



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Scuola di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Corso di Laurea Magistrale in Chimica Industriale

Tesi di Laurea Magistrale

Sintesi ed applicazione di PCL a stella nella preparazione di
sistemi da applicare in campo biomedicale

Relatore

Prof.ssa Orietta Monticelli

Correlatore

Prof. Dario Cavallo

Secondo Correlatore

Prof.ssa Cinzia Tavani

Candidato

Martina Cozzani

Anno Accademico 2021/2022

A mamma e papà.

Sommario

1. SCOPO DEL LAVORO	1
2. INTRODUZIONE	3
2.1 Poli(ϵ -caprolattone) (PCL)	3
2.1.1 Sintesi ed applicazioni del PCL.....	5
2.1.1.1 Film porosi a base di PCL	10
2.1.1.2 Film elettrofilati a base di PCL.....	11
2.1.2 PCL con geometria <i>star-shaped</i>	13
2.1.2.1 Sintesi ed applicazioni di PCL a stella.....	14
2.2 Formulazioni a base di PCL	17
2.2.1 Formulazioni a base di PCL e poli(N-isopropilacrilammide) (PNIPAAm)	19
2.3 Applicazione di polimerizzazione frontale nella sintesi di sistemi a base di PNIPAAm	21
3. MATERIALI E METODI	24
3.1 Materiali.....	24
3.2 Preparazione PCL-COOH	24
3.3 Preparazione TETDPPS.....	27
3.4 Preparazione idrogeli a base PNIPAAm	27
3.5 Preparazione membrane a base PLA/PCL.....	28
3.6 Prove di adsorbimento e rilascio di colorante	28
3.7 Preparazione membrane elettrofilate a base PCL/PGS.....	29
3.8 Analisi comparativa di saggi colorimetrici per la quantificazione di lisozima da membrane elettrofilate a base PCL/PGS.....	31
3.9 Tecniche di caratterizzazione	32
3.9.1 Spettroscopia $^1\text{H-NMR}$	32
3.9.2 Spettroscopia IR.....	32
3.9.3 Calorimetria a scansione differenziale (DSC).....	33
3.9.4 Analisi termogravimetrica (TGA).....	33
3.9.5 Misure di <i>swelling ratio</i>	34
3.9.6 Spettroscopia UV-VIS.....	34
3.9.7 Analisi morfologica FE-SEM	35
3.9.8 Prove meccaniche in compressione	36
3.9.9 Prove di citotossicità.....	36
3.9.10 Prove di degradazione a diverso pH e <i>fluid uptake</i>	37
3.9.11 Prove meccaniche per membrane elettrofilate a base PCL/PGS	38

4. RISULTATI E DISCUSSIONE	39
4.1 Studio delle condizioni ottimali per la polimerizzazione frontale	39
4.1.1 Studio del solvente	39
4.1.2 Studio dell'iniziatore.....	40
4.1.3 Studio dei parametri caratteristici della reazione	42
4.1.4 Confronto tra campioni sintetizzati tramite polimerizzazione frontale e polimerizzazione in massa.....	43
4.2 Caratterizzazione FT-IR per idrogeli a base PNIPAAm	45
4.3 Analisi termiche (DSC, TGA) per idrogeli a base PNIPAAm	49
4.4 Misure di <i>swelling ratio</i> per idrogeli a base PNIPAAm.....	54
4.5 Analisi morfologica (FE-SEM) degli idrogeli a base PNIPAAm	55
4.6 Prove meccaniche in compressione per idrogeli a base PNIPAAm.....	56
4.7 Prove di adsorbimento e rilascio colorante per idrogeli a base PNIPAAm.....	57
4.8 Valutazione citotossicità di idrogeli a base PNIPAAm	63
4.9 Analisi morfologica (FE-SEM) di membrane a base PLA/PCL-COOH	65
4.10 Prove di adsorbimento di colorante per le membrane PLA/PCL-COOH	66
5. SVILUPPI FUTURI	69
5.1 Analisi morfologica (FE-SEM) di membrane elettrofilate a base PCL/PGS	69
5.2 Analisi comparativa di saggi colorimetrici per la quantificazione di lisozima da membrane elettrofilate a base PCL/PGS.....	70
5.3 Prove di degradazione a diverso pH e <i>fluid uptake</i> per membrane elettrofilate a base PCL/PGS	72
5.4 Prove meccaniche per membrane elettrofilate a base PCL/PGS	74
6. CONCLUSIONI	75
7. BIBLIOGRAFIA.....	77

1. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo progetto di tesi è stato quello di sviluppare dispositivi a base di PCL *star-shaped* applicabili in campo biomedicale. A tal fine è stato sintetizzato del poli(ϵ -caprolattone) con geometria stellare avente quattro braccia, di massa molecolare definita, recanti gruppi terminali maleici (PCL-COOH).

La prima parte del lavoro ha visto come principale obiettivo la preparazione di idrogeli termoresponsivi a base PNIPAAm, nei quali il PCL-COOH è stato impiegato come agente reticolante capace al contempo di introdurre gruppi ionizzabili. Dopo aver ricercato le condizioni ottimali per il sistema, molteplici idrogeli aventi diversa composizione sono stati realizzati applicando la tecnica della polimerizzazione frontale. Il carattere idrofobo e semicristallino del PCL comporta modifiche significative nelle proprietà e nelle prestazioni dei sistemi a base PNIPAAm. In particolare, l'introduzione nel sistema del PCL-COOH consente potenzialmente il miglioramento delle proprietà meccaniche dei geli ed una modifica del grado di *swelling*, in maniera dipendente dalla quantità di PCL aggiunta. Inoltre, è stato investigato l'effetto dell'introduzione di funzionalità carbossiliche sull'interazione con la pararosanilina cloridrato, molecola modello testata al fine di determinare l'applicabilità di questi sistemi come dispositivi impiegabili nel *drug delivery*. Successivamente, è stata studiata la citotossicità degli idrogeli allo scopo di confermarne l'applicabilità come *scaffold* per la rigenerazione tissutale.

I vantaggi relativi all'introduzione di terminali acidi al fine di realizzare materiali applicabili nel settore del *drug delivery*, sono stati ulteriormente investigati nella seconda parte del progetto. Sono stati realizzati dei film porosi a base di PLA e PCL-COOH sfruttando la tecnica *phase-inversion*. Successivamente, tramite analisi UV-VIS, è stata esaminata la capacità di interazione fra il sistema e molecole organiche in grado di mimare il comportamento di farmaci.

Infine, la terza parte del lavoro si è focalizzata sulla ricerca di un sistema innovativo in grado di fungere da *graft* vascolare. A tal proposito sono state sviluppate membrane elettrofilate a base di PCL lineare, PCL-COOH e poliglicerol sebacato (PGS), preparate presso il Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica e Ambientale (DICCA) dell'Università

degli Studi di Genova. Il sistema è stato sottoposto a caratterizzazione meccanica e ne è stata studiata la cinetica di degradazione. L'introduzione delle funzionalità acide del PCL a stella ha avuto come obiettivo un incremento nella capacità di immobilizzazione di proteine sulla superficie della membrana. Quindi, sono state effettuate prove di adsorbimento di una proteina modello, il lisozima, ed è stata analizzata l'interazione fra il sistema e la proteina.

2. INTRODUZIONE

2.1 Poli(ϵ -caprolattone) (PCL)

Il poli(ϵ -caprolattone) (PCL) è un poliestere sintetico alifatico, biodegradabile, biocompatibile e termoplastico che può essere sintetizzato tramite la reazione di *Ring Opening Polymerization* dell' ϵ -caprolattone. Il PCL è un polimero semicristallino le cui proprietà fisiche, termiche e meccaniche dipendono fortemente dalla massa molecolare e dal grado di cristallinità. Quest'ultimo diminuisce all'aumentare della massa molecolare¹ e può raggiungere valori elevati, fino all'80%². A temperatura ambiente, esso si presenta come un materiale semirigido caratterizzato da una bassa resistenza alla trazione e da un'elevatissima elongazione a rottura (> 700%)³. In *Tabella 1* sono riassunte alcune proprietà di rilievo caratteristiche del poli(ϵ -caprolattone).

Tabella 1: proprietà fisiche e meccaniche del PCL⁴.

Property	Range	Unit
Melting Temperature T_m	56-65	°C
Number average molecular weight M_n	42.5-64	kDa
Weight average molecular weight M_w	50.4-124	kDa
Tensile elastic modulus E_t	251.9-440	MPa
Yield stress σ_y	8.2-17.8	MPa
Tensile strength σ_m	10.5-27.3	MPa
Strain at yield ϵ_y	2.4-7	%
Strain at break ϵ_b	80-800	%

Le ottime proprietà reologiche e viscoelastiche, unite ad una temperatura di transizione vetrosa di -60°C ed una temperatura di fusione compresa tra 56°C e 65°C , rendono il PCL un polimero facilmente processabile. Inoltre, il PCL, essendo fortemente idrofobico, risulta solubile in molti solventi organici a temperatura ambiente, quali cloroformio, tetraclorometano, diclorometano, benzene, toluene e cicloesano⁵; presenta invece parziale solubilità in acetone, acetato di etile ed acetonitrile, mentre è insolubile in alcoli, etere di petrolio e dietil etere⁶.

Una caratteristica peculiare del PCL è la sua capacità di formare miscele con una grande quantità di polimeri, come ad esempio il chitosano, l'acido polilattico, il poli(vinilcloruro) ed i policarbonati. La preparazione di blend polimerici, in alcuni casi, consente di migliorare le proprietà dei componenti iniziali, al fine di realizzare materiali performanti e dotati di caratteristiche innovative.

Sulla base di quanto riportato in precedenza, il poli(ϵ -caprolattone) è stato approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per l'utilizzo nella produzione di diversi dispositivi medici⁷ e viene ampiamente sfruttato per le sue proprietà meccaniche e la sua lenta biodegradazione.

Il PCL è soggetto a degradazione per idrolisi in ambiente fisiologico; la degradazione procede per scissione idrolitica dei legami esterei presenti in catena. Le specie derivanti dalla degradazione di questo polimero vengono naturalmente metabolizzate attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici o eliminate per secrezione renale. Quando un dispositivo a base di PCL viene impiantato nel corpo umano, conserva invariate le proprietà meccaniche per 6 mesi e viene metabolizzato completamente in circa 2 anni⁸. Sebbene tutti i poliesteri siano, almeno teoricamente, biodegradabili per la presenza di legami esterei, solamente quelli con catene alifatiche sufficientemente corte, come il PCL, possono degradare in un intervallo di tempo adeguato al fine di essere sfruttati in campo biomedico. Tuttavia, la velocità di degradazione del PCL a causa del suo carattere idrofobo e dell'elevata cristallinità risulta essere estremamente limitata rispetto agli altri poliesteri alifatici, come ad esempio l'acido polilattico (PLA); questo comporta dei limiti nei riguardi della sua applicabilità.

2.1.1 Sintesi ed applicazioni del PCL

La sintesi del poli(ϵ -caprolattone) viene realizzata attraverso tre tecniche principali⁹, illustrate in *Figura 1*:

- Policondensazione dell'acido 6-idrossicaproico;
- *Radical ring-opening polymerization* (RROP) del 2-metilene-1,3-diossepano (MDO);
- *Ring-opening polymerization* (ROP) dell' ϵ -caprolattone.

