



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

**TESI DI LAUREA IN  
INGEGNERIA PROCESSI INDUSTRIALI E MATERIALI**  
(Laurea triennale DM 270/04 – indirizzo Materiali)

**PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI SISTEMI  
COMPOSITI IN POLIMERI BIODEGRADABILI E  
IDROSSIAPATITE PER LA REALIZZAZIONE DI SCAFFOLD**

*Relatore: Prof.ssa Giovanna Brusatin*

*Correlatore: Dott.ssa Veronica Vascotto*

*Laureanda: Elena Colusso*

ANNO ACCADEMICO 2011 – 2012



# Indice

<b>Introduzione</b> .....	<b>1</b>
<b>Capitolo 1 Ingegneria tissutale e stato dell'arte</b> .....	<b>3</b>
1.1 Lo scaffold: caratteristiche e funzioni .....	3
1.2 I materiali biocompatibili .....	6
1.2.1 L'acido polilattico (PLA) .....	7
1.2.2 I Poliidrossialcanoati (PHA) .....	9
1.2.3 L'idrossiapatite (HA) .....	10
<b>Capitolo 2 Parte sperimentale</b> .....	<b>13</b>
2.1 Descrizione e fasi del lavoro .....	13
2.2 Materiali utilizzati .....	14
2.2.1 Polimeri biorisorbibili .....	14
2.2.2 Agenti porogeni .....	15
2.2.3 Idrossiapatite nanometrica .....	16
2.3 Preparazione dei campioni .....	17
2.3.1 Essiccazione .....	17
2.3.2 Miscelazione .....	17
2.3.3 Preparazione dei provini .....	19
2.3.4 Particulate Leaching .....	19
2.4 Tecniche di caratterizzazione .....	20
2.4.1 Microscopia Elettronica a Scansione .....	20
2.4.2 Spettroscopia infrarossa FT-IR .....	21
2.4.3 Diffrazione a raggi X .....	21
<b>Capitolo 3 Risultati ed Analisi</b> .....	<b>23</b>
3.1 Analisi al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) .....	23
3.1.2 Spettrometria a dispersione d'energia (EDS) .....	32
3.2 Caratterizzazione tramite spettroscopia infrarossa FT-IR .....	35
3.3 Caratterizzazione mediante diffrazione ai raggi x .....	44
<b>Conclusioni</b> .....	<b>49</b>
<b>Riferimenti bibliografici</b> .....	<b>53</b>



# Introduzione

Negli ultimi decenni ci sono stati ampi sviluppi di ricerca nell'ambito dell'ingegneria tissutale. Tale sviluppo è stato favorito dalla crescente necessità di trovare valide alternative all'impiego di impianti e protesi a lungo termine, al fine di ridurre o eliminare i problemi riguardanti le reazioni immunologiche da parte dell'organismo. L'ampliamento della conoscenza dei biomateriali, inoltre, ha permesso di sviluppare strutture di sostegno, *scaffold*, in grado di stimolare e favorire la rigenerazione del tessuto danneggiato.

Il lavoro di tesi presentato in questo elaborato ha avuto come scopo la progettazione e la caratterizzazione di materiali compositi a matrice polimerica per la realizzazione di *scaffold* in grado di rigenerare il tessuto osseo. L'attività di ricerca è stata condotta presso i laboratori del Coordinamento Interuniversitario Veneto per le Nanotecnologie (Associazione CIVEN) di Marghera.

L'attività si è concentrata inizialmente sulla scelta delle materie prime, restringendo il campo a due biopolimeri, un poliacido lattico (PLA) e un poliidrossialcanoato (PHA), per le loro caratteristiche di biocompatibilità e biorisorbibilità. Inoltre, è stata addizionata una nano-idrossiapatite, un materiale ceramico noto per la capacità di migliorare le prestazioni meccaniche della matrice polimerica alla quale viene aggiunta e favorire l'adesione e la crescita di cellule ossee (osteoblasti).

Secondariamente, è stato sviluppato e ottimizzato un metodo di preparazione dei materiali che ovviasse ai problemi di tossicità connessi all'uso di solventi organici e che fosse facilmente trasferibile a livello industriale: il processo elaborato prevede un primo step di miscelazione in fuso (*melt blending*) del biopolimero e dei vari additivi, seguito da una fase di lisciviazione del particolato (*particulate leaching*), finalizzato alla formazione di pori necessari per la rigenerazione e la vascolarizzazione dei tessuti.

L'elaborato è strutturato in 4 capitoli. Nel primo capitolo, di carattere teorico, si descrive lo stato attuale della ricerca nel settore dell'ingegneria tissutale, le caratteristiche principali che deve possedere uno *scaffold* e si introducono la chimica e le proprietà delle materie prime che verranno impiegate in questo studio durante la fase sperimentale. Nel secondo capitolo vengono illustrate le fasi del lavoro, i materiali, i processi e le tecniche utilizzate per la realizzazione e la caratterizzazione dei prodotti. I risultati ottenuti dalla caratterizzazione vengono esposti e discussi all'interno del terzo capitolo, mentre nell'ultimo capitolo sono esposte le conclusioni di questo studio.



# Capitolo 1

## Ingegneria tissutale e stato dell'arte

Nel 1988 la National Science Foundation conia il termine “*tissue engineering*” per indicare una nuova tecnica interdisciplinare che unisce le conoscenze dell'ingegneria e delle scienze biologiche allo scopo di comprendere le relazioni tra struttura e funzione nei tessuti sani e malati dei mammiferi, al fine di sviluppare dei sostituti biologici in grado di ripristinarne o migliorarne le funzioni.

La nascita di questa disciplina apre un nuovo scenario nel campo della ricerca medica: dallo sviluppo di protesi biocompatibili a lungo termine, si passa alla progettazione di componenti che non solo mirano a rispondere alle funzioni di supporto e sostituzione del tessuto danneggiato ma anche stimolano e favoriscono la rigenerazione di tale tessuto venendo riassorbiti dal corpo una volta conclusa la loro funzione.

Uno dei settori in cui l'ingegneria tissutale ha trovato maggior applicazione è quello ortopedico, dove risulta di grande interesse la rigenerazione del tessuto osseo mediante la realizzazione di “*scaffold*”.

### 1.1 Lo scaffold: caratteristiche e funzioni

Lo *scaffold* è un supporto, inserito nel corpo umano, che ha lo scopo di provvedere alla rigenerazione del tessuto. Esso è, in genere, realizzato con materiali biodegradabili-biorassorbibili, cioè tali da subire il processo di biodegradazione indotto dall'attività vitale dell'organismo e dal contatto con l'ambiente fisiologico e i cui prodotti di degradazione entrano nei processi metabolici.

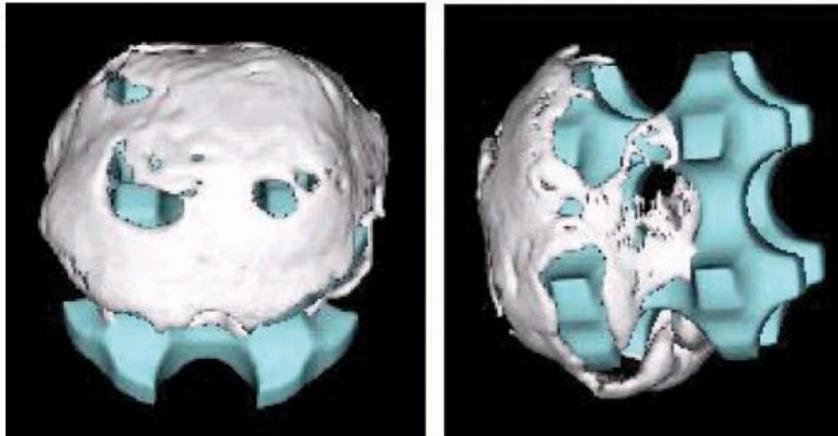
Le principali caratteristiche che dovrebbe presentare uno *scaffold* osseo sono <sup>(1,2)</sup> :

- essere biocompatibile e permettere la crescita delle cellule ossee, favorendo il loro attecchimento sulla superficie e la proliferazione;
- essere facilmente sterilizzabile, per prevenire le infezioni, in accordo con i requisiti standard internazionali per l'uso clinico (il processo di sterilizzazione non deve modificare la composizione chimica);
- avere una lavorabilità adeguata per poter costruire le opportune geometrie;

- possedere proprietà meccaniche simili a quelle delle ossa che vanno ad integrare, e in particolare una resistenza meccanica adeguata a fornire un supporto per la rigenerazione del nuovo tessuto;
- avere una struttura porosa per permettere la penetrazione delle cellule, la crescita del tessuto e la sua vascolarizzazione. La porosità deve presentare un buon grado di interconnessione per consentire alle cellule di migrare in più direzioni.

Il materiale di cui è costituito il supporto deve, inoltre, indurre la formazione di un forte legame osseo, favorendo l'osteconduzione e l'osteoiduzione. Con *osteconduzione* s'intende il processo mediante il quale, tramite l'utilizzo di impalcature temporanee, vengono fornite le condizioni necessarie per la deposizione di una nuova frazione di tessuto osseo. Il supporto biologico ideale è un osso autologo ma si può ricorrere a materiali sintetici biocompatibili, come per esempio alcuni tipi di polimeri. In Figura 1.1 è rappresentato un esempio di scaffold realizzato in policaprolattone sul quale, come si può osservare, sta crescendo il nuovo tessuto.

L'*osteoiduzione*, invece, indica il processo secondo cui le molecole hanno la capacità di stimolare le cellule preposte alla formazione dell'osso, inducendo o incrementando la loro funzione.



**Figura 1.1** Due differenti viste della crescita dell'osso su uno scaffold di policaprolattone (in bianco è rappresentato il materiale osseo, in azzurro il policaprolattone) (3).

Come accennato, una caratteristica importante per lo scaffold è la porosità. Sebbene in letteratura si trovino esempi di scaffold non porosi (4,5), diversi studi dimostrano che la presenza dei pori favorisce la rigenerazione del tessuto osseo; in particolare, è auspicabile la presenza di gradienti di porosità, così da ottenere una struttura il più possibile simile a quella delle ossa umane. L'eterogeneità dei pori, infatti, può migliorare le proprietà meccaniche,

strutturali e biologiche, rispetto ad un biomateriale caratterizzato da pori dello stesso tipo; tuttavia, affinché avvenga la mineralizzazione e la rigenerazione delle ossa, la dimensione dei pori dovrebbe essere dell'ordine dei 100  $\mu\text{m}$  <sup>(6)</sup>.

È possibile schematizzare la struttura porosa in 4 livelli "dimensionali" dei pori, in base alle funzioni strutturali che vengono svolte:

1. 1-100  $\mu\text{m}$ , per impartire caratteristiche biomimetiche (i pori piccoli porterebbero a un miglioramento dell'adesione cellulare al substrato);
2. 100-500  $\mu\text{m}$ , per promuovere la crescita dell'osso (*bone in-growth*);
3. 500-1000  $\mu\text{m}$ , per portare a una diminuzione del modulo di Young dello scaffold, al fine di contenere il fenomeno di *stress-shielding* (sebbene questo vada a discapito di una generale resistenza meccanica);
4. >1000  $\mu\text{m}$ , per il primo fissaggio dello scaffold all'"osso ospite" del paziente, durante gli interventi medici chirurgici.

In Tabella 1.1, invece, sono riportati i diversi processi biologici (come per esempio l'interazione con le proteine) che avvengono all'interno dello scaffold al variare della dimensione dei pori.

**Tabella 1.1** Distribuzione della dimensione dei pori in uno scaffold ideale per applicazioni nell'ingegneria del tessuto osseo <sup>(2)</sup>.

Dimensione pori ( $\mu\text{m}$ )	Funzione biologica
<1	Interazione con le proteine, responsabile della bioattività
1-20	Adesione delle cellule e orientazione della crescita cellulare
100-1000	Crescita cellulare e crescita ossea
>1000	Forma e funzionalità dell'impianto

Vari biomateriali inclusi ceramici, metalli, polimeri e compositi sono stati investigati come potenziali materiali per *scaffold* ossei. Tra questi i polimeri si sono rivelati i materiali più indicati grazie alle loro proprietà fisico-chimiche, alla biocompatibilità e alla possibilità di controllare la biodegradabilità, regolando la velocità di degradazione attraverso la copolimerizzazione o modificando l'idrofobicità e la cristallinità del polimero <sup>(7)</sup>.

Le caratteristiche dei diversi materiali biocompatibili saranno trattate in maniera approfondita nel prossimo paragrafo, soffermandosi in particolare sui polimeri biorassorbibili.

## 1.2 I materiali biocompatibili

La principale caratteristica richiesta ad un materiale per poter essere utilizzato in campo medico è la biocompatibilità. Un materiale si definisce biocompatibile se è in grado di svolgere la sua funzione in una specifica applicazione biomedica senza causare effetti tossici o dannosi sul sistema biologico <sup>(8)</sup>. I materiali biocompatibili si differenziano in due classi: inorganici (metalli, ceramici) e organici, come per esempio i polimeri. I metalli comunemente utilizzati come biomateriali includono l'oro, il tantalio, il titanio e le leghe di titanio, le leghe cobalto-cromo. Essi presentano ottime proprietà meccaniche, sono facilmente lavorabili per realizzare anche forme complesse e sono relativamente poco costosi. I principali limiti che presentano sono di non essere biodegradabili e di essere inerti, cioè di non permettere un'interazione 'attiva' con i tessuti circostanti.

Al contrario, i materiali ceramici, quali l'ossido di zirconio e di titanio, i vetri bioattivi e l'idrossiapatite esibiscono una buona velocità di degradazione e discreta processabilità, sono biocompatibili, hanno una struttura chimica simile a quella delle ossa umane e sono bioattivi<sup>1</sup>. I principali svantaggi per il loro uso clinico sono la bassa resistenza meccanica e la fragilità.

I materiali organici più studiati per applicazioni mediche sono i polimeri ed in particolare quelli biodegradabili. La loro degradazione, di solito, avviene inizialmente per via chimica, tramite un processo di idrolisi, e successivamente per via enzimatica. L'idrolisi non riguarda solo l'area superficiale ma tutto il volume (*bulk degradation*) ed è causata dalla rapida diffusione di acqua nel materiale.

La principale classe di polimeri utilizzata è quella dei poliesteri, approvata per uso clinico dalla Food and Drug Administration, e che comprende principalmente l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA) e i loro copolimeri. Il PGA e il PLA hanno caratteristiche molto differenti. L'acido poliglicolico è un termoplastico, rigido con alta cristallinità. Esso degrada rapidamente in soluzioni acquose o *in vivo*. L'acido polilattico, invece, è semicristallino e la sua struttura chimica lo rende più idrofobo e, dunque, più resistente agli attacchi idrolitici. Al fine di modulare velocità di degradazione intermedie sono stati sintetizzati diversi copolimeri dell'acido glicolico e dell'acido lattico. La velocità di degradazione di tali copolimeri dipende dalla loro configurazione strutturale, dalla percentuale dei componenti presenti, dalla cristallinità, dal peso molecolare, dalla porosità e dalla zona di impianto <sup>(9)</sup>.

Un altro esempio di poliestere alifatico lineare usato nell'ingegneria tissutale è il policaprolattone (PCL). Il PCL presenta una struttura semicristallina ed è caratterizzato da una temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) di  $-60^\circ\text{C}$  e una temperatura di fusione ( $T_m$ ) che varia

---

<sup>1</sup> Si definisce "bioattivo" un materiale che è in grado di formare dei legami tra l'impianto e il tessuto. Durante la rigenerazione dell'osso, il materiale bioattivo permette l'osteogenesi e la mineralizzazione all'interfaccia impianto-tessuto, al fine di sviluppare una naturale giunzione tra il materiale vivente e non.

tra i 59°C e i 64°C. Esso degrada più lentamente del PLA, pertanto risulta adatto per impianti a lungo termine.

Recentemente, un'altra classe di polimeri molto studiata è quella dei poliidrossialcanoati (PHA). Essi sono biocompatibili e degradano in prodotti non tossici. Il principale svantaggio è, però, la loro fragilità, che limita il loro utilizzo nella riparazione di zone cartilaginee danneggiate<sup>(10)</sup>.

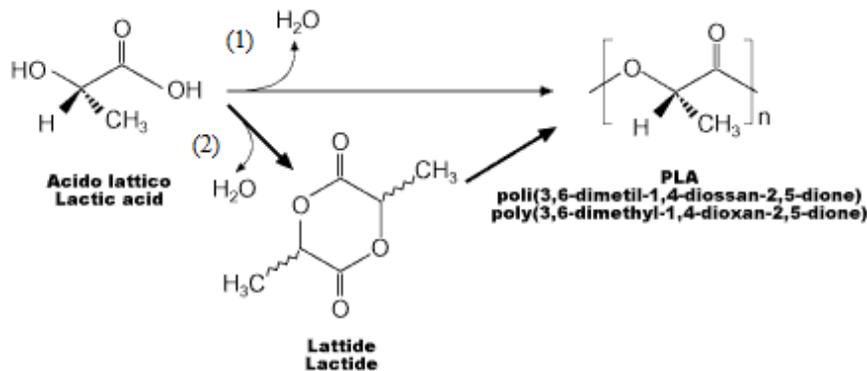
Per la realizzazione di scaffold sono stati impiegati anche polianidridi, policarbonati, poliuretani, poliortoesteri e polifosfazeni. Le principali limitazioni nell'utilizzo di tali materiali sono imputabili alle scarse proprietà meccaniche, tra le quali un basso modulo elastico, e l'assenza di bioattività. Per questo motivo, negli ultimi anni sono stati sviluppati sistemi nanocompositi caratterizzati da una matrice polimerica rinforzata da materiali ceramici bioattivi, come l'idrossiapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) o la pseudowollastonite ( $\text{CaSiO}_3$ )<sup>(11)</sup>. Gli studi dimostrano infatti che la presenza di particelle di idrossiapatite (HA) favorisce l'adesione cellulare<sup>(12)</sup>.

Nelle prossime pagine saranno analizzate in modo puntuale le caratteristiche chimico-fisiche e di biocompatibilità dei materiali utilizzati (acido polilattico, poliidrossialcanoati e idrossiapatite) nell'attività sperimentale di ricerca.

### ***1.2.1 L'acido polilattico (PLA)***

L'acido polilattico o il polilattato (PLA) è un poliesteri alifatico. Esso viene sintetizzato mediante esterificazione dell'acido lattico, ottenuto tramite un processo di fermentazione anaerobica di substrati carboniosi (il più utilizzato è l'amido di mais). Il monomero di partenza è una molecola idrofobica contenente tre atomi di carbonio che, data la presenza di un carbonio chirale, esiste in due forme enantiomeriche (L-D).

Per ottenere il polimero si possono seguire due vie: una 'diretta' tramite condensazione dell'acido lattico, ed una 'indiretta' tramite la formazione temporanea di lattide. La prima via ha il limite di portare alla formazione di un polimero dal basso peso molecolare in quanto la reazione di condensazione tende velocemente all'equilibrio. Maggiormente utilizzato è il secondo procedimento che presenta un maggior controllo del peso molecolare finale e della stereochimica. Inizialmente viene ricavato un pre-polimero a basso peso molecolare mediante la condensazione dell'acido lattico in soluzione acquosa. Tale pre-polimero viene depolimerizzato, formando una miscela dei due stereoisomeri. Successivamente si procede per polimerizzazione per apertura ad anello del dimero ciclico tramite l'utilizzo di catalizzatori. In Figura 1.2 sono rappresentati i due meccanismi di polimerizzazione.



**Figura 1.2** Schema delle due reazioni di polimerizzazione dell'acido polilattico a partire dalla molecola di acido lattico.

Dalla polimerizzazione dei due enantiomeri si hanno il PLLA (configurazione levogira) e il PDLA (configurazione destrogira), mentre da quella di una miscela racemica si ha il PDLLA. Le proprietà dell'acido polilattico sono correlate al grado di "purezza enantiomerica" dei monomeri di partenza. Gli omopolimeri, costituiti da catene formate da monomeri della stessa composizione ottica, sono generalmente semicristallini. Il PDLA, invece, presenta una struttura amorfa.

Industrialmente i più prodotti sono l'acido poli-l-lattico e quello poli-dl-lattico <sup>(13)</sup>.

