



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

Corso di Laurea in Chimica Industriale

**CARATTERISTICHE DEL POLI(GLICEROL SEBACATO)  
E SUE APPLICAZIONI IN INGEGNERIA TISSUTALE**

Relatore: Prof. FERNANDO FORMAGGIO

Laureando: RICCARDO THIELLA

Matricola: 1232943

Accademico 2022/2023

|   |    |
|---|----|
| INDICE  |    |
| 1. INTRODUZIONE   | 2  |
| 2. SCOPO  | 2  |
| 3. IL POLI(GLICEROL SEBACATO)                                     | 2  |
| 4. SINTESI DEL POLI(GLICEROL SEBACATO)                            | 5  |
| 5. TECNICHE FABBRICAZIONE DI SCAFFOLD DI POLI GLICEROL SEBACATO   | 6  |
| ○ ELETTROFILATURA O ELETROSPINNING                                | 7  |
| ○ ELETTRO FILATURA MISCELATA                                      | 9  |
| ○ ELETTRO FILATURA COASSIALE                                      | 9  |
| ○ ELETTRO FILATURA SENZA UGELLI                                   | 10 |
| 6. EFFETTI DELLA STERILIZZAZIONE SULLE PROPRIETÀ CHIMICHE DEL PGS | 10 |
| 7. APPLICAZIONE DEL PGS   | 12 |
| ○ TESSUTO CARDIACO  | 12 |
| ○ TESSUTO NERVOSO   | 15 |
| ○ TESSUTO OSSEO   | 16 |
| 8. CONCLUSIONI  | 18 |
| BIBLIOGRAFIA  | 19 |

## 1. INTRODUZIONE

L'obiettivo di questa tesi è quello di fornire un'analisi completa e riportare le principali applicazioni in ambito di ingegneria dei tessuti del poli(glicerol sebacato) (PGS). Si vedrà quali vantaggi possiede per essere utilizzato come biomateriale nella produzione di scaffold. Questa tesi è così suddivisa in 6 sezioni: nella prima sezione viene fornita un'analisi sulla struttura dei biopolimeri e le loro caratteristiche con particolare attenzione alla struttura del PGS. Nella seconda sezione spiegherò come e con quali condizioni avviene la sintesi e la polimerizzazione tra i monomeri del PGS, e come questa vada migliorata affinché possa avere buone applicazioni come biomateriale. Nella terza sezione riporterò una serie di tecniche di fabbricazione del PGS e descriverò perché questo abbia necessità di essere prodotto sotto forma di blend. Nella quarta sezione illustrerò come il materiale resista alla sterilizzazione affinché mantenga le sue proprietà come biomateriale. Nella quinta sezione riporterò una serie di risultati di applicazione in vivo del PGS, unito ad altri materiali. Infine, nella sesta sezione darò le mie conclusioni sulle analisi riportate in questa tesi e su un possibile futuro del PGS nell'industria biomedicale.

## 2. SCOPO DELLA TESI

Come appena descritto nell'introduzione, questo elaborato di tesi mira a valutare le proprietà chimiche del PGS per possibili applicazioni per l'ingegneria tissutale

## 3. IL POLI(GLICEROL SEBACATO)

Il poli(glicerol sebacato) è un polimero, per la precisione un elastomero, biodegradabile e biocompatibile. Pertanto, risulta essere un buon candidato per la produzione di scaffold. Gli scaffold dovrebbero supportare l'attaccamento, la proliferazione e la differenziazione cellulare, nonché la genesi del neo-tessuto [Baolin 2014]. Quindi, la composizione chimica, la struttura fisica e le parti biologicamente funzionali sono tutti attributi importanti per gli scaffold per l'ingegneria dei tessuti. Idealmente, uno scaffold dovrebbe:

- (i) essere un substrato biocompatibile e biodegradabile con tassi di degradazione regolabili e prodotti di degradazione non tossici;
- (ii) avere una rete di pori tridimensionale (3D) altamente porosa e interconnessa, per facilitare il trasporto di nutrienti e rifiuti;
- (iii) avere integrità meccanica per supportare la rigenerazione;
- (iv) avere l'appropriata chimica e la topografia superficiale per interagire positivamente con le cellule.

Una serie di polimeri di origine sintetica si sono visti essere degli ottimi candidati per la produzione di scaffold (figura 1), in quanto riescono a sostenere la matrice extracellulare (ECM). Questa è costituita da una varietà di proteine e polisaccaridi assemblati in una rete organizzata, che fornisce supporto strutturale alle cellule.

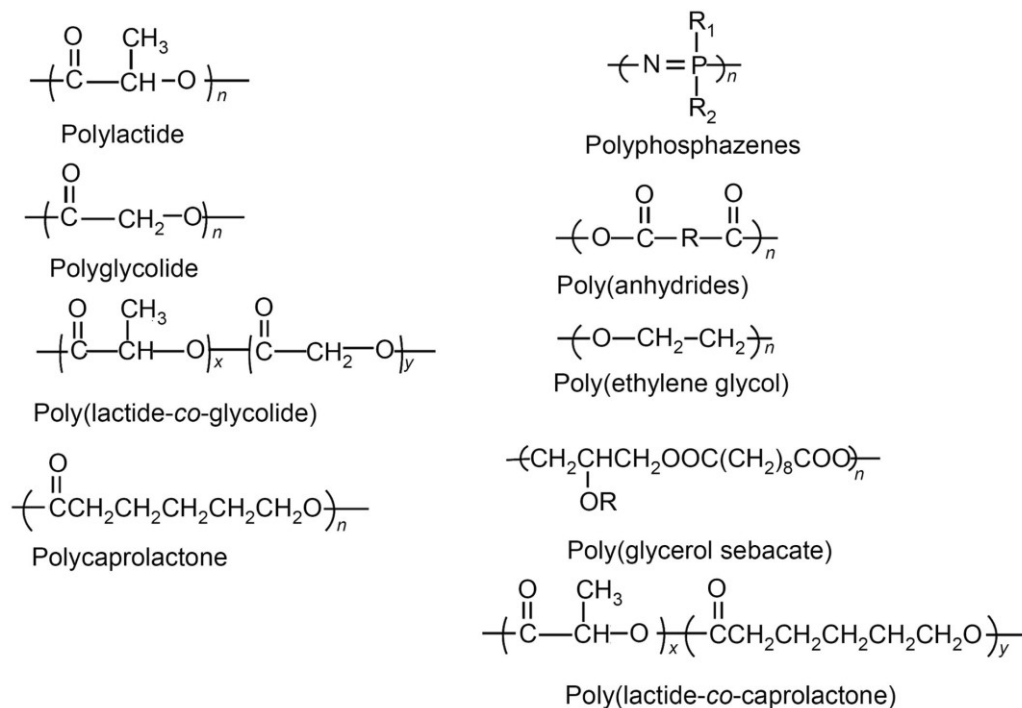


Figura 1. Esempi di copolimeri biocompatibili e biodegradabili [Baolin 2014]

In un articolo recente sono state riportate tutte le caratteristiche del PGS [Jaafar 2021]. Il PGS viene sintetizzato attraverso la policondensazione di glicerolo e acido sebacico (figura 2). Nell'articolo citato viene detto che il materiale possiede proprietà meccaniche simili a quelle dei tessuti molli del corpo e che sono modulabili alterando la temperatura di polimerizzazione, il tempo di polimerizzazione e il rapporto molare di acido sebacico e glicerolo. Ad esempio, il modulo di Young per i tessuti viventi come i muscoli è 0,01–0,5 MPa e 0,7–16 MPa per la pelle. Un aumento della temperatura di polimerizzazione nella preparazione del PGS è correlato a una maggiore quantità di reticolazione, che implica un modulo elastico maggiore. Il PGS forma una rete tridimensionale reticolata in maniera non regolare (random coils) con gruppi idrossilici attaccati alla sua struttura portante. Si ritiene che i legami idrogeno tra i gruppi idrossilici influenzino le proprietà meccaniche e la biodegradabilità del PGS.