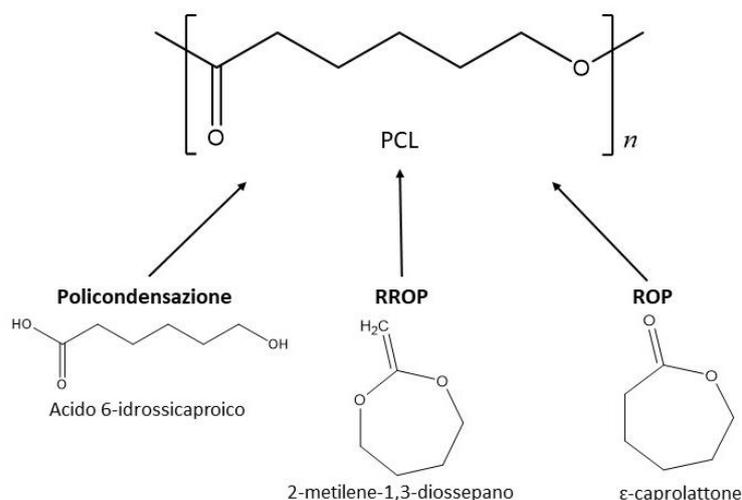


Figura 1: schema riassuntivo delle strategie di sintesi più comunemente utilizzate per la produzione di PCL.

Policondensazione

La reazione di policondensazione di acidi idrossicarbossilici viene sfruttata per la sintesi di diversi poliesteri alifatici come il PCL. Questa tecnica non richiede necessariamente l'utilizzo di un catalizzatore, tuttavia il più interessante approccio riguardante la policondensazione dell'acido 6-idrossicaproico è quello basato sulla catalisi enzimatica: ad esempio, utilizzando la lipasi ricavata dalla *Candida Antartica* e operando in condizioni di vuoto è stato possibile sintetizzare PCL di massa molecolare media pari a $9000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e polidispersità inferiore a 1.5 in due giorni¹⁰. Tuttavia, questo approccio presenta diversi svantaggi, quali gli elevati tempi di reazione, la necessità di utilizzare elevate temperature e di operare sottovuoto per poter rimuovere l'acqua generata durante la reazione di policondensazione e spostare così l'equilibrio verso i prodotti. Inoltre, tramite la policondensazione non è possibile raggiungere elevati livelli di

polimerizzazione e le macromolecole così prodotte presentano bassi valori di massa molecolare ed elevati valori di polidispersità¹¹.

Radical ring-opening polymerization

La sintesi del PCL mediante RROP del 2-metilene-1,3-diossepano è stata illustrata per la prima volta da Bailey e collaboratori nel 1982¹². Attualmente, la reazione di *radical ring-opening polymerization* non trova largo impiego nella preparazione del poli(ϵ -caprolattone), tuttavia risulta potenzialmente molto interessante poiché consente la combinazione di unità esteree e viniliche per la sintesi di diversi poli(vinil-co-esteri) biodegradabili, grazie all'utilizzo di iniziatori radicalici come perossidi organici o azobisisobutirronitrile (AIBN). Infatti, il monomero MDO è stato copolimerizzato con diversi monomeri vinilici come lo stirene, il metil metacrilato e il dimetil amminoetil metacrilato¹³.

Ring-opening polymerization

La tecnica maggiormente utilizzata per la sintesi del poli(ϵ -caprolattone) è la reazione di *ring-opening polymerization* (ROP) dell' ϵ -caprolattone. Il PCL è stato sintetizzato tramite ROP per la prima volta da Van Natta e collaboratori negli anni '30¹⁴. Il meccanismo di reazione dipende dalla tipologia di iniziatore e di catalizzatore impiegati. Di conseguenza, è possibile individuare quattro meccanismi principali: anionico, cationico, monomero-attivato e coordinazione-inserzione.

- ROP anionica: come riportato in *Figura 2*, la polimerizzazione procede tramite la formazione di specie anioniche che attaccano l'atomo di carbonio del gruppo carbonile dell' ϵ -caprolattone. Viene così indotta l'apertura dell'anello con formazione di un alcossido.

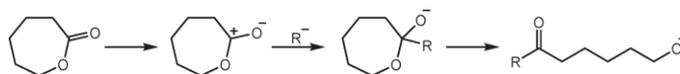


Figura 2: meccanismo dello step iniziale della ROP anionica¹⁵.

Tuttavia, seguendo questo meccanismo, la massa molecolare del polimero prodotto può subire importanti riduzioni a seguito di reazioni di

transesterificazione principalmente intramolecolari (*back-biting*), che costituiscono un processo secondario non trascurabile.

- ROP cationica: il meccanismo prevede la formazione di una specie cationica che viene attaccata dall'atomo di ossigeno del gruppo carbonile dell' ϵ -caprolattone. La specie carica positivamente così formata viene a sua volta attaccata da una seconda molecola di monomero e viene così indotta l'apertura dell'anello attraverso una reazione di sostituzione nucleofila (S_N2) sul carbonio ϵ . Una rappresentazione sintetica del meccanismo viene riportata in *Figura 3*.

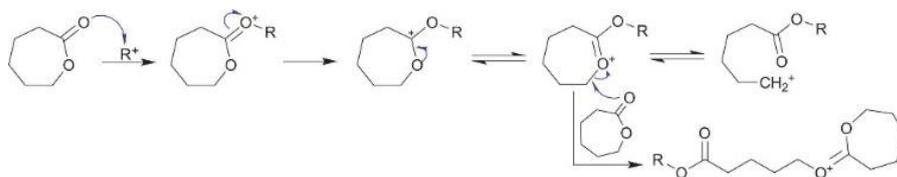


Figura 3: meccanismo dello step iniziale della ROP cationica^{15,16}.

Una reazione di *ring-opening polymerization* con meccanismo cationico avviene, ad esempio, in presenza di acidi di Lewis.

- ROP monomero-attivata: come illustrato in *Figura 4*, la polimerizzazione ha inizio grazie all'attivazione di una molecola di monomero per azione di un opportuno iniziatore alcolico, seguita dall'attacco della specie attivata sulla parte terminale della catena polimerica.

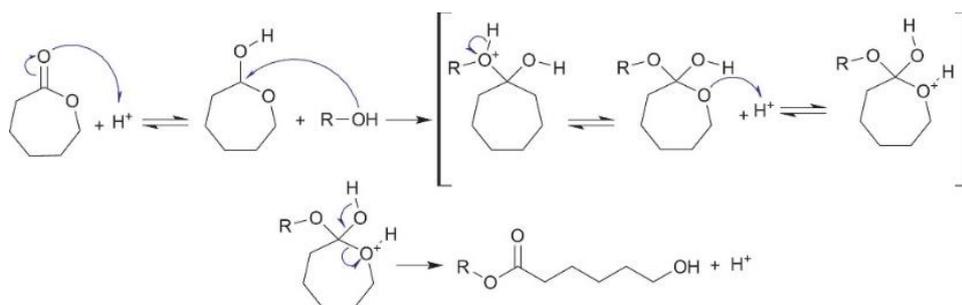


Figura 4: meccanismo dello step iniziale della ROP monomero-attivata^{17,18}.

- ROP coordinazione-inserzione: questo meccanismo, illustrato in *Figura 5*, procede attraverso la coordinazione e la reazione dell' ϵ -caprolattone con un catalizzatore metallico. Il monomero si inserisce nel legame metallo-ossigeno del

catalizzatore e durante la propagazione la catena in crescita è legata al metallo attraverso un legame alchossido. Talvolta questo meccanismo viene denominato “ROP pseudo-anionica”.

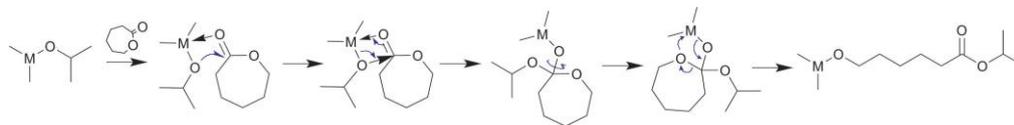


Figura 5: meccanismo dello step iniziale della ROP coordinazione-inserzione^{15,16}.

Durante una reazione di *ring-opening polymerization* possono avere luogo transesterificazioni intermolecolari ed intramolecolari (Figura 6, Figura 7). Queste reazioni generalmente si verificano negli ultimi stadi della polimerizzazione, soprattutto in condizioni di elevata temperatura¹⁹, e comportano un aumento della polidispersità e una perdita di controllo della reazione.

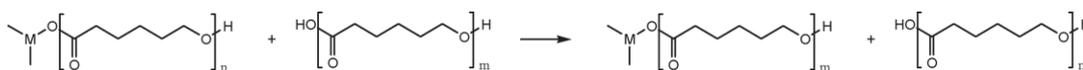


Figura 6: reazione di transesterificazione intermolecolare durante la sintesi del PCL¹⁹.

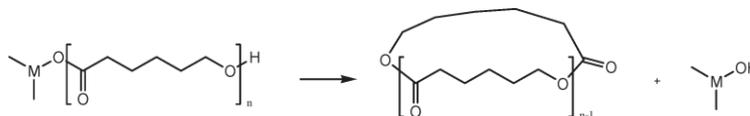


Figura 7: reazione di transesterificazione intramolecolare durante la sintesi del PCL¹⁹.

In generale, la reazione ROP maggiormente sfruttata per la sintesi del poli(ε-caprolattone) è quella basata sul meccanismo di coordinazione-inserzione. I complessi metallici sono frequentemente utilizzati come catalizzatori poiché consentono il raggiungimento di elevate masse molecolari e bassi valori di polidispersità. In particolare, quelli che trovano maggiore impiego sono lo stagno(II) 2-etilesanoato²⁰ e l'isopropossido di alluminio(III)²¹. Catalizzatori organici come il difenil fosfato sono attualmente oggetto di interesse¹¹ grazie alla semplicità con cui possono essere rimossi dall'ambiente di reazione; è infatti sufficiente effettuare un lavaggio con solventi organici per rimuovere questi catalizzatori.

Il PCL viene largamente utilizzato nel settore del *drug delivery* grazie alle sue caratteristiche di permeabilità nei confronti di molti medicinali, l'eccellente biocompatibilità e la capacità di essere degradato e metabolizzato dall'organismo. Per

la sua lenta degradazione, si dimostra più adatto per sistemi di *long-term delivery*⁹, utilizzati per un rilascio prolungato nel tempo. La velocità con cui il farmaco viene rilasciato da un dispositivo a base di PCL può essere controllata realizzando blend polimerici a diversa composizione: la miscelazione del PCL con polimeri naturali come la gelatina, il collagene o il chitosano, o con polimeri sintetici come il polietilene glicole, poliuretani o polivinilalcol, ha consentito il raggiungimento delle proprietà chimiche e biofisiche, nonché cinetiche di rilascio ottimali per sistemi impiegati nel *drug delivery*.

Inoltre, la processabilità e la biocompatibilità caratteristiche del PCL hanno reso questo materiale adatto alla produzione di *scaffold* tridimensionali applicabili nel campo dell'ingegneria tissutale. Gli *scaffold* impiegati nella *tissue engineering* sono sistemi porosi che devono agire come supporti per la crescita e la proliferazione cellulare, al fine di rigenerare il tessuto d'interesse. In tale applicazione, il PCL mostra una modesta velocità di degradazione e bassi valori di adsorbimento di acqua e di perdita di peso dopo 110 settimane immerso in un mezzo acquoso simulante i fluidi corporei²². Di conseguenza, questo polimero si è dimostrato idoneo in particolare per fornire supporto alla rigenerazione di tessuti molli, come pelle, muscoli, nervi, cornea e vescica.

In aggiunta, il poli(ϵ -caprolattone) viene utilizzato per la produzione di dispositivi medici che entrano in contatto solo parzialmente con i tessuti, quindi necessitano di un livello intermedio di biocompatibilità. Ad esempio, il PCL viene impiegato nella fabbricazione di filo da sutura e di sistemi di fissaggio utilizzati in ortopedia. Questi ultimi hanno scaturito grande interesse perché capaci di limitare i fenomeni di *stress-shielding*²³, tipici dei comuni fissatori in acciaio inossidabile.