Il PLLA presenta elevata resistenza a trazione, alta temperatura di fusione, rigidità, durezza e un grado di cristallinità di circa il 40%. Il PDLA, invece, ha una resistenza a trazione minore, è più soffice e si degrada più velocemente. In Tabella 1.2 sono riportate le principali proprietà di questi due polimeri.

**Tabella 1.2** Effetti della stereochimica sulle proprietà del PLA <sup>(13)</sup>.

Parametri	L-PLA	D,L-PLA
Temperatura di fusione (°C)	173-178	120-170
Temperatura di transizione vetrosa (°C)	55-80	43-53
Modulo di elasticità (MPa)	3750	3900
Resistenza a trazione (MPa)	59	44
Allungamento a rottura (%)	7	5.4

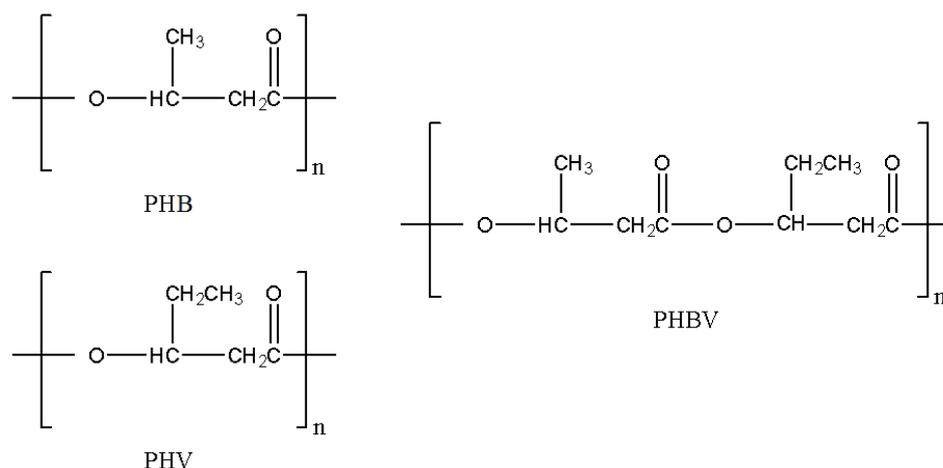
Le caratteristiche che rendono questo polimero particolarmente interessante per applicazioni in campo medico sono l'eccellente biocompatibilità e la biorisorbibilità. Esse sono spiegabili se si considera che il corpo umano prevede processi rivolti alla metabolizzazione delle molecole di acido lattico, un sottoprodotto dell'attività anaerobica dei muscoli.

La degradazione del PLA avviene tramite il processo di idrolisi, che comporta la scissione delle catene polimeriche nei monomeri di acido. I prodotti finali della degradazione vengono

infine eliminati dal corpo tramite il ciclo di Krebs. La velocità di tale processo dipende dal peso molecolare iniziale, dalla cristallinità, dall'area superficiale e dalla presenza o meno di porosità. Generalmente occorrono circa 2-5 anni perché il polimero sia completamente assorbito dal corpo (<sup>14</sup>).

### 1.2.2 I Polioidrossialcanoati (PHA)

I polioidrossialcanoati (PHA) sono biopolimeri di origine microbica che vengono prodotti e accumulati da alcuni batteri come riserva di energia e fonte di carbonio. Essi rappresentano una classe di poliesteri termoplastici molto ampia che comprende più di 100 polimeri ottenuti da differenti monomeri di partenza. I principali polimeri utilizzati (Figura 1.3) sono il polioidrossibutirrato (PHB), il polioidrossivalerato (PHV) e il loro copolimero polioidrossibutirrato-co-valerato (PHBV).



**Figura 1.3** Formule di struttura dei principali polioidrossialcanoati.

Il polioidrossibutirrato fu scoperto nel 1925 dal microbiologo francese Maurice Lemoigne. Viene prodotto da un microorganismo, il *Ralstonia eutrophus*, in risposta a condizioni di stress fisiologico. La biosintesi batterica del PHB prevede inizialmente la condensazione di due molecole di acetil-CoA per dare acetoacetil-CoA e successivamente la sua riduzione a idrossibutiril-CoA, il monomero che polimerizza per dare PHB.

Negli ultimi anni grazie agli sviluppi dell'ingegneria genetica sono state sviluppate nuove tecniche di fermentazione che consentono di sviluppare diverse tipologie di PHA in colture vegetali ad un prezzo competitivo con le tradizionali plastiche derivate dal petrolio (<sup>15</sup>).

Le proprietà di questa classe di polimeri variano in un range piuttosto ampio e sono dovute, dal punto di vista chimico, alla lunghezza dei gruppi laterali che si estendono a partire dalla

catena principale o alla distanza tra i legami estere. Generalmente un gruppo laterale corto porta ad un polimero cristallino, mentre uno lungo ad un polimero elastomerico. Questi materiali sono facilmente processabili e le loro proprietà sono comparabili a quelle delle plastiche convenzionali come il polipropilene (PP), come riportato in Tabella 1.3.

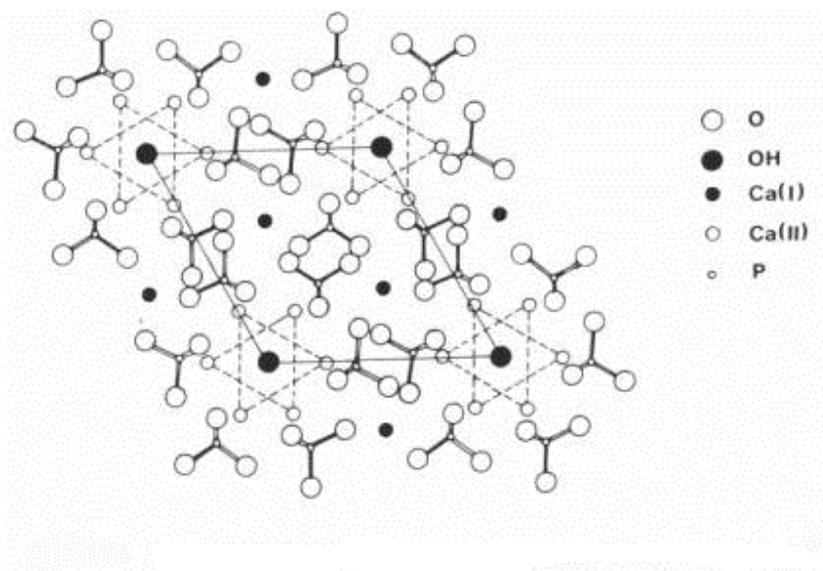
**Tabella 1.3** Confronto di alcune proprietà del PHB, PHBV e del PP (<sup>16</sup>).

Parametri	PHB	PHBV	PP
Temperatura di fusione (°C)	177	145	176
Temperatura di transizione vetrosa (°C)	2	-1	-10
Cristallinità (%)	60	56	50-70
Resistenza a trazione (MPa)	43	20	38
Allungamento a rottura (%)	5	50	400

Anche nel caso dei poliidrossialcanoati, la degradazione avviene per idrolisi, in tempi che possono variare da pochi mesi ad alcuni anni. Essi, inoltre, sono biocompatibili, anche se è necessario sottoporli a processi di purificazione: infatti, durante la loro produzione è possibile che si formino endotossine, in grado poi di provocare risposte immunologiche da parte dell'organismo (<sup>17</sup>). La biocompatibilità rende i PHA utilizzabili in campo medico principalmente per le seguenti applicazioni: rilascio controllato di farmaci, suture chirurgiche, *scaffold* ortopedici e valvole cardiache. Il vantaggio offerto da questi polimeri è dovuto al fatto che è possibile personalizzare le proprietà grazie alla vasta gamma di monomeri da cui vengono sintetizzati: si possono fissare fattori bioattivi, alterare le proprietà meccaniche e di superficie, variare la velocità di degradazione.

### 1.2.3 L'idrossiapatite (HA)

L'idrossiapatite (HA) è un fosfato di calcio basico avente formula chimica  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Appartiene alla famiglia delle apatiti e costituisce la fase minerale dello scheletro dei vertebrati. Ha una struttura cristallina esagonale costituita da tetraedri di ioni  $\text{PO}_4^{3-}$ , in cui due atomi di ossigeno sono sul piano orizzontale, mentre gli altri due si trovano sugli assi paralleli all'asse c. In Figura 1.4 è rappresentata la disposizione degli atomi nella cella unitaria dell'idrossiapatite, in proiezione [001].



**Figura 1.4** Proiezioni degli ioni che costituiscono l'idrossiapatite sul piano basale [001].

Per quanto riguarda le proprietà chimico-fisiche di questo materiale, esso è caratterizzato da alta temperatura di fusione, durezza, elevata resistenza alla compressione, ma nello stesso tempo presenta una certa fragilità e una difficile processabilità. In Tabella 1.4 sono riportate le principali proprietà meccaniche dell'idrossiapatite sintetica, che differiscono parzialmente da quella biologica, in quanto dipendono dal processo con cui si sono formati i cristalli.

**Tabella 1.4** Proprietà meccaniche dell'idrossiapatite.

Proprietà	HA
Modulo di Young (GPa)	40-117
Resistenza a compressione (MPa)	294
Resistenza a flessione (MPa)	147
Densità (g/cm <sup>3</sup> )	3.16

Questo ceramico è caratterizzato, inoltre, da una buona biocompatibilità, dovuta al fatto che è uno dei costituenti naturali delle ossa umane, e bioattività: esso, infatti, è in grado di formare legami con il tessuto osseo stimolando la sua rigenerazione. Per quanto riguarda la biorisorbibilità, essa viene favorita dalla presenza di porosità: la velocità di degradazione, infatti, aumenta con l'aumento dell'area superficiale.

L'idrossiapatite porosa presenta caratteristiche meccaniche inferiori a quella compatta, ma molto simili a quelle delle ossa spugnose. La presenza di pori della dimensione di 250-500  $\mu\text{m}$  crea il microambiente ideale per la rigenerazione ossea ed inoltre accelera il processo di dissoluzione grazie alla maggior area superficiale specifica rispetto ad un ceramico denso (<sup>18</sup>).



# Capitolo 2

## Parte sperimentale

Nel seguente capitolo, strutturato in quattro paragrafi, viene descritta l'attività sperimentale svolta durante il tirocinio presso il Civen. Nel primo paragrafo vengono riassunte le fasi del lavoro, nel secondo, invece, vengono riportate le caratteristiche tecniche dei materiali utilizzati. Il terzo paragrafo presenta i vari step che hanno portato alla preparazione dei provini, mentre il quarto riporta le tecniche utilizzate per la caratterizzazione.

### 2.1 Descrizione e fasi del lavoro

La tecnica utilizzata per la realizzazione dei materiali oggetto di questo lavoro di tesi è la miscelazione in fuso (*melt blending*), preferita rispetto al *solvent casting/particulate leaching* (SC/PL). Quest'ultimo è il metodo più frequentemente impiegato per la produzione di scaffold polimerici con micro e macro pori ma presenta lo svantaggio di utilizzare solventi organici che, se non debitamente rimossi, potrebbero rimanere all'interno del materiale risultando poi dannosi per cellule e tessuti (<sup>19</sup>). Per tale motivo è stata scelta una tecnica "*solvent free*" che presenta anche il vantaggio di essere più facilmente applicabile industrialmente. Al fine però di ottenere un materiale poroso, con una buona interconnessione dei pori, si è deciso di combinare la tecnica di *melt blending* con il *particulate leaching*.

La miscelazione in fuso è stata eseguita con l'utilizzo di un miscelatore discontinuo Plastograph CE (Brabender GmbH & Co. KG). Sono stati utilizzati due differenti polimeri, l'acido polilattico e un poliidrossialcanoato. Tali polimeri sono stati miscelati con due agenti porogeni, solubili in acqua: cloruro di sodio (NaCl) e polietilenoossido (PEO, un polimero termoplastico, biocompatibile e usato in applicazioni biomedicali (<sup>20</sup>). In una prima fase del lavoro sono state valutate le condizioni di processo e le concentrazioni dei singoli componenti. Inizialmente al polimero è stato addizionato solo il sale per poter valutare la quantità inseribile nel miscelatore, in modo da ottimizzare il riempimento della camera di miscelazione e ottenere una viscosità del fuso adeguata. Successivamente, assieme al sale, è stato fuso anche il PEO, in proporzioni variabili. Solo nell'ultima fase è stata addizionata l'idrossiapatite nanometrica.

Le varie mescole ottenute sono state fatte raffreddare e da queste sono stati successivamente realizzati dei provini di forma discoidale mediante l'utilizzo di una pressa a piatti paralleli (P

200 E, Collin GmbH). I campioni sono stati poi immersi in un bagno di acqua distillata per favorire il fenomeno di *leaching*.

Una volta preparati i campioni, sono state eseguite le prove di caratterizzazione. Tutti i materiali, dopo una fase di disidratazione, sono stati caratterizzati tramite analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM), spettroscopia infrarossa FTIR e diffrazione ai raggi X.

## 2.2 Materiali utilizzati

### 2.2.1 Polimeri biorisorbibili

Al fine di confrontare le proprietà di diverse matrici e valutarne l'effettivo utilizzo per la realizzazione di *scaffold*, sono state impiegate due tipologie di polimeri. Il primo polimero è il PLA 4032D, prodotto dalla NatureWorks® LLC. Si tratta di un P(LD)LA, un copolimero che contiene anche lo stereoisomero PDLA. Proprio la presenza di quest'ultimo rende tale PLA amorfo rispetto all'omopolimero PLLA, più utilizzato per questo tipo di impieghi e che presenta diversa velocità di degradazione e diverse proprietà meccaniche. Il PLA utilizzato presenta comunque le caratteristiche di biocompatibilità e biorisorbibilità ricercate per queste applicazioni, oltre alla processabilità tipica dei poliesteri alifatici. Nella Tabella 2.1 si riportano le principali caratteristiche così come fornite dal produttore nella scheda tecnica.

**Tabella 2.1** Caratteristiche del PLA4032D.

Proprietà	Valore tipico
Contenuto di isomero D (%)	1.5
Densità (g/cm <sup>3</sup> )	1.24
Temperatura di fusione (°C)	160
Resistenza a trazione (MPa)	144.5
Modulo elastico a trazione (Gpa)	3.78
Allungamento a rottura (%)	100

Il secondo polimero utilizzato è un poliidrossialcanoato: in particolare si tratta di un copolimero dell'acido idrossibutirrico e dell'acido idrossivalerico prodotto dalla Goodfellow. Esso presenta un contenuto di PHV del 5-20% che conferisce al copolimero proprietà simili alle poliolefine anche se a costi più elevati. Inoltre, la sua temperatura di fusione risulta inferiore all'omopolimero, rendendolo più facilmente processabile.

In Tabella 2.2 si riportano alcune caratteristiche come dichiarato nella scheda tecnica fornita dal produttore.

**Tabella 2.2** *Caratteristiche del PHB88/PHV12 Polioidrossibutirrato/Polioidrossivalerato 12%.*

<b>Proprietà</b>	<b>Valore tipico</b>
Densità (g/cm <sup>3</sup> )	1.25
Temperatura di fusione (°C)	145
Resistenza a trazione (MPa)	23
Modulo elastico a trazione (Gpa)	0.5
Allungamento a rottura (%)	35
Resistenza all'impatto tipo Izod (J/m)	200

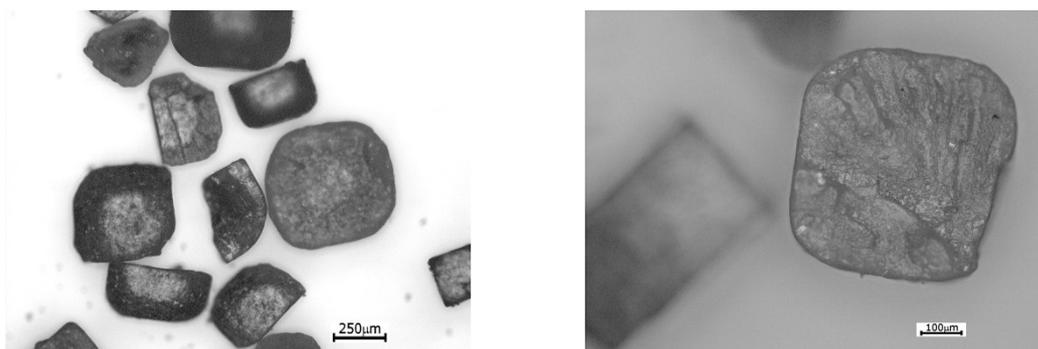
### 2.2.2 Agenti porogeni

Per ottenere una struttura porosa sono stati utilizzati due agenti porogeni: un cloruro di sodio, con dimensione delle particelle di 80 mesh, e polietilenossido (PEO), entrambi commercializzati dalla Sigma-Aldrich®. Per quanto riguarda il sale si è deciso di utilizzare un prodotto a dimensione controllata di circa 170 µm per ottenere un'adeguata dimensione dei pori. Di seguito sono riportate le principali caratteristiche del NaCl, come da scheda tecnica fornita dal produttore.

**Tabella 2.3** *Caratteristiche del cloruro di sodio.*

<b>Proprietà</b>	<b>Valore tipico</b>
Peso molecolare medio	58.44
Pressione di vapore a 865°C (mmHg)	1
Dimensione particelle (mesh)	80
Temperatura di fusione (°C)	801

Per verificare l'effettiva dimensione dei cristalli, il cloruro di sodio è stato osservato al microscopio ottico (Figura 2.1). La dimensione osservata risulta in media superiore a quella dichiarata, ma comunque adeguata per l'utilizzo prefissato.



**Figura 2.1** Cristalli di NaCl (80 mesh) osservati al microscopio ottico: ingrandimenti 50 x (foto a sinistra) e 100 x (foto a destra).

Il polietilenossido è un polimero solubile in acqua che forma una seconda fase all'interno della matrice polimerica. Esso è biocompatibile e permette di ottenere una struttura porosa con dimensione dei pori di circa 10-50  $\mu\text{m}$ , un range dimensionale decisamente inferiore rispetto a quello che si può ottenere con il cloruro di sodio.

In Tabella 2.4 sono riportate le caratteristiche dichiarate nella scheda tecnica dal produttore.

**Tabella 2.4** Caratteristiche del polietilenossido.

Proprietà	Valore tipico
Viscosità (cP)	12-50
Indice di rifrazione N20/D	1.4539
Temperatura di transizione vetrosa ( $^{\circ}\text{C}$ )	-67
Temperatura di fusione ( $^{\circ}\text{C}$ )	65

L'utilizzo sinergico dei materiali sopra descritti, NaCl e PEO, permette di ottenere gradienti di porosità all'interno della matrice, caratteristica ricercata per migliorare le proprietà del prodotto finale (come spiegato nel cap.1 di questa tesi).

### 2.2.3 Idrossiapatite nanometrica

Per conferire al materiale le caratteristiche di bioattività e migliorarne le proprietà meccaniche si è scelto di disperdere all'interno della matrice, durante la miscelazione in fuso, una nano-idrossiapatite (nHA, Sigma-Aldrich®), la cui peculiarità è la dimensione delle particelle inferiore ai 200 nm. Essa non solo è biocompatibile ma stimola anche l'attecchimento degli osteoblasti. Di seguito (in Tabella 2.5) sono riportate le principali caratteristiche del prodotto.

**Tabella 2.5** *Caratteristiche dell'idrossiapatite nanometrica.*

<b>Proprietà</b>	<b>Valore tipico</b>
Peso molecolare medio	502.31
Dimensione particelle (nm)	< 200
Area superficiale (m <sup>2</sup> /g)	9.4
Temperatura di fusione (°C)	1100

In questa prima fase della ricerca non è stata valutata l'effettiva capacità di dispersione e di distribuzione all'interno della matrice, ma soltanto la percentuale inseribile nel fuso.

## 2.3 Preparazione dei campioni

La preparazione dei campioni si è sviluppata attraverso una serie di fasi: essiccazione dei diversi materiali, miscelazione, pressofusione, solubilizzazione degli elementi porogeni e successiva disidratazione.