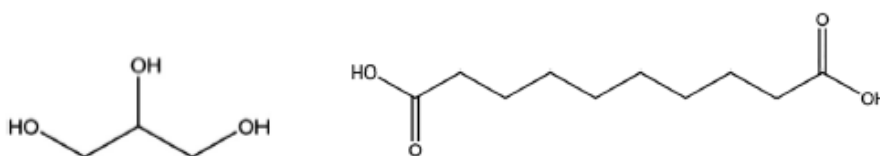


Figura 2. Struttura molecolare del glicerolo (a sinistra) e dell'acido sebacico (a destra) [Jaafar 2021]

Scegliendo rapporti molari specifici, in cui il glicerolo supera per quantità l'acido sebacico, sulla superficie del PGS possono rimanere gruppi idrossilici non reagiti [Jaafar 2021]. Ciò favorisce la natura idrofila della

superficie, che può facilitare l'attaccamento cellulare. L'uso del glicerolo dà come risultato anche un polimero con molte ramificazioni, facilitato pertanto nella reticolazione. In genere il PGS è formato dalla reazione di policondensazione di quantità equimolari di glicerolo e acido sebacico, un derivato dell'olio di ricino. L'unità costitutiva è rappresentata in figura 3. In condizioni equimolari dei due componenti si forma un piccolo numero di reticoli. Pertanto, data una certa composizione della miscela di glicerolo e acido sebacico, l'elasticità del polimero risultante dipende dalla temperatura e dal tempo di polimerizzazione. Inoltre, dopo che il polimero viene sottoposto ad un ulteriore riscaldamento sottovuoto per togliere l'acqua, come effetto secondario si formano ulteriori legami incrociati tra le catene polimeriche (figura 4).

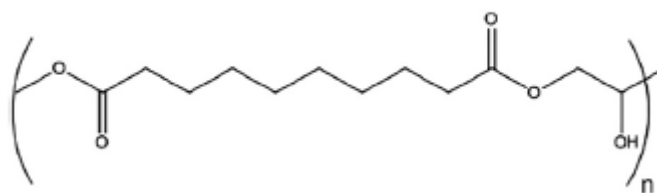


Figura 3. Unità costitutiva del PGS [Jaafar 2021]

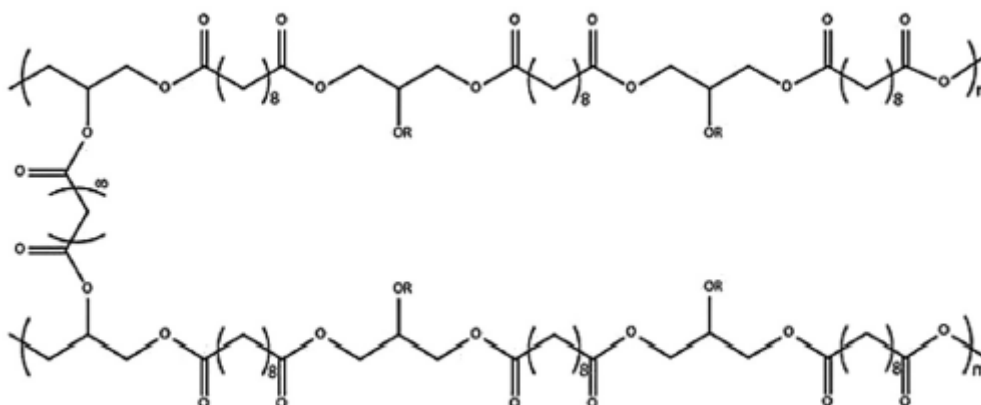


Figura 4. Reticolazioni presenti nel PGS [Jaafar 2021]

Il PGS ha proprietà meccaniche paragonabili a quelle dei comuni tessuti molli. È un elastomero biodegradabile, morbido e meccanicamente stabile, analogo alla gomma vulcanizzata. Allo stato completamente indurito è anche biocompatibile e non tossico. Il PGS si degrada principalmente per erosione superficiale, ma conservando la geometria di superficie e mantenendo la resistenza meccanica. Il PGS ha anche molti gruppi carbossilici e idrossilici all'interno delle sue catene che gli consentono di interagire con molecole bioattive attraverso la formazione di legami esterei, ammidici, eterei o acetalici. Tutto questo fornisce un ottimo substrato per la proliferazione cellulare.

#### 4. SINTESI DEL POLI(GLICEROL SEBACATO)

A seconda del grado di esterificazione (ED, esterification degree), il PGS acquisisce proprietà diverse [Gadomska-Gajadhur 2018]. L'ED può essere controllato eseguendo la sintesi in condizioni appropriate (tempo di reazione e temperatura). La sintesi del PGS viene spesso condotta in due fasi, che portano ad un polimero reticolato (elastomero). Tuttavia, a causa della sua insolubilità nei solventi organici, è difficile da trasformare in un prodotto di uso medico.

I metodi per la preparazione del PGS si basano sulla policondensazione in massa sotto un gas inerte. L'acido sebacico viene sciolto nel glicerolo e quindi, molto spesso, viene riscaldato a 120-130 °C per 24-48 h per formare un prepolimero [Gadomska-Gajadhur 2018]. Questo prepolimero viene conservato a temperatura ambiente in soluzione di tetraidrofurano (THF), acetone o metanolo. Senza l'aggiunta di solventi, è instabile in condizioni di conservazione perché subisce una degradazione autocatalitica da parte dei monomeri non reagiti. La sintesi viene riportata in Figura 5.

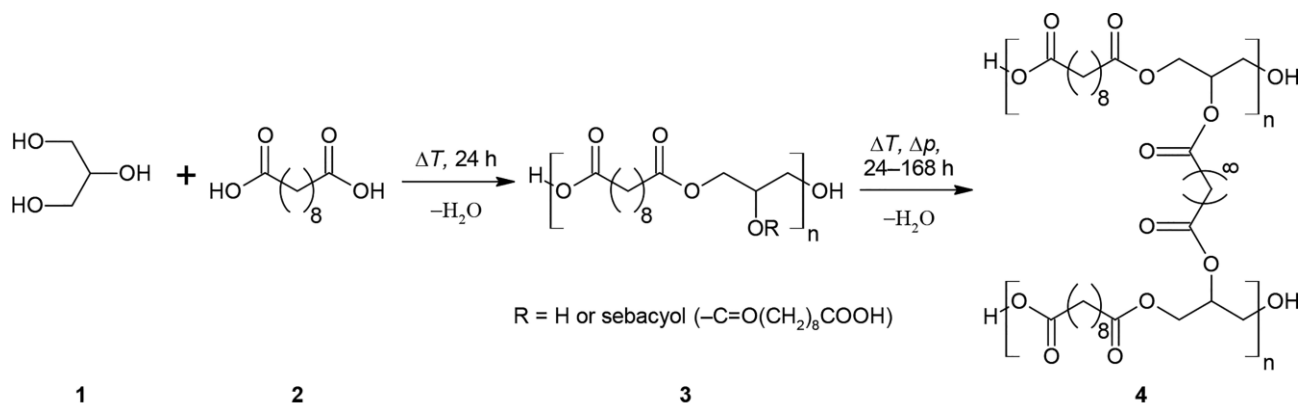


Figura 5. Schema di sintesi del poli(glicerol sebacato) [Gadomska-Gajadhur 2018]

Allo scopo di rendere il PGS un polimero adatto all'uso medicale, è necessario che il prodotto finale non contenga residui di monomero non reagito ed è pure importante che si ottenga un alto grado di conversione. È stato sviluppato un metodo per purificare il prepolimero PGS da acido sebacico e glicerolo non reagiti [Gadomska-Gajadhur 2018]. La miscela post-reazione è stata posta in diossano per 24 ore per sciogliere completamente il polimero. La soluzione è stata poi versata in acqua fredda e filtrata. Il sedimento è stato essiccato a pressione ridotta a 45°C per 24 ore. Dopo la purificazione del prepolimero, è stato calcolato il livello di esterificazione. Si è osservato che non era cambiato e che quindi il polimero non veniva idrolizzato durante la purificazione. Invece, la quantità di gruppi carbossilici era diminuita, indicando la rimozione dell'acido sebacico non reagito. Grazie alla solubilità del diossano in acqua, esso viene completamente rimosso dal polimero durante la precipitazione. Infatti, una gascromatografia del prodotto dopo la purificazione non ha mostrato diossano residuo nel polimero. Pertanto, il prodotto può essere utilizzato come biomateriale. Tutto lo schema è rappresentato in figura 6. Questa sintesi permette di avere un prodotto

puro, ma a causa della sua scarsa resistenza meccanica il PGS non può essere utilizzato direttamente come scaffold ed essendo un polimero termoindurente non è possibile lavorare ad alta temperatura. Nella prossima sezione verranno discussi i metodi di produzione.

