazione del polimero e, tale riduzione è lineare con la concentrazione di gas. L'effetto plasticizzante del gas rallenta inoltre le cinetiche di cristallizzazione delle macromolecole ed impatta quindi sui processi di crescita e stabilizzazione della struttura porosa durante la fase di espansione. Ne consegue che, all'aumentare della frazione di gas disciolto nel polimero, è necessario ridurre la  $T_F$  per evitare il collasso della porosità.

Per evidenziare l'effetto della composizione di agente espandente sulle proprietà microstrutturali degli espansi, in figura 71 sono illustrate le microstrutture ottenute espandendo la zeina termoplastica impiegando differenti tipologie di gas. [74]

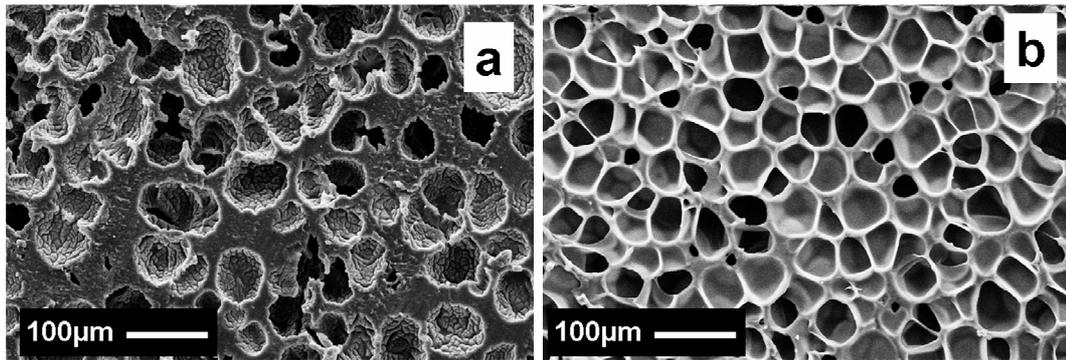


Figura 71 - Effetto dell'agente espandente sulla morfologia di espansi di zeina termoplastica: (a)  $\text{CO}_2$ ,  $T_F=50^\circ\text{C}$ ,  $P_{\text{sat}}=60\text{bar}$  e  $\text{PDR}=250\text{bar/s}$ ; (b)  $\text{N}_2$ ,  $T_F=100^\circ\text{C}$ ,  $P_{\text{sat}}=180\text{bar}$  e  $\text{PDR}=700\text{bar/s}$ .

Dall'analisi delle micrografie al SEM di figura 71 è possibile notare come la morfologia degli espansi sia profondamente legata alla tipologia di agente espandente. In particolare, nel caso della schiuma ottenuta con la  $\text{CO}_2$ , le bolle sono separate le une dalle altre da pareti dei pori molto spesse, cosa che suggerisce la presenza di una elevata densità. Inoltre i pori, di dimensioni di circa  $70\mu\text{m}$ , sono caratterizzati da una superficie particolarmente irregolare. Nel caso dell' $\text{N}_2$  invece, figura 71b, il maggior potere nucleante di tale gas porta alla formazione di una struttura porosa più omogenea e caratterizzata da una dimensione media dei pori inferiore ( $48\mu\text{m}$ ). Nell'analisi di questi risultati va tenuto comunque in conto che le condizioni di processo sono molto diverse. In particolare, la ridotta  $P_{\text{sat}}$  nel caso (a) ha come conseguenza una riduzione del PDR che, come vedremo fra poco, riduce la nucleazione a favore della crescita delle bolle di gas. Tuttavia, tale effetto è controbilanciato dal significativo incremento della  $T_F$  nel caso (b), che dovrebbe portare alla formazione di una porosità con pori di dimensione maggiore.