### 2.3.1 Essiccazione

Al fine di eliminare l'umidità presente nei polimeri, i pellets di PLA e PHA sono stati sottoposti a un trattamento di essiccazione mediante l'utilizzo di un evaporatore rotante per circa 4 ore, alla temperatura di 80°C. Per quanto riguarda il polietilenoossido, invece, è stata utilizzata una temperatura inferiore, 45°C, visto che la sua temperatura di fusione è 65°C.

### 2.3.2 Miscelazione

La realizzazione dei materiali compositi è stata effettuata tramite l'utilizzo di un miscelatore discontinuo *Brabender Plastograph EC*. I parametri di funzionamento possono essere impostati in remoto dal computer, consentendo così all'operatore di controllare e studiare l'andamento delle curve di temperatura vs momento torcente. Il parametri di processo impostati sono gli stessi per tutte le mescole: velocità dei rotori pari a 30 rpm per i primi 300 secondi e 60 rpm per i restanti 600 secondi. Le temperature di lavorazione, invece, sono state impostate a 175°C per il PHA e a 190°C per il PLA.

La Tabella 2.6 riporta in maniera schematica i programmi di lavorazione adottati per la produzione delle mescole.

**Tabella 2.6** *Programmi di lavorazione adottati per realizzare le mescole.*

	<b>PHA</b>	<b>PLA</b>
Temperatura (°C)	175	190
Velocità rotori (rpm)	30 x 300 sec 60 x 600 sec	30 x 300 sec 60 x 600 sec

Le prime mescole sono state realizzate miscelando assieme il polimero e il cloruro di sodio. All'inizio è stata inserita una percentuale di NaCl di circa 35% in peso rispetto alla massa totale. In queste condizioni la camera di miscelazione risultava però parzialmente vuota e il composto ottenuto appariva molto fluido. Per una migliore miscelazione la quantità di sale è stata portata fino al 65% in peso. L'aggiunta del sale ha, però, comportato un aumento della viscosità del fuso rendendo più difficoltosa la miscelazione a basse velocità di rotazione.

Successivamente sono state realizzate alcune mescole inserendo anche il polietilenossido, variando le quantità dei componenti, fino ad ottenere il risultato ottimale. Una volta decise le percentuali ottimali dei singoli additivi, è stato possibile aggiungere anche l'idrossiapatite, in quantità pari al 5% in peso della matrice polimerica (in accordo con la letteratura (<sup>19</sup>)).

In Tabella 2.7 sono riportate le formulazioni realizzate con la matrice in polidrossialcanoato.

**Tabella 2.7** *Mescole realizzate con la matrice in PHA.*

Mescola	Peso totale inserito (g)	PHA (wt%)	NaCl (wt%)	PEO (wt%)	nHA (wt%)
1	50	62.5	37.5		
2*	100	62.5	37.5		
3	80	50	50		
4	100	35	65		
5	85	20	60	20	
6	85	20	60	20	5

\* non è stato possibile inserire le dosi ipotizzate: circa 11 g di PHA non sono stati miscelati, rimanendo in tramoggia. Le percentuali finali risultano così suddivise: 57% PHA e 43% di NaCl.

In Tabella 2.8 sono riportate, invece, le formulazioni delle miscele con la matrice di acido polilattico.

**Tabella 2.8** *Mescole realizzate con la matrice in PLA.*

Mescola	Peso totale inserito (g)	PLA (wt%)	NaCl (wt%)	PEO (wt%)	nHA (wt%)
7	100	35	65		
8	87	20	60	20	
9	85	20	60	20	5

Allo scopo di avere degli elementi di confronto nelle prove di caratterizzazione dei campioni sono state realizzate anche due mescole contenenti soltanto le matrici polimeriche, che costituiranno i "puri" di riferimento.

### 2.3.3 Preparazione dei provini

I provini per le prove di caratterizzazione sono stati realizzati utilizzando una pressa a piatti paralleli P 200 E della Collin GmbH. I materiali ottenuti al mescolatore, una volta raffreddati, sono stati pressati all'interno di uno stampo per consentire la produzione dei campioni dalla forma idonea per le prove di caratterizzazione.

La realizzazione dei campioni in pressa ha previsto una fase di riscaldamento/compressione (180°C per 2 minuti), seguita da uno stadio di raffreddamento della durata di 10 minuti (tempo necessario per riportare la temperatura a circa 23°C).

Con questo procedimento sono state realizzate due tipologie di provini:

- dischi di 2 mm di spessore e 25 mm di diametro, utilizzati per le analisi SEM e FTIR;
- provini quadrati di circa 3 cm per lato e 2 mm di spessore per le prove XRD.

### 2.3.4 Particulate Leaching

Una volta realizzati i provini, questi sono stati pesati con una bilancia di precisione e messi a bagno in un becher contenente acqua distillata per consentire la solubilizzazione degli additivi porogeni. L'acqua è stata cambiata tre volte al giorno per i primi 3 giorni e 2 volte per altri 5 giorni. I campioni n.1, n.2 e n.3 sono rimasti nel bagno per una settimana ma le analisi al SEM hanno rivelato la presenza di cristalli di sale (come verrà approfondito nel capitolo 3); per questo motivo il tempo di permanenza nel bagno è stato prolungato fino a due settimane.

Una volta concluso il processo di lisciviazione i provini sono stati tolti dall'acqua e disidratati, mediante una pompa da vuoto, per circa 24 ore. Infine, sono stati nuovamente pesati per verificare l'effettiva perdita di peso dovuta alla solubilizzazione degli agenti porogeni.

Nelle Tabelle 2.9 e 2.10 sono riportati i dati che riguardano la perdita di peso dei campioni.

**Tabella 2.9** Perdita di peso dei campioni in PHA dopo la solubilizzazione (la numerazione utilizzata corrisponde a quella delle rispettivamente mescole di partenza).

Campione	Peso iniziale(g)	Peso finale (g)	Percentuale teorica elementi solubili (wt%)	Percentuale persa (wt%)
1	1.3594	0.7791	37.5	43
2	1.4696	0.7270	43	50.5
3	1.3796	0.7764	50	43.7
4	1.7055	0.4138	65	75
5	1.6617	0.3755	80	77.5
6	1.6616	0.6873	80	59

**Tabella 2.10** Perdita di peso dei campioni in PLA dopo la solubilizzazione (la numerazione utilizzata corrisponde a quella delle rispettive mescole di partenza).

Campione	Peso iniziale (g)	Peso finale (g)	Percentuale teorica elementi solubili (wt%)	Percentuale persa (wt%)
7	1.8580	0.8775	65	53
8	1.6888	0.3405	80	80
9	1.7029	0.7125	80	58

I campioni n.5, n.6 e n.9 presentano una perdita di peso inferiore a quella prevista. Questo può essere dovuto alla presenza di residui non solubilizzati all'interno della matrice o a tracce d'acqua. La spettroscopia IR ha permesso di verificare che l'eccessivo peso è dovuto alla presenza di acqua nei provini.

## 2.4 Tecniche di caratterizzazione

### 2.4.1 Microscopia Elettronica a Scansione

Il microscopio elettronico a scansione (SEM) è uno strumento che sfrutta l'interazione degli elettroni con la materia al fine di fornire un'immagine della superficie osservata con risoluzione e profondità di campo superiori rispetto a quello ottico.

Tramite l'analisi al SEM è possibile ottenere immagini morfologiche (elettroni secondari) e immagini di contrasto bianco-nero basate sul numero atomico ( $Z$ ) degli elementi (elettroni retrodiffusi). Inoltre, accoppiando il microscopio ad un rivelatore EDS (Energy Dispersive X-ray spectroscopy), si possono effettuare microanalisi, anche puntuali, sulla superficie del campione per determinare la composizione elementare del materiale.

Tutti i campioni realizzati sono stati osservati al microscopio elettronico a scansione allo scopo di studiarne la morfologia e la dimensione dei pori.

Dopo essere stati immersi in azoto liquido (abbassando la temperatura infatti il polimero diventa più fragile), i provini sono stati spezzati così da poterne osservare la zona di frattura. Questa operazione è stata necessaria soltanto per i campioni n.1, n.2 e n.3, infatti quelli con una percentuale di elementi porogeni superiore al 50 wt% si sono rivelati fragili ed è stato possibile romperli a temperatura ambiente.

Successivamente i campioni sono stati metallizzati con oro così da rendere la superficie conduttiva.

Le immagini sono state ottenute sfruttando sia gli *elettroni secondari* (SE) sia quelli *retrodifusi* (BSE), osservando i campioni a diversi ingrandimenti 100 x e 500 x; soltanto i provini contenenti idrossiapatite sono stati indagati a ingrandimenti maggiori, allo scopo di esaminare meglio le nanoparticelle.

Su questi ultimi campioni, inoltre, è stata effettuata la microanalisi per avere una conferma che le nanoparticelle osservate fossero realmente di idrossiapatite. È stato, inoltre, raccolto lo spettro della nHA tal quale, così da avere uno spettro di riferimento.

### 2.4.2 Spettroscopia infrarossa FT-IR

Per ogni campione è stato registrato uno spettro in riflettanza totale attenuata (ATR) effettuando 100 scansioni nel range 4000-650  $\text{cm}^{-1}$  con uno spettrometro FT-IR di Perkin Elmer. Questo tipo di spettroscopia permette di rilevare i legami chimici presenti in un materiale e di evidenziare i suoi gruppi funzionali.

Ogni spettro è stato analizzato applicando in modo automatico un processo di smoothing e di aggiustamento della linea di base, e una correzione ATR di un fattore 2. Tale fattore tiene conto del non perfetto contatto tra campione e cristallo dello strumento e può variare tra 0 e 2. Le analisi sono state effettuate sia prima che dopo la solubilizzazione degli agenti porogeni; sono stati acquisiti anche gli spettri dei campioni puri di PLA, PHA, PEO e idrossiapatite.

### 2.4.3 Diffrazione a raggi X

Le analisi diffrattometriche sono state condotte con il diffrattometro *Bruker D8 Advance X-Ray Diffractometer* (geometria Bragg-Brentano, radiazione  $\text{CuK}\alpha$ , con  $\lambda=0.15418$  nm) in dotazione presso il Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università degli Studi di Padova.

Noti l'angolo d'incidenza e la lunghezza d'onda, è possibile ricavare le distanze interplanari e i parametri del reticolo tramite la legge di Bragg (Equazione 2.1):

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad , \quad (2.1)$$

dove  $n$  è un numero intero,  $\lambda$  la lunghezza d'onda della radiazione,  $\theta$  l'angolo d'incidenza e  $d$  è la distanza interplanare. L'analisi dello spettro permette, inoltre, di ottenere informazioni sulle fasi presenti, sulla dimensione dei cristalli e sulla loro deformazione.

Sono stati analizzati con questa tecnica i campioni contenenti l'idrossiapatite e le due formulazioni analoghe ma senza l'nHA.

I parametri di acquisizione utilizzati sono i seguenti:

- ampiezza di scansione: 1.5°-70° ( $2\theta$ );
- velocità di scansione: 2 sec/scan;
- dimensione passi: 0.05°;
- modalità: *locked coupled*.



# Capitolo 3

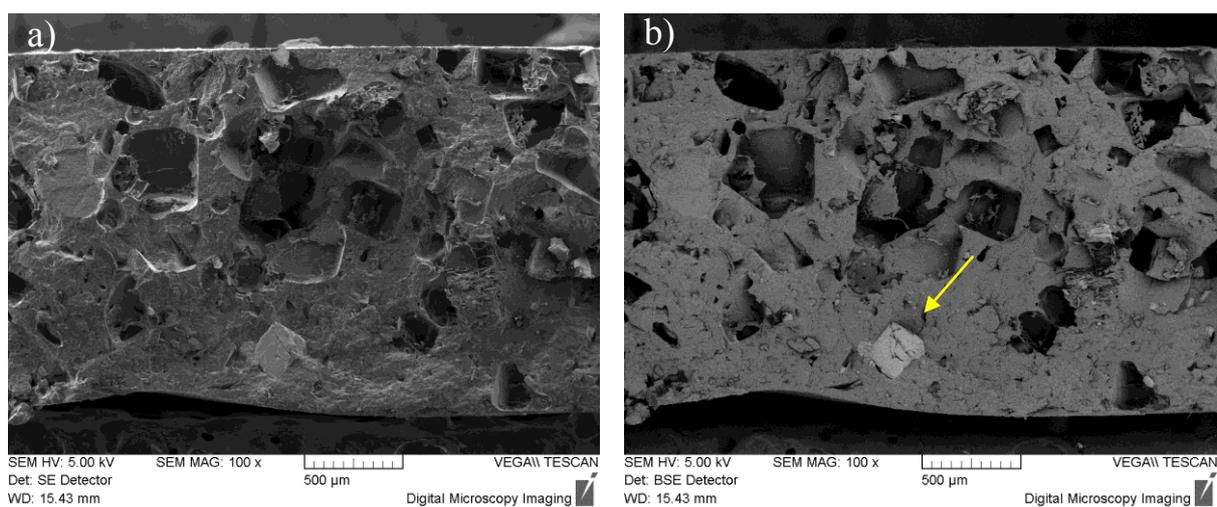
## Risultati ed Analisi

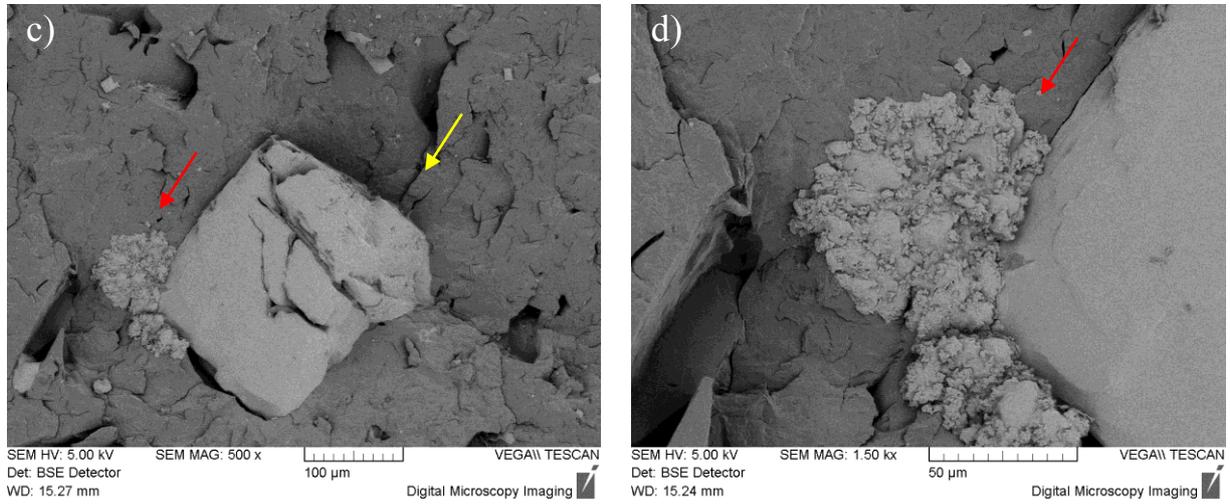
Il seguente capitolo riporta i risultati ottenuti tramite le tecniche di caratterizzazione. Nella prima sessione viene descritta la microscopia elettronica a scansione, con un paragrafo dedicato in particolare alla microanalisi. Le altre due sezioni riguardano, invece, la spettroscopia infrarossa e la diffrazione.

### 3.1 Analisi al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)

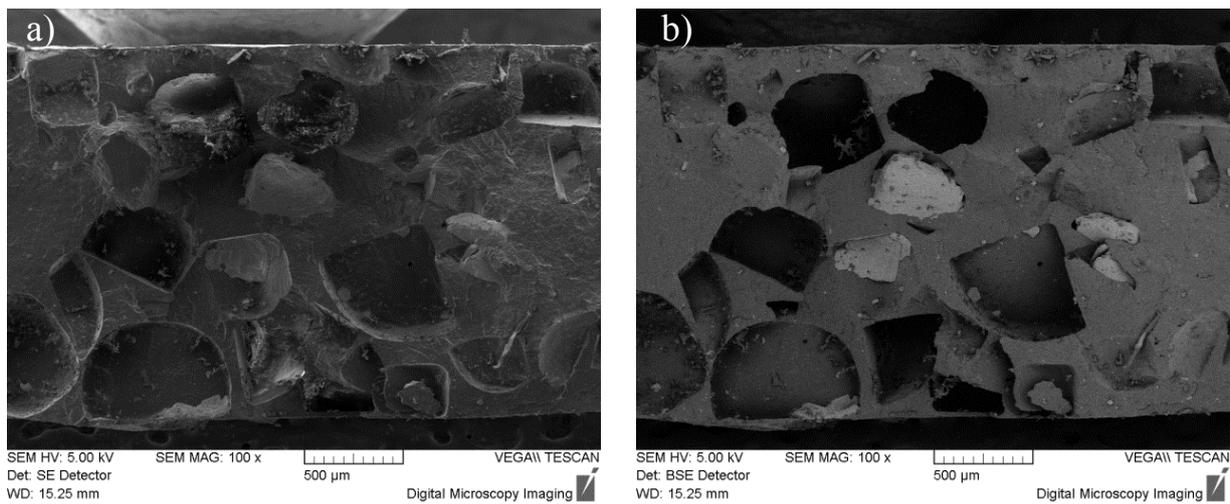
La morfologia dei macro e micro pori creati all'interno dello *scaffold* è stata osservata utilizzando il microscopio elettronico a scansione (SEM). Le immagini acquisite in sezione hanno permesso di osservare la forma e la dimensione dei pori ottenuti sia utilizzando il solo NaCl, sia il PEO. Inoltre, è stato possibile valutare la presenza di eventuale sale residuo e in tal modo ridefinire il tempo necessario per la solubilizzazione degli agenti porogeni.

Le immagini sono state acquisite sfruttando sia gli elettroni retrodiffusi (BSE) sia quelli secondari (SE). Per primi sono stati osservati i campioni n.1 (Figura 3.1), n.2 (Figura 3.2) e n.3 (Figura 3.3), rimasti a bagno nell'acqua distillata per una settimana (la numerazione utilizzata per i campioni fa riferimento alle Tabelle 2.7 e 2.8).

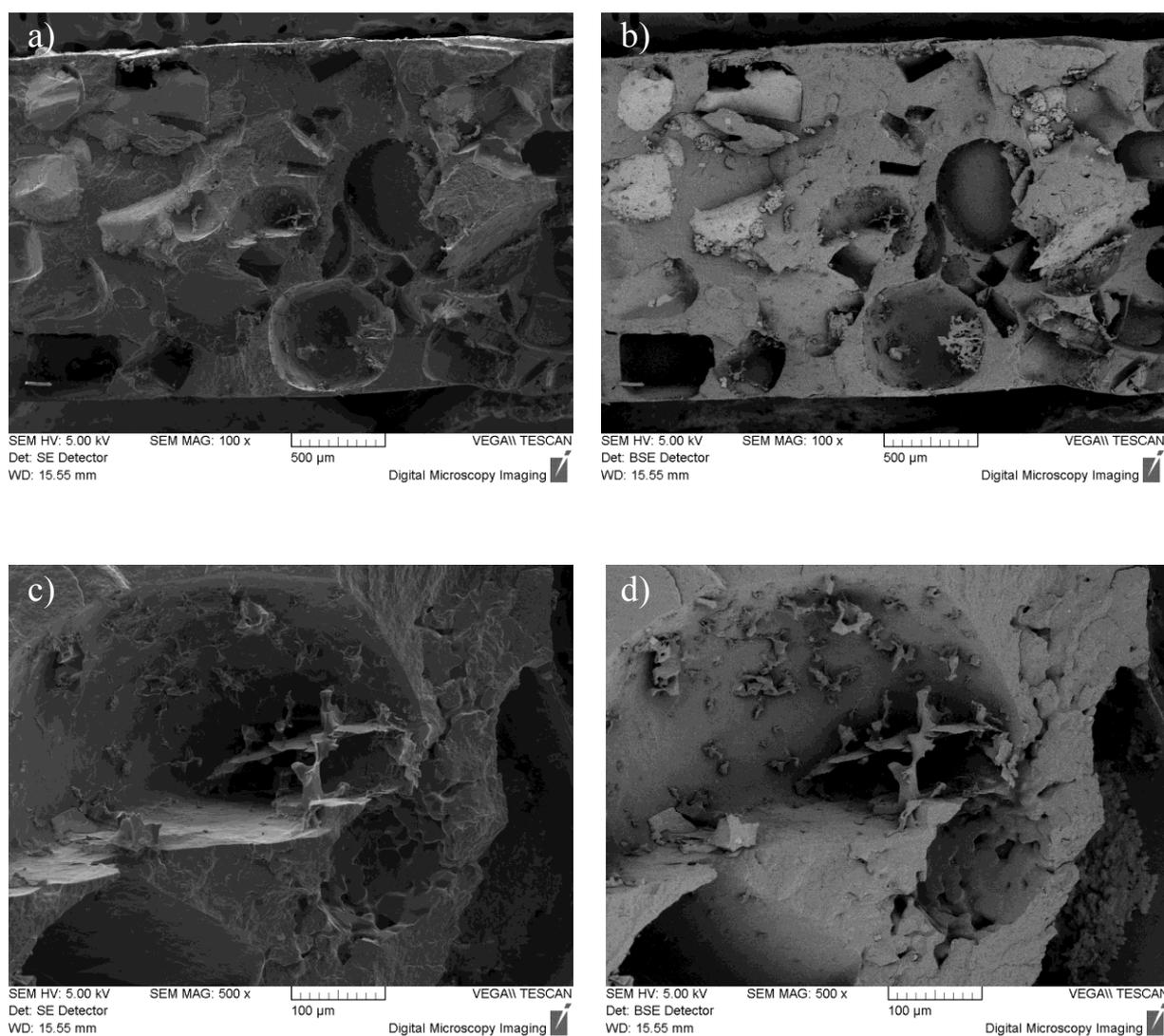




**Figura 3.1** Immagini al SEM del campione n.1. Le immagini (a) e (b) sono state acquisite con ingrandimento a 100 x, rispettivamente mediante SE e BSE; l'immagine (c) rappresenta un cristallo di NaCl (freccia gialla) con ingrandimento 500 x, con elettroni BSE; l'immagine (d) è un dettaglio (1.5 kx, BSE) di un agglomerato di sale accanto al cristallo (freccia rossa).