Un ulteriore settore applicativo di spicco per il PCL è quello del *packaging*. In tale ambito, il PCL viene utilizzato in combinazione con altri polimeri, sotto forma di blend o copolimeri, poiché la sua degradazione, fino ad ora descritta come lenta, risulta invece troppo veloce per l'imballaggio²⁴. Sistemi a base di PCL sono attualmente oggetto di studio per la realizzazione di materiali innovativi utilizzabili per il confezionamento degli alimenti²⁴.

2.1.1.1 Film porosi a base di PCL

La realizzazione di film dalla porosità controllabile è ad oggi oggetto di grande interesse per diversi campi applicativi, quali la realizzazione di *scaffolds*^{25,26,27}, processi di filtrazione²⁸ e *drug delivery*²⁹. Le proprietà delle membrane destinate all'utilizzo nel settore della *tissue engineering* vengono attentamente controllate modificando la struttura, la dimensione e la forma dei pori, regolando il grado di porosità e l'interconnessione fra i pori. Agendo su questi parametri è infatti possibile ottenere *scaffold* con proprietà meccaniche variabili. Come già accennato, i film porosi vengono sfruttati anche per processi di filtrazione, in particolare per la filtrazione e la purificazione dell'acqua. A tal scopo vengono utilizzati prevalentemente film preparati con la tecnica *phase-inversion* indotta da non solvente²⁸, che sarà descritta di seguito e che presenta il vantaggio di richiedere un modesto consumo energetico. Infine, anche per la produzione di dispositivi impiegabili per il rilascio controllato di farmaci, le proprietà meccaniche dei film devono essere controllate, e le membrane vengono valutate sulla base dello spessore, della morfologia superficiale e di proprietà quali il grado di *swelling*.

Film e membrane porose a base di poli(ϵ -caprolattone) possono essere preparati seguendo diverse strategie. Di seguito si riportano le più comuni:

1. *Solvent casting*: metodo molto semplice utilizzato principalmente per la produzione di film di elevato spessore, ma talvolta sfruttato anche per membrane sottili. Il polimero viene disciolto in un solvente opportuno e la soluzione risultante viene colata all'interno di un contenitore della forma desiderata. Quindi, il solvente viene rimosso per evaporazione. Lo spessore e le proprietà del film così prodotto possono essere controllati modificando la concentrazione del polimero in soluzione, la velocità di evaporazione del solvente e la temperatura del substrato. Utilizzando un agente porogeno è possibile realizzare strutture porose che possono trovare impiego come scaffold.
2. *Separation phase*: tecnica comunemente utilizzata per la produzione di scaffold porosi con pori interconnessi. La separazione di fase è un processo in cui due o più componenti del sistema si separano in fasi distinte a causa di differenze nelle

loro proprietà fisiche, come densità, solubilità o tensione superficiale. In particolare, per la produzione di membrane microporose si sfrutta il metodo *phase-inversion*: la soluzione polimerica viene immersa in un liquido immiscibile con il solvente utilizzato per dissolvere il polimero; quando la soluzione ed il liquido immiscibile entrano in contatto, il polimero precipita e forma una membrana sottile.

3. *Spin coating*: tecnica altamente riproducibile che consente la produzione di film uniformi e di spessore controllabile. Viene utilizzata una superficie piana sulla quale è riposta una quantità nota di soluzione polimerica; la superficie viene fatta ruotare a velocità elevata così da distribuire la soluzione su tutta la sua lunghezza per effetto della forza centrifuga. Lo spessore del film così generato può essere regolato variando la velocità di rotazione e la viscosità del sistema in uso.

2.1.1.2 Film elettrofilati a base di PCL

Un'ulteriore tecnica ampiamente utilizzata per la produzione di film e membrane è l'*electrospinning*, che permette di ottenere tessuti-non-tessuti costituiti da fibre polimeriche di dimensioni micro e nanometriche. Il processo di elettrofilatura ha avuto origine ed è stato brevettato nel 1934³⁰, anno in cui Anton Formhals brevettò uno strumento in grado di produrre filamenti di acetato di cellulosa grazie all'utilizzo di un campo elettrico. La filatura elettrostatica o *electrospinning* è un processo produttivo elettrodinamico che consente la produzione di fibre con diametri nell'ordine di grandezza di pochi micron o, più comunemente, dei nanometri. Ridurre le dimensioni delle fibre fino alla scala nanometrica comporta l'insorgere di nuove proprietà, quali elevato rapporto superficie-volume, diminuzione dei difetti superficiali, flessibilità nelle funzionalità della superficie, porosità e ottimi valori di modulo elastico.

La soluzione polimerica, inizialmente contenuta all'interno di una siringa collegata ad una pompa, viene erogata con una portata costante verso un ago metallico a cui viene impartito un elevato voltaggio dal generatore di tensione. Si genera quindi un campo elettrico fra l'ago ed un collettore metallico posto a terra, che porta alla formazione di

cariche sulla soluzione. All'aumentare dell'entità della carica si forma sulla punta dell'ago il *cono di Taylor*: quando il voltaggio applicato è tale da portare le forze elettrostatiche a superare la tensione superficiale delle gocce di soluzione, un getto di soluzione polimerica viene scaricato dal vertice del cono verso la piastra metallica. In questa fase il solvente evapora e questo comporta un incremento nella carica superficiale del getto, che quindi diventa instabile e subisce processi di stiramento ed accelerazione che portano ad una diminuzione nel suo diametro, fino al *range* dei nanometri. Sul collettore, infine, si raccolgono fibre di materiale polimerico solidificate.

L'*electrospinning* è una tecnica estremamente flessibile e conveniente, capace di produrre fibre di materiale polimerico caratterizzate da diverse morfologie. I film polimerici prodotti tramite *electrospinning* possiedono proprietà peculiari che li rendono particolarmente adatti all'applicazione in campo biomedico³¹. In generale, le proprietà fisiche e biologiche quali l'idrofilicità, la biocompatibilità e la resistenza meccanica, dipendono dalla composizione e dalle proprietà chimiche intrinseche del materiale utilizzato. Fibre elettrofilate di PCL vengono utilizzate nel settore dell'ingegneria tissutale come *scaffold* per la rigenerazione di tessuti ossei. Patlolla e collaboratori³², a tale scopo, hanno realizzato *scaffold* a base di PCL e contenenti il 20% di idrossiapatite e l'80% di fosfato di calcio, dimostrando che, grazie all'introduzione dell'idrossiapatite, il sistema ha raggiunto ottime proprietà meccaniche ed è stato in grado di favorire la rigenerazione del tessuto interessato.

Inoltre, membrane elettrofilate a base di PCL sono impiegate come pelle artificiale o come dispositivi per medicazioni³³. L'aspetto vantaggioso legato all'utilizzo di tali membrane consiste nella possibilità di incorporare in esse sostanze bioattive, come ad esempio fattori di crescita, nanoparticelle, agenti antimicrobici e antinfiammatori. In aggiunta, questi sistemi fungono da barriere fisiche e prevengono le infezioni ostacolando l'entrata di microbi e batteri³⁴.

Un'ulteriore caratteristica interessante dei film elettrofilati è l'elevata area superficiale, superiore a quella dei film prodotti per *solvent casting*, dovuta alla loro natura fibrosa. Questa peculiarità li rende particolarmente adatti all'impiego nel *drug delivery*. Ad esempio, Puiggalí-Jou e collaboratori³⁵ hanno sviluppato un sistema a base di PCL

elettrofilato, poli(3,4-etilendiossitiolfene) (PEDOT) e curcumina, in grado di emulare il comportamento della matrice extracellulare. Si è visto come in tale sistema il rilascio della curcumina per semplice diffusione risulti fattibile, anche se con tempistiche dilatate. Per ovviare a questo problema sono stati utilizzati impulsi elettrici che hanno consentito un rilascio più efficace e controllato della curcumina.

2.1.2 PCL con geometria *star-shaped*

Le proprietà del poli(ϵ -caprolattone) dipendono fortemente dal grado di cristallinità: ad esempio, elevati livelli di cristallinità causano la sua lenta degradazione, rispetto agli altri poliesteri alifatici, e si è visto come ciò comporti diverse limitazioni nella sua applicabilità. L'architettura risulta un parametro significativamente influente sulle proprietà fisiche e le performance di una macromolecola. In tal senso, i polimeri con geometria *star-shaped* hanno destato grande interesse grazie alla loro struttura ben definita e al ridotto grado di cristallinità. I polimeri *star* sono macromolecole ramificate in cui da un singolo punto di diramazione (*core*) si sviluppano più catene lineari (*arms*), restituendo così una geometria stellare. L'aspetto più interessante dei polimeri a stella, che li contraddistingue dai corrispondenti polimeri lineari aventi uguale massa molecolare, è il maggiore numero di funzionalità terminali³⁶, caratteristica sfruttata in molteplici campi applicativi.

Tramite analisi calorimetriche, è stato dimostrato come i PCL-*star* presentino temperature di cristallizzazione e fusione inferiori rispetto ad analoghi PCL con geometria lineare. Sarvari e collaboratori³⁷ hanno attribuito tale effetto alle imperfezioni contenute nei domini cristallini, introdotte dalle minori dimensioni delle catene che si irradiano dal core, e alla struttura ramificata dei PCL a stella. In virtù di ciò, il minor grado di cristallinità che li caratterizza, ne favorisce la degradazione in tempi più brevi. Inoltre, questa geometria risulta maggiormente performante quando applicata nel *drug delivery*: il ridotto volume idrodinamico e la contenuta viscosità intrinseca di questi polimeri risultano essere parametri favorevoli nelle fasi di caricamento e rilascio del farmaco³⁸.

2.1.2.1 Sintesi ed applicazioni di PCL a stella

I polimeri a stella possono essere sintetizzati seguendo tre diverse metodologie: approccio *core-first* (Figura 8), approccio *arm-first* (Figura 9) e processo *grafting-onto* (Figura 10). La scelta della strategia di sintesi dipende dalla struttura desiderata, dalle caratteristiche chimiche del *core* e delle braccia e dal campo applicativo di interesse.

Core-first approach

Nella tecnica *core-first* si utilizza come iniziatore una molecola multifunzionale a bassa massa molecolare, la quale costituisce il *core* del polimero *star-shaped*. Dalle funzionalità dell'iniziatore si sviluppano catene lineari del polimero di interesse, le cosiddette *arms*. È necessario che i siti attivi dell'iniziatore possiedano tutti uguale reattività per poter produrre polimeri a stella dalla struttura ben definita. L'aspetto vantaggioso di questo approccio risiede nell'ottima resa di reazione, dovuta alla semplicità con cui è possibile separare il polimero da eventuali leganti, monomero non reagito o catalizzatori tramite procedure di routine quali la precipitazione. Tuttavia, il numero di braccia ottenibile con l'approccio *core-first* è piuttosto modesto, tipicamente si ha un minimo di tre braccia ed un massimo di otto. Tale limitazione è dovuta all'utilizzo di molecole di piccole dimensioni come iniziatori, che comportano una diminuzione nella dimensione del *core* e nel numero di *arms* raggiungibile.

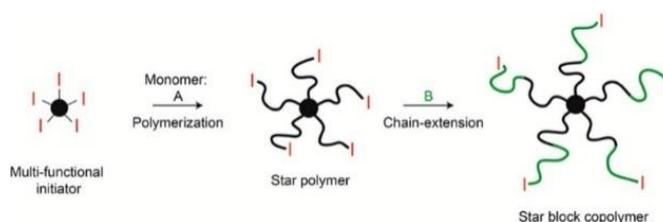


Figura 8: illustrazione schematica della sintesi *core-first*³⁹.