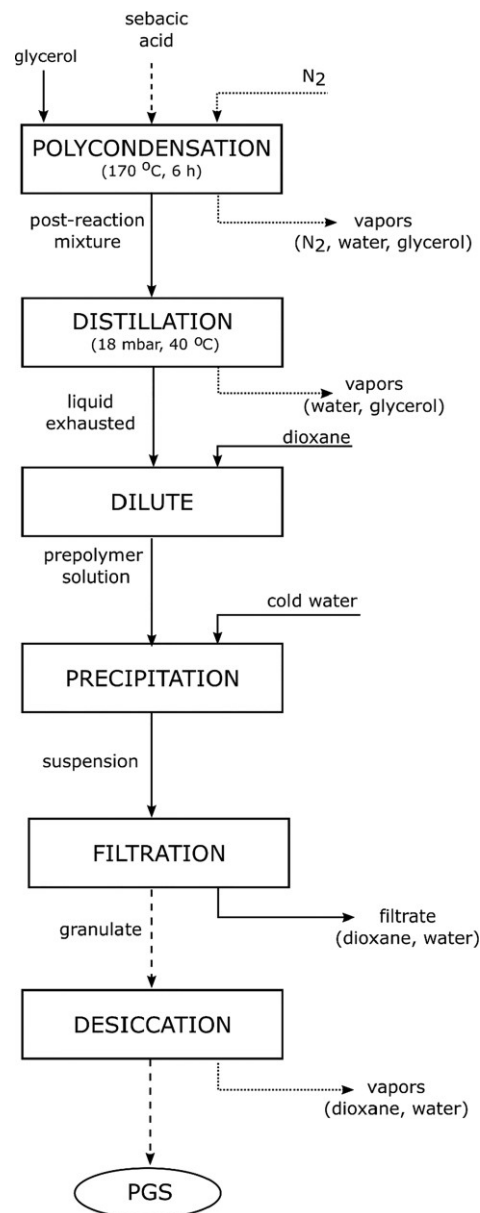


Figura 6. Schema di purificazione del PGS [Gadomska-Gajadur 2018]

## 5. TECNICHE FABBRICAZIONE DI SCAFFOLD DI POLI(GLICEROL SEBACATO)

In questa sezione della tesi andrò a mostrare una serie di tecniche di produzione di scaffold fibrosi e porosi [Wu 2021]. Il PGS, nonostante le sue grandi capacità di adesione cellulare, purtroppo mostra un rapido tasso di degradazione ed una scarsa lavorabilità. Per risolvere queste limitazioni si può miscelare il PGS con altri polimeri. Si tratta di un metodo di modifica semplice e pratico, che permette di combinare le proprietà del PGS con quelle uniche di altri polimeri. Si possono formare miscele (blend) di PGS con polimeri come il

poli(caprolattone) (PCL), l'acido polilattico (PLA), l'alcol polivinilico (PVA), la gelatina e il poli(ossido di etilene) (PEO) meglio conosciuto come polietilenglicole (PEG).

Per costruire un ambiente desiderabile che incoraggi l'adesione cellulare e la rigenerazione dei tessuti, è vitale per il materiale avere biodegradabilità, biocompatibilità, disponibilità alla lavorazione e proprietà meccaniche controllate. Una panoramica delle tecniche per la fabbricazione del PGS è riportata in Figura7.

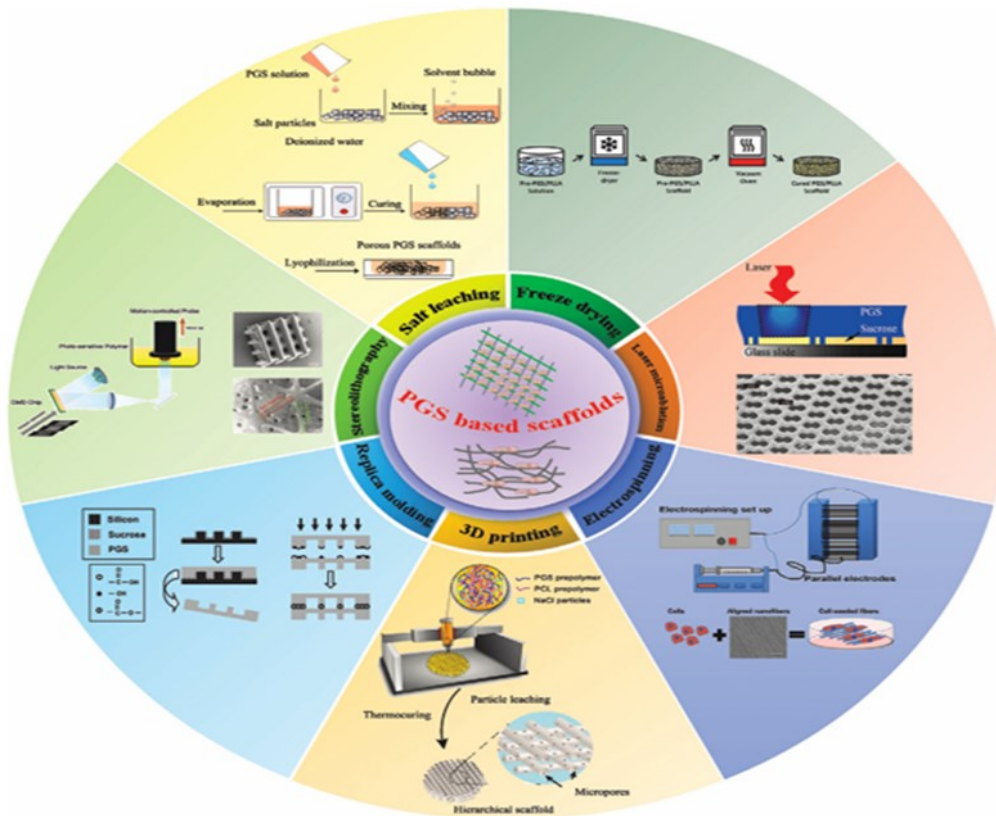


Figura 7. Panoramica delle attuali tecniche di fabbricazione per scaffold basati su PGS [Wu 2021]

Nella produzione degli scaffold si fa distinzione tra due tipi di scaffold: porosi e fibrosi. Gli scaffold porosi hanno una superficie ottima per l'adesione cellulare ma sono troppo rigidi; quindi, non possiedono una ampia gamma di applicazioni. I metodi per produrli sono mediante lisciviazione a sale, liofilizzazione, microablazione laser e stampa 3D. Per questa tesi mi limiterò a parlare dell'elettrospinning come tecnica in quanto solo questa tecnica permette di produrre scaffold fibrosi.

## 5.1 ELETTROFILATURA O ELETTROSPINNING

Gli scaffold fibrosi sono preferiti perché hanno una struttura più simile all'ECM ed una resistenza relativamente più elevata. Scaffold fibrosi possono essere prodotti attraverso l'autoassemblaggio, la separazione di fase e l'elettrofilatura.



L'elettrospinning è risultata la tecnica più versatile ed efficace per la fabbricazione di scaffold micro e nanofibrosi. Sono preparati da soluzioni polimeriche alle quali si applica un'elevata intensità elettrica [Wu 2021]. Gli scaffold fibrosi elettrofilati hanno una superficie elevata. L'area e la porosità sono adatti alla adesione cellulare perché supportano la diffusione dei nutrienti e lo scambio di rifiuti. Un tipico dispositivo di elettrofilatura è generalmente costituito da quattro elementi:

- un alimentatore ad alta tensione,
- una pompa a siringa,
- una filiera,
- un collettore messo a terra.

Quando l'intensità di corrente e la differenza di potenziale tra l'ago e il collettore sono sufficientemente elevati, la soluzione carica supera la sua tensione superficiale e viene espulsa verso il raccoglitore. Il solvente evapora rapidamente quando il getto fuoriesce, l'estruso viene allungato in fibre con diametri adeguati e come risultato finale si forma una membrana sul collettore. La morfologia e le proprietà delle nanofibre possono essere alterate modificando attentamente molti parametri: i parametri della soluzione (tipo di solvente, viscosità, concentrazione, conduttività, peso molecolare del polimero), parametri ambientali (temperatura e umidità) e parametri di processo (portata, tensione applicata, distanza punta-collettore). Il PGS è un polimero termoindurente, adatto all'ingegneria dei tessuti perché biocompatibile, in possesso di un ideale profilo di degradazione, con caratteristiche fisiche modificabili e una buona flessibilità. Tuttavia, nonostante caratteristiche eccezionali, l'elettrofilatura delle fibre PGS risulta piuttosto impegnativa per quattro ragioni:

- a) è necessario utilizzare dapprima un prepolimero di PGS non reticolato, a causa dell'insolubilità del PGS polimerizzato;
- b) il prepolimero tende a essere molto viscoso a temperatura ambiente, per cui è difficile modellare in modo continuo i filamenti estrusi;
- c) il peso molecolare del prepolimero è basso, per cui non si formano intrecci di catene;
- d) il processo di reticolazione termica porta alla fusione e collasso dei pori generando una membrana non porosa.

Per superare gli ostacoli sopra menzionati, sono state proposte tre principali tecniche di elettrofilatura:

- l'elettrofilatura miscelata;
- l'elettrofilatura coassiale;
- l'elettrofilatura senza ugelli.