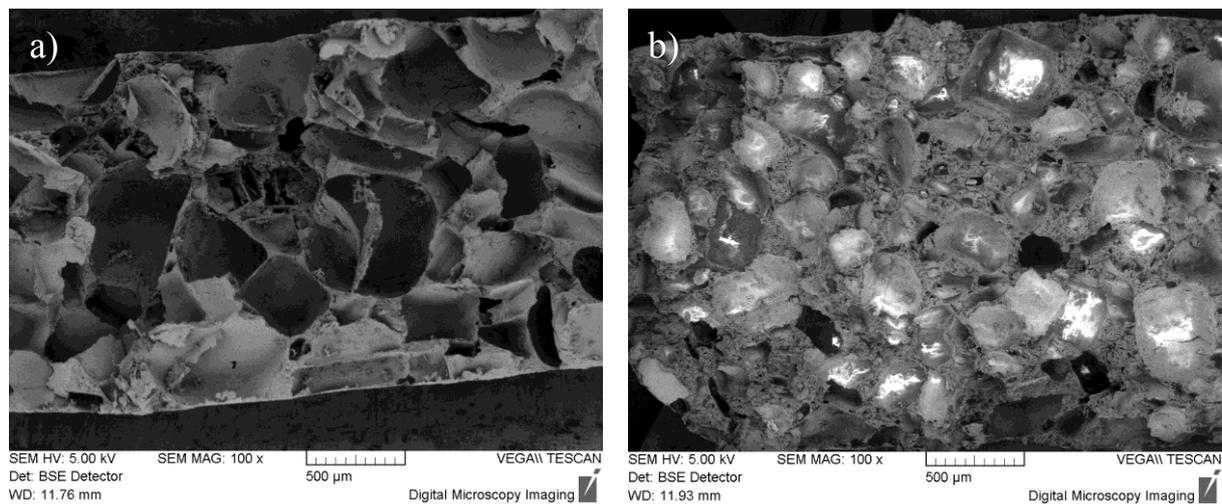
**Figura 3.2** Immagini al SEM del campione n.2: ingrandimento 100 x in modalità SE (a) e BSE (b).



**Figura 3.3** Immagini al SEM del campione n.3: ingrandimento 100 x con SE (a) e BSE (b), particolare di un poro ingrandito a 500 x in modalità SE (c) e BSE (d).

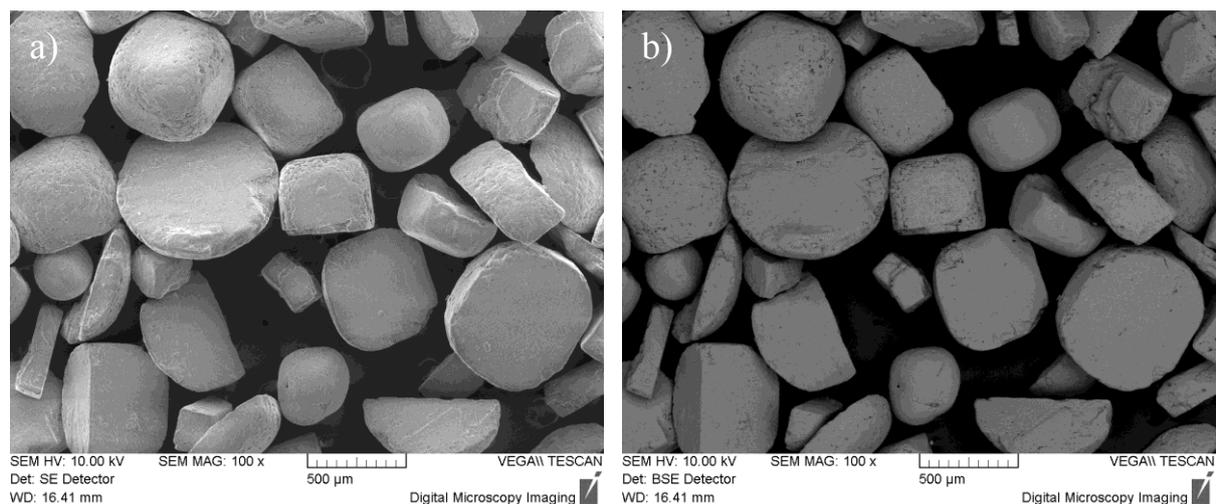
Dalle immagini possiamo osservare come i campioni in PHA-NaCl presentino macropori con dimensioni che variano tra i 100 e i 200  $\mu\text{m}$ . Un altro dato visibile, in particolare nel campione in figura 3.3b, è la presenza di cristalli di sale e agglomerati salini: per favorire la loro solubilizzazione, il bagno dei successivi campioni è stato prolungato fino a due settimane. Nei campioni n.1, n.2 e n.3 è stato osservato un numero esiguo di pori, omogenei nella dimensione. Al fine di ottenere le caratteristiche di interconnessione e eterogeneità nella dimensione dei pori, particolarmente importanti per la funzione che deve svolgere lo *scaffold*, è stata aumentata la concentrazione di cloruro di sodio ed è stato introdotto l'altro materiale porogeno, il polietilenossido.

L'aumento della concentrazione di NaCl fino al 65% in peso rispetto alla matrice ha portato ad un notevole aumento della porosità, come possiamo osservare in Figura 3.4. In queste immagini non sono più visibili tracce di cloruro di sodio: la morfologia superficiale risulta caratterizzata dalla presenza di pori con una dimensione compresa tra i 50 e i 200  $\mu\text{m}$  e con una forma cubica che rispecchia la morfologia dei cristalli salini (Figura 3.5).



**Figura 3.4** Immagini al SEM in modalità BSE, ingrandimento 100 x: a) campione n.4, b) campione n.7.

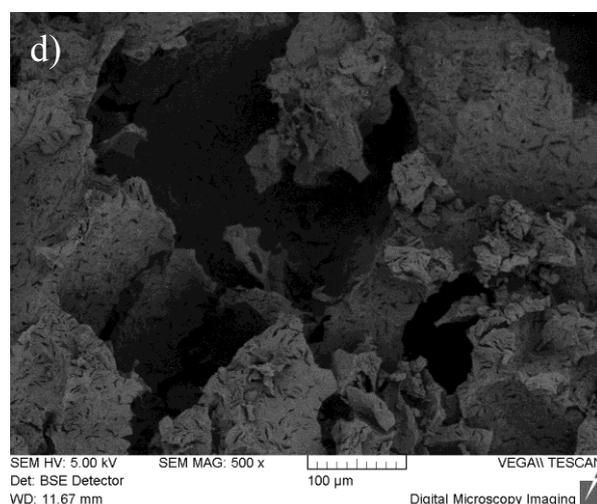
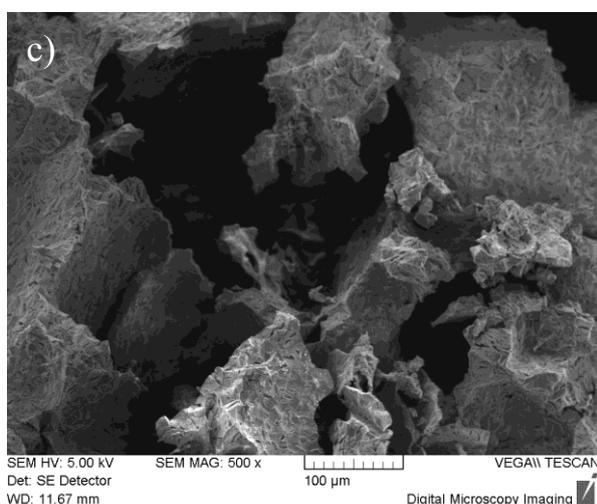
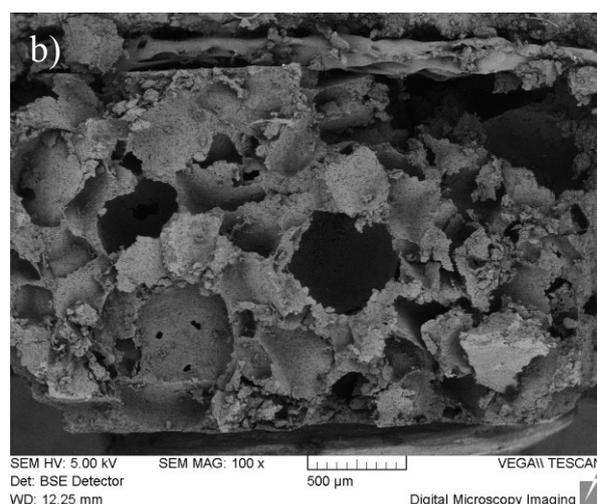
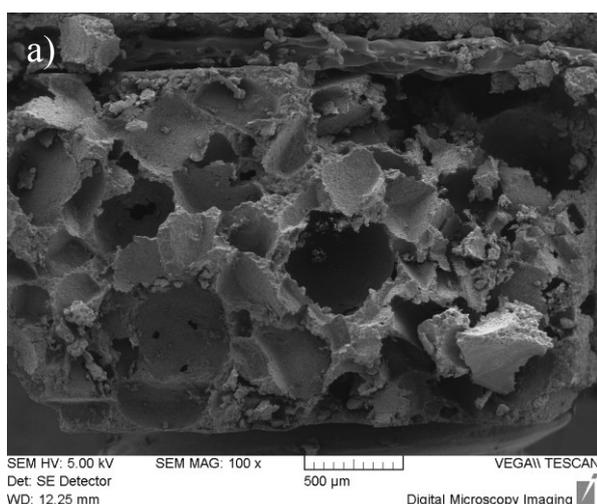
L'immagine acquisita in modalità BSE (figura 3.4) permette di verificare l'assenza di inclusioni di natura diversa da quella della matrice: non si osservano, infatti, contrasti nei toni del grigio.

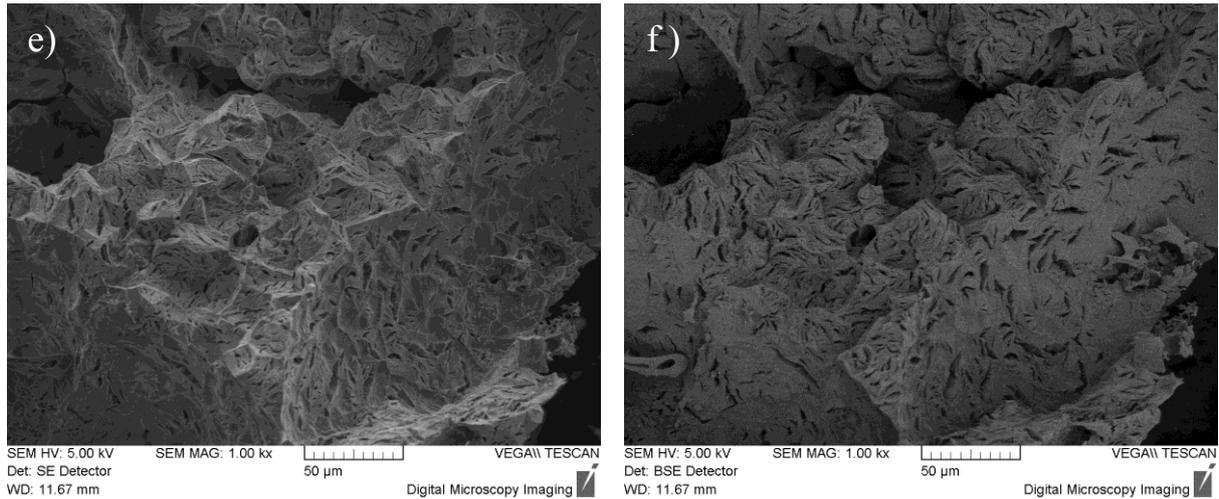


**Figura 3.5** Cristalli di NaCl: ingrandimento 100 x, modalità SE (a) e BSE (b). Le immagini mostrano come i cristalli di sale presentino la caratteristica forma cubica.

L'aggiunta del polietilenoossido permette di ottenere micropori di forma cilindrica con dimensioni comprese tra i 5 e i 10  $\mu\text{m}$  (Figura 3.6). Esso forma una fase distinta rispetto alla matrice, come conferma uno studio di letteratura secondo il quale PLA/PEO in rapporto 50/50 wt% dà origine a una fase omogenea di PLA/PEO e ad una fase ricca di polietilenoossido <sup>(20)</sup>. Questo assicura una buona interconnessione tra i micropori, caratteristica desiderata nell'ingegneria tissutale in quanto favorisce gli scambi di nutrienti tra le cellule.

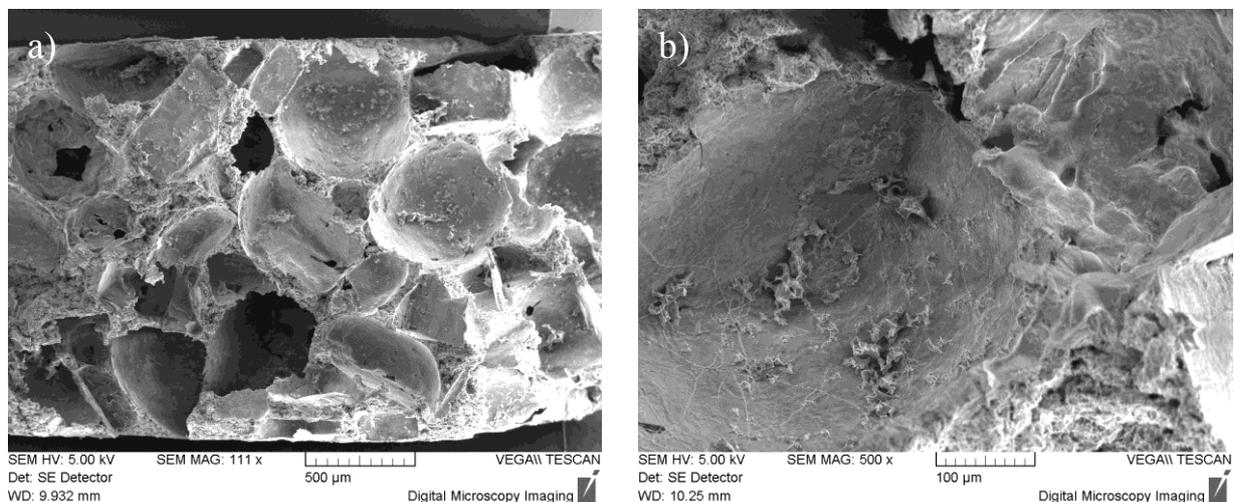
In Figura 3.6 si possono osservare le micro e macro porosità formatesi nel campione n.8 in PLA. La struttura porosa presenta tre livelli dimensionali: micropori (5-10  $\mu\text{m}$ ) dovuti al PEO, macropori (100-200  $\mu\text{m}$ ) dovuti ai cristalli di NaCl, pori di dimensione intermedia (20-50  $\mu\text{m}$ ) probabilmente creati dal contatto tra le particelle di sale e il polietilenoossido. L'eterogeneità dimensionale dei pori è una caratteristica fondamentale in quanto alla dimensione dei pori sono associate diverse funzioni biologiche: i micropori migliorano la bioattività e stimolano l'attecchimento cellulare, mentre i macropori garantiscono la crescita del tessuto osseo e l'accesso dei vasi sanguigni (cap.1).





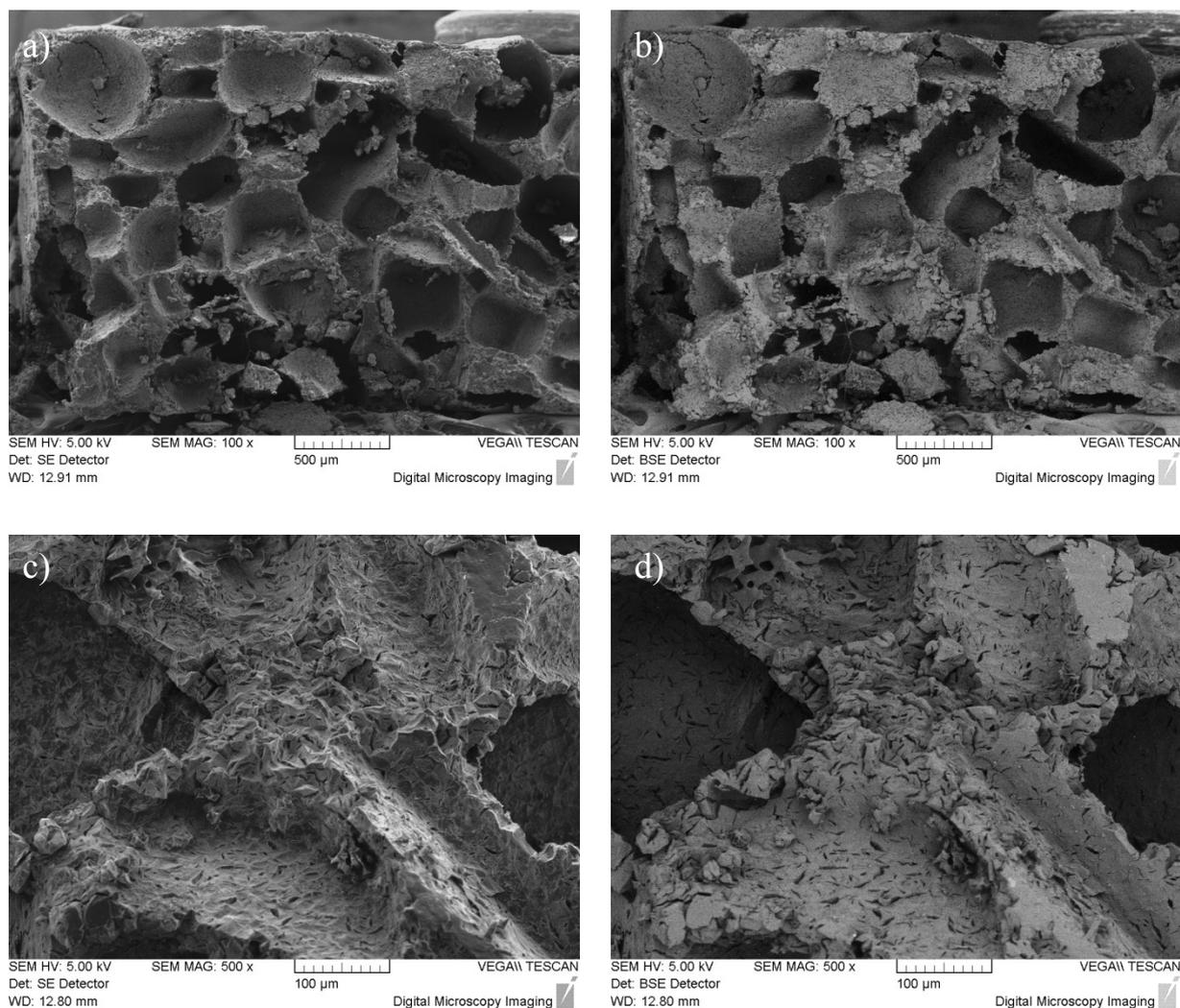
**Figura 3.6** Campione n.8 di PLA: immagini in sezione del provino con ingrandimento 100 x modalità SE (a) e BSE (b); particolare di un poro, ingrandimento 500 x in modalità SE (c) e BSE (d); ingrandimenti 1 kx in SE (e) e BSE (f) che evidenziano le microporosità dovute alla solubilizzazione del PEO.