Arm-first approach

L'approccio *arm-first* prevede la formazione di polimeri con geometria stellare a partire dalla reticolazione di catene lineari attraverso una reazione di polimerizzazione o una *coupling reaction*. Si tratta quindi di una sintesi convergente, opposta alla tecnica *core-first* descritta in precedenza, e il cui meccanismo è suddivisibile in tre ulteriori categorie: *macroinitiator* (MI), *macromonomer* (MM) e *self-assembly cross-linking* (SC). Il primo

step, comune a tutti i meccanismi, prevede la preparazione di polimeri lineari che costituiranno le braccia del sistema *star*. Quindi, se i terminali presentano gruppi in grado di fungere da iniziatori, segue il meccanismo MI: il polimero *star-shaped* si forma grazie alla polimerizzazione, tramite un macroiniziatore, di un monomero multifunzionale che agisce da reticolante. Viceversa, se i terminali di catena sono gruppi capaci di polimerizzare, si utilizza una piccola molecola come iniziatore e le braccia si comportano come macromonomeri; la sintesi segue quindi il meccanismo MM. Il meccanismo SC prevede invece una *coupling reaction*; le catene lineari devono presentare blocchi “*cross-linkable*” e talvolta vengono preparate *ad hoc* per far sì che siano in grado di aggregarsi a formare delle micelle ancor prima del processo di reticolazione.

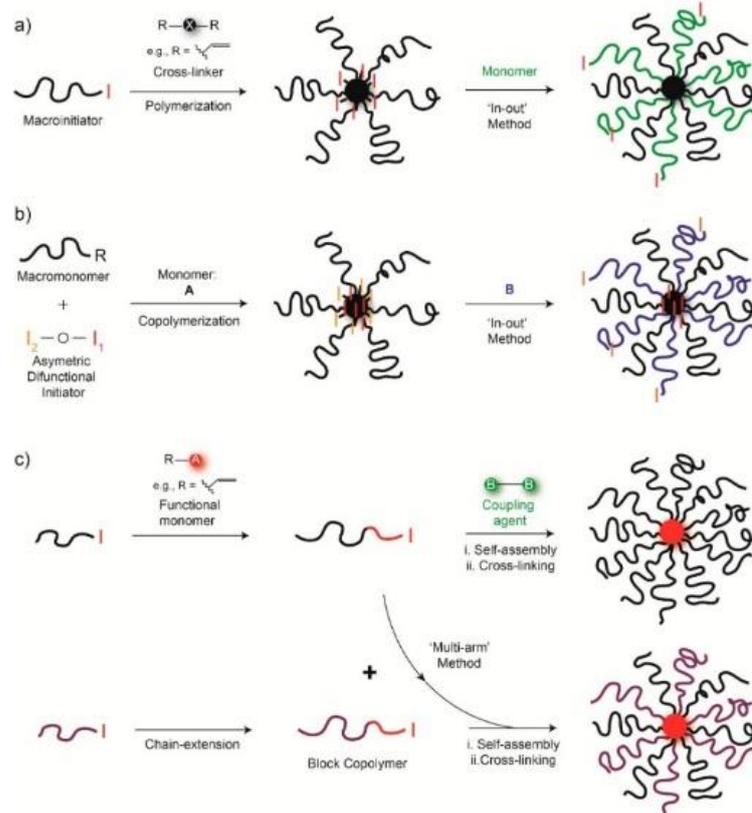


Figura 9: illustrazione schematica della sintesi arm-first attraverso i meccanismi (a) macroinitiator, (b) macromonomer, (c) self-assembly cross-linking³⁹.

Grafting-onto

Sfruttando il metodo *grafting-onto* le macromolecole *star* vengono sintetizzate tramite reazioni di *coupling* tra il *core* e le braccia. Le braccia possono essere sintetizzate tramite

un'opportuna reazione di polimerizzazione oppure possono derivare da un processo di post-polimerizzazione condotto a partire da polimeri lineari pre-sintetizzati. La *coupling reaction* è quantitativa, di conseguenza si ottiene un numero di braccia pari al numero di funzionalità del *core*. Generalmente, i *coupling compounds* disponibili sono molecole di piccole dimensioni e portano quindi alla formazione di polimeri *star* con un basso numero di braccia (da un minimo di quattro ad un massimo di otto) e una ridotta dimensione del *core*. La tecnica *grafting-onto* risulta estremamente vantaggiosa in quanto il *core* e le braccia vengono sintetizzati e caratterizzati individualmente, consentendo un accurato controllo della struttura della macromolecola prodotta.

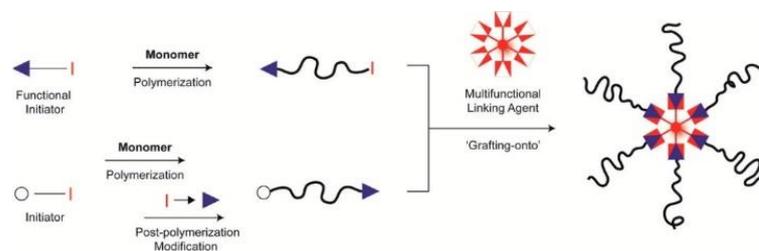


Figura 10: illustrazione schematica della sintesi *grafting-onto*³⁹.

I PCL con geometria stellare trovano impiego in numerosi campi applicativi. Ad esempio, sono stati utilizzati al fine di implementare la tenacità delle resine epossidiche⁴⁰: i composti epossidici presentano una buona rigidità e resistenza meccanica, ma sono materiali fragili e questo ne limita l'applicabilità⁴¹. I polimeri *star-shaped* sono in grado di aumentare la flessibilità e la tenacità di specie termoidurenti, senza andare ad intaccare le altre proprietà, come la T_g o il modulo elastico.

Choi e collaboratori⁴², invece, hanno utilizzato PCL-*star* come plastificante per un sistema a base di polivinilcloruro (PVC). L'azione plastificante è confermata dalla diminuzione della temperatura di transizione vetrosa e dalla maggiore capacità di elongazione, che hanno consentito al materiale di diventare più flessibile e facilmente processabile. Infine, questi polimeri trovano largo impiego per molteplici applicazioni biomediche^{43,44,45,46,47}.

2.2 Formulazioni a base di PCL

Il poli(ϵ -caprolattone) mostra un'elevata propensione a formare miscele compatibili con una grande varietà di polimeri. Nel dettaglio, il PCL partecipa alla formazione di tre diverse tipologie di blend⁴⁸:

- Blend compatibili, ossia blend caratterizzati da un'unica temperatura di transizione vetrosa, il cui valore dipende dal valore di T_g dei due omopolimeri e dalle relative concentrazioni all'interno della miscela;
- Blend meccanicamente compatibili, i quali presentano due T_g distinte, ma proprietà meccaniche differenti rispetto ai polimeri di partenza;
- Blend con interazioni cristalline, che si formano a seguito del miscelamento tra il PCL e un altro polimero semicristallino; in tal caso, infatti, la cristallinità viene implementata e hanno origine nuove interazioni.

La preparazione di blend è, in generale, un approccio sfruttato per l'ottenimento di materiali innovativi che presentino proprietà altrimenti non raggiungibili dai polimeri di partenza. In tal senso, risultano molto interessanti i sistemi ricavati dalla combinazione di polimeri sintetici e polimeri naturali, come per esempio il blend a base di poli(ϵ -caprolattone) e chitosano. Il chitosano è un polisaccaride ottenuto a partire dall'esoscheletro dei crostacei, caratterizzato da buona biocompatibilità e attività antimicrobica, oltre ad essere un materiale economico e di facile reperibilità. Ciò che ostacola l'applicabilità del chitosano è la complessità nel controllarne le proprietà meccaniche e la biodegradazione. Per lo sviluppo di miscele PCL/chitosano un possibile approccio consiste nella dissoluzione dei due polimeri in acido acetico anidro e acido acetico 0.5 mol/l, rispettivamente, e nel successivo mescolamento delle due soluzioni così generate⁴⁹. Le proprietà meccaniche dei materiali così ottenuti risultano più flessibili, ossia più semplici da modificare e controllare variando le condizioni operative, rispetto al chitosano tal quale.

Un ulteriore polimero naturale miscibile con il poli(ϵ -caprolattone) è l'amido. Il miscelamento con l'amido consente l'ottenimento di un materiale complessivamente più economico, grazie ai bassi costi che caratterizzano la produzione di questo polimero,

e più facilmente biodegradabile. I blend PCL/amido (SPCL), investigati da Wang e collaboratori⁵⁰, mostrano un elevato livello di biocompatibilità, che ne consente l'applicazione per la produzione di *scaffold* per ingegneria tissutale e diversi dispositivi utilizzati in ortopedia. In questi sistemi, l'amido è in grado di agire come agente nucleante, aumentando la velocità del processo di cristallizzazione e portando dunque alla formazione di un maggior numero di sferuliti aventi dimensioni inferiori, rispetto al PCL tal quale. Inoltre, effettuando un'analisi meccanica dinamica, si è visto come il modulo elastico risulti più elevato per il sistema SPCL, suggerendo quindi che l'amido abbia anche un effetto rinforzante. Analizzando poi il fattore di smorzamento, nuovamente tramite DMA, in corrispondenza della temperatura fisiologica, si è dimostrato che il blend PCL/amido possa essere considerato un materiale estremamente promettente per applicazioni biomedicali ed in particolare nel campo dell'ortopedia.

Inoltre, il poli(ϵ -caprolattone) viene spesso utilizzato per la preparazione di blend con acido polilattico (PLA). Il PLA è un poliestere alifatico biodegradabile sintetizzato a partire da risorse naturali, sfruttato in diversi settori quali il *packaging*, l'ingegneria tissutale e la costruzione di fissatori ossei. Tuttavia, la fragilità del PLA costituisce un importante limite alle sue applicazioni. Esso è caratterizzato da una temperatura di fusione pari a 160 °C e una temperatura di transizione vetrosa di 60 °C⁵¹, quindi a temperatura ambiente presenta proprietà meccaniche pressoché opposte a quelle del PCL. Il miscelamento con il poli(ϵ -caprolattone) si dimostra interessante poiché potenzialmente potrebbe consentire la realizzazione di materiali aventi un più basso punto di fusione e una maggiore flessibilità, senza però subire eccessive perdite nella rigidità tipica del PLA. Tuttavia, le problematiche legate a questi blend, sono dovute alle scarse proprietà meccaniche, causate dalla immiscibilità fra i due componenti⁵²: tra le fasi di PLA e quelle di PCL non si ha una buona adesione, quindi è frequente la separazione. Per poter preparare efficacemente un blend PLA/PCL dalle buone proprietà meccaniche è necessario controllare attentamente le dimensioni dei domini di PCL, che tendono ad aumentare con l'incremento della tensione interfacciale fra i due componenti della miscela, inficiando le proprietà meccaniche. In particolare, Bai e collaboratori⁵³ hanno evidenziato come il controllo delle dimensioni dei domini diventi

ancora più critico nel caso in cui si vogliono ottenere materiali in cui il PLA sia caratterizzato da un elevato grado di cristallinità, poiché per la preparazione sono necessarie elevate temperature e lunghi tempi di sinterizzazione. Comunemente, si ricorre all'utilizzo di compatibilizzanti, come ad esempio copolimeri a blocchi miscibili in entrambi i componenti, glicidil metacrilato⁵⁴ (GMA) o nanofillers di diversa natura, che sono in grado di stabilizzare ed ottimizzare le dimensioni dei domini di PCL.