- Effetto della soprassaturazione

La soprassaturazione rappresenta la forza spingente del processo di nucleazione e crescita delle bolle di gas. Come descritto in precedenza e riportato nell'equazione 6, il  $\Delta P$  controlla la velocità di nucleazione ed in particolare, tanto maggiore è il  $\Delta P$ , tanto più veloce sarà il processo di nucleazione. A partire dalle equazioni che descrivono le fasi del processo di gas foaming, ci si aspetta quindi un aumento della densità dei pori all'aumentare della soprassaturazione. Studi effettuati in merito all'effetto del  $\Delta P$  sulla nucleazione mostrano però dati discordanti per differenti tipologie di sistemi polimero/gas investigati. [118-121] In effetti, la soprassaturazione determina la concentrazione di gas nel polimero e quindi produce effetti rilevanti anche sulle proprietà viscoelastiche del sistema e sulla tensione interfacciale fra le fasi. Per tale motivo, l'effetto del  $\Delta P$  deve essere valutato sperimentalmente in relazione allo specifico sistema polimero/gas preso in esame.

- Effetto della temperatura di espansione

Anche per quanto concerne l'effetto della temperatura di espansione sulla morfologia è necessario tenere in considerazione la dipendenza da tale parametro delle proprietà fisiche del sistema. La teoria classica della nucleazione omogenea prevede sostanzialmente che, ad un incremento della temperatura di espansione, corrisponda un aumento della velocità di nucleazione. Questo aspetto deve comunque essere correlato al processo di crescita delle bolle in cui gioca un ruolo fondamentale la viscosità del polimero. L'aumento della temperatura di espansione porta infatti ad una diminuzione della viscosità della soluzione polimerica, con una conseguente riduzione della resistenza del materiale alla crescita delle bolle al suo interno. All'aumentare della temperatura di espansione ci si aspetta quindi un incremento del rapporto di espansione che si manifesta in una diminuzione della densità. Quando tuttavia la temperatura diventa troppo elevata, in seguito alla fase di espansione del gas, la soluzione polimerica non è in grado di stabilizzare/cristallizzare la struttura porosa, per cui si osserva il collasso dei pori ed il conseguente aumento della densità.

A titolo di esempio, in figura 72 sono riportati i risultati delle misura di densità e delle analisi al SEM di espansi si PCL (tipologia impiegata in questo lavoro di tesi) al varare della  $T_F$ . Si può notare chiaramente l'effetto precedentemente discusso. In particolare, la densità degli espansi diminuisce da 0.5 a 0.23g/cm<sup>3</sup> quando la  $T_F$  passa da 35 a 40.5°C, per poi aumentare fino a 0.3 per una  $T_F=49^\circ\text{C}$ . L'effetto del collasso della densificazione prodotta dal parziale collasso della porosità è inoltre ben evidenziabile nelle micrografie al SEM dei campioni ottenuti a  $T_F$  pari a 40.5 e 49°C.

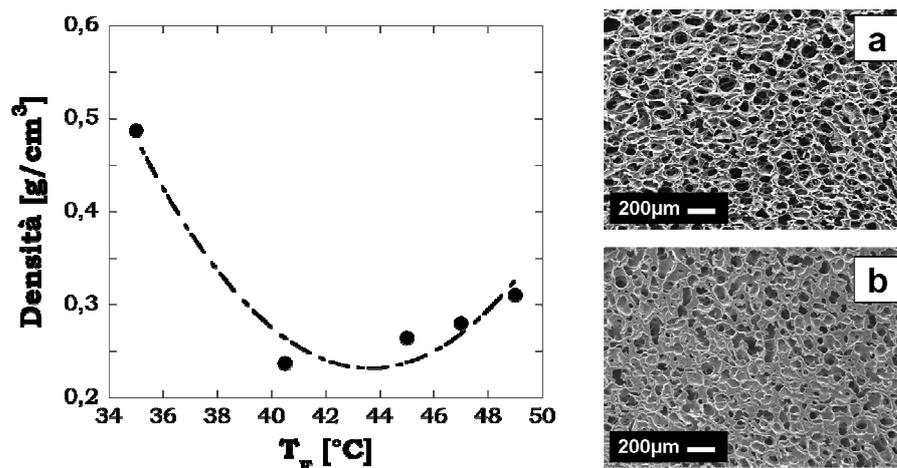


Figura 72 - Effetto della  $T_F$  sulla densità e sulla morfologia di espansi di PCL ottenuti impiegando una miscela CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> 20-80, una  $P_{\text{sat}}=180\text{bar}$  ed un PDR=700bar/s: (a)  $T_F=40.5^\circ\text{C}$ , (b)  $T_F = 49^\circ\text{C}$ .