A differenza del campione in PLA (visto in Figura 3.6), quello in PHA (Figura 3.7) non mostra la presenza delle microporosità dovute al PEO. In letteratura non sono stati trovati casi simili che possano fornire un elemento di confronto, per questo le analisi IR potrebbero fornire informazioni utili a spiegare quanto osservato.



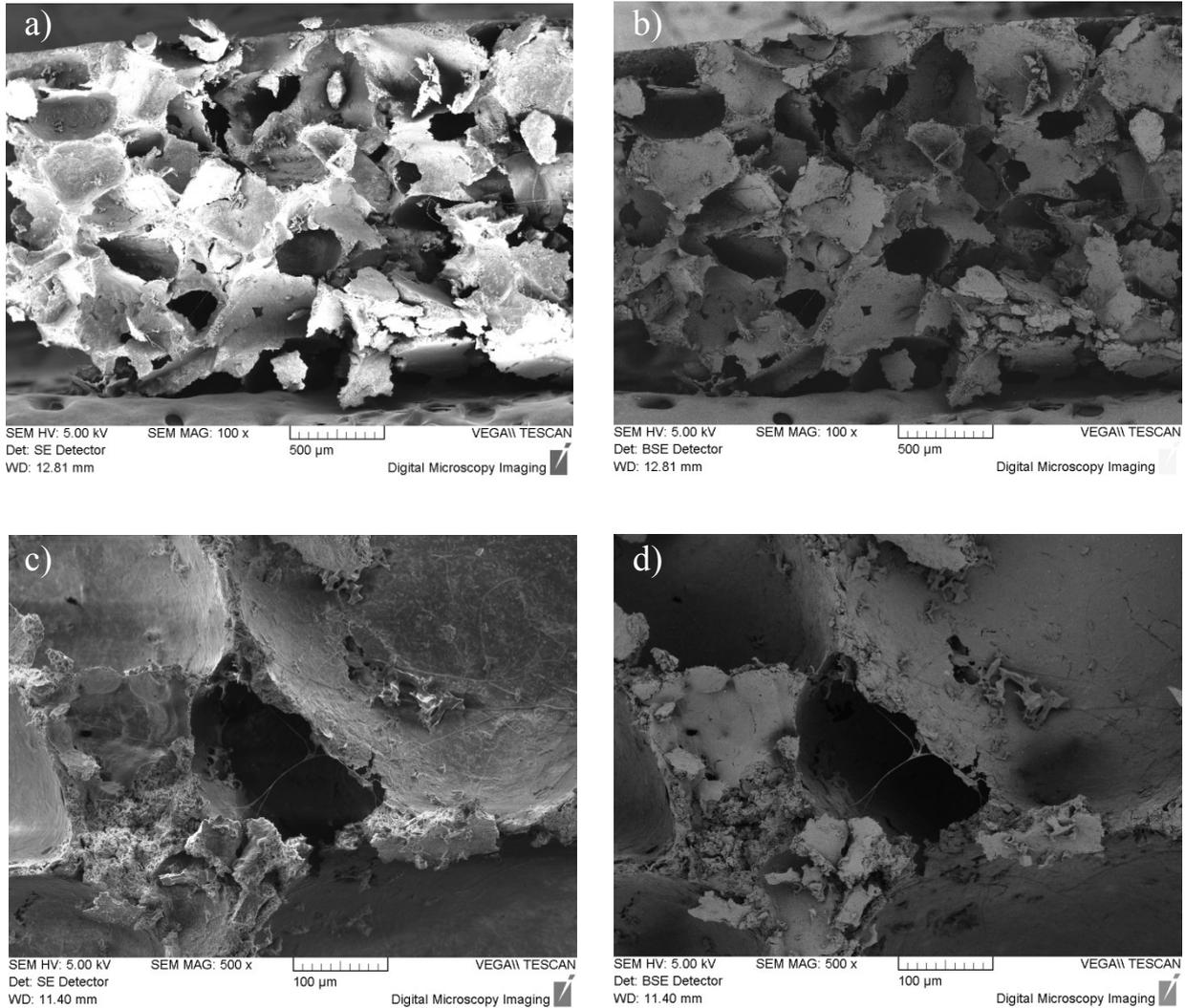
**Figura 3.7** Campione n.5 di PHA: ingrandimento 100 x (a) e 500 x (b), acquisizioni in modalità elettronica secondaria. Le immagini evidenziano in particolare le macroporosità dovute al sale.

Gli ultimi provini analizzati sono quelli contenenti la nano-idrossiapatite. I campioni ottenuti manifestano una certa fragilità imputabile all'alta percentuale di porosità vista al SEM. Nelle immagini 3.8 e 3.9 si può osservare la morfologia dei compositi con la nano-idrossiapatite.



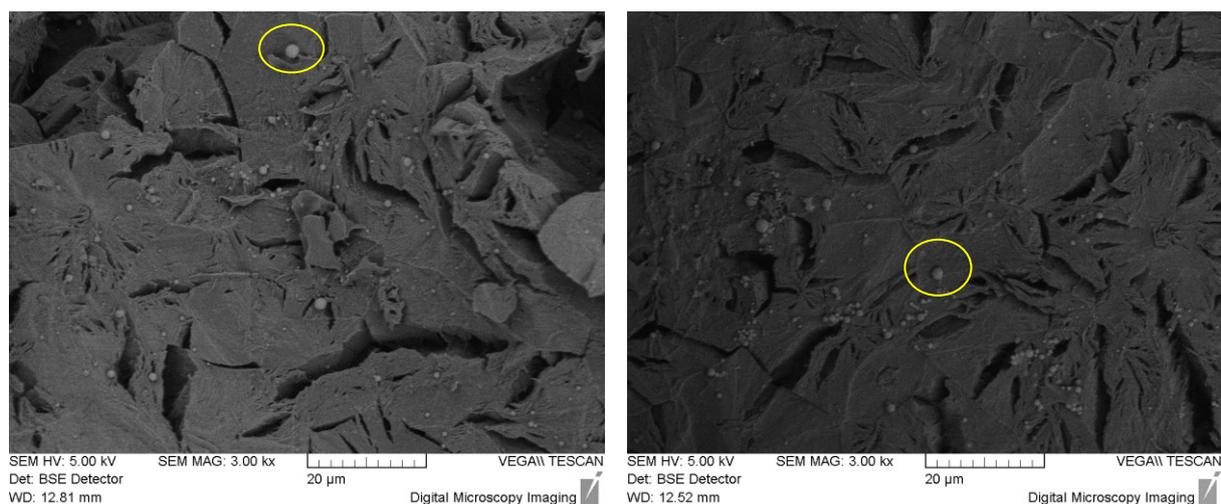
**Figura 3.8** Campione n.9 di PLA dopo la solubilizzazione degli elementi porogeni: ingrandimenti 100 x modalità SE (a) e BSE (b), 500 x modalità SE (c) e BSE (d).

Il campione n.9 in PLA (Figura 3.8) presenta una morfologia molto simile a quella ottenuta nei provini precedenti contenenti sia NaCl che PEO. Dalle immagini possiamo notare la presenza di pori di dimensione 100-200 μm (Figure 3.8a e 3.8b) creati dai cristalli di cloruro di sodio, e porosità molto più piccole, 10-20 μm, dovute alla solubilizzazione del PEO (Figure 3.8c e 3.8d). Il campione n.6 con la matrice di PHA, invece, presenta (Figura 3.9) dei pori dovuti al NaCl ma non si osservano i micropori dovuti al polietilenossido.

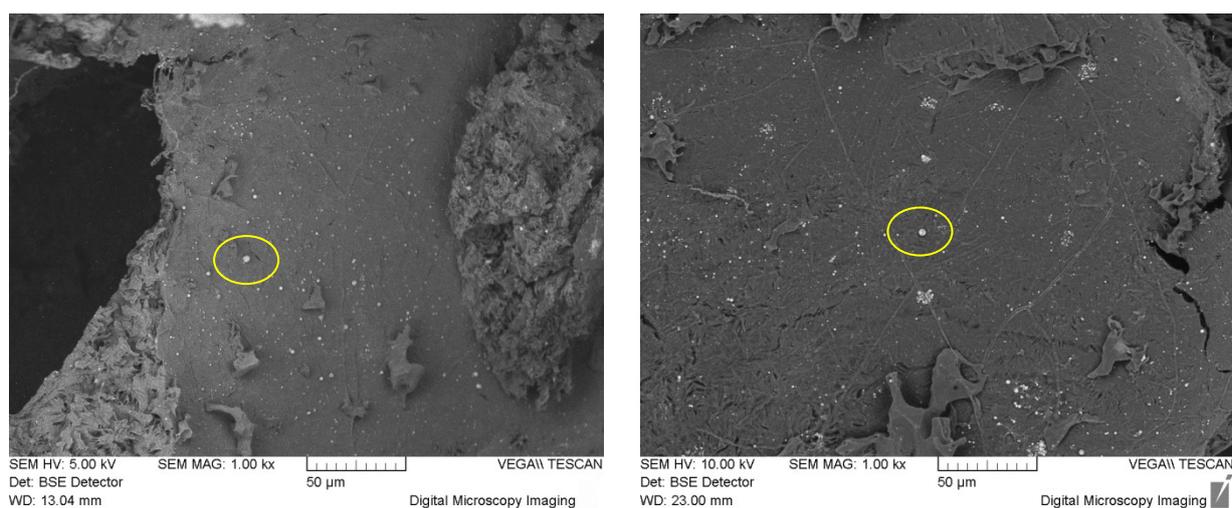


**Figura 3.9** Campione n.6 di PHA dopo la solubilizzazione degli elementi porogeni: ingrandimenti 100 x modalità SE (a) e BSE (b), 500 x modalità SE (c) e BSE (d).

In entrambi i campioni (n.6 e n.9) sono stati effettuati ingrandimenti maggiori allo scopo di identificare particelle di nano-idrossiapatite. Dalle immagini 3.10 e 3.11 possiamo notare l'effettiva presenza di nano particelle disperse nella matrice (sono state cerchiare in giallo per metterle in evidenza). Anche se l'osservazione al microscopio elettronico a scansione non permette di quantificare il livello di dispersione e distribuzione delle nanoparticelle all'interno della matrice, si può notare una discreta dispersione dell'idrossiapatite.



**Figura 3.10** Nanoparticelle di idrossiapatite disperse nella matrice del campione in PLA: immagini acquisite in modalità BSE, ingrandimento 3.00 kx. Alcune particelle sono cerchiare in giallo.



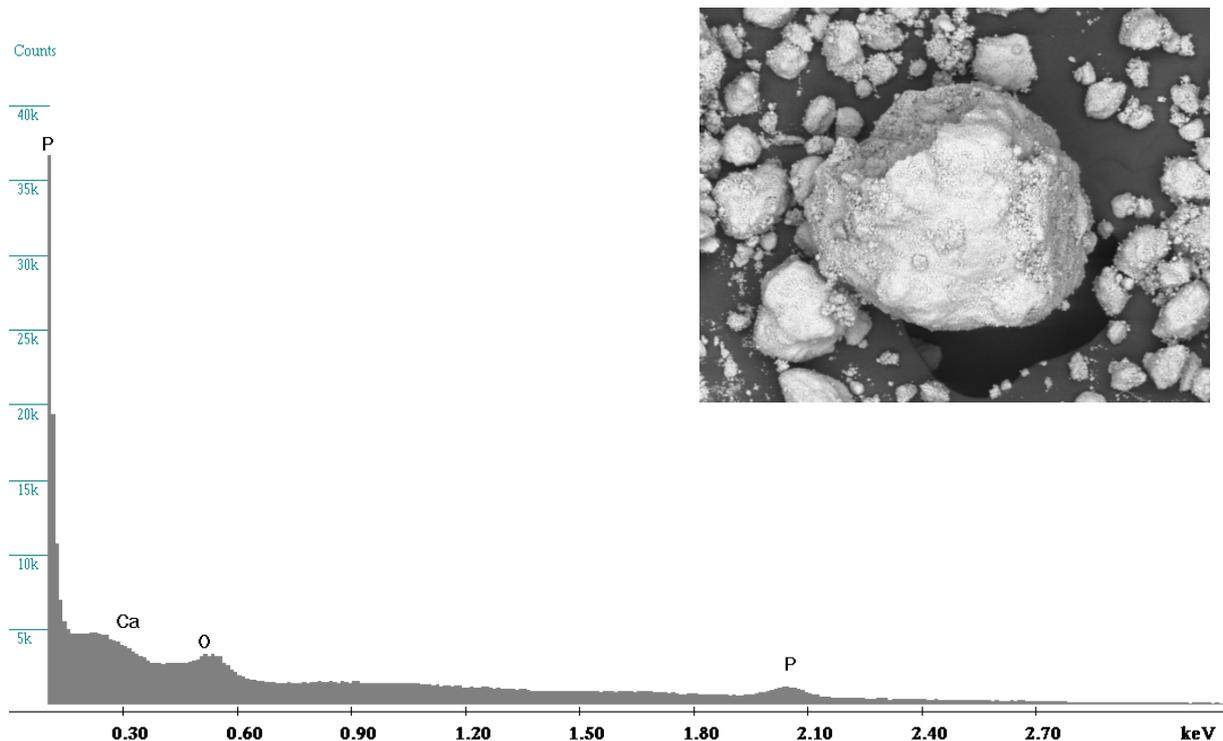
**Figura 3.11** Nanoparticelle di idrossiapatite nella matrice del campione in PHA: immagini acquisite in modalità BSE, ingrandimento 1.00 kx. Alcune particelle sono cerchiare in giallo.

Le immagini ricavate mediante gli elettroni retrodiffusi, in base al contrasto dei toni di grigio delle immagini dettato dalla differenza del numero atomico ( $Z$ ) degli elementi, danno conferma della presenza delle nanoparticelle di idrossiapatite all'interno della matrice polimerica. La microanalisi confermerà la composizione.

### 3.1.2 Spettrometria a dispersione d'energia (EDS)

La spettrometria a dispersione d'energia permette di ottenere informazioni sulla composizione elementare di un materiale.

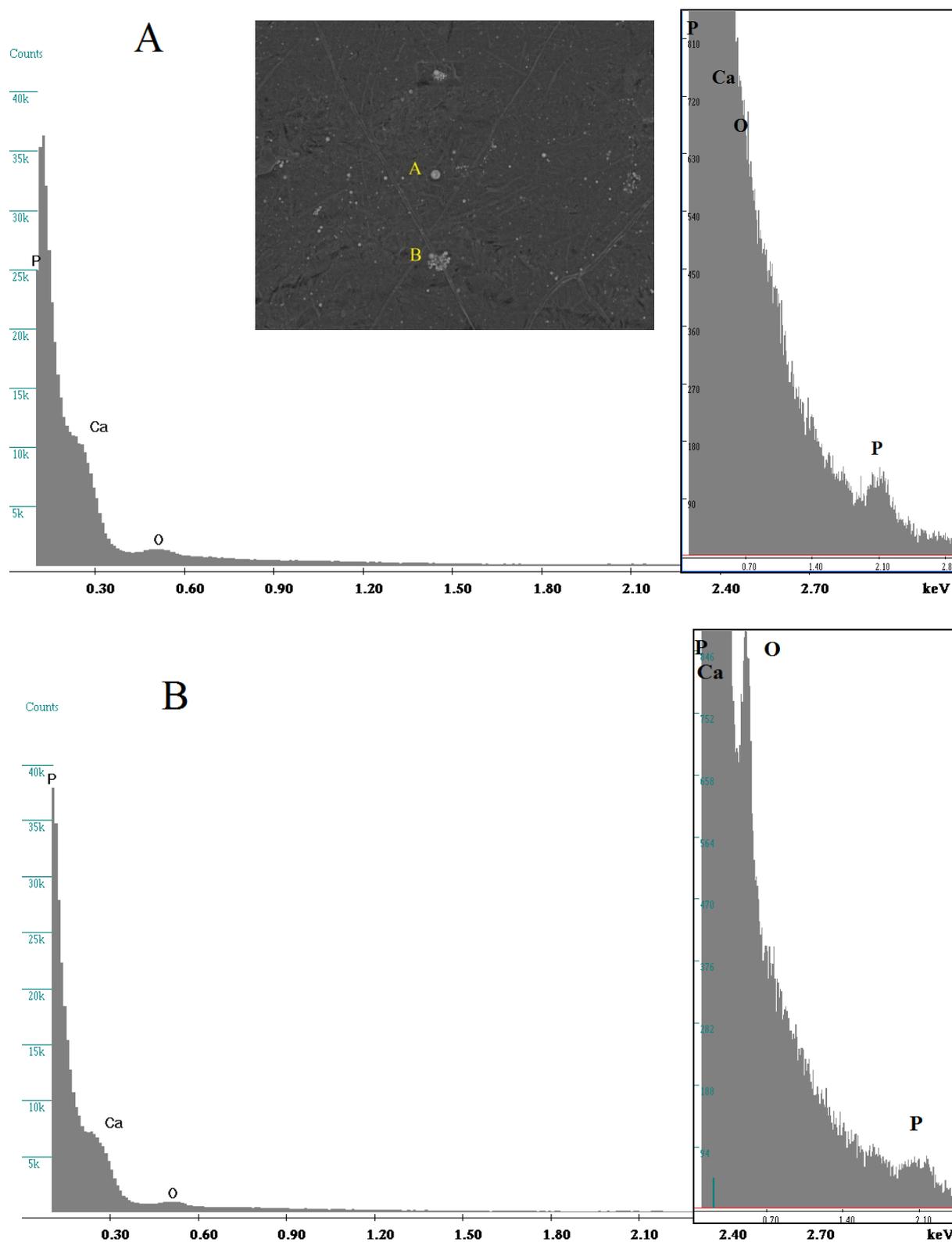
In Figura 3.12 è visibile lo spettro relativo alla polvere di nano-idrossiapatite pura e l'immagine SEM relativa al punto di acquisizione dello spettro.



**Figura 3.12** Spettro EDS della polvere di idrossiapatite. Nell'immagine è illustrata la particella di nHA della quale è stato raccolto lo spettro.

Si possono osservare i picchi principali a: 0,341 keV (calcio, Ca), 0,5 keV (ossigeno, O) e 2,013 keV (fosforo, P), come conferma la letteratura<sup>(10,22)</sup>.