L'elettro spinning di film fibrosi a base di PGS ha consentito di produrre scaffold impiegabili nell'ingegneria del tessuto cardiaco, corneale, nervoso, vascolare e delle corde vocali. Ma questo tipo di PGS è stato impiegato anche per sostituire la pelle, valvole cardiache, tendini e legamenti (figura 8).

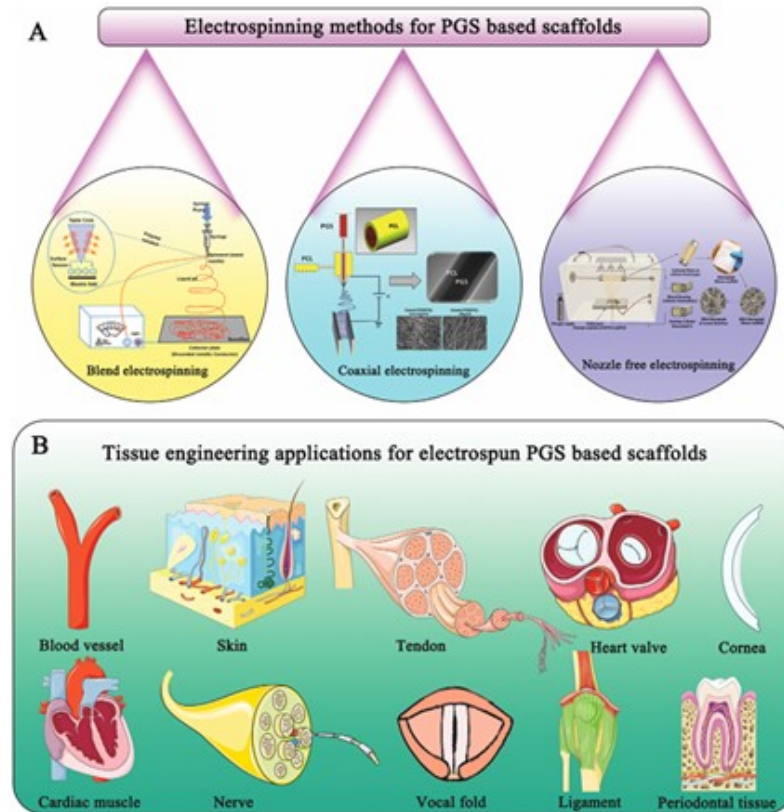


Figura 8. Rappresentazioni di metodi di elettrofilatura e delle applicazioni all'ingegneria tissutale [Wu 2021]

## 5.2 ELETTROFILATURA MISCELATA

L'elettrofilatura del PGS tipicamente comporta la miscelazione di prepolimeri di PGS e altre soluzioni polimeriche filabili insieme attraverso il tradizionale apparato di elettrofilatura. Durante il processo di elettrofilatura, gli altri polimeri miscelati aiutano nella produzione di fibre con migliore filabilità rispetto al PGS. È stata utilizzata una vasta gamma di materiali per miscelarli con il PGS, ottenendo così nuove proprietà adatte a più applicazioni. Questi i materiali includono polimeri naturali o sintetici, organici o inorganici come PCL (poli caprolattone), PLLA (acido polilattico), PVA (poli vinilacetato), PANI (polianilina), PP (poli propilene), TPU (poliuretano termoplastico), poli(butilene succinato-succinato dilinoleico) (PBS-DLS), gelatina, chitosano, zeina, nanotubi di carbonio e anche particelle di vetro bioattivo.

## 5.3 ELETTROFILATURA COASSIALE

L'elettrofilatura coassiale è considerata una potente tecnica per produrre fibre composte da due soluzioni polimeriche immiscibili una interna ed una esterna. Si ottengono fibre coassiali attraverso due aghi allineati concentricamente. Le fibre coassiali elettrofilate sono estremamente utili in molte applicazioni. Ad esempio, si possono utilizzare per somministrare farmaci poiché la struttura interna si può modificare e si possono

migliorare la biocompatibilità e le proprietà meccaniche. L'elettrofilatura coassiale potrebbe consentire anche l'elettrofilatura di polimeri non elettrofilabili inserendoli all'interno di un altro polimero che costituisce la parte esterna della fibra coassiale. Tali fibre possono anche essere sfruttate per modulare proprietà e funzioni sia in direzione radiale sia assiale. Nella parte interna è inoltre possibile inserire sostanze che rimangono protette, ma vengono rilasciate nel luogo e nel momento opportuni. Per la progettazione di dispositivi con configurazione complessa, non è facile controllare bene la tensione interfacciale di liquidi esterni ed interni per formare un getto coassiale. I polimeri maggiormente usati con il PGS sono il PEO e il PCL, che uniti al PGS formano la fibra interna, e la KGN (Kartogenina o gelatina) che costituisce la parte esterna.

#### **5.4 ELETTRO FILATURA SENZA UGELLI**

Una normale elettrofilatura senza ugelli consiste in un elettrodo a cilindro rotante motorizzato, parzialmente immerso nella soluzione miscelata. Rispetto ai convenzionali apparecchi, garantisce una maggiore produttività e continuità di elettrofilatura e permette di produrre getti multipli e nanofibre dal tamburo rotante. Uno scaffold fibroso prodotto con questa tecnica, composto da polivinilpirrolidone e poli(glicerol sebacato) PVP/PGS, è stato usato per la rigenerazione della pelle. Dopo aver ottenuto delle membrane fibrose, è stata utilizzata l'irradiazione UV per guidare la polimerizzazione mentre avveniva la elettrofilatura. Un altro scaffold prodotto con questa tecnica contiene PCL, PGS e fibroina della seta (SF) come elastomero biocompatibile con bagnabilità regolabile. Si sono riscontrati un'adesione cellulare ed una crescita soddisfacenti dei fibroblasti dermici umani. Pertanto, lo scaffold PCL/PGS/SF è consigliabile per la ricostruzione del tessuto cutaneo.

#### **6. EFFETTI DELLA STERILIZZAZIONE SULLE PROPRIETÀ CHIMICHE DEL PGS**

Prima che un qualsiasi scaffold venga impiantato nel corpo, dovrà essere sterilizzato. Per sterilizzazione si intende qualunque processo che, come fine ultimo, abbassi la carica batterica sulla superficie dello scaffold, così da non avere il rischio di infezione o rigetto dopo l'impianto e necrosi del tessuto. Sono stati sterilizzati tre film di PGS in tre modi diversi [Raia 2013]. Un film è stato sterilizzato con radiazioni gamma per 10 ore in aria a temperatura ambiente. Un altro film è stato sterilizzato con ossido di etilene (EtO) a 45 °C per 5 ore. Un terzo film è stato sterilizzato in autoclave, riscaldando a 121 °C per 10 minuti e a 15 psi. Dopo aver sterilizzato ogni singolo film, si è controllato via spettroscopie ATR-FTIR e Raman che i gruppi bioattivi del PGS non si fossero ossidati durante i diversi processi di sterilizzazione. Gli spettri sono riportati in figura 9.

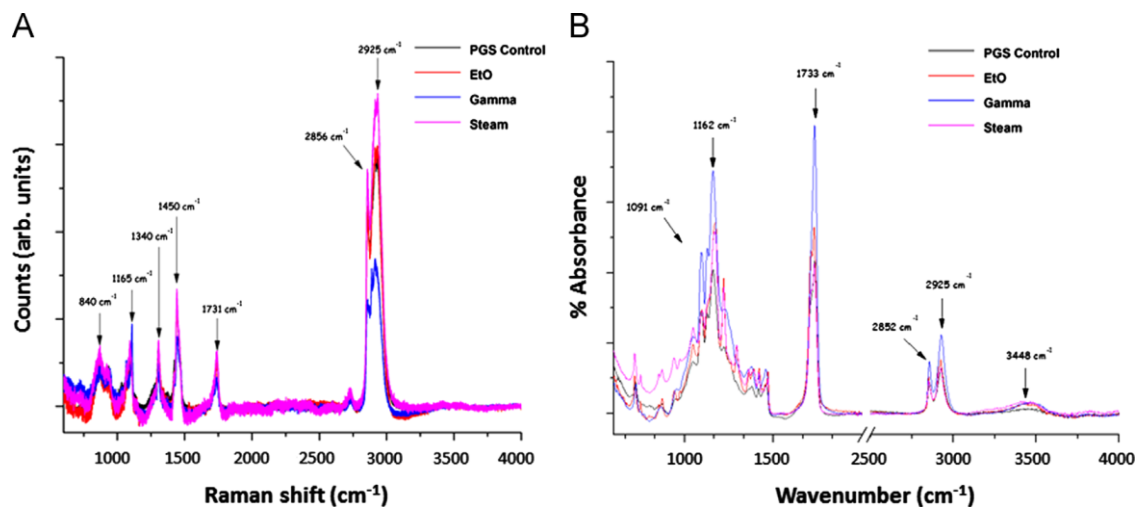


Figura 9. Spettro Raman del PGS nei 3 modi di sterilizzazione (A). Spettro ATR-FTIR del PGS nei 3 modi di sterilizzazione [Raia 2013].