Anche nel caso della  $T_F$ , è necessario prendere in considerazione i differenti sistemi polimero/gas e verificare sperimentalmente l'effetto di

tale parametro sui processi di nucleazione e crescita delle bolle di gas. [79]

- Effetto della velocità di caduta di pressione

Pur non comparando direttamente nelle equazioni relative ai processi di nucleazione e crescita delle bolle di gas, il PDR ha una influenza molto importante sulla morfologia degli espansi ottenuti per gas foaming. Per comprendere l'effetto del PDR sulle proprietà microstrutturali degli espansi, introduciamo il concetto di volume di influenza. Prendiamo in considerazione la nucleazione di una singola bolla di gas all'interno della fase polimerica, come illustrato in figura 73a. [122]

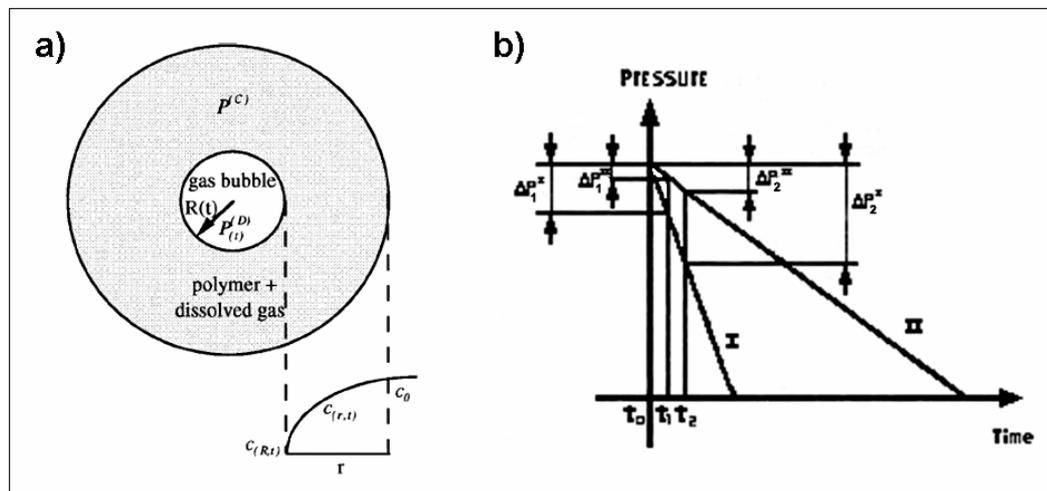


Figura 73 - Rappresentazione schematica di: (a) singola bolla e suo volume di influenza; (b) basso e alto PDR.

Come illustrato in precedenza, il processo di nucleazione e crescita delle bolle di gas è un processo spinto da fenomeni di natura diffusiva. Infatti, in seguito alla nucleazione della bolla, il gas presente nella soluzione polimerica diffonde all'interno del nucleo formatosi. In seguito a tale fenomeno, la concentrazione di gas nella regione circostante la bolla si riduce, assumendo un profilo come quello riportato in figura 73a. Il volume di influenza è quella regione di soluzione polimero/gas circostante la bolla, in cui la concentrazione del gas è inferiore alla concentrazione critica necessaria alla formazione di un nuovo nucleo. Per tale motivo, il gas presente in questa regione può solamente diffondere all'interno di bolle già formatesi per accrescerne la dimensione.

Consideriamo ora i due differenti profili di caduta di pressione riportati in figura 73b che, per semplicità di trattazione, supponiamo essere lineari. [77]

Indicato con  $t_0$  l'istante di tempo in cui inizia la caduta di pressione e quindi la nucleazione delle prime bolle, all'istante  $t_1$  il profilo I (alto PDR) sarà caratterizzato da un  $\Delta P_1^I > \Delta P_1^{II}$ . Per cui, nel caso I, il numero di

celle nucleate nell'unità di tempo e di volume, dato dall'equazione 6, sarà più elevato rispetto al caso II (basso PDR).