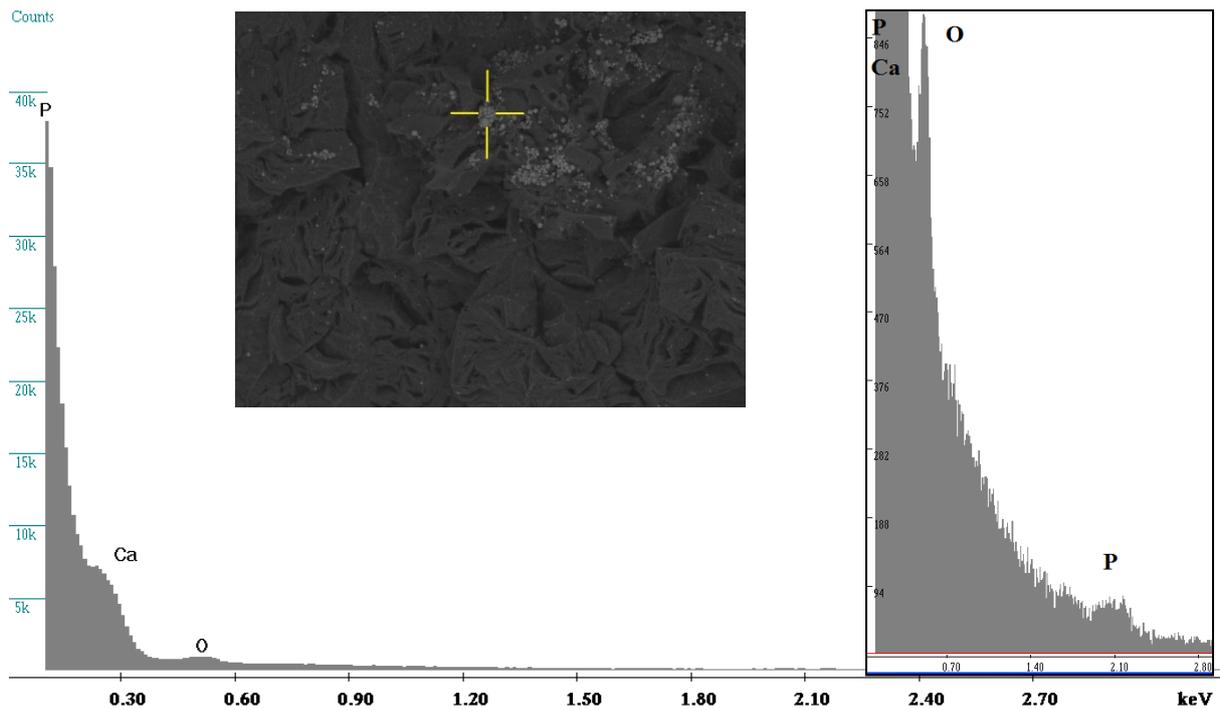
Nelle immagini seguenti sono riportati gli spettri relativi ad alcune particelle di nHA presenti nelle due matrici. Gli spettri sono stati raccolti mantenendo lo stesso numero di conteggi utilizzato per l'idrossiapatite tal quale, in modo da avere un riferimento di confronto. Purtroppo in questo caso l'eccessivo rumore di fondo, causato dal carbonio (C) della matrice, e la geometria del campione hanno portato ad ottenere uno spettro meno pulito. L'ingrandimento ha però permesso di verificare che anche in questo caso sono presenti i picchi degli elementi cercati.



**Figura 3.13** Spettri EDS relativi a due punti particolari del campione n.6 di PHA: particella singola di idrossiapatite (a) e piccolo agglomerato di nano particelle (b). Nei riquadri è visibile l'ingrandimento relativo al picco di fosforo a 2,013 keV. In alto è presente l'immagine SEM relativa ai punti di indagine (acquisizione in BSE).

Gli spettri raccolti su due punti del campione in polidrossialcanoato (Figura 3.13) presentano la stessa posizione dei picchi di quelli relativi all'HA tal quale. Questo ci permette di affermare che in entrambi i casi si tratta proprio di particelle di idrossiapatite.

La stessa analisi è stata effettuata anche in un punto del campione in PLA n.9 ed ha permesso di riscontrare la stessa composizione degli spettri precedenti (Figura 3.14).



**Figura 3.14** Spettro di un agglomerato di particelle di idrossiapatite nel campione n.9 di PLA e immagine SEM relativa al punto di indagine (acquisizione in BSE). Nel riquadro l'ingrandimento relativo al picco del fosforo a 2,013 keV.

Questo dato è significativo perché dimostra che avviene una buona miscelazione nel fuso e che tali particelle non vengono invece incorporate nel polietileno ossido rischiando successivamente di fuoriuscire dal composto durante la fase di leaching.

### 3.2 Caratterizzazione tramite spettroscopia infrarossa FT-IR

La spettroscopia infrarossa è una tecnica rapida per l'identificazione dei gruppi funzionali dei materiali, con il vantaggio di avere una preparazione dei campioni relativamente semplice e veloce. Le analisi sono state condotte in riflettanza totale attenuata (ATR). Prevedibilmente, gli spettri delle due matrici polimeriche conterranno i picchi caratteristici relativi ai gruppi molecolari presenti nell'unità ripetente: il gruppo estereo (bande dei legami C=O e C-O-C) e lo scheletro alifatico (bande relative ai legami C-C e C-H).

Lo scopo di questa caratterizzazione è verificare se c'è una variazione dei picchi del polimero a seguito dell'introduzione degli elementi porogeni e se avvengono cambiamenti nella composizione chimica durante il processo di *melt blending*.

Un ulteriore dato rilevabile è la possibile formazione di legami secondari tra il polimero e il gruppo ossidrilico dell'idrossiapatite, di cui si fa menzione in alcuni studi di letteratura<sup>(23,24)</sup>.

In Figura 3.15 è visibile lo spettro relativo all'idrossiapatite, mentre l'attribuzione delle bande caratteristiche è schematizzata in tabella 3.1.

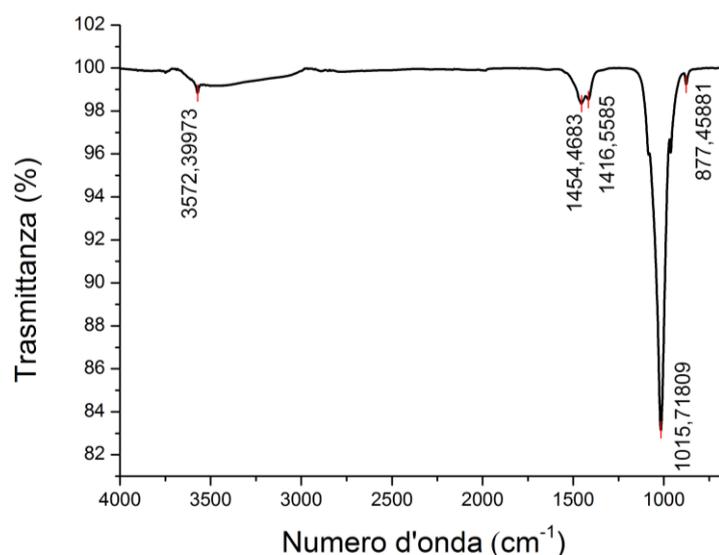


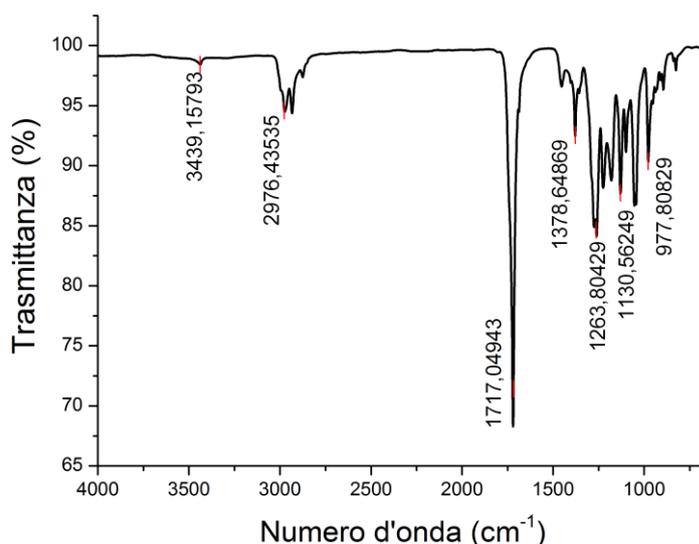
Figura 3.15 Spettro IR dell'idrossiapatite.

Tabella 3.1 Attribuzione dei principali picchi dell'idrossiapatite.

Numero d'onda (cm <sup>-1</sup> )	Gruppo caratteristico	Vibrazione
3572	OH	stretching
1455-1416	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	stretching
1016	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	stretching
877	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	stretching

I valori dei picchi riscontrati sono in accordo con quelli riportati nello studio di Sundaram e Durance (<sup>25</sup>).

Negli spettri dei due poliesteri, invece, sono state riscontrate le bande caratteristiche di questa classe. In Figura 3.16 è visibile il grafico relativo al PHA, mentre l'attribuzione dei picchi è riportata sinteticamente in Tabella 3.2.



**Figura 3.16** Spettro IR caratteristico del poliidrossialcanoato.

**Tabella 3.2** Attribuzione dei principali picchi del poliidrossialcanoato.

Numero d'onda (cm <sup>-1</sup> )	Gruppo caratteristico	Vibrazione
3439	CO	stretching (sovratono)
2975-2875	CH <sub>3</sub>	stretching
1717	CO	stretching
1450-1370	CH <sub>3</sub>	stretching
1263-1225-1180	COC	stretching
1130-820	CC	stretching

Il picco di intensità maggiore visibile nello spettro IR del PHA è quello del carbonile che cade a circa 1720 cm<sup>-1</sup>. Tale banda risente particolarmente del grado di cristallinità del polimero, spostandosi nel range 1740-1715 cm<sup>-1</sup> a seconda della struttura più o meno amorfa (<sup>24</sup>).

Nello spettro dell'acido polilattico (Figura 3.17), invece, la banda più intensa è a 1750 cm<sup>-1</sup> ed è associata allo stretching del doppio legame C=O. I movimenti di *stretching* e *bending* dei gruppi CH e CH<sub>3</sub> appaiono rispettivamente nell'intervallo 1300-1450 cm<sup>-1</sup> e 2800-3000 cm<sup>-1</sup> (<sup>27</sup>). In Tabella 3.3 è riportata l'assegnazione dei picchi.

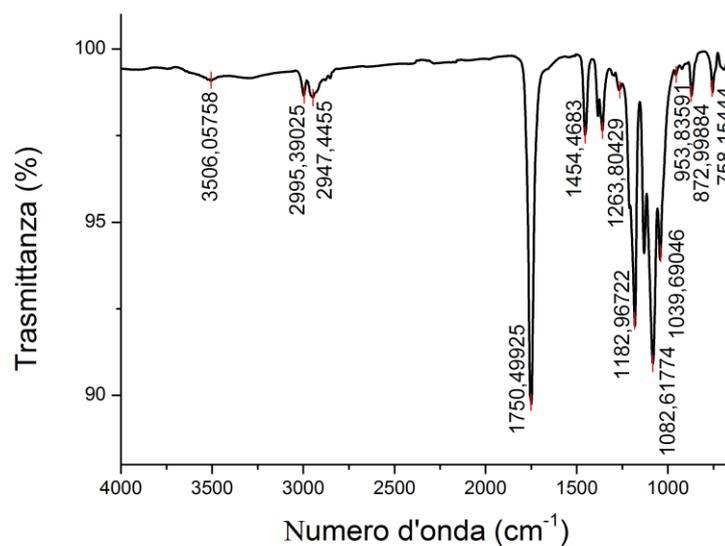


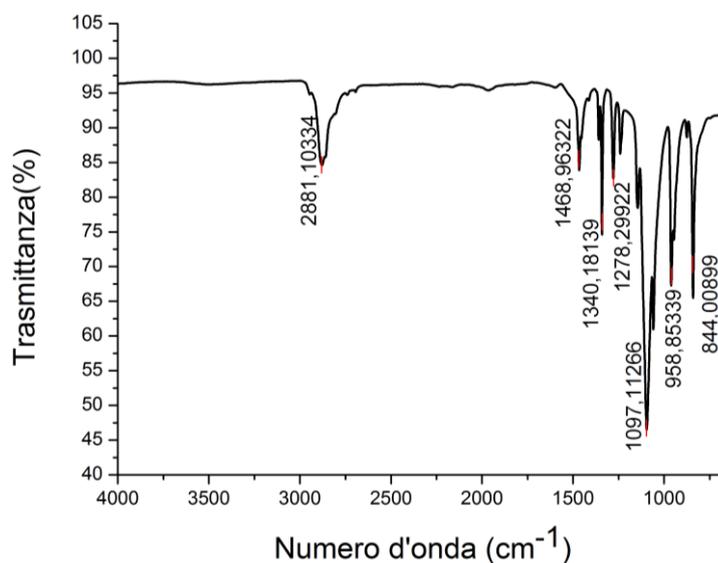
Figura 3.17 Spettro IR dell'acido polilattico.

Tabella 3.3 Attribuzione dei principali picchi dell'acido polilattico

Numero d'onda (cm <sup>-1</sup> )	Gruppo caratteristico	Vibrazione
3500	CO	stretching
2975-2875	CH <sub>3</sub>	stretching
1750	CO	stretching
1454-1360	CH	stretching
1263	COC	stretching
1182-1039	CH <sub>3</sub>	stretching
953	CH <sub>3</sub> e CC	rocking
872	C-COO	stretching
758	CO	bending

Infine, è stato acquisito lo spettro del polietilenossido per poterne verificare l'effettiva solubilizzazione nei campioni: le matrici in PLA, infatti, mostrano la presenza di microporosità dovute al PEO, mentre non è stata osservata la stessa morfologia nei provini in PHA.

Lo spettro del polietilenossido è riportato in Figura 3.18, mentre l'assegnazione dei picchi corrispondenti è schematizzata in Tabella 3.4.



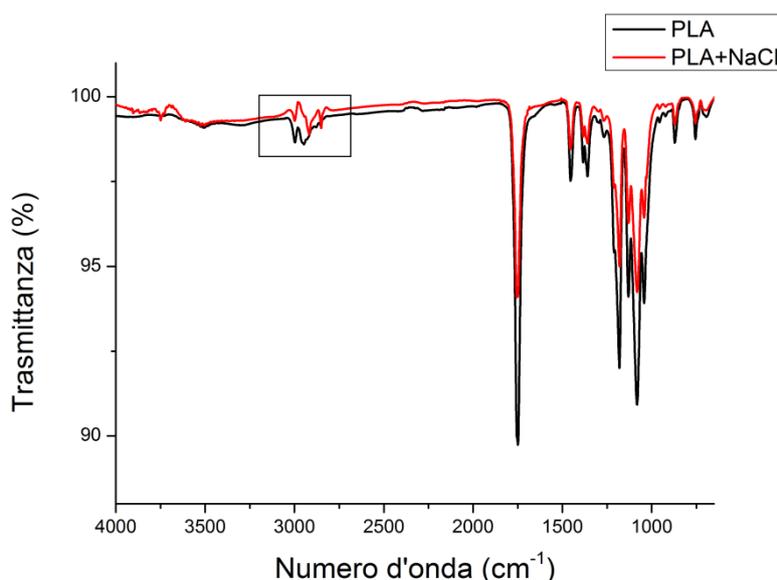
**Figura 3.18** Spettro IR del polietilenossido.

**Tabella 3.4** Attribuzione dei principali picchi del polietilenossido.

Numero d'onda (cm)	Gruppo caratteristico	Vibrazione
2881-1468	CH	stretching
1340-1278-1240	CH	bending
1097-958	CC	stretching
844	CO	stretching

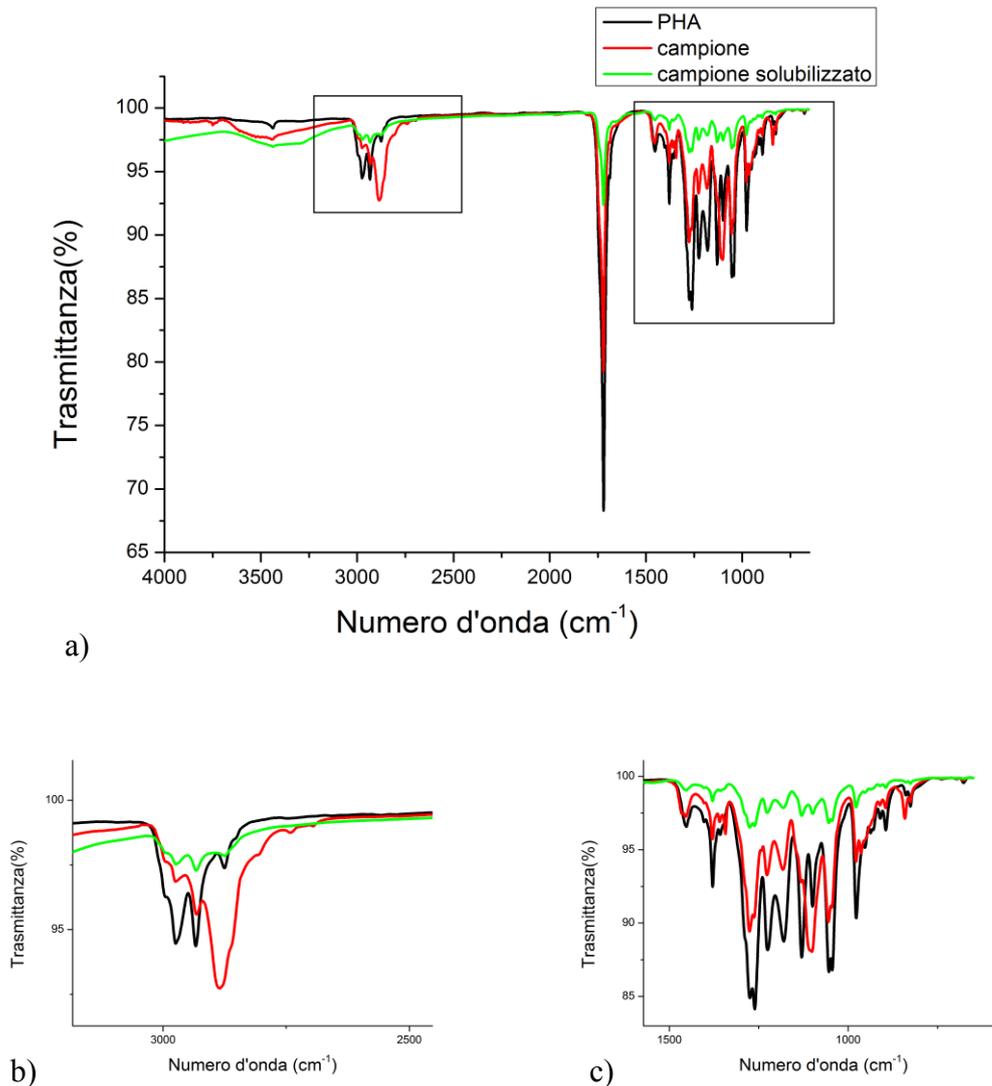
L'intensità dei picchi è notevolmente influenzata dalla presenza di impurezze, come risulta particolarmente evidente negli spettri dei campioni contenenti il sale (Figura 3.19 e 3.20). Tutte le formulazioni sono state sottoposte all'analisi sia prima che dopo la solubilizzazione. Dall'analisi dei dati raccolti emerge che la presenza di NaCl riduce l'intensità dei picchi o ne provoca uno shift, come si può osservare, per esempio, nello spettro del campione n.7 in PLA contenente anche 65wt% di NaCl (Figura 3.19). Il cloruro di sodio utilizzato, infatti, non è puro al 100%, per cui al suo interno si possono trovare tracce di altri minerali (per esempio nel cloruro di sodio comunemente usato in cucina ci sono tracce di cloruro di magnesio)<sup>2</sup>.

<sup>2</sup> Al fine di verificare che il sale non interferisca nell'analisi, si è deciso di raccogliergli lo spettro. Dopo aver opportunamente pestato i cristalli di NaCl, essi sono stati pressati fino ad ottenere una pastiglia. Il provino è stato analizzato tramite spettroscopia FTIR. Nello spettro raccolto non sono stati rilevati picchi evidenti ad eccezione di una banda molto larga a 3300 cm<sup>-1</sup> tipica del legame OH. Questo si può spiegare considerando che il cloruro di sodio è molto igroscopico.



**Figura 3.19** Confronto tra lo spettro del PLA puro con quello del campione n.7. In nero è cerchiata una zona dove si osserva lo shift subito da alcuni picchi.

Nei campioni solubilizzati, invece, sono presenti solamente i picchi caratteristici delle matrici e non si trovano tracce di altri materiali. Questo conferma che è avvenuta una completa solubilizzazione degli elementi porogeni, non solo quindi del cloruro di sodio, ma anche del polietilenossido. In Figura 3.20 è riportato lo spettro del campione n.5 con matrice in PHA, contenente il 60wt% di NaCl e 20wt% di PEO, acquisito prima e dopo la solubilizzazione, e quello relativo al poliidrossialcanoato puro. Nel campione non solubilizzato (in rosso) troviamo una variazione dei picchi attorno a  $2886\text{ cm}^{-1}$  e  $1098\text{ cm}^{-1}$  dovuta alla presenza del PEO; in quello solubilizzato (in verde), invece, la posizione dei picchi corrisponde a quella del polimero puro (in nero) ma l'intensità risulta inferiore. L'unica differenza è la presenza di una banda larga attorno ai  $3000\text{ cm}^{-1}$ , tipica dei gruppi OH, che può essere attribuita alla presenza di acqua residua.