Si può notare in figura 9 la presenza della banda a  $1731\text{ cm}^{-1}$ , derivante dal C–O estereo. EtO è assente nei campioni sterilizzati con esso altrimenti darebbe un assorbimento a  $1255\text{ cm}^{-1}$ . L'assenza di assorbimenti nella zona dei carbonili, fatta eccezione per la banda dell'estere a  $1731\text{ cm}^{-1}$ , suggerisce che non si sono verificati processi ossidativi all'interno del materiale durante l'esposizione alle radiazioni gamma. Anche sulla superficie dei film non ci sono state modifiche (figura 10) [Raia 2013]. Pertanto, i tre processi permettono di abbattere la carica batterica, pur mantenendo le capacità strutturali adatte all'adesione cellulare e alla diffusione dei nutrienti.

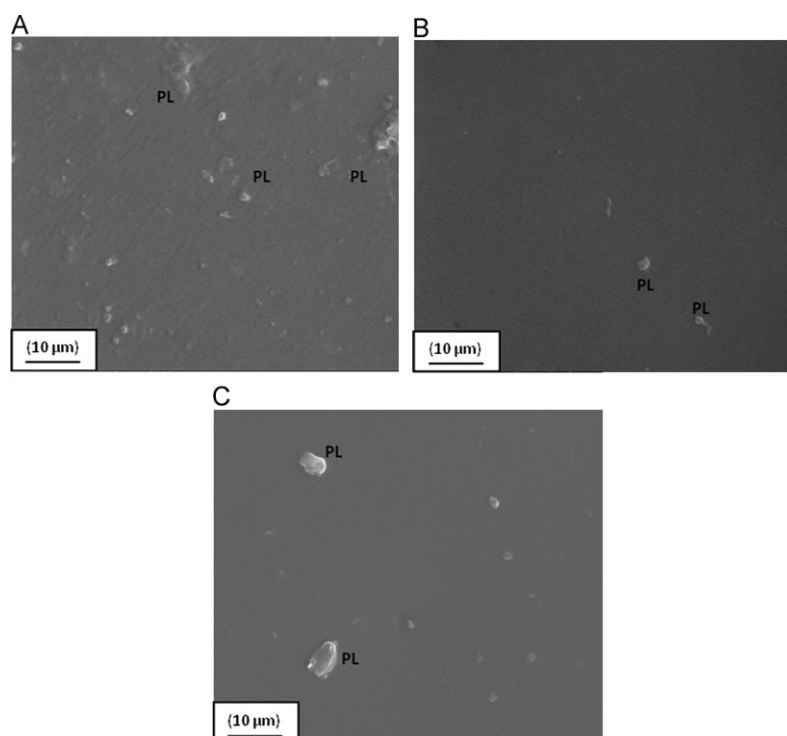


Figura 10. Immagini SEM delle superfici planari dei film PGS: (A) film di controllo PGS, (B) irradiato  $\gamma$  e (C) trattato con ossido di etilene [Raia 2013].

## 7. APPLICAZIONE DEL PGS

Per il PGS ci sono molteplici applicazioni in ambito biomedico, che variano a seconda del modo di produzione, compresenza di altre molecole e altri fattori. In questa sezione andrò a mostrare come il PGS può supportare la crescita di tessuti viventi. Le tre tipologie di tessuto che andrò a mostrare sono il tessuto cardiaco, nervoso e osseo

### 7.1 TESSUTO CARDIACO

L'organo detentore del tessuto cardiaco all'interno del corpo umano è il cuore. Esso può subire diversi danni, che possono essere congeniti o acquisiti. È un organo fondamentale per la nostra sopravvivenza. La principale funzione del cuore è quella di pompare il sangue. Il pompaggio si divide in due fasi: una diastolica (dove gli atri si aprono e fanno entrare il sangue nei ventricoli) ed una seconda sistolica (dove i ventricoli si contraggono e mandano il sangue nel sistema portale). Il PGS potrebbe essere applicato come materiale per cerotti cardiaci, al livello del miocardio (figura 11) [Chen 2008]. Idealmente, la cedevolezza (definita come  $1/E$ , dove  $E$  è la rigidità) del materiale dello scaffold dovrebbe essere quella del collagene, matrice del muscolo cardiaco. La figura 12 riporta le più importanti proprietà meccaniche (rigidezza e resistenza alla trazione). Ne emerge che la rigidità dell'attuale PGS può adattarsi alla rigidità del muscolo cardiaco all'inizio della diastole (la rigidità è 10–20 kPa) e alla fine della diastole (200–500 kPa).

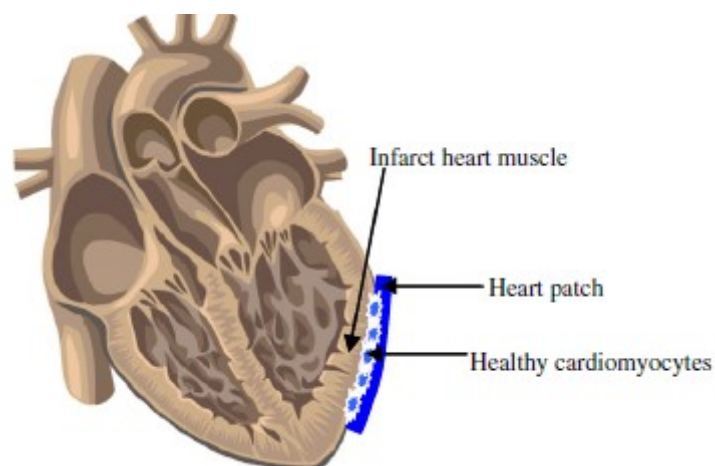


Figura 11. Possibile posizione del cerotto a livello di miocardio [Chen 2008].

| Polymer   | Elastomer (E) or Thermoplastic (T) | Young's modulus (or stiffness) | Tensile strength | Degradation (Month) | Refs.                   |
|---|------------------------------------|--------------------------------|------------------|---------------------|-------------------------|
| PGA   | T                                  | 7–10 GPa                       | 70 MPa           | 2–12                | [42,43]                 |
| PLLA or PDLLA                                   | T                                  | 1–4 GPa                        | 30–80 MPa        | 2–12                | [42]                    |
| PHB   | E                                  | 2–3 GPa                        | 36 MPa           | Degradable          | [44]                    |
| PPD (also called PDS)                           | E                                  | 0.6 GPa                        | 12 MPa           | 6                   | [43,45]                 |
| TMC   | E                                  | 6 MPa                          | 12 MPa           | Degradable          | [46]                    |
| TMC-PDLLA (50:50)                               | E                                  | 16 MPa                         | 10 MPa           | Degradable          | [46]                    |
| POC   | T                                  | 1–16 MPa                       | 6.7 MPa          | Degradable          | [43,47]                 |
| PGS   | E                                  | 0.04–1.2 MPa                   | 0.2–0.5 MPa      | Degradable          | [25,43,48] Present work |
| Collagen fibre (Tendon/cartilage/ligament/bone) | E                                  | 2–46 MPa                       | 1–7 MPa          | Degradable          | [43,49,50]              |
| Collagen gel (calf skin)                        | E                                  | 0.002–0.022 MPa                | 1–9 kPa          | Degradable          | [51]                    |
| Myocardium of rat                               | E                                  | 0.001–0.14 MPa                 | 30–70 kPa        | NA                  | [52–54]                 |
| Myocardium of human                             | E                                  | 0.02–0.5 MPa                   | 3–15 kPa         | NA                  | [32,55,56]              |

Figura 12. Valori di confronto della rigidità tra tessuto cardiaco e PGS [Chen 2008].

Un altro studio si è occupato del PGS come scaffold per la crescita di tessuto cardiaco [Vogta 2019]. Sono state prodotte membrane in fibra omogenea e prive di difetti, costituite da miscele di PCL, PGS<sub>P</sub> (PGS policondensato) e PGS<sub>MXL</sub> (PGS con reticolazioni) che sono stati elettrofilati utilizzando acido acetico come solvente. L'acido acetico non ha influenzato la capacità di formare fibre prive di difetti e uniformi con diametri di  $\approx 1,3 \mu\text{m}$ . Le analisi FTIR non hanno mostrato segni di acido acetico residuo nella fibra e si è vista una lieve reticolazione del PGS (figura 13). Le proprietà meccaniche sono migliori rispetto al miocardio umano. Inoltre, le fibre PCL pure non sono quasi interessate dal processo di degradazione, mentre entrambe le miscele, PCL/PGS<sub>P</sub> e PCL/PGS<sub>MXL</sub>, hanno subito un degrado superficiale già dopo 1 giorno. La natura acida del mezzo di degradazione di PCL/PGS<sub>MXL</sub> mostra condizioni più adeguate per la sopravvivenza cellulare.