2.2.1 Formulazioni a base di PCL e poli(N-isopropilacrilammide) (PNIPAAm)

La poli(N-isopropilacrilammide) (PNIPAAm) è un polimero sintetico, termoresponsivo, non tossico e biocompatibile. È stata sintetizzata per la prima volta negli anni '50⁵⁵. La PNIPAAm trova numerose applicazioni nel settore biomedicale per la sua biocompatibilità e perché caratterizzata da una *Lower Critical Solution Temperature* (LCST) di circa 32°C⁵⁶, vicino alla temperatura fisiologica. Al di sotto della LCST il polimero rigonfia in acqua e mostra un comportamento idrofilo, a causa dei legami ad idrogeno intermolecolari che si instaurano tra le catene polimeriche e l'acqua. Al di sopra della temperatura critica, invece, l'acqua viene espulsa poiché questi legami si rompono e vengono sostituiti da legami ad idrogeno intramolecolari, che portano il polimero ad assumere una configurazione globulare ed un comportamento idrofobo. Tale transizione è reversibile ed ha consentito alla PNIPAAm di destare interesse specialmente nel settore del *drug delivery*.

La PNIPAAm viene sfruttata perlopiù per la produzione di idrogeli⁵⁷, *network* polimerici tridimensionali le cui proprietà possono essere controllate modificando opportunamente la struttura chimica o la composizione del materiale di partenza, il grado di reticolazione o la porosità. Gli idrogeli presentano una struttura simile alla matrice extracellulare ed inoltre, grazie all'estesa rete di reticolazioni di cui sono costituiti, agiscono efficacemente come supporti per la crescita e la proliferazione cellulare o come sistemi per il rilascio controllato di farmaci⁵⁸. La problematica legata

agli idrogeli a base PNIPAAm è la fragilità, dovuta alle scarse proprietà meccaniche del sistema⁵⁶. Inoltre, questi sistemi non sono biodegradabili⁵⁶.

Il poli(ϵ -caprolattone) è soggetto a biodegradazione secondo un processo di idrolisi che porta alla formazione di molecole di bassa massa molecolare che vengono naturalmente metabolizzate dall'organismo. Per poter rendere gli idrogeli a base di PNIPAAm biodegradabili, un possibile approccio consiste nell'utilizzare del policaprolattone diacrilato (PCLdA) come agente reticolante⁵⁹. In questi sistemi il grado di rigonfiamento subisce una diminuzione all'aumentare della quantità di *cross-linkante*, poiché il carattere idrofobo del PCL rende difficoltosa l'introduzione dell'acqua all'interno del gel. Una maggiore concentrazione di PCLdA comporta inoltre un aumento nel modulo elastico, causata dall'incremento del grado di reticolazione e dal carattere semicristallino del PCL. Di conseguenza, gli idrogeli così prodotti risultano meccanicamente più resistenti e più performanti rispetto ai sistemi reticolati con un comune *cross-linker* come l'NMBA. Per quanto concerne la biodegradazione, è stato osservato come il PCL, presente sotto forma estremamente suddivisa all'interno dei geli, si degradi più velocemente rispetto al polimero tal quale, grazie all'elevata superficie esposta all'azione idrolitica dell'acqua.

Stoychev e collaboratori⁶⁰ hanno utilizzato PNIPAAm e PCL per la preparazione di *self-folding capsules*, ossia sistemi in grado di catturare e rilasciare cellule in modo controllato grazie a fenomeni di ripiegamento e distensione dipendenti dalla temperatura. Per la realizzazione di questi sistemi è stato preparato un *bilayer* costituito da PCL e PNIPAAm. Il *layer* di PCL costringe lo *swelling* della PNIPAAm in una sola direzione, di conseguenza il sistema non subisce rigonfiamento o *shrinkage* in maniera uniforme, bensì si ripiega su sé stesso e si distende a seguito dello *swelling* e del collasso della PNIPAAm rispettivamente. Questo peculiare comportamento consente di catturare e rilasciare cellule in modo controllato semplicemente variando la temperatura operativa.

2.3 Applicazione di polimerizzazione frontale nella sintesi di sistemi a base di PNIPAAm

La polimerizzazione frontale (FP) è un tipo di polimerizzazione che procede tramite la formazione di un fronte, avvenuta a seguito di un input energetico di diversa natura. È una reazione in grado di autosostenersi, in cui il monomero viene convertito nel polimero grazie alla propagazione di una zona di reazione localizzata, ossia il fronte. La forza motrice del processo è rappresentata dal calore sviluppato dalle reazioni esotermiche ed autocatalitiche coinvolte nella polimerizzazione. Quindi, non è necessario fornire energia al sistema dall'esterno, fatta eccezione per il breve apporto energetico iniziale indispensabile per innescare la reazione.

Rispetto alle comuni tecniche di polimerizzazione, la polimerizzazione frontale presenta diversi vantaggi, tra i quali la semplicità operativa, i ridotti tempi di reazione, il minor consumo energetico e soprattutto la capacità di produrre sistemi caratterizzati da un'efficiente dispersione e da una composizione omogenea. Tuttavia, la sintesi di macromolecole tramite FP può avvenire solo nel caso in cui il sistema presenti un'elevata energia di attivazione⁶¹: è necessario che la velocità di reazione risulti pressoché nulla alla temperatura iniziale ed invece estremamente elevata in corrispondenza della temperatura del fronte, così da produrre una quantità di calore tale da compensare il calore perduto. Chiaramente, le reazioni coinvolte nel processo devono essere fortemente esotermiche⁶¹.

La propagazione del fronte procede con velocità costante e comporta un profilo di temperatura in cui si distinguono una fase stabile, una fase ascendente e una fase di declino: nelle regioni del sistema distanti dal fronte, la temperatura è stabile, perché non avviene alcun processo di polimerizzazione; l'avvicinamento del fronte comporta un aumento della temperatura fino ad un valore massimo; a seguito del passaggio del fronte e quindi terminata la polimerizzazione di una specifica zona del sistema, la temperatura si abbassa nuovamente. In *Figura 11* si riportano (a) il caratteristico andamento della velocità del fronte e (b) il profilo di temperatura proprio di una FP.

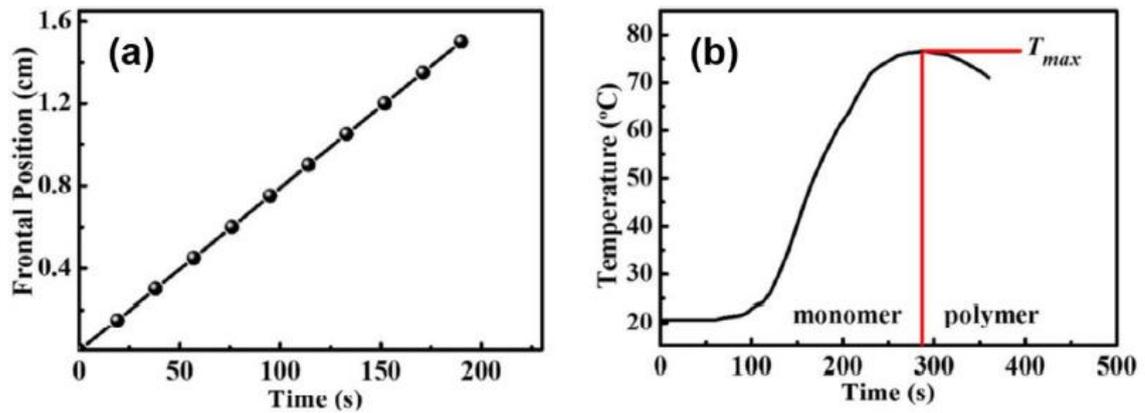


Figura 11: (a) tipica curva posizione del fronte vs tempo per una polimerizzazione frontale⁶², (b) profilo di temperatura caratteristico di una polimerizzazione frontale⁶³.

Esistono tre tipi di polimerizzazione frontale:

- *Photofrontal polymerization*: il fronte viene generato da un flusso continuo di radiazioni, generalmente raggi UV;
- *Isothermal frontal polymerization*: la formazione e la propagazione del fronte avvengono a partire da un frammento solido di polimero immerso in una soluzione costituita dal suo monomero e da un iniziatore radicalico;
- *Thermal frontal polymerization*: la reazione procede per effetto della diffusione termica e della dipendenza della velocità di reazione dalla temperatura secondo Arrhenius.

La poli(N-isopropilacrilammide), polimero termoresponsivo, non tossico e biocompatibile, ha attirato grande attenzione grazie alle sue peculiari caratteristiche. In particolare, la PNIPAAm trova largo impiego nel settore biomedicale e farmaceutico. Come detto in precedenza, però, le scarse proprietà meccaniche e termiche caratteristiche di questo polimero, ne limitano l'applicabilità. Tuttavia, sfruttando la tecnica di polimerizzazione frontale, è possibile preparare idrogeli a base di PNIPAAm in combinazione con diversi polimeri, così da incrementare le proprietà del prodotto finale.

Risulta particolarmente interessante la possibilità di modificare la *Lower Critical Solution Temperature* della PNIPAAm: effettuando la copolimerizzazione con un monomero idrofilico si ha un innalzamento della LCST, viceversa la copolimerizzazione con un monomero idrofobico comporta una diminuzione della LCST. A tal proposito, sono stati

preparati tramite polimerizzazione frontale idrogeli a base poli(N-isopropilacrilammide) e metilcellulosa⁶⁴. La metilcellulosa è un polimero derivato dalla cellulosa che presenta quantità variabili di sostituenti metilici e la cui LCST cade tra 60°C e 80°C, a seconda appunto del grado di sostituzione. La LCST del copolimero PNIPAAm-MC cade al di sotto dei 30°C, quindi subisce una diminuzione rispetto alla LCST normalmente riscontrabile nei campioni a base PNIPAAm. La riduzione della LCST è dovuta alla presenza di metilcellulosa, che rende il sistema maggiormente idrofobico. Tuttavia, Liu e collaboratori⁶⁴ hanno dimostrato che, per elevate concentrazioni di metilcellulosa, si osserva l'effetto opposto, poiché la temperatura critica del copolimero viene determinata dal contributo predominante della metilcellulosa.

Qiao e collaboratori⁶⁵ hanno invece sfruttato la polimerizzazione frontale per la sintesi di idrogeli sensibili sia alla temperatura sia al pH, a base di poli(N-isopropilacrilammide) e acido acrilico. Questi idrogeli a risposta *dual-sensitive* si sono dimostrati estremamente utili nel settore del *drug delivery*. La LCST dell'idrogelo così prodotto presenta valori sempre più elevati all'aumentare della frazione molare di acido acrilico. L'incremento della temperatura critica è dovuto alla forte idrofilia dell'acido acrilico e alla porosità del sistema. La realizzazione di strutture porose è stata dimostrata essere un metodo efficace per aumentare la capacità di *swelling* di un materiale al di sotto della LCST, poiché una matrice porosa favorisce l'ingresso e l'accumulo di liquido al suo interno⁶⁶. Inoltre, la polimerizzazione frontale è stata applicata per la sintesi di *interpenetrating polymer networks* (IPN) a base di poli(N-isopropilacrilammide) e polivinilpirrolidone⁶⁷: un IPN consiste in un blend tra due o più polimeri che formano tra loro una struttura reticolata e interconnessa. Generalmente, per la preparazione di IPN viene applicata la polimerizzazione in massa, la quale però comporta diverse difficoltà nella dissipazione del calore sviluppato durante la reazione. Di conseguenza, l'utilizzo della polimerizzazione frontale risulta un approccio più conveniente. L'introduzione del PVP nella matrice polimerica di PNIPAAm consente un incremento delle proprietà meccaniche del sistema. All'aumentare della concentrazione di PVP è stato riscontrato un aumento nella resistenza alla compressione, dovuto al maggior grado di reticolazione.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

N-isopropilacrilammide (NIPAAm, purezza = 97%), dimetilsolfossido (DMSO, purezza \geq 99%), aliquat persolfato (APS, purezza \geq 98%), pentaeritrolo (purezza = 99%), pentaeritrolo tetraacrilato (PE-TA, con 350 ppm di idrochinone monometil etere), stagno ottanoato ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$, purezza \geq 96%), ϵ -caprolattone (ϵ -CL, purezza = 97%), metanolo (purezza \geq 99.9%), anidride maleica (purezza \geq 99%), dietil etere (purezza \geq 99%, stabilizzato con BHT), toluene (purezza = 99.8%, anidro), pararosnilina cloridrato (purezza \geq 85%, anidro) e diclorometano (DCM, purezza \geq 99.8%, stabilizzato con amilene) sono stati acquistati da Sigma Aldrich®. P-tetradecil-P,P,P-triesil fosfonio cloruro (triesil tetradecil fosfonio cloruro, TETDPC, purezza \geq 97%) è stato acquistato da TCI Chemicals. Diclorometano ed ϵ -caprolattone sono stati purificati prima dell'uso tramite distillazione sottovuoto in presenza di idruro di calcio (CaH_2) e conservati in atmosfera di Argon. Il dietil etere è stato purificato mediante distillazione per rimuovere l'inibitore prima dell'uso. Il pentaeritrolo è stato essiccato in stufa sottovuoto a 40°C. Tutti gli altri reagenti erano di grado analitico e sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione.