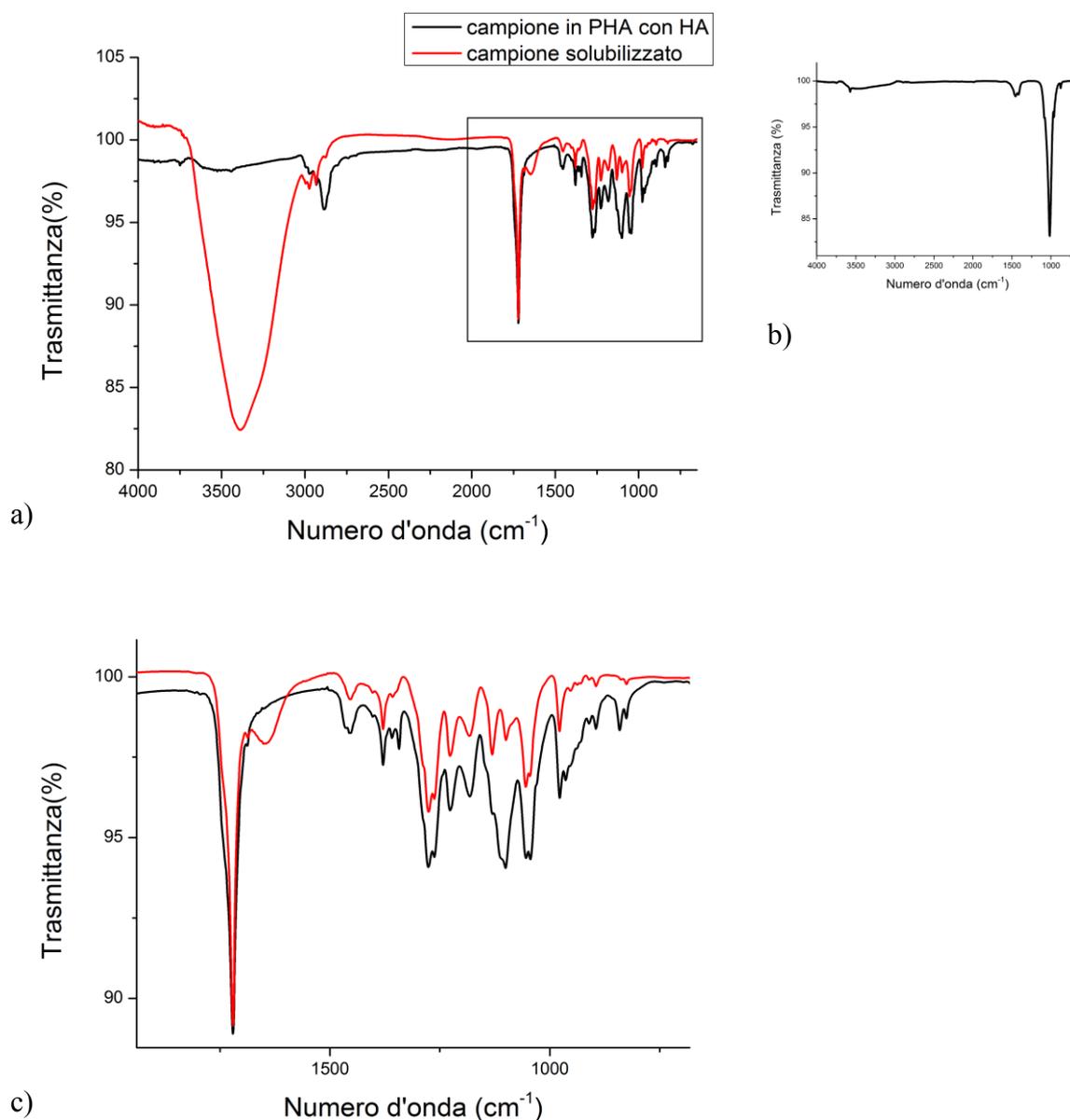


**Figura 3.20** Confronto tra gli spettri del PHA puro (in nero), del campione n.5 prima (in rosso) e dopo la solubilizzazione (in verde) (immagine 3.20a). Nei particolari (b) e (c) sono evidenziate due bande in cui si nota una significativa variazione dei picchi.

Analogo comportamento si riscontra nel campione con la matrice in PLA (60wt%NaCl e 20%PEO), dove, dopo la solubilizzazione, non si osservano più i picchi relativi al PEO (2885 cm<sup>-1</sup> e 962 cm<sup>-1</sup>).

Per quanto riguarda le formulazioni contenenti anche l'idrossiapatite, è stato effettuato un confronto prima e dopo la solubilizzazione per evidenziare la presenza/assenza delle bande caratteristiche. Il campione con la matrice in PHA (Figura 3.22), dopo la solubilizzazione, mostra la scomparsa di alcuni picchi relativi al PEO (2884 cm<sup>-1</sup>, 1452 cm<sup>-1</sup> e 825 cm<sup>-1</sup>) e la comparsa di una banda larga e di forte intensità attorno a 3500 cm<sup>-1</sup> relativa al legame OH,

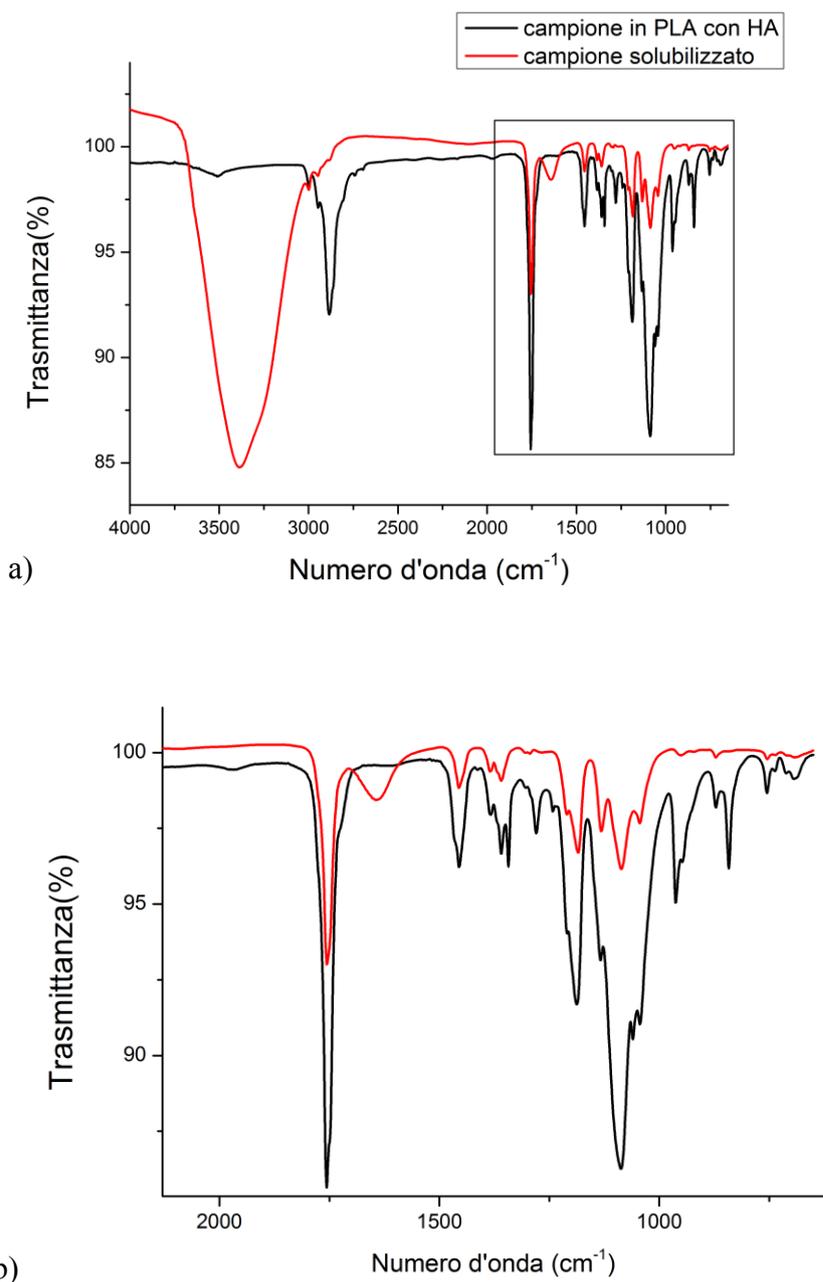
imputabile a un processo di disidratazione non ancora completato (non compare, infatti, prima del bagno in acqua). Come si può osservare dallo spettro, non sono invece evidenti picchi relativi all'idrossipatite.



**Figura 3.21** Spettro del campione n.6 prima (in nero) e dopo (in rosso) la fase di leaching (immagine 3.21a) . Nel particolare (c) è evidenziata la zona tra 2000 cm<sup>-1</sup> e 650 cm<sup>-1</sup> dove si osservano alcune variazioni nella posizione dei picchi. In alto a destra (b), invece, è riportato lo spettro dell'idrossipatite.

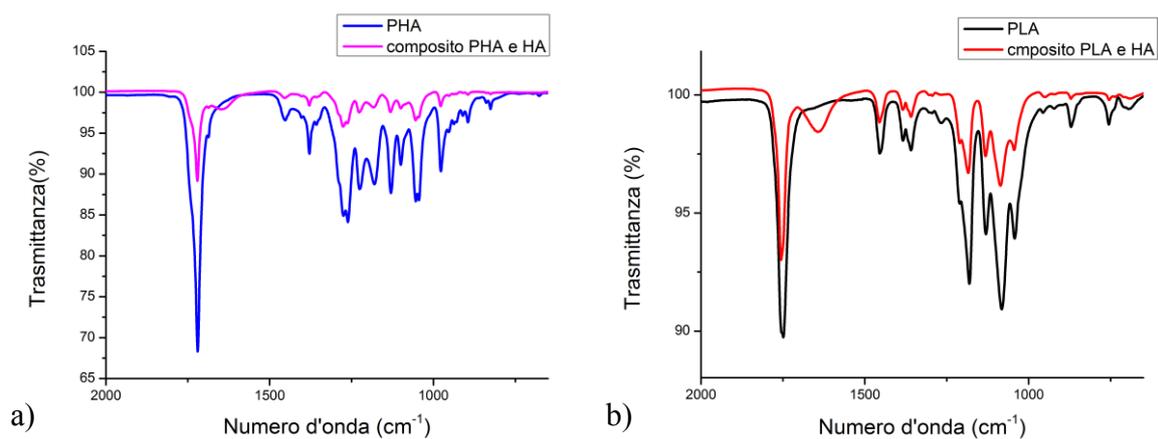
Anche nel campione con la matrice in PLA (Figura 3.22) non si trovano picchi caratteristici delle nano particelle di HA.

Prima della solubilizzazione si riscontrano alcuni picchi relativi al polietilenossido ( $2881\text{ cm}^{-1}$ ,  $1278\text{ cm}^{-1}$  e  $835\text{ cm}^{-1}$ ), che poi scompaiono nel campione finale dove risaltano, invece, tracce d'acqua (bande a  $3500\text{ cm}^{-1}$  e  $1645\text{ cm}^{-1}$ ).



**Figura 3.22** Spettro del campione con formulazione PLA n. 9 prima (in nero) e dopo (in rosso) la fase di leaching (immagine 3.22a). Nel particolare (b) è evidenziata la banda tra  $2000\text{ cm}^{-1}$  e  $650\text{ cm}^{-1}$  dove si osservano alcune variazioni dei picchi.

Entrambi i campioni con nHA mostrano lo stesso andamento delle rispettive matrici polimeriche pure, come si può osservare in Figura 3.23.



**Figura 3.23** Confronto tra lo spettro del composito e quello della matrice polimerica tal quale nel range 2000-650  $\text{cm}^{-1}$ : a) PHA puro (in blu) e campione n.6 PHA/HA (in viola); b) PLA puro (in nero) e campione n.9 PLA/HA (in rosso).

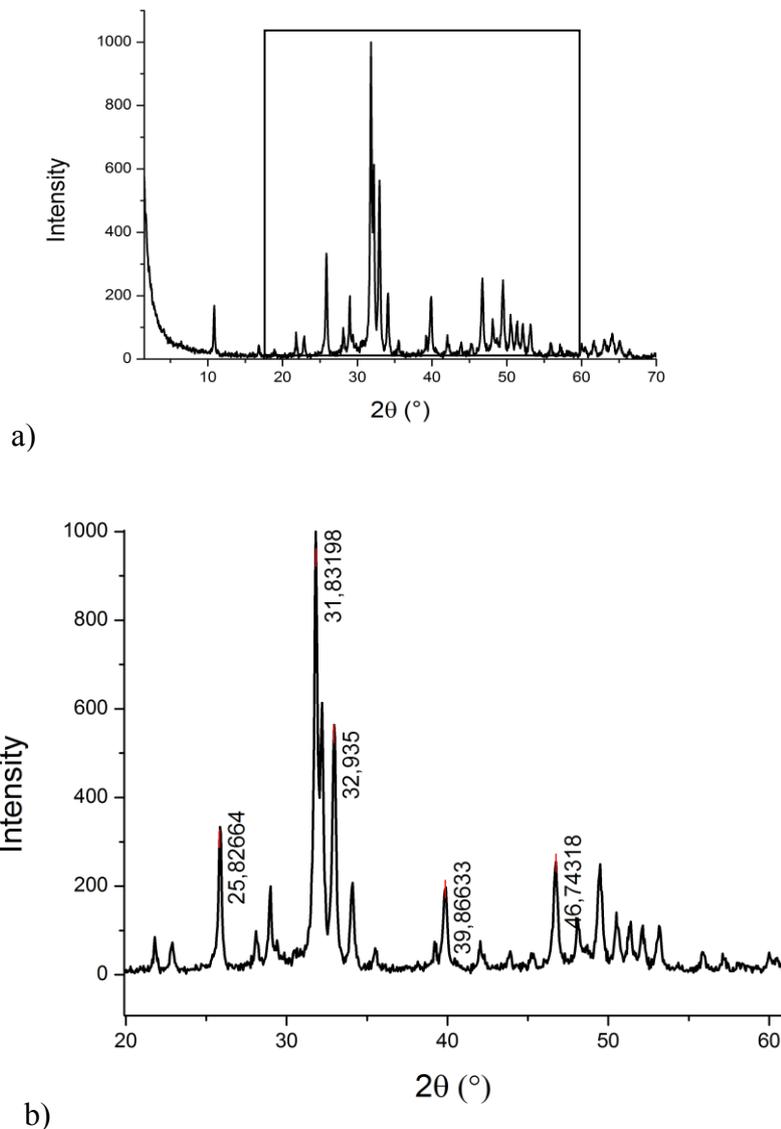
Ciò che appare evidente è una notevole riduzione d'intensità delle bande nello spettro del composito rispetto a quello del polimero puro. Poiché la forma dei picchi dipende da vari fattori, non ci sono elementi sufficienti per affermare che ciò sia dovuto a possibili interazioni instauratesi tra la matrice e il materiale ceramico, di cui si fa menzione in letteratura.

### 3.3 Caratterizzazione mediante diffrazione ai raggi X

L'analisi diffrattometrica è stata effettuata per verificare le fasi presenti nel composito e trarre informazioni sulla struttura cristallina.

Sono stati raccolti gli spettri di 4 provini quadrati ottenuti a partire dalle formulazioni n.5 in PHA e n.6 in PHA/HA, n.8 in PLA e n.9 in PLA/HA, sottoposti alla fase di leaching.

Al fine di poter verificare il comportamento del polimero dopo l'introduzione dell'idrossiapatite, è stata effettuata un'analisi anche su un campione di polvere di nHA (Figura 3.24). In accordo con la letteratura (<sup>28</sup>), sono stati riscontrati picchi a  $2\theta = 25.8^\circ$ ,  $31.8^\circ$ ,  $32.9^\circ$ ,  $46.7^\circ$ , corrispondenti rispettivamente ai seguenti piani cristallini: [002], [211], [112], [310], [203].



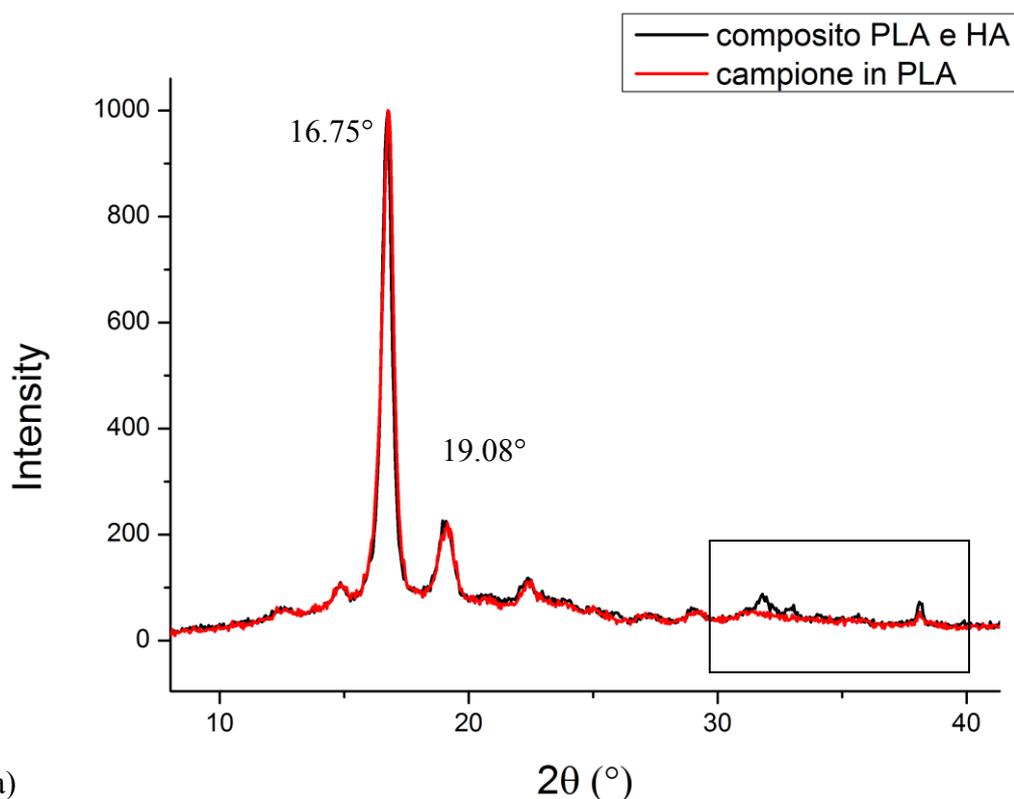
**Figura 3.24** Spettro relativo alla polvere di nHA (a). Nel particolare (b) viene messa in risalto la banda compresa tra  $2\theta = 20^\circ$  e  $2\theta = 60^\circ$ , dove si trovano i picchi principali.