In un altro studio sono state fabbricate bende di copolimero PGS-zeina. Il copolimero prodotto mostrava macro e micropori con ottime funzionalità per l'adesione e proliferazione cellulare [Ruther 2022]. Nello stesso studio sono riportate due sintesi (figura 14). Entrambe le formulazioni hanno dato sufficiente stabilità strutturale per resistere alle variazioni delle temperature. A livelli crescenti di zeina si osserva un aumento della idrofilicità e anche una maggiore stabilità alla degradazione per via idrolitica degli scaffold (fino a sei mesi). I test di resistenza hanno indicato una caratteristica anisotropa delle strutture stampate in 3D. per forza di trazione verticale in direzioni lineari e trasversali. Si può facilmente dedurre che il PGS mostra ottime applicazioni come tessuto cardiaco in quanto garantisce supporto e struttura molto simili al tessuto vivente.

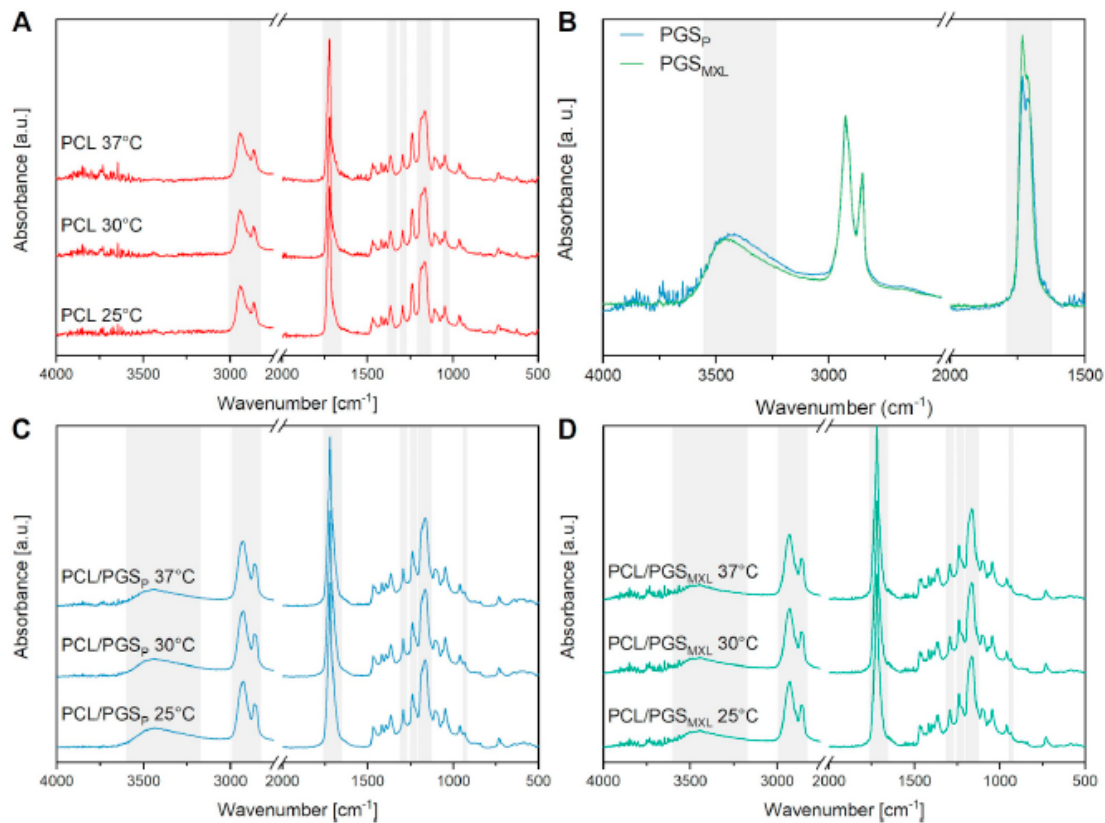


Figura 13. Spettri FTIR : confronto PCL a diverse temperature (A) confronto spettri PGS<sub>p</sub> e PGS<sub>MXL</sub> a diverse temperature (B) confronto spettri di PGS<sub>p</sub>/PCL a diverse temperature (C) confronto spettri di PGS<sub>MXL</sub>/PCL a diverse temperature (D) [Vogtal 2019].

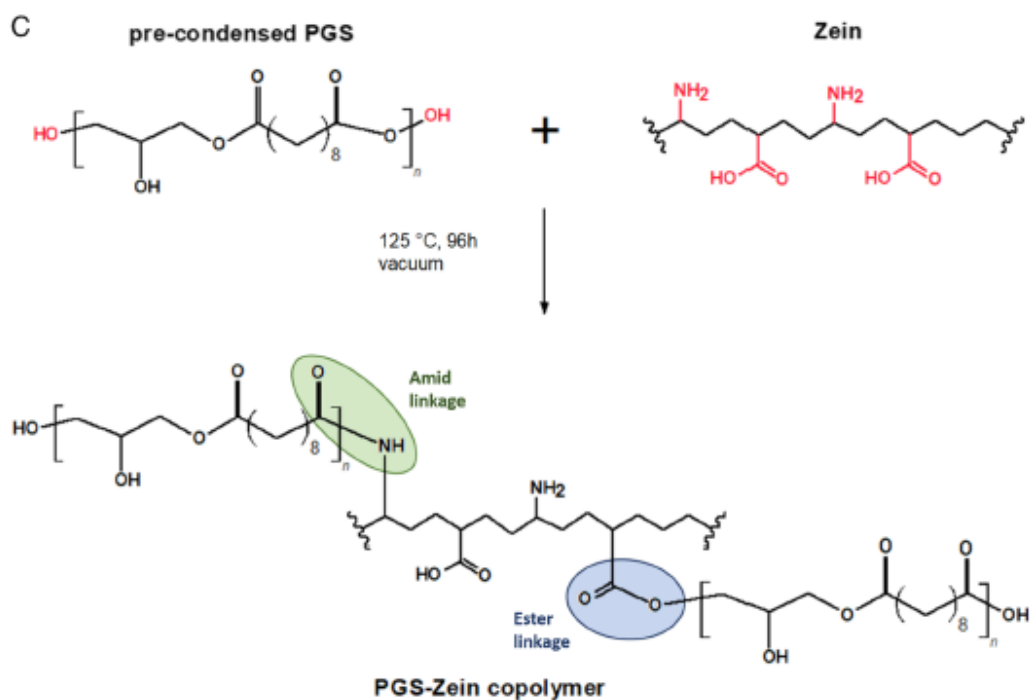


Figura 14. Copolimerizzazione PGS e Zeina [Ruther 2022].

## 7.2 TESSUTO NERVOSO

Il tessuto nervoso è uno forse dei più importanti tessuti all'interno del corpo umano. Le sue funzioni sono tra le più varie, dal tenere una penna al semplice camminare. Ci sono una serie di patologie che possono recare danno al tessuto nervoso e compromettere la qualità della vita. Tramite elettrofilatura allineata sono stati prodotti scaffold di polivinilacrilato e poli(glicerol sebacato) con diversi rapporti (40:60, 50:50 e 60:40) [Saudi 2019]. Le analisi FTIR hanno confermato che PVA e PGS vengono miscelati con successo indipendentemente dai rapporti utilizzati (figura 15). Si è inoltre riscontrato che a contatto con l'acqua, l'angolo di contatto aumenta all'aumentare del contenuto di PGS. Un aumento di PGS si traduce in una maggiore fusione delle fibre e in un aumento dell'UTS (Ultimate tensile strength) e del modulo di Young (il modulo di elasticità a trazione o compressione assiale) degli scaffold. In particolare, il modulo di Young delle miscele PVA-PGS 40:60 e 50:50 rientra nell'intervallo previsto per il tessuto nervoso. Inoltre, anche il tasso di degradazione lento e continuo mostrato da ciascun tipo di scaffold è idoneo per l'ingegneria dei tessuti neurali. PVA-PGS 40:60 e 50:50 mostrano anche una buona biocompatibilità per cui sono certamente idonei per applicazioni nella rigenerazione dei nervi.