3.2 Preparazione PCL-COOH

La sintesi di PCL *star-shaped* con terminali maleici (PCL-COOH) ha previsto due passaggi successivi: è stata effettuata la sintesi di PCL con geometria stellare e gruppi terminali idrossilici (PCL-OH), che in seguito è stato sottoposto ad un'esterificazione con anidride maleica al fine di introdurre terminali acidi.

- Sintesi PCL-OH

La sintesi è stata effettuata tramite una reazione di *ring-opening polymerization* dell' ϵ -caprolattone in presenza di un iniziatore alcolico, il pentaeritrolo. Sono state effettuate due preparazioni in parallelo, con lo scopo di sintetizzare PCL-OH dotato di braccia aventi ciascuna massa molecolare 2000 g/mol (PCL-2k-OH),

nel primo caso, e 1000 g/mol (PCL-1k-OH), nel secondo caso. Quindi, la quantità di iniziatore è stata regolata in modo tale da consentire il raggiungimento della massa molecolare desiderata. Nel dettaglio, per la sintesi di PCL-2k-OH sono stati utilizzati 30.419g di ϵ -caprolattone e 518mg di PE-TA, per la preparazione di PCL-1k-OH invece sono stati necessari 19.386g di ϵ -caprolattone e 660mg di PE-TA. I sistemi costituiti da monomero e iniziatore sono stati inseriti in un bagno ad olio termostato a 80°C e mantenuti in agitazione fino alla completa solubilizzazione dell'iniziatore. Quindi, la polimerizzazione è stata indotta aumentando la temperatura fino a 120°C ed introducendo, mediante micropipetta, il catalizzatore, ossia una soluzione di Sn(Oct)₂ 100mg/ml in toluene anidro; per la sintesi di PCL-2k-OH ne sono stati aggiunti 218.5 μ l, mentre per la sintesi di PCL-1k-OH ne sono stati aggiunti 139.2 μ l (rapporto [ϵ -CL]/[Sn(Oct)₂]=5000). Il sistema è stato mantenuto in agitazione per 24 ore, in atmosfera inerte. I polimeri così ottenuti sono stati lasciati raffreddare e la viscosità è stata attenuata aggiungendo alla massa polimerica DCM. Successivamente, il catalizzatore è stato rimosso effettuando una precipitazione in metanolo freddo. Quindi, i prodotti finali sono stati recuperati tramite filtrazione su buchner ed essiccati in stufa sottovuoto a 30°C per 48 ore.

¹H-NMR, chemical shift δ (300 MHz, CDCl₃, TMS, ppm):

4.09 (-CH₂- pentaeritritolo, s); 4.05 (-CH₂-, t); 3.63 (-CH₂-OH P terminale di catena PCL, t); 2.29 (-CH₂-, t); 1.64 (-CH₂-, m); 1.38 (-CH₂-, m).

Picchi IR (cm⁻¹):

2945.23 (-CH₂- *stretching* asimmetrico); 2870.43 (-CH₂- *stretching* simmetrico); 1725.16 (>C=O *stretching* simmetrico); 1296.68 (-C-O- e -C-C- *stretching*); 1242.44 (-C-O-C- *stretching* asimmetrico); 1178.56 (-C-O-C- *stretching* asimmetrico).

- Sintesi PCL-COOH

In un pallone a due colli tarato, sono stati introdotti, sotto Argon, 10g del PCL-2k-OH sintetizzato e 2750mg di anidride maleica. Il sistema è stato disciolto in 20ml di toluene anidro ed è stato posto per 24 ore sotto agitazione in un bagno

ad olio termostato a 80°C. In seguito, è stata effettuata una precipitazione con metanolo freddo e il polimero è stato filtrato su buchner e così recuperato. Infine, il prodotto è stato essiccato lasciandolo in stufa sottovuoto a 30°C per 48 ore. La stessa procedura è stata seguita per introdurre terminali maleici nel PCL-1k-OH.

$^1\text{H-NMR}$, chemical shift δ (300 MHz, CDCl_3 , TMS, ppm):

Oltre al segnale caratteristico della catena di PCL, sono presenti due segnali aggiuntivi nella zona dei protoni vinilici, rispettivamente a 6.42 ppm (R-OOC-CH=CH-COOH, d) e 6.31 ppm (R-OOC-CH=CH-COOH, d). Inoltre, il segnale dei protoni terminali delle catene PCL (-CH₂-OOC-, t) si è spostato ad un valore di 4.28 ppm, tipico degli esteri maleici.

Picchi IR (cm^{-1}):

Oltre ai picchi riportati precedentemente per il PCL terminato con gruppi ossidrilici, sono presenti picchi aggiuntivi a 1640 cm^{-1} (-C=C- stretching, unità maleica) e 822 cm^{-1} (-Csp²-H bending, unità maleica).

La sintesi è stata illustrata in *Figura 12*.

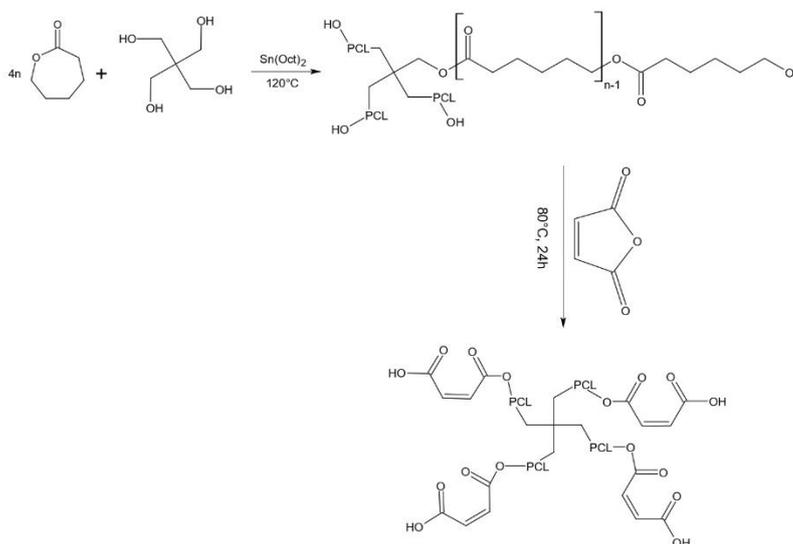


Figura 12: sintesi del PCL-COOH

3.3 Preparazione TETDPPS

Per la sintesi dell'iniziatore, il triesil tetradecil fosfonio persolfato (TETDPPS), una soluzione costituita da 1.8g di TETDPC disciolti in 20ml di dietil etere è stata versata all'interno di un imbuto gocciolatore e mescolata con una soluzione acquosa di 30ml contenente 5g di APS. Il sistema è stato agitato per cinque minuti, quindi la fase organica è stata separata e lavata tre volte con acqua. In seguito, è stato aggiunto carbonato di potassio anidro alla fase organica per rimuovere l'acqua in eccesso. Per la rimozione del solvente è stato utilizzato il rotavapor. Il prodotto finale, un liquido biancastro e molto viscoso, è stato infine mantenuto in stufa sottovuoto fino al raggiungimento di un peso costante.

3.4 Preparazione idrogeli a base PNIPAAm

Sono stati disciolti 2.5g di NIPAAm in 1.5ml di DMSO all'interno di una provetta di diametro 13mm e di lunghezza 100mm. Il sistema è stato mantenuto sotto agitazione ed è stato aggiunto il reticolante: per ciascun campione sono state selezionate diverse quantità di PCL-COOH e PE-TA, come riportato in *Tabella 2*, mantenendo sempre un totale di 0.66mol% rispetto alla NIPAAm. A seguito della completa solubilizzazione del sistema, sono stati aggiunti 75mg di iniziatore (0.5mol% rispetto alla NIPAAm), il TETDPPS, ed è stata mantenuta l'agitazione per altri 30 secondi circa. È stata quindi sfruttata la tecnica della polimerizzazione frontale, iniziata grazie all'ausilio di un saldatore a punta mantenuto alla temperatura di 450°C ed avvicinato alla parte superiore della provetta. Gli idrogeli così ottenuti sono stati rimossi dalla provetta, rompendola, e sono stati immersi in acqua Milli-Q per 5 giorni, effettuando il cambio dell'acqua ogni 24h, al fine di rimuovere il solvente, il monomero non reagito ed altre eventuali impurezze presenti nel prodotto. È stato preparato un ulteriore campione sfruttando la tecnica della polimerizzazione in massa: sono state mantenute le quantità di NIPAAm, solvente, reticolante ed iniziatore descritte in precedenza e la provetta contenente il sistema è stata inserita all'interno di un bagno ad acqua portato alla temperatura di 50°C per 6 ore. Anche questo campione è stato sottoposto a lavaggio

con acqua Milli-Q per 5 giorni. Tutti i campioni, a seguito del lavaggio, sono stati tagliati in dischetti e pezzi della forma desiderata e sono stati lasciati ad asciugare sottovuoto e a temperatura ambiente fino al raggiungimento di un peso costante.

Tabella 2: composizione campioni, il rapporto PE-TA/PCL indica la frazione di reticolante aggiunta alla NIPAAm, la quantità di PCL è espressa in funzione della quantità di NIPAAm

Sample code	PE-TA/PCL	Qtà. PCL [m/m%]	Qtà. PCL [mol%]	Qtà. PCL [g]	Qtà. PE-TA [mg]	Tipologia di reazione
PNIP_F	100/0	0	0	0	50	FP
PNIP_PCL_10_F	80/20	10	0.132	0.25	40	FP
PNIP_PCL_20_F	60/40	20	0.264	0.5	30	FP
PNIP_PCL_25_F	50/50	25	0.33	0.625	25	FP
PNIP_PCL_25_B	50/50	25	0.33	0.625	25	BP

3.5 Preparazione membrane a base PLA/PCL

Per la preparazione di membrane a base di PLA/PCL-COOH è stata selezionata una concentrazione di polimero del 10% m/v. È stato utilizzato PCL con geometria stellare avente braccia di massa molecolare 1000g/mol e terminali acidi. Sono state preparate membrane caratterizzate da diversi rapporti PLA/PCL-COOH, ossia 95/5, 90/10, 85/15 e 80/20. La miscela dei due polimeri è stata disciolta in 10ml di DMF ad 80°C. Le membrane sono state generate effettuando il *casting* delle soluzioni su una piastra in vetro e inserendo i sistemi all'interno di un bagno di coagulazione mantenuto a 25°C, dove sono stati lasciati per due ore. In seguito, le membrane sono state lavate con acqua per 6 ore, effettuando diversi cambi dell'acqua, quindi essiccate per 24 ore a temperatura ambiente ed in seguito poste in stufa sottovuoto a 30°C.