Passando dall'istante di tempo  $t_1$  all'istante di tempo  $t_2$ , l'ulteriore caduta di pressione porterà alla crescita delle bolle preesistenti, per effetto della diffusione delle molecole di gas al loro interno o per la riduzione di pressione e, alla nucleazione di ulteriori bolle laddove la concentrazione del gas nel polimero è superiore alla concentrazione critica. Nel caso del processo I la velocità di nucleazione sarà in ogni istante di tempo superiore a quella del processo II, essendoci una dipendenza esponenziale dal  $\Delta P$ , mentre la situazione opposta si avrà per i tempi di nucleazione. Essendo quindi i tempi di nucleazione del processo II più lunghi di quelli del processo I, rispetto a quest'ultimo, nel processo II una parte del gas sarà servita al processo di crescita rendendo quindi minore la percentuale di gas a disposizione della nucleazione. Nel profilo di caduta di pressione più basso, la maggiore fase di crescita e i lunghi tempi richiesti alla nucleazione porteranno le regioni di influenza a sovrapporsi prima che nel caso di un alto PDR. La sovrapposizione delle regioni di influenza fa sì che fra le bolle non possa verificarsi più alcuna nucleazione e, il gas restante sarà tutto a disposizione della crescita. Ma tenendo quindi costanti tutti gli altri parametri di processo, tanto più elevata è la velocità di espansione tanto più sarà favorito il processo di nucleazione rispetto a quello di crescita e l'espanso sarà caratterizzato da una densità di pori maggiore.

#### Fase di raffreddamento

Pur non essendo un parametro di processo vero e proprio, il raffreddamento del sistema nel passaggio dalla temperatura di saturazione a quella di espansione risulta una fase molto importante. Infatti per ottenere una struttura espansa con caratteristiche microstrutturali omogenee, è necessario che il raffreddamento sia tale da impedire la desolubilizzazione del gas indotta dalla riduzione di pressione per il raffreddamento. Inoltre, un profilo di raffreddamento ottimale deve prevedere una fase finale caratterizzata da una temperatura costante, al fine di evitare la presenza di gradienti termici all'interno del materiale. Nel caso in cui il polimero da espandere sia un polimero semicristallino, è necessario considerare un ulteriore aspetto durante la fase di raffreddamento. Se infatti il tempo impiegato per il raggiungimento della  $T_F$  risulta confrontabile con quello necessario alle macromolecole per riarrangiarsi a formare fasi cristalline, il processo di espansione può essere fortemente compromesso. Le regioni cristalline infatti, producono un incremento della viscosità della matrice e non permettono il processo di espansione del gas. Un profilo di raffreddamento ottimale deve quindi rispettare le seguenti condizioni:

1. Avere una fase iniziale caratterizzata da una velocità di raffreddamento elevata così da impedire la fuoriuscita del gas dalla matrice per effetto della riduzione di temperatura.

2. Avere una fase finale caratterizzata da una velocità di raffreddamento sufficientemente bassa da permettere di uniformare la temperatura in tutta la sezione del campione.
3. Avere una durata totale inferiore al tempo necessario alla formazione dei cristalli per quella data temperatura di espansione.