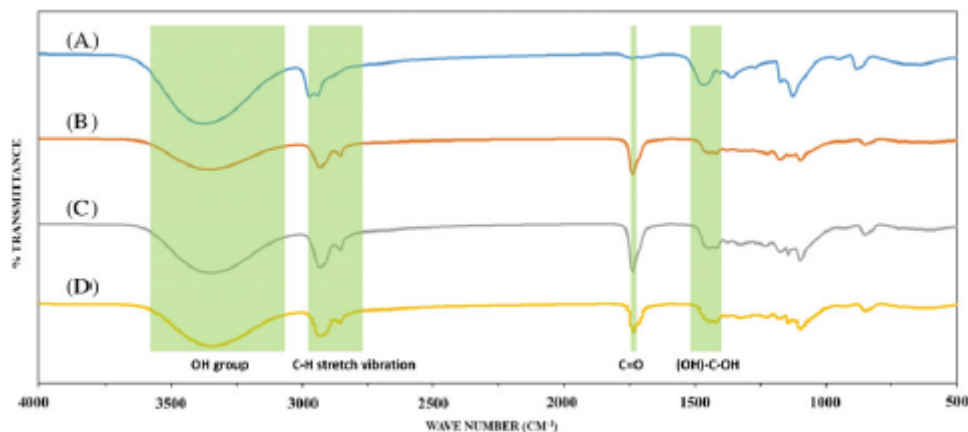


Figura 15. Spettri FTIR: PGS puro (A) e miscele PVA/PGS 40:60 (B), 50:50 (C) e 60:40 (D)

Copolimeri a base di PGS sono stati sintetizzati anche tramite ATRP (Atom transfer radical polymerization) [Hu 2017]. I nuovi copolimeri PGS-PMMA (PMMA = polimetilmetacrilato) hanno pesi molecolari modificabili, ottime proprietà termiche ed eccellente elettrofilabilità. Si sono prodotte nanofibre elettrofilate uniformi miscelando polimeri puri per dare, PGS-PMMA e PGS-PMMA/gelatina. Le nano fibre PGS-PMMA/gelatina hanno mostrato una buona biocompatibilità con cellule PC12 e un grande potenziale per l'ingegneria tissutale del sistema nervoso [Hu 2017]. Tali polimeri integrerebbero l'eccellente proprietà meccaniche del PGS, ma fornirebbero anche altre interessanti proprietà come l'autoriparazione, la memoria della forma o la sensibilità agli stimoli.



Sono stati fabbricati con successo anche film nanocompositi, composti da PGS, PCL e nanografene (nano Gr) utilizzando il metodo di colata con solvente [Ghafaralahi 2018]. L'incorporazione del grafene ha permesso anche di esaminare le proprietà elettriche, ma si sono pure valutati l'attaccamento e la sopravvivenza delle cellule PC12, poiché il PCL è un biomateriale idrofobo e la quantità di adesione cellulare sui substrati è bassa. L'aggiunta di PGS, idrofilo, migliora le proprietà biologiche dei film, ma fa diminuire le proprietà meccaniche. Pertanto, si è compensato con l'aggiunta di grafene. I risultati hanno mostrato che l'addizione di grafene non solo non ha causato alcun effetto negativo sulle proprietà biologiche, ma ha anche favorito notevolmente l'adesione e la proliferazione cellulare grazie alla sua conduttività elettrica e alle proprietà meccaniche superiori [Ghafaralahi 2018]. I livelli più elevati di adesione e sopravvivenza delle cellule PC12 sono stati ottenuti per i film con la formulazione di 50% (p/p) PGS, 50% (p/p) PCL e 1% (p/p) di Gr, grazie all'effetto sinergico delle caratteristiche di PGS e Gr.

### 7.3 TESSUTO OSSEO

Il tessuto osseo ha come funzione principali il sostegno e la protezione del corpo. Anch'esso può essere danneggiato e solo parti in cui sono presenti cartilagini possono essere rigenerate. Ma all'avanzare dell'età la capacità di rigenerazione si riduce e le ossa diventano più fragili. Il PGS ha dimostrato di avere proprietà osteoconduttive, favorendo la differenziazione proliferativa e osteogenica delle cellule osteo-precursori (MC3T3-E1) [Zaky 2014]. È stato dimostrato che le cellule si attaccavano e proliferavano sul PGS. Il tasso di proliferazione più lento rilevato potrebbe essere attribuito alla più lenta differenziazione piuttosto che alla morte cellulare. Studiando l'espressione di marcatori osteogenici all'interno del PGS durante un periodo di coltura di quattro settimane, si è notata la presenza di marker osteogenici come Runx2 (Fattore di trascrizione correlato a Runt 2), BSP (sialoproteina ossea) e OC (Osteocalcina). Si è riscontrato che la deposizione e l'aumento della quantità di collagene all'interno dello scaffold determina un rilassamento del materiale che diventa più deformabile, indipendentemente dalla densità delle cellule seminate [Zaky 2014]. Ciò suggerirebbe che lo scaffold viene rapidamente sostituito da nuova matrice cartilaginea. Le proprietà meccaniche del PGS sono basse rispetto all'osso nativo. Pertanto, non sembra esso sia l'ambiente corretto per i pre-osteoblasti

Si sono anche prodotti scaffold porosi a base di PGS/PCL, in quanto il solo PGS non genera uno scaffold sufficientemente stabile meccanicamente [Liu 2019]. Il PGS mantiene la biocompatibilità e la biodegradabilità mentre il PCL prolunga il tempo di degradazione e aumentare la rigidità. Questi scaffold PGS/PCL si sono rivelati eccezionali in ambito di citocompatibilità in vitro sia con BMSC (cellule staminali mesenchimali di midollo) che con ACC (condrociti articolari) (figura 16). Le BMSC sono state sottoposte con successo alla condrogenesi in scaffold PGS/PCL e sono diventate condrogeniche simili per attività alle ACC.

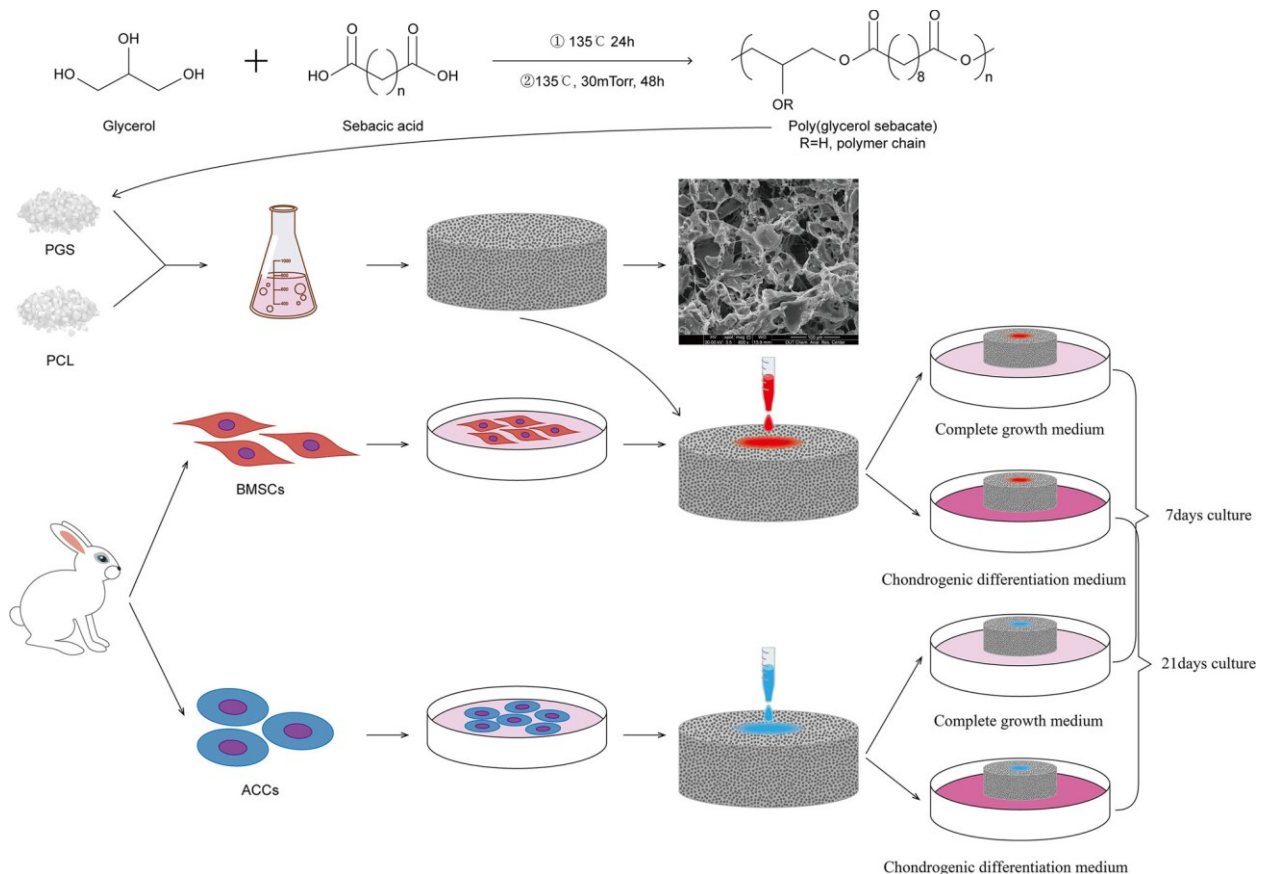


Figura 16. Scaffold PGS/PCL stati seminati con BMSC e ACC per la coltura in vitro. [Liu 2019].