3.6 Prove di adsorbimento e rilascio di colorante

Sono stati ritagliati dischetti di diametro 5mm e di spessore 3mm per ciascun idrogel. I dischetti sono stati immersi in 5ml di una soluzione acquosa di pararosanilina cloridrato di concentrazione 5µg/ml per 24 ore. Successivamente, è stata analizzata la

concentrazione del surnatante tramite lo spettrometro UV-VIS Shimadzu UV-1800. La concentrazione di colorante ottenuta dalle misure di assorbanza è stata ricorretta considerando il grado di *swelling* dei campioni in esame, ossia la quantità di acqua trattenuta dagli idrogeli durante la prova di adsorbimento. Per calcolare quindi il valore corretto di concentrazione è stata utilizzata la seguente equazione:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Nella quale C_1 è la concentrazione misurata, V_1 è dato dalla differenza tra il volume iniziale (5ml) e il volume di acqua adsorbita durante il rigonfiamento del campione, C_2 è la concentrazione corretta e V_2 è pari a 5ml. Le concentrazioni sono state espresse in termini di $\mu\text{g/ml}$, mentre la quantità di colorante adsorbito da ciascun campione è stata espressa come $\mu\text{g/g}$ di materiale secco.

Gli idrogeli sono stati sottoposti a prove di rilascio di colorante, utilizzando nuovamente pararosanilina cloridrato. I dischetti sono stati immersi in 5ml di una soluzione acquosa di pararosanilina cloridrato di concentrazione $100\mu\text{g/ml}$ ed in seguito immersi in 5ml di Milli-Q. Il surnatante è stato analizzato mediante spettroscopia UV-VIS a diversi tempi al fine di seguire il rilascio del colorante nel tempo.

Prove di adsorbimento di pararosanilina cloridrato così descritte sono state effettuate anche su campioni ricavati dalle membrane PLA/PCL. Sono stati ritagliati dischetti di diametro 5mm e di spessore 1mm ed è stata seguita la stessa procedura illustrata in precedenza.

3.7 Preparazione membrane elettrofilate a base PCL/PGS

Le membrane elettrofilate sono state preparate presso il Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica e Ambientale (DICCA) dell'Università degli Studi di Genova. È stata preparata una soluzione costituita da 6.21ml di cloroformio e 0.69ml etanolo (rapporto $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}=9:1$) al 20% m/v contenente 20% di PCL-COOH (precedentemente sintetizzato e caratterizzato da quattro braccia aventi massa molecolare 2000g/mol) e 80% di PCL lineare commerciale. Nel dettaglio, sono stati addizionati 0.276g di PCL-COOH e 1.104g di PCL lineare. Inoltre, è stata preparata una soluzione costituita da 18ml

di cloroformio e 2ml di etanolo (nuovamente rapporto CHCl_3 : $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ =9:1) contenente 4g di poliglicerol sebacato (20% m/v). Entrambi i sistemi sono stati mantenuti a temperatura ambiente e sotto agitazione fino alla completa solubilizzazione.

Le due soluzioni sono state utilizzate per generare una nuova soluzione contenente le due componenti in rapporto 1:1 v/v, che è stata utilizzata per la produzione delle membrane elettrofilate a base di PCL lineare, PCL-COOH e PGS. Seguendo la stessa procedura, è stata preparata la soluzione a base di PCL lineare e PGS dalla quale sono state ricavate le membrane elettrofilate utilizzate come controllo.

Per l'elettrofilatura è stato utilizzato un apparecchio fornito da Spinbow, costituito da un alimentatore ad alta tensione Spellman, serie PCM, un dispositivo rototraslante in alluminio di lunghezza 13cm e di diametro 2mm per la raccolta delle fibre ed una pompa a siringa per il controllo della portata di alimentazione, modello KDS-100, KD Scientific, Holliston. In *Tabella 3* sono stati riportati i parametri operativi impostati per la produzione delle membrane elettrofilate.

Tabella 3: parametri operativi impostati per l'elettrofilatura di membrane a base PCL/PGS

Parametro operativo	Valore impostato
Diametro ago [mm]	1.63
Distanza ago-collettore [cm]	18.0
Flusso soluzione [ml/h]	1.10
Voltaggio [KV]	17.0
Velocità rotazionale [rpm]	500
Velocità traslazionale [mm/min]	600
Limite destro di traslazione [mm]	115
Limite sinistro di traslazione [mm]	15.0
Volume soluzione elettrofilata [ml]	2.00

3.8 Analisi comparativa di saggi colorimetrici per la quantificazione di lisozima da membrane elettrofilate a base PCL/PGS

Sono stati ritagliati pezzetti dal peso pari a circa 10mg dalle membrane elettrofilate contenenti PCL-COOH e da quelle di controllo, contenenti solo PCL lineare. È stata preparata una soluzione a base di Phosphate Buffered Saline (PBS) e lisozima di concentrazione 1mg/ml, nella quale i campioni sono stati immersi per poter effettuare analisi volte alla quantificazione della proteina immobilizzata sulla superficie delle membrane. In particolare, sono stati effettuati saggi colorimetrici: il saggio BCA ed il saggio Bradford.

Il saggio BCA si basa sulla riduzione di Cu^{2+} in Cu^+ che avviene in ambiente alcalino per azione delle proteine ed è quindi un fenomeno che ha luogo in maniera proporzionale alla quantità di proteina presente in soluzione. L'acido bicinconinico (BCA) reagisce con Cu^+ restituendo un composto color porpora. Quindi, la soluzione viene analizzata mediante uno spettrometro UV-VIS, misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 562nm, in corrispondenza della quale si ha il valore massimo di assorbimento. Il saggio Macro BCA è in grado di operare nell'intervallo di concentrazioni che va da 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mentre il saggio Micro BCA opera nell'intervallo che va da 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

È stata effettuata una prova di adsorbimento aspecifico immergendo ciascun campione in 3ml di soluzione PBS/lisozima e sfruttando il saggio Macro BCA per quantificare la proteina legata alla superficie delle membrane. In seguito, i campioni sono stati trattati con 1-etil-3-(3-dimetil-ammino-propil)carbodiimmide / N-idrossisulfo-succinimmide (ECD/NHS) per poter effettuare una prova di adsorbimento specifico. Il trattamento con ECD/NHS è un metodo utilizzato per avere adsorbimento specifico della proteina, in quanto l'immobilizzazione di proteine su superfici funzionalizzate può essere mediata da processi di *cross-linking*. I gruppi carbossilici del PCL *star-shaped*, grazie all'applicazione del protocollo ECD/NHS, sono resi maggiormente attivi nei confronti delle ammine primarie presenti nella struttura delle proteine che si desidera

immobilizzare sulla superficie delle membrane. In questo caso, il surnatante è stato analizzato mediante il saggio Micro BCA, a seguito dell'immersione di ogni campione in 3ml di soluzione PBS/lisozima.

Il saggio Bradford, invece, si basa sul legame fra il colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 e le proteine presenti in soluzione. Questo colorante in condizioni acide è protonato e presenta una colorazione tendente al marrone o al rossastro, virando al blu a seguito della deprotonazione, dovuta all'interazione con le molecole proteiche. La quantificazione delle proteine viene effettuata mediante analisi UV-VIS, misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 595nm. Questo saggio opera nell'intervallo di concentrazione che va da 100µg/ml a 1000µg/ml.

Per effettuare le analisi UV-VIS, è stato utilizzato lo strumento Tecan Infinite® 200 Pro, disponibile presso il Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Diagnostiche Integrate (DISC) dell'Università degli Studi di Genova.

3.9 Tecniche di caratterizzazione

3.9.1 Spettroscopia ¹H-NMR

La spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) è una tecnica analitica che consente di ottenere informazioni sulla struttura del campione in esame studiando il comportamento dei nuclei atomici quando sottoposti ad un forte campo magnetico. Lo strumento utilizzato è Jeol ECZ400R/S3, operante ad una frequenza di 400MHz. I campioni sono stati solubilizzati in CDCl₃ (concentrazione pari a 30mg/ml) prima di essere sottoposti all'analisi e sono stati utilizzati dei tubi di diametro 10mm. L'azzeramento della scala δ (ppm) è stato effettuato grazie all'utilizzo di tetrametilsilano (TMS) come riferimento.

3.9.2 Spettroscopia IR

La spettroscopia infrarossa è una tecnica spettroscopia di assorbimento utilizzata prevalentemente per analisi di tipo qualitativo, che consente il riconoscimento di gruppi

funzionali caratteristici del campione. Gli spettri sono stati acquisiti in modalità ATR con cristallo di diamante, utilizzando lo spettrometro Vertex 70 prodotto da Bruker. È stata analizzata la regione del medio infrarosso (MIR) che si estende da 400cm^{-1} a 4000cm^{-1} . L'acquisizione di ciascuno spettro è stata preceduta dalla correzione del *background*, quindi è stato misurato e successivamente sottratto dai risultati delle analisi lo spettro del bianco. I campioni non hanno richiesto alcuna preparazione, sono stati posti direttamente a contatto con il cristallo. I risultati ottenuti sono stati presentati in funzione del numero d'onda (cm^{-1}).

3.9.3 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Tecnica di analisi termica che, sottoponendo il campione ed il riferimento ad un programma di temperatura controllato nel tempo, consente di misurarne la differenza nei flussi termici. Viene utilizzata per misurare la temperatura e il flusso di calore associato alle transizioni di fase caratteristiche di un materiale polimerico (temperatura di fusione T_m , temperatura di cristallizzazione T_c , temperatura di transizione vetrosa T_g , entalpia di fusione ΔH_m , ecc.). Per le analisi sono stati utilizzati lo strumento Mettler Toledo DSC1 STAR^e System[®] e capsulini portacampione in alluminio con capienza $40\mu\text{l}$ e dotati di pin. I campioni sono stati pesati e ne è stata analizzata una quantità compresa tra i 4.3 e i 4.8mg. I capsulini sono stati forati prima dell'analisi per permettere la fuoriuscita di eventuali prodotti gassosi formati durante il riscaldamento. Il programma utilizzato per i campioni ha previsto un primo riscaldamento da 25°C a 150°C con un incremento di $10^\circ\text{C}/\text{min}$, seguito da un'isoterma a 150°C per un minuto e da un raffreddamento fino a -100°C operando a $-10^\circ\text{C}/\text{min}$; infine, il campione è stato nuovamente riscaldato fino a 150°C sempre con velocità di $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Le analisi sono state effettuate mantenendo il flusso di N_2 a $20\text{ml}/\text{min}$.

3.9.4 Analisi termogravimetrica (TGA)

Tecnica sperimentale capace di fornire informazioni in merito alla stabilità termica del campione in atmosfera inerte, ossidativa o riducente. Tramite la TGA è possibile

quantificare la variazione in peso di un materiale polimerico sottoposto ad un graduale e controllato aumento di temperatura. È stato utilizzato lo strumento Mettler Toledo TGA1 STAR^e System[®], costituito da un forno in grado di raggiungere i 1500°C, una bilancia analitica ed un sistema di flussaggio con due diversi gas di spurgo. Lo strumento è collegato ad un sistema di elaborazione dei dati interfacciato con un computer. I campioni sono stati pesati all'interno di un crogiolo e per ciascuno di essi è stata analizzata una quantità di materiale compresa tra 10 e 12mg. Le analisi sono state effettuate nell'intervallo che va da 30 a 800°C in atmosfera inerte grazie ad un flusso di N₂ di 80ml/min. Il riscaldamento è avvenuto con una velocità di 10°C/min ed infine la temperatura è stata mantenuta pari a 800°C per 10 minuti con flusso di O₂ di 80ml/min per consentire la pulizia del crogiolo portacampione.