# Bibliografia

- [1] M. S. Chapekar, *J. Biomed. Mater. Res.: Appl. Biomater.* **2000**, 53, 617.
- [2] R. Langer, J. P. Vacanti, *Science* **2003**, 260, 920.
- [3] V. Karageorgiou, D. Kaplan, *Biomaterials* **2005**, 26, 5474.
- [4] D. W. Huttmacher, *Biomaterials* **2000**, 21, 2529.
- [5] P. A. Gunatillake, R. Adhikari, *Europ. Cells Mater.* **2003**, 5, 1.
- [6] S. Yang, K. Leong, Z. Du, C. Chua, *Tissue Eng.* **2001**, 7, 679.
- [7] J. M. Dang, K. W. Leong, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, 7, 487.
- [8] W. Friess, *Europ. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, 45, 113.
- [9] H. Kim, J. C. Knowles, H. Kim, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* **2005**, 74B, 686.
- [10] M. E. Gomes, V. I. Sikavitsas, E. Behravesch, R. L. Reis, A. G. Mikos, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2003**, 67A, 87.
- [11] S. V. Madihally, H. W.T. Matthew, *Biomaterials* **1999**, 20, 1133.
- [12] K. Whang, K. E. Healy, D. R. Elenz, E.K. NAM, D. C. Tsai, C. H. Thomas, G. W. Nuber, F. H. Glorieux, R. Travers, S. M. Srague *Tissue Eng.* **1999**, 5, 35.
- [13] Y. S. Nam, T. G. Park, *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, 47, 8.
- [14] S. Kim, M. S. Park, O. Jeon, C. Y. Choi, B. Kim, *Biomaterials* **2006**, 27, 1399.
- [15] T. J. Corden, I. A. Jones, C. D. Rudd, P. Christian, S. Downes, K. E. McDougall, *Biomaterials* **2000**, 21, 713.
- [16] M. Martina, D. W. Huttmacher, *Polym. Int.* **2007**, 56, 145.
- [17] R. Suuronen, T. Pohjonen, J. Hietanen, C. Lindqvist, *J. Oral Maxillofac. Surg.* **1998**, 56, 604.
- [18] S. Su, K. T. Nguyen, P. Satasyia, P. E. Greilich, L. Tang, R. C. Eberhart *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, **2005**, 16, 353.
- [19] S. H. Li, J. R. De Wijn, P. Layrolle, K. de Groot, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, 61 109.
- [20] M. A. Knackstedta, C. H. Arnsa, T. J. Sendena, K. Gross, *Biomaterials* **2006**, 27, 2776.
- [21] O. Hironobu, K. Shoichi, Y. Eiichi, I. Hiroyoshi, H. Larry, W. June, T. Eiji, S. Tomihito, *Clin. Orthop. Rel. Res.* **1997**, 334, 316.
- [22] M. Jarcho, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1981**, 157, 259.
- [23] C. T. Laurencin, A. M. A. Ambrosio, M. D. Borden, J. A. Cooper, *Tissue Eng.: Orthop, Appl. Annu. Rev. Biomed. Eng.* **1999**, 1, 19.
- [24] M. J. Mondrinos, R. Dembzyński, L. Lu, V. K.C. Byrapogu, D. M. Wootton, P. I. Lelkes, J. Zhou, *Biomaterials* **2006**, 27, 4399.
- [25] S. Kim, M. S. Park, O. Jeon, C. Y. Choi, B. Kim, *Biomaterials* **2006**, 27, 1399.
- [26] J. Zeltinger, J. K. Sherwood, D. A. Graham, R. Müller, L. G. Griffith, *Tissue Eng.* **2001**, 7, 557.