Si sono prodotti anche scaffold di PGS/nanosilicati [Kerativitayanan 2017]. L'aggiunta di nanosilicati ha dato origine a maggiore forza meccanica e tenacità, mentre si è ridotta l'elasticità. Le proprietà meccaniche raggiunte sembrano promettenti per il trattamento di ricostruzione dei difetti craniofacciali. Lo scaffold prodotto supporta infatti la proliferazione, adesione e diffusione dei preosteoblasti. Gli scaffold PGS/nanosilicati potrebbero promuovere la differenziazione osteogenica senza alcun supplemento osteogenico. Inoltre, essi sono biocompatibili, biodegradabili e non inducono infiammazione cronica in vivo (figura 17).

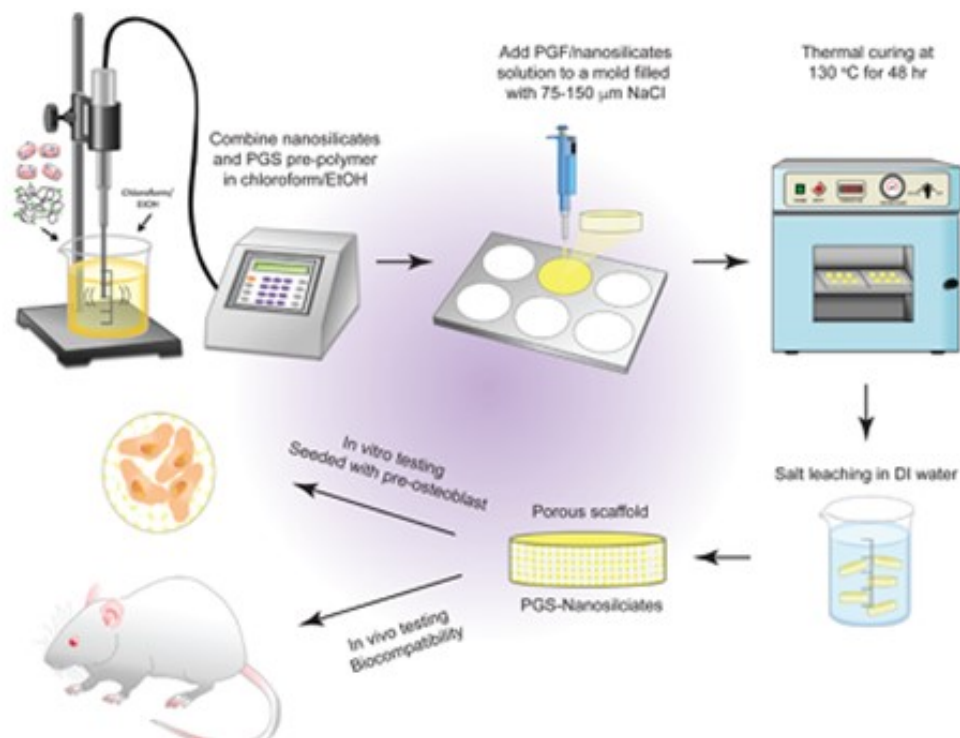


Figura 17. Realizzazione di scaffold in nanocompositi porosi PGS/nanosilicati per test in vivo [Kerativitayanan 2017].

Per concludere, per applicazioni nel tessuto osseo il PGS presenta qualche punto debole in quanto la sua fragilità necessita di un supporto fisico maggiore. Tuttavia, sulla sua superficie esso promuove una proliferazione e un'adesione cellulare eccellenti.

## 8. CONCLUSIONI

In questa tesi ho analizzato la struttura e le funzionalità del poli(glicerol sebacato) (PSG) il quale ha dimostrato di avere buone proprietà meccaniche ed elastiche. Le sue qualità come biopolimero fanno di esso un ottimo biomateriale nella produzione di scaffold. Inoltre, la possibilità di biodegradarsi mantenendo la struttura 3D lo rendono un candidato ideale. Ho riportato e analizzato diverse tecniche nella produzione di scaffold di PGS in base alle sue applicazioni. Il PGS mostra dei limiti relativamente a sintesi, produzione e fabbricazione, che possono tuttavia essere superati miscelando il PGS con altri polimeri. Se sottoposto a sterilizzazione il PGS mantiene la struttura fisica e non vengono modificati i legami idrossilici utili per l'adesione delle cellule. Tale caratteristica, infatti, è necessaria per poter effettuare studi in vivo e vitro. Ho riportato anche diverse applicazioni del PGS come supporto di organi e apparati umani dove viene usato come sostituto o terreno di crescita del tessuto. Ci vorranno ulteriori studi in vivo affinché il PGS venga effettivamente usato come biomateriale nell'industria biomedicale.

**BIBLIOGRAFIA**

- BaoLin G., MA P. X. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Sci. China Chem.*, 57, 490–500 (2014).
- Chen Q. Z., Bismarck A., Hansen U., Junaid S., Tran M.Q., Harding S. E., Ali N.N., Boccaccini A. R.: Characterisation of a soft elastomer poly(glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue. *Biomaterials*, 29, 47–57 (2008).
- Gadomska-Gajadur A. , Wrzecionek M., Matyszczyk G., Piętowski P., Więclaw M., Ruskowski P. : Optimization of Poly(glycerol sebacate) Synthesis for Biomedical Purposes with the Design of Experiments . *Org. Process Res. Dev.*, 22, 1793–180 (2018).
- Ghafaralahi S., Ebrahimian-Hosseiniabadi M., Kharazi A. Z. Poly(glycerolsebacate)/poly(caprolactone)/graphene nanocomposites for nerve tissue engineering. *J. Bioact. Compat. Pol.*, 33, 529–542 (2018).
- Hu J., Kai D., Ye H., Tian L., Ding X., Ramakrishna S., Loh J. X. Electrospinning of poly(glycerol sebacate)-based nanofibers for nerve tissue engineering. *Mater. Sci. Eng., C* 70, 1089–1094 (2017).
- Jaafar I. H., Jedlicka S. S., Coulter J. P.: Poly(glycerol sebacate) – a revolutionary biopolymer. In: *Biopolymers and Composites: Processing and Characterization*, Madbouly S. A. e Zhang C. editors, De Gruyter pp. 353-374 (2021)
- Kerativitayanan P., Tatullo M., Khariton M., Joshi P., Perniconi.B., Gaharwar K. A. Nanoengineered Osteoinductive and Elastomeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 3, 590–600 (2017).
- Liu Y., Tian K., Hao J., Yang T., Geng X., Zhang W. Biomimetic poly(glycerol sebacate)/polycaprolactone blend scaffolds for cartilage tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 30:53 (2019).
- Raia R., Tallawia M., Roetherb J.A., Detscha R., Barbani N., Rosellini E., Kaschtab J., Schubert D. W., Boccaccinia A. R. Sterilization effects on the physical properties and cytotoxicity of poly (glycerol sebacate). *Mater. Lett.*, 105, 32–35 (2013).
- Ruther F., Roether J.A., Boccaccini A. R. 3D Printing of Mechanically Resistant Poly (Glycerol Sebacate) (PGS)-Zein Scaffolds for Potential Cardiac Tissue Engineering Applications, *Adv. Eng. Mater.*, 24, 2101768 (2022).
- Saudi. A, Rafienia. M, Kharazi. Z. A., Salehi H., Zarrabi A., Karevan. M. Design and fabrication of poly (glycerol sebacate)-based fibers for neural tissue engineering: Synthesis, electrospinning, and characterization. *Polym. Adv. Technol.* 30, 1427–1440 (2019).
- Vogt L., Rivera L. R., Liverani L., Piegat A., El Fray M., Boccaccini A. R. Poly( $\epsilon$ -caprolactone)/poly(glycerol sebacate) electrospun scaffolds for cardiac tissue engineering using benign solvents. *Mater. Sci. Eng., C* 103, 109712 (2019).
- Wu Z., Jin K., Wang L., Fan Y. A Review: Optimization for Poly(glycerolsebacate) and Fabrication Techniques for Its Centered Scaffolds. *Macromol. Biosci.*, 21, art 2100022 (2021).
- Zaky H. S. Poly (glycerol sebacate) elastomer supports osteogenic phenotype for bone engineering applications. *Biomed. Mater.* 9, 025003 (2014).