3.9.5 Misure di *swelling ratio*

Il grado di rigonfiamento percentuale caratteristico degli idrogeli a base PNIPAAm preparati, è stato misurato analizzando il comportamento di dischetti di diametro 5mm e spessore 3mm immersi in acqua Milli-Q, al variare della temperatura. È stato studiato l'intervallo di temperature compreso tra 20 e 70°C e la temperatura è stata aumentata di 5°C al giorno, ad eccezione dell'intervallo 30-40°C in corrispondenza del quale la temperatura è stata variata di 2°C al giorno per permettere una migliore osservazione della *Lower Critical Solution Temperature*. I dischetti rigonfiati sono stati pesati utilizzando una bilancia analitica ogni 24 ore, quindi è stata monitorata la variazione di peso dei campioni a seguito dell'aumento di temperatura. Il grado di rigonfiamento percentuale è stato calcolato come segue:

$$SR(\%) = \frac{M_s - M_d}{M_d} \cdot 100$$

Dove M_s indica il peso del campione rigonfiato e M_d indica il peso del campione secco.

3.9.6 Spettroscopia UV-VIS

Tecnica basata sull'assorbimento, da parte del campione, di radiazioni monocromatiche nelle regioni dell'ultravioletto (UV) e del visibile (VIS). Questa tecnica di analisi consente

una determinazione quantitativa e qualitativa di sostanze contenenti gruppi cromofori all'interno di una soluzione. È stato utilizzato lo strumento Shimadzu UV-1800. Prima di procedere all'analisi dei campioni è stato necessario correggere la linea di base ed effettuare l'analisi del *background*, ossia un'analisi svolta sul solvente utilizzato per la preparazione delle soluzioni, nel nostro caso acqua Milli-Q, allo scopo di registrare uno spettro di riferimento da sottrarre poi agli spettri relativi ai campioni. Sono state utilizzate cuvette aventi un cammino ottico pari a 0.2cm ed è stato studiato l'intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 300 e 600nm, nel quale ricade la lunghezza d'onda caratteristica della pararosanilina cloridrato (539nm), in modalità di scansione lenta.

3.9.7 Analisi morfologica FE-SEM

Il microscopio elettronico a scansione (SEM) viene utilizzato per ricavare informazioni in merito alla morfologia e alla struttura della superficie del campione in esame. Le sue prestazioni sono superiori ad un comune microscopio ottico in termini di potere risolutivo e profondità di campo. Il fascio di elettroni utilizzato nella microscopia SEM, che è generato da un filamento di tungsteno per effetto Joule, viene concentrato da un sistema di lenti elettromagnetiche ed infine focalizzato e direzionato da una lente obiettivo, che consente la scansione dell'intera superficie del campione. Per effettuare l'analisi morfologica degli idrogeli e delle membrane porose a base PLA/PCL-COOH, lo strumento utilizzato è il microscopio Zeiss Supra 40 VP. I campioni sono stati ricoperti da un sottile strato di grafite utilizzando un Polaron E5100 prima di essere sottoposti all'analisi, al fine di metallizzarli e renderli conduttori. Per l'analisi superficiale delle membrane elettrofilate a base PCL/PGS, effettuata presso il Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica e Ambientale (DICCA) dell'Università degli Studi di Genova, è stato utilizzato lo strumento Hitachi 2500. Il diametro dei pori è stato misurato utilizzando il software ImageJ. I campioni sono stati liofilizzati per eliminare l'umidità in essi contenuta prima di essere sottoposti all'analisi.

3.9.8 Prove meccaniche in compressione

Sono state effettuate prove meccaniche in compressione su dischetti rigonfiati di diametro 5mm e di spessore ~3mm ricavati ritagliando gli idrogeli a base PNIPAAm con l'ausilio di una fustella. Per ogni campione sono stati preparati e testati tre dischetti. È stato misurato con precisione lo spessore di ciascun dischetto ed è stata effettuata una precompressione di entità pari al 20% dello spessore. Lo strumento utilizzato è un Instron 5542, disponibile presso il Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica e Ambientale (DICCA) dell'Università degli Studi di Genova e le prove sono state effettuate a temperatura ambiente. Il modulo elastico è stato calcolato come la pendenza del tratto iniziale della regione lineare della curva sforzo/deformazione.

3.9.9 Prove di citotossicità

Le prove di citotossicità sono state effettuate presso il Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica e Ingegneria dei sistemi (DIBRIS) dell'Università degli Studi di Genova. Sono stati ritagliati dischetti di diametro 5mm e spessore 3mm per ciascun idrogelo. Questi sono stati sterilizzati per immersione in 2ml di etanolo per 40 minuti. Successivamente, sono stati effettuati tre lavaggi con acqua deionizzata. Parallelamente è stato preparato il terreno di coltura cellulare, costituito da 26.4ml di Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 300 μ l di penicillina streptomina (PIS), 300 μ l di Glutamax e 3ml di Fetal Bovin Serum. A seguito dei lavaggi, i campioni sono stati depositati all'interno di una piastra *multiwell* da 6 pozzetti e sono stati immersi nel terreno e lasciati in incubatore a 37°C per una notte. All'interno di un'altra piastra sono state depositate le cellule (200000 cells/well) appartenenti alla linea cellulare SH-SY5Y, derivata da neuroblastoma umano. Le cellule, immerse nel terreno di coltura preparato in precedenza, sono state lasciate per 24 in incubatore a 37°C. Successivamente, i campioni sono stati posti a contatto con le cellule utilizzando dei *cell strainers* per evitare contatti diretti e poter quindi valutare il rilascio di sostanze tossiche e nocive per le cellule. Sono state acquisite immagini prima dell'esposizione delle cellule ai campioni, dopo un giorno e dopo cinque giorni dall'esposizione utilizzando un microscopio Inverted IX-51 Olympus equipaggiato con una camera digitale DP70. Dopo 5 giorni

dall'esposizione è stata valutata la proliferazione cellulare mediante il saggio MTT. Il saggio MTT si basa sulla capacità delle deidrogenasi mitocondriali delle cellule vive di ridurre il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazano, conferendo alla sostanza un colore violaceo. Il sistema viene monitorato mediante spettroscopia UV-VIS analizzando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 565nm. Dopo 6 giorni dall'esposizione la vitalità delle cellule è stata valutata mediante un saggio live/dead™ standard. Il saggio si basa sull'interazione tra due coloranti fluorescenti, la calceina AM e l'etidio omodimero, e il campione: la calceina AM è permeabile alla membrana cellulare e viene scissa dalle esterasi nelle cellule vive conferendo una colorazione verde accesa, mentre l'etidio omodimero, impermeabile alla membrana, colora di rosso le cellule in cui è stata compromessa l'integrità della membrana. Le immagini per il saggio live/dead™ sono state acquisite con un microscopio Olympus BX-51 equipaggiato con una camera digitale Hamamatsu Orca ER II. Sono state raccolte dieci immagini per ciascun campione e sono state poi analizzate ed elaborate mediante il software ImageJ.

3.9.10 Prove di degradazione a diverso pH e *fluid uptake*

Le membrane a base PCL/PGS sono state sottoposte a prove di degradazione e prove di *fluid uptake*. Sono stati ritagliati campioni di forma cilindrica (5x2mm²), che sono stati sottoposti a liofilizzazione per 24 ore utilizzando lo strumento Christ Alpha1-2 LDplus, presso il Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica e Ambientale (DICCA) dell'Università degli Studi di Genova. I campioni sono stati pesati e ne è stato analizzato il processo di degradazione in ambiente neutro e in ambiente acido. Il valore percentuale di degradazione è stato ricavato calcolando il rapporto fra la perdita in peso a seguito di due settimane di incubazione e il peso iniziale misurato per ciascun campione.

Per effettuare le prove di *fluid uptake*, sono stati preparati nuovamente campioni cilindrici 5x2mm². I campioni sono stati pesati ed immersi in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS). Ciascun campione è stato pesato dopo 30 minuti, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 24 ore a seguito dell'immersione in DPBS. Il valore di *fluid uptake* percentuale è stato calcolato seguendo l'equazione (1).

$$\text{Fluid uptake (\%)} = \frac{m_w - m_0}{m_0} \cdot 100 \quad (1)$$

Dove con m_w si indica la massa campione dopo l'immersione in DPBS e con m_0 si indica la massa campione prima dell'immersione.

3.9.11 Prove meccaniche per membrane elettrofilate a base

PCL/PGS

Sono state analizzate le proprietà meccaniche delle membrane a base PCL/PGS al fine di determinarne il modulo di Young, la resistenza alla trazione e l'allungamento percentuale. Le membrane contenenti PCL-COOH e quelle di controllo sono state ritagliate per ottenere campioni di forma rettangolare di lunghezza pari a 30mm e spessore di 2mm. È stato utilizzato lo strumento Zwick Roell Z0.5, disponibile presso il Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica e Ambientale (DICCA) dell'Università degli Studi di Genova. Il modulo elastico è stato calcolato considerando i valori della curva sforzo-deformazione compresi nell'intervallo 0.5-2% di deformazione.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Studio delle condizioni ottimali per la polimerizzazione frontale

4.1.1 Studio del solvente

La selezione del solvente è stata effettuata focalizzando l'attenzione nei confronti di alcuni requisiti, quali assenza di tossicità, solubilità in acqua, stabilità termica e chimica ed elevato punto di ebollizione. Inoltre, è necessario che esso risulti essere un buon solvente sia per il PCL *star-shaped* sia per la NIPAAm, così da consentire la realizzazione di soluzioni sufficientemente concentrate da generare una quantità di calore tale da permettere il sostenimento della propagazione del fronte di reazione. A tal fine, sono stati selezionati N-metilpirrolidone (NMP) e dimetilsolfossido (DMSO).

Sono state effettuate prove preliminari di solubilità utilizzando 1g di NIPAAm (NIP_1). Dai risultati ottenuti, riportati in *Tabella 4*, è stato possibile dedurre che utilizzando DMSO è necessario un volume minore di solvente per solubilizzare il campione rispetto al caso dell'NMP.

Tabella 4: prove solubilità per il sistema NIP_1

Sample code	Volume DMSO [ml]	Solubilizzazione DMSO	Volume NMP [ml]	Solubilizzazione NMP
NIP_1	0.3	-	0.5	-
	0.35	-	1.0	-
	0.4	-	1.2	-
	0.45	-	1.5	-
	0.5	+	2.0	+

Successivamente, è stata effettuata una prova per valutare la minima quantità di DMSO necessaria per solubilizzare 0.5g di PCL-COOH (PCL_0.5). In questo caso sono stati necessari 17.0ml di solvente ed una temperatura pari a 40°C per favorire la dissoluzione.

Tuttavia, a temperatura ambiente il polimero è precipitato nuovamente, di conseguenza è stata ottenuta una soluzione metastabile.

Infine, è stato effettuato un test per valutare la solubilità di un sistema costituito da 1g di NIPAAm e 0.5g di PCL-COOH (NIP_PCL_1_0.5) in DMSO. In questo caso è stato sufficiente l'utilizzo di 0.6ml di solvente, dimostrando che la NIPAAm esercita sul PCL un effetto da co-solvente e viceversa. I risultati relativi a queste prove sono stati riportati in *Tabella 5*.

Tabella 5: prove solubilità per i sistemi PCL_0.5 e NIP_PCL_1_0.5

Sample code	Volume DMSO [ml]	Solubilizzazione
PCL_0.5	14.5	-
	15.0	-
	15.5	-
	16.0	-
	16.5	-
	17.0	+
NIP_PCL_1_0.5	0.4	-
	0.5	-
	0.6	+

4.1.2 Studio dell'iniziatore

Al fine di determinare l'iniziatore maggiormente adatto per effettuare una reazione di polimerizzazione frontale, sono stati testati e confrontati due iniziatori radicalici comunemente utilizzati, ossia benzoilperossido (BPO) e azobisisobutirronitrile (AIBN), con due iniziatori non convenzionali, l'aliquat persolfato (APS) e il triesil tetradecil fosfonio persolfato (TETDPPS). In *Figura 13* sono illustrati la struttura chimica e il meccanismo di decomposizione di queste specie.