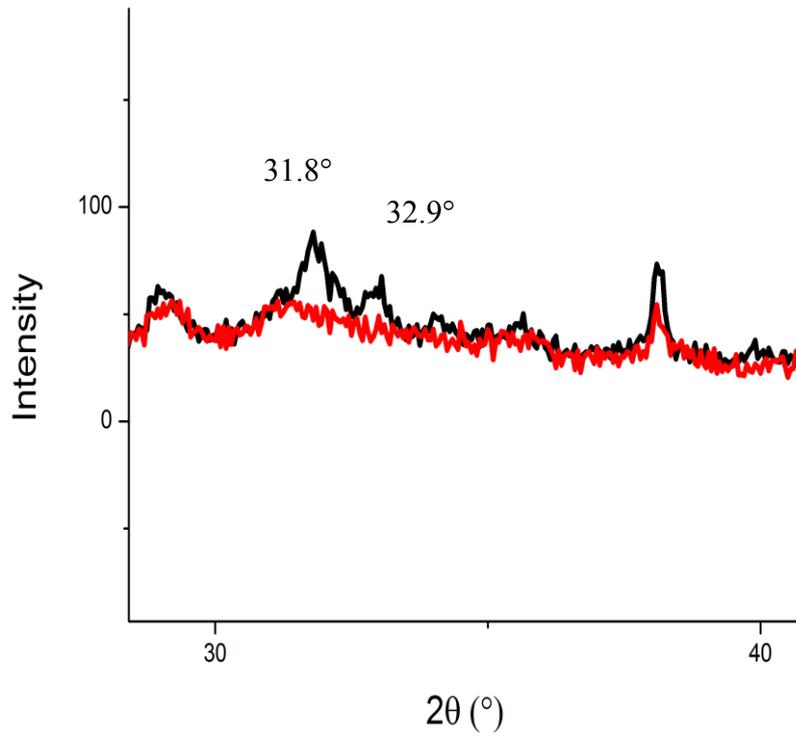
Per quanto riguarda i due poliesteri, la zona significativa risulta essere quella compresa tra  $2\theta=10^\circ$  e  $2\theta=40^\circ$ . Nelle figure 3.26 e 3.27 sono riportati i diffrattogrammi corrispondenti ai campioni n.5 e n.8 ed ai compositi n.6 e n.9. Osservando i grafici è possibile constatare che sia il campione di PLA che quello di PHA sono sostanzialmente amorfi.

L'acido polilattico presenta due picchi principali a  $2\theta=16.75^\circ$  e a  $2\theta=19.08^\circ$ , in accordo con quanto riportato in letteratura <sup>(27)</sup>.

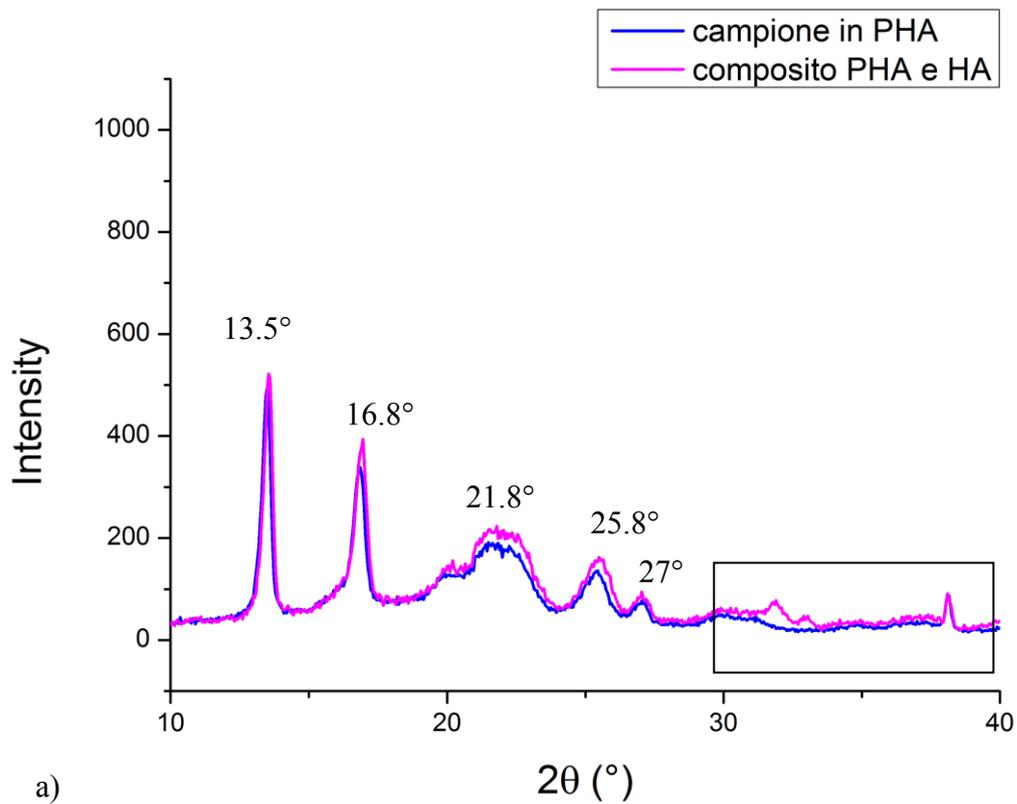
Il poliidrossialcanoato presenta un numero maggiore di picchi:  $2\theta=13.5^\circ$ ,  $16.8^\circ$ ,  $21.8^\circ$ ,  $25.3^\circ$  e  $27^\circ$ , corrispondenti rispettivamente ai piani [020], [110], [111], [031], [040] <sup>(28)</sup>. I primi picchi sono più stretti, segno di un maggior grado di cristallinità, mentre gli altri sono più larghi e di minor intensità, a sottolineare la presenza di una forte componente amorfa.

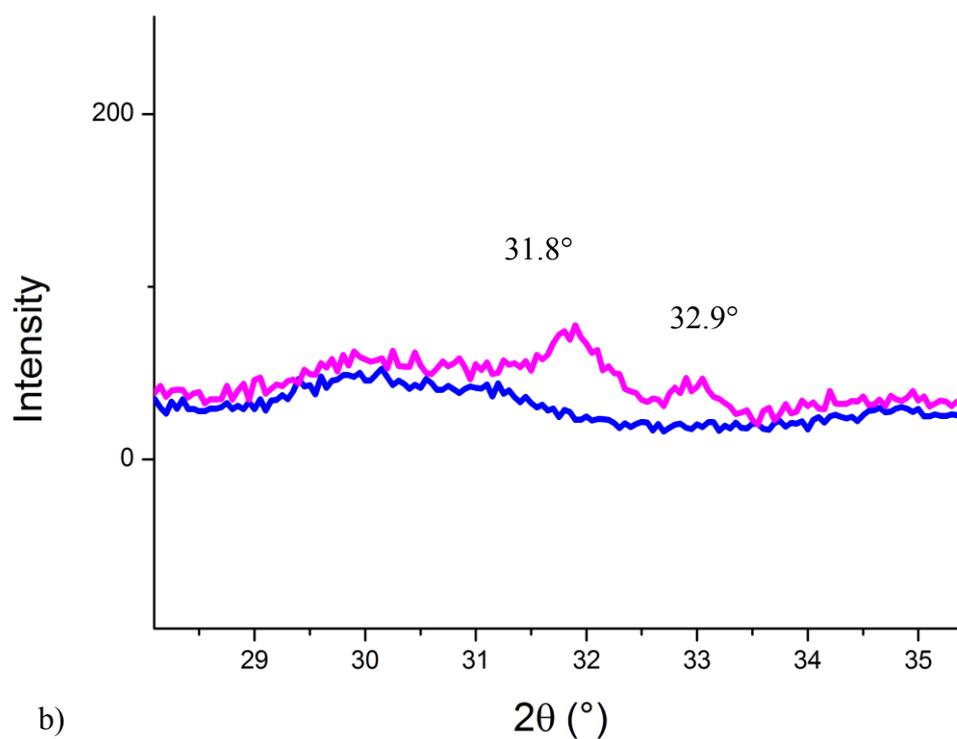
L'introduzione dell'idrossiapatite nella matrice polimerica comporta una variazione dei picchi. Nel particolare della Figura 3.26 si evidenzia la comparsa di due picchi a  $2\theta=31.8^\circ$  e  $2\theta=32.9^\circ$  che corrispondono alla presenza di nHA. Anche nel composito in poliidrossialcanoato (Figura 3.27) notiamo la comparsa di due picchi in corrispondenza degli stessi valori di  $2\theta$ . Queste bande risultano poco intense, segno che la componente cristallina è poco presente, ma confermano la presenza delle nano particelle di idrossiapatite nella miscela.





**Figura 3.25** Confronto dei diffrattogrammi del campione n.8 in PLA e del composito n.9 in PLA/HA (figura a). Nel particolare (b) si osserva la comparsa di due picchi relativi all'idrossipatite.





**Figura 3.26** Confronto dei diffrattogrammi del campione n.5 in PHA e del composito n.6 in PHA/HA (figura a). Nel particolare (b) si osserva la comparsa di due picchi relativi all'idrossiapatite.

Poiché dal confronto dei diffrattogrammi non emergono ulteriori differenze significative, è quindi ragionevole affermare che l'idrossiapatite non altera la struttura cristallina dei due polimeri.



# Conclusioni

Il lavoro di tesi esposto in questi capitoli ha avuto come obiettivo la preparazione di materiali compositi a matrice polimerica per la realizzazione di *scaffold* ossei.

Inizialmente l'attività si è concentrata sulla ricerca dei materiali da utilizzare. Dopo uno studio approfondito della letteratura sono stati selezionati due polimeri biocompatibili e biorisorbibili, un poliacido lattico e un poliidrossialcanoato. Il poliacido lattico è stato scelto per l'eccellente biocompatibilità dovuta alla facilità di metabolizzazione da parte dell'organismo e per le discrete proprietà meccaniche. Per quanto riguarda i poliidrossialcanoati, sebbene abbiano destato interesse per questo tipo di applicazioni solo recentemente, le moderne tecniche di fermentazione e lavorazione hanno permesso di personalizzarne le proprietà finali grazie alla vasta gamma di monomeri.

Successivamente, è stato sviluppato e ottimizzato un metodo di preparazione *solvent free*, che ovvia ai problemi di tossicità legati all'uso di solventi organici. Esso prevede la combinazione di due tecniche: la miscelazione in fuso (*melt blending*) e la lisciviazione del particolato (*particulate leaching*), quest'ultima finalizzata alla creazione di una macro- e micro-porosità, necessaria per favorire la penetrazione delle cellule, la crescita dei tessuti e la loro vascolarizzazione.

Durante la prima fase di preparazione (*melt blending*), ciascuna matrice polimerica è stata miscelata insieme a due elementi porogeni, il cloruro di sodio e il polietilenoossido, al fine di ottenere nel composto finale pori con diverse dimensioni. Sono state condotte diverse prove per definire i parametri di processo e le quantità delle materie prime, fino ad ottimizzare il riempimento della camera del mescolatore ed ottenere una buona miscelazione dei componenti.

Inoltre, sono state realizzate due mescole inserendo nella matrice delle nano-particelle di idrossiapatite, allo scopo di conferire al composito caratteristiche di bioattività e migliorarne le prestazioni meccaniche.

La seconda fase di preparazione ha, invece, previsto la solubilizzazione degli elementi porogeni precedentemente introdotti nel materiale. Si è osservato che i tempi necessari per una completa lisciviazione del particolato sono di due settimane. Al termine della preparazione tutti i campioni sono stati sottoposti alle prove di caratterizzazione.

L'analisi SEM ha permesso di verificare l'effettiva presenza di pori all'interno dei materiali prodotti: l'eterogeneità dimensionale dei pori (in particolare nei compositi di PLA), sebbene non sia stato possibile determinarne quantitativamente il diametro e la loro interconnessione

mediante un porosimetro, è comunque un risultato soddisfacente in quanto conferma l'efficacia del processo di *leaching* messo a punto, soprattutto tenendo in considerazione l'assenza di solventi organici che potrebbero risultare tossici per i tessuti coi quali vengono in contatto mediante lo *scaffold*.

La spettroscopia infrarossa FT-IR ha permesso di analizzare chimicamente i materiali prodotti. L'introduzione degli elementi porogeni comporta una modificazione dei picchi tipici delle matrici tal quali, in termini di shift di alcune bande caratteristiche. Tale variazione è legata alla presenza nel composito dei materiali solubili: infatti, il fenomeno scompare negli spettri IR effettuati dopo il processo di *leaching*. Infine, è stato osservato che l'introduzione dell'idrossipatite non comporta la comparsa di nuovi picchi rispetto a quelli della matrice pura: questo ci permette di ipotizzare che non sono venute a crearsi interazioni tra il polimero e il materiale ceramico, di cui invece si fa menzione in letteratura.

La diffrazione a raggi X ha permesso di verificare la struttura cristallina del composito e rilevare le fasi presenti nella matrice. Dallo spettro raccolto dal campione di PLA è stata confermata la presenza di una componente cristallina nel polimero. Anche nello spettro del poliidrossialcanoato sono stati evidenziati alcuni picchi dovuti alla diffrazione dei piani cristallini aventi la forma caratteristica delle componenti amorfe. Infine, nei campioni relativi ai due compositi con l'idrossipatite è stata osservata la comparsa di due picchi relativi al materiale ceramico, che dimostrano la formazione di una seconda fase nel composito.

In conclusione, per quanto riguarda la tecnica di preparazione utilizzata si osserva che:

- il processo di *melt blending* prevede l'utilizzo di un unico strumento;
- non sono state riscontrate particolari difficoltà nella fase di miscelazione dei vari materiali;
- la fase di *leaching* non prevede l'utilizzo di solventi organici, tossici per i tessuti con cui poi andrà ad interagire lo *scaffold*;
- la fase di *leaching* ha permesso di ottenere una completa solubilizzazione degli elementi porogeni in tempi abbastanza rapidi;
- è stata ottenuta una morfologia dei pori comparabile a quella realizzabile con tecniche più tradizionali;
- è possibile aggiungere alla matrice la nano-idrossipatite, necessaria per le sue proprietà osteoconduttive, senza comportare modificazioni chimiche;
- la facilità di lavorazione rende ipotizzabile la realizzazione di geometrie complesse del campione finale.

Si può quindi affermare che il metodo sviluppato è praticabile ed è ipotizzabile il suo trasferimento a livello industriale. In particolare, al fine di ridurre ulteriormente i tempi di solubilizzazione, si può pensare di agitare la soluzione acquosa o alzarne leggermente la temperatura, verificando però di non modificare chimicamente i campioni o provocarne la rottura.

Per quanto riguarda i due materiali, entrambi hanno permesso di ottenere risultati comparabili per quanto riguarda la miscelazione con gli agenti porogeni e l'interazione con l'idrossiapatite. La morfologia dei pori ottenuta con il PLA risulta però migliore dal punto di vista dell'eterogeneità della dimensione.

Gli sviluppi futuri comprendono sicuramente la valutazione della biocompatibilità e citossicità (con test *in vitro* e *in vivo*), affiancate a test che permettano di determinare l'effettiva porosità e le prestazioni meccaniche dei campioni (per esempio, prove di resistenza a compressione e a trazione).

Inoltre, tra gli obiettivi previsti c'è l'aumento del contenuto di idrossiapatite per favorire ulteriormente l'attecchimento cellulare e la creazione di una rugosità superficiale mediante trattamento al plasma atmosferico (<sup>31</sup>), che faciliti ulteriormente l'adesione degli osteoblasti.

Solo dopo aver verificato che si può ottenere un materiale che combina la biocompatibilità e la porosità ad adeguate prestazioni meccaniche, è possibile procedere con la prototipizzazione e la realizzazione dello *scaffold*.



# Riferimenti bibliografici

1. Lichte, P., et al., *Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence*. Injury, 2011. **42**(6): p. 569-573.
2. Tripathi, G. and B. Basu, *A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations*. Ceramics International, 2012. **38**(1): p. 341-349.
3. Hollister, S.J., *Porous scaffold design for tissue engineering*. Nat Mater, 2006. **5**(7): p. 590-590.
4. Hao, Yuan et Deng, *Biodegradable and Biocompatible Nanocomposites of Poly( $\epsilon$ -caprolactone) with Hydroxyapatite Nanocrystals: Thermal and Mechanical Properties*, Journal of Applied Polymer Science, 2002. **86**: p. 676–683.
5. Rizzi, Heath et al., *Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts*, Journal of Biomedical Materials Research, 2001. **55**(4): p. 475-486.
6. Narayan, R., *Biomedical Materials*, 2009: Springer.
7. Porter, T.T. Ruckh et al., *Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies*. AIChE J., 2009. **25**(6): p. 1539-1560.
8. Davis J. R., *Handbook Materials for Medical Devices*. ASM International, 2003, p. 341.
9. Gunatillake e R. Adhikari, *Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering*. European Cells and Materials, 2003. **5**: p. 1-16.
10. Zhao, Deng et al., *Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility*. Biomaterials, 2003. **24**: p. 1041-1045.
11. Raquez, Barone, L., et al., *Osteoconductive and bioresorbable composite based on poly(L,L-lactide) and pseudowollastonite: from synthesis and interfacial compatibilization to in vitro bioactivity and in vivo osseointegration studies*. Biomacromolecules, 2011. **12**: p. 692-700.
12. Yanagida, H., et al., *Cell adhesion and tissue response to hydroxyapatite nanocrystal-coated poly(l-lactic acid) fabric*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009. **108**(3): p. 235-243.
13. Mohanty, M. Misra et L. T. Drzal, *Natural Fibers, Biopolymers and Biocomposites*. CRC Press, 2005.
14. Garlotta, *A literature review of poly(lactic acid)*. Journal of Polymers and the Environment, 2001. **9**(2): p. 63-83.

15. Harvie, B. Sc., Ph. D, *PLA in Surgery: a Safe and Effective Material*. Smith and Nephew, 2000.
16. Verlinden, Hill et al., *Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates*. J. of Applied Microbiology, 2007. **102**(6): p. 1437-1449.
17. Williams, Martin, et al., *PHA application: addressing the price performance issue I. Tissue engineering*. I. J. of Biological Macromolecules, 1999. **25**: 111-121.
18. C. e F. Mangano, *Osso ingegnerizzato versus idrossiapatite porosa nel rialzo del seno mascellare*. Italian Oral Surgery, 2008. **4**: p. 45-59.
19. Kim, S.-S., et al., *Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2006. **27**(8): p. 1399-1409.
20. Ghosh, S., et al., *Development of porous lamellar poly(l-lactic acid) scaffolds by conventional injection molding process*. Acta Biomaterialia, 2008. **4**(4): p. 887-896.
21. Delabarde, Plummer et al., *Accelerated ageing and degradation in poly-L-lactide/hydroxyapatite nanocomposites*. Polymer degradation and Stability, 2011. **96**(4): p. 595-607.
22. Joschek, Nies et al., *Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone*. Biomaterials, 2000. **21**(16): p. 1645-1658.
23. Li, Nan et al., *Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan cross-linking composite membrane intended for tissue engineering*. I.J. of Biological macromolecules, 2012. **50**(1): p. 43-49.
24. Raucci, D'Antò, Guarino et al., *Biomaterialized porous composite scaffolds prepared by chemical synthesis for bone tissue regeneration*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**(10): p. 4090-4099.
25. Sundaram, T.D. Durance et Wang, *Porous scaffold of gelatin-starch with nanohydroxyapatite composite processed via novel microwave vacuum drying*. Acta Biomaterialia, 2008. **4**(4): p. 932-942.
26. Wu, Tian, Sun et al., *Study of microbial polyhydroxyalkanoates using two-dimensional fourier-transform infrared correlation spectroscopy*. J. of Applied Polymer Science, 2001. **82**(4): p. 934-940.
27. Kaitian et al., *Poly(D,L-Lactic Acid) homopolymers: synthesis and characterization*. J. of Chemistry, 1996. **20**: p. 43-53.
28. Li, Chen, Yin et al., *Modulation of nano-hydroxyapatite size via formation on chitosan-gelatin network film in situ*. Biomaterials, 2007. **28**(5): p. 781-790.
29. Quynh, Mitomo et al., *Properties of radiation-induced crosslinking stereocomplexes derived from poly(L-lactide) and different poly(D-lactide)*. Polymer Engineering and Science, 2009. **49**(5): p. 970-976.

30. Sato, Nakamura et al., *Thermal behavior and molecular interaction of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) studied by wide-angle x-ray diffraction*. *Macromolecules*, 2004. **37**(10): p. 3763-3769.
31. Nakagawa, M., et al., *Improvement of cell adhesion on poly(L-lactide) by atmospheric plasma treatment*. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 2006. **77**(1): p. 112-118.

Siti web

[http://www.luigi-marino.it/softdocs/cer\\_n\\_s\\_Biomateriali\\_ceramici.pdf](http://www.luigi-marino.it/softdocs/cer_n_s_Biomateriali_ceramici.pdf)

[http://www.uniroma2.it/didattica/MA2/deposito/spettroscopia\\_infrarossa.pdf](http://www.uniroma2.it/didattica/MA2/deposito/spettroscopia_infrarossa.pdf)