- [27] F. J. O'Brien, B. A. Harley, I. V. Yannas, L. J. Gibson, *Biomaterials* **2005**, 26, 433.
- [28] S. Miot, T. Woodfield, A. U. Daniels, R. Suetterlin, I. Peterschmitt, M. Heberer, C. A. van Blitterswijk, J. Riesle, I. Martin, *Biomaterials* **2005**, 26, 2479.
- [29] T. B. F. Woodfield, C. A. Van Blitterswijk, J. De Wijn, T. J. Sims, A. P. Hollander, J. Riesle, *Tissue Eng.* **2005**, 11, 1297.
- [30] L. G. Cima, J. P. Vacanti, C. Vacanti, D. Ingber, D. Mooney, R. Langer, *J. Biomech. Eng.* **1991**, 113, 143.
- [31] J. J. Klawitter, S. F. Hulbert, *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* **1971**, 2, 161.
- [32] B. D. Ratner, S. J. Bryant, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2004**, 6, 41.
- [33] D. J. Mooney, D. F. Baldwin, N. P. Suh, J. P. Vacanti, R. Langer, *Biomaterials* **1996**, 17, 1417.
- [34] T. S. Karande, J. L. Ong, C. M. Agrawal, *Ann. Biomed. Eng.* **2004**, 32, 1728.
- [35] A. F. Black, F. Berthod, N. L'Heureux, L. Germain, F. A. Auger, *FASEB J* **1998**; 12,1331.
- [36] R. R. Chen, E. A. Silva, W. W. Yuen, D. J. Mooney, *Pharm. Res.* **2007**, 24, 258.
- [37] P. X. Ma, R. Zhang, *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 56, 469.
- [38] R. V. Bellamkonda, *Biomaterials* **2006**, 27, 3515.
- [39] B. D. Boyan, T.W. Hummert, D. D. Dean, Z. Schwartz, *Biomaterials* **1996**, 17, 137.
- [40] T. P. Kunzler, T. Drobek, M. Schuler, N. D. Spencer, *Biomaterials* **2007**, 28, 2175.
- [41] J. R. Parsons, J. Black, S. L. Woo, G. Hastings, *Handbook of Biomaterials Properties. New York: Chapman & Hall* **1998**.
- [42] R. Pietrabissa, *Biomateriali per protesi ed organi artificiali* **1996**.
- [43] A. G. Mikos, G. Sarakinos, S. M. Leite, J. P. Vacanti, R. Langer, *Biomaterials* **1993**, 14, 323.
- [44] A. G. Mikos, A. J. Thorsen, L. A. Gzerwonka, Y. Bao, R. Langer, D. N. Winslow, J. P. Vacanti, *Polymer* **1994**, 35, 1068.
- [45] R. C. Thomson, M. J. Yaszemski, J. M. Powers, , A. G. Mikos, *Biomaterials* **1998**, 19, 1935.
- [46] K. A. Gross, L. M. Rodríguez-Lorenzo, *Biomaterials* **2004**, 25, 4955.
- [47] J. Zhang, L. Wu, D. Jing, J. Ding, *Polymer* **2005**, 46, 4979.
- [48] N. R. Washburn, C. G. Simon, Jr., A. Tona, H. M. Elgendy, A. Karim, E. J. Amis, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, 60, 20.
- [49] Z. Yuan, B. D. Favis, *Biomaterials* **2004**, 25, 2161.

- [50] M. Montjovent, L. Mathieu, H. Schmoekel, S. Mark, P. Bourban, P. Zambelli, L. A. Laurent-Applegate, D. P. Pioletti, *J. Biomed. Mater. Res.* **2007**, 83A, 41.
- [51] L. M. Mathieu, T. L. Mueller, P. Bourban, D. P. Pioletti, R. Muller, J. E. Manson, *Biomaterials* **2006**, 27, 905.
- [52] B. Flautre, M. Descamps, C. Delecourt, M. C. Blary, P. Hardouin, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2001**, 12, 679.
- [53] F. R. Rose, L. A. Cyster, D. M. Grant, C. A. Scotchford, S. M. Howdle, K. M. Shakesheff, *Biomaterials* **2004**, 25, 5507.
- [54] Y. S. Nam, T. G. Park, *Biomaterials* **1999**, 20, 1783.
- [55] X. Liu, P. X. Ma, *Ann. Biomed. Eng.* **2004**, 32, 477.
- [56] I. Zein, D. W. Hutmacher, K. C. Tan, S. H. Teoh, *Biomaterials* **2002**, 23, 1169.
- [57] J. M. Williams, A. Adewunmi, R. M. Schek, C. L. Flanagan, P. H. Krebsbach, S. E. Feinberg, S. J. Hollister, S. Das, *Biomaterials* **2005**, 26, 4817.
- [58] J. G. Dellinger, J. Cesarano, R. D. Jamison, *J. Biomed. Mater. Res.* **2007**, 82A, 383.
- [59] T. Subbiah, G. S. Bhat, R. W. Tock, S. Parameswaran, S. S. Ramkumar *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, 96, 557.
- [60] Z. Huang, Y.Z. Zhang, S. Ramakrishna, C.T. Limb, *Polymer* **2004**, 45, 5361.
- [61] B. Mina, S. W. Lee, J. N. Limb, Y. You, T. S. Lee, P. H. Kang, W. H. Park, *Polymer* **2004**, 45, 7137.
- [62] W. Li, R. Tuli, X. Huang, P. Laquerriere, R. S. Tuan, *Biomaterials* **2005**, 26, 5158.
- [63] G. Ciapetti, L. Ambrosio, L. Savarino, D. Granchi, E. Cenni, N. Baldini, S. Pagani, S. Guizzardi, F. Causa, A. Giunti, *Biomaterials* **2003**, 24, 3815.
- [64] D. L. Harris, B. Kim, D. J. Mooney, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, 42, 396.
- [65] S. Kima, M. S. Park, O. Jeon, C. Y. Choi, B. Kim, *Biomaterials* **2006**, 27, 1399.
- [66] J. Reignier, M. A. Huneault, *Polymer* **2006**, 47, 4703.
- [67] E. Di Maio, G. Mensitieri, S. Iannace, L. Nicolais, W. Li, R. W. Flumerfelt, *Polym. Eng. Sci.* **2005**, 45, 432.
- [68] J. Reignier, J. Tatibouët, R. Gendron, *Polymer* **2006**, 47, 5012.
- [69] I. Tsvintzelis, E. Pavlidou, C. Panayiotou, *J. Supercr. Fluids* **2007**, 42, 265.
- [70] H. Kweon, M. K. Yoo, I. KyuPark, T. H. Kim, H. C. Lee, H. Lee, J. Oh, T. Akaiked, C. Cho, *Biomaterials* **2003**, 24, 801.
- [71] A.G. Word, *The British Gelatine and Glue Research Association*, London, 7, **1954**.

- [72] S. B. Lee, Y. H. Kim, M. S. Chong, S. H. Hong, Y. M. Lee, *Biomaterials* **2005**, 26, 1961.
- [73] Y. Z. Zhang, J. Venugopal, Z. M. Huang, C. T. Lim, S. Ramakrishna, *Polymer* **2006**, 47, 2911.
- [74] A. Salerno, M. Oliviero, E. Di Maio, S. Iannace, *Int. Polym. Proc.* **2007**, 5, 480.
- [75] P. Sepulveda, A. H. Bressiani, J. C. Bressiani, L. Meseguer, B. König, Jr. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, 62, 587.
- [76] P. Ducheine, Q. Qiu, *Biomaterials* **1999**, 20, 2287.
- [77] C. B. Park, D. F. Baldwin, N. P. Suh, **2004**, 35, 432.
- [78] J. J. A. Barry, M. M. C. G. Silva, V. K. Popov, K. M. Shakesheff, S. M. Howdle, *Phil. Trans. R. Soc. A* **2006**, 364, 249.
- [79] X. Han, K. W. Koelling, D. L. Tomasko, J. L. Lee, *Polym. Eng. Sci.* **2003**, 43, 1206.
- [80] Q. Huang, B. Seibig, D. Paul, J. Ding, *J. Membrane. Sci.* **1999**, 161, 287.
- [81] B. A. Rodeheaver, J. S. Colton, *Polym. Eng. Sci.* **2001**, 46, 380.
- [82] Y. Zhang, D. Rodrigue, A. Ait-Kadi, *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, 90, 2111.
- [83] Y. Ema, M. Ikeya, M. Okamoto, *Polymer* **2006**, 47, 5350.
- [84] P. A. M. Lips, I. W. Velthoen, P. J. Dijkstra, M. Wessling, J. Feijen, *Polymer* **2005**, 46, 9396.
- [85] Q. Xu, Q. Peng, W. Ni, Z. Hou, J. Li, L. Yu, *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, 100, 2901.
- [86] D. Ladin, S. S. Park, H. E. Naguib, *J. Cell. Plast.* **2001**, 37, 109.
- [87] A. V. Nawaby, A. A. Farah, X. Liao, W. J. Pietro, M. Day, *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2458.
- [88] S. H. Alavi, B. K. Gogoi, M. Khan, B. J. Bowman, S. S. H. Rizvi, *Food. Res. Int.* **1999**, 32, 107.
- [89] A. B. Metzner, *J. Rheol.* **1985**, 29, 739.
- [90] D. Jing, J. Ding, *Macromol. Biosci.* **2007**, 7, 1.
- [91] A. V. Shenoy, *Rheology of filled polymer systems*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, **1999**.
- [92] V. Trappe, P. Sandkühler, *Curr. Opin. Colloid. In.* **2004**, 8, 494.
- [93] J. Paquien, J. Galy, J. Gérard, A. Pouchelon, *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2005**, 260, 165.
- [94] R. C. Willemse, A. P. de Boer, J. van Dam, A. D. Gotsis, *Polymer* **1998**, 39, 5879.
- [95] R. C. Willemse, A. Posthuma de Boer\*, J. van Dam, A. D. Gotsis, *Polymer* **1999**, 40, 827.
- [96] M. Jaziri, T. K. Kallel, S. Mbarek, B. Elleuch, *Polym. Int.* **2005**, 54, 1384.

- [97] P. R. Hornsby, *Adv. Polym. Sci.* **1999**, 139, 155.
- [98] S. Iannace, E. Di Maio, L. Nicolais, *Cell. Polym.* **2001**, 20, 321.
- [99] P. C. Lee, J. Wang, C. B. Park, *ANTEC* **2005**, 2260.
- [100] P. C. Lee, J. Wang, C. B. Park, *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, 102, 3376.
- [101] S. H. Oh, K. Park, J. M. Kim, J. H. Lee *Biomaterials* **2007**, 28, 1664.
- [102] Y. Di, S. Iannace, E. Di Maio, L. Nicolais, *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* **2003**, 41, 670.
- [103] G. W. Padua, *Protein-Based Films and Coatings*, Gennadios, CRC Press LLC, Boca Raton **2002**, 43.
- [104] T. T. Ha, G. W. Padua, *Trans. ASAE* **2001**, 44, 1223.
- [105] A. Redl, M. H. Morel, J. Bonicel, S. Guilbert, B. Vergnes, *Rheol. ACTA* **1999**, 38, 311.
- [106] F. M. Vanin, P. J. A. Sobral, F. C. Menegalli, R. A. Carvalho, A. M. Q. B. Habitante, *Food Hydroc.* **2005**, 19, 899.
- [107] P. Sarazin, B. D. Favis, *Biomacromolecules* **2003**, 4, 1669.
- [108] S. Whitaker, *Ind. Eng. Chem.* **1969**, 61, 14.
- [109] K. D. Kwak, M. Okada, T. Chiba, T. Nose, *Macromolecules* **1992**, 25, 7204.
- [110] A. Salerno, M. Oliviero, E. Di Maio, S. Iannace, P. A. Netti, *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, 106, 3335.
- [111] S. Yamane, N. Iwasaki, Y. Kasahara, K. Harada, T. Majima, K. Monde, S. Nishimura, A. Minami, *J. Biomed. Mater. Res.* **2007**, 81A, 586.
- [112] X. Liao, A. V. Nawaby, P. Whitfield, M. Day, M. Champagne, J. Denault, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2937.
- [113] S. Cotugno, E. Di Maio, G. Mensitieri, L. Nicolais, S. Iannace, *Handbook of Biodegradable Polymeric Materials and Their Applications* **2005**.
- [114] J. S. Colton, N. P. Suh, *Polym. Eng. Sci.* **1987**, 27, 500.
- [115] J. S. Colton, N. P. Suh, *Polym. Eng. Sci.* **1987**, 27, 485.
- [116] J. D. Yoon, S. W. Cha, *Polymer Testing* **2001**, 20, 287.
- [117] M. Varma-Nair, P. Y. Handa, A. K. Mehta, P. Agarwal, *Thermochimica Acta* **2003**, 396, 57.
- [118] C. B. Park L. K. Cheung, *Polym. Eng. Sci.* **1997**, 37, 1.
- [119] S. K. Goel, E. J. Beckman, *Polym. Eng. Sci.* **1994**; 34, 1137.
- [120] I. Tsvintzelis, A. G. Angelopoulou, C. Panayiotou, *Polymer* **2007**, 48, 5928.
- [121] K. A. Arora, A. J. Lesser, T. J. McCarthy, *Macromolecules* **1998**, 31, 4614.

- [122] K. Joshi J. G. Lee, M. A. Shafi, R. W. Flumerfelt, J. Appl. Polym. Sci. **1998**, 67, 1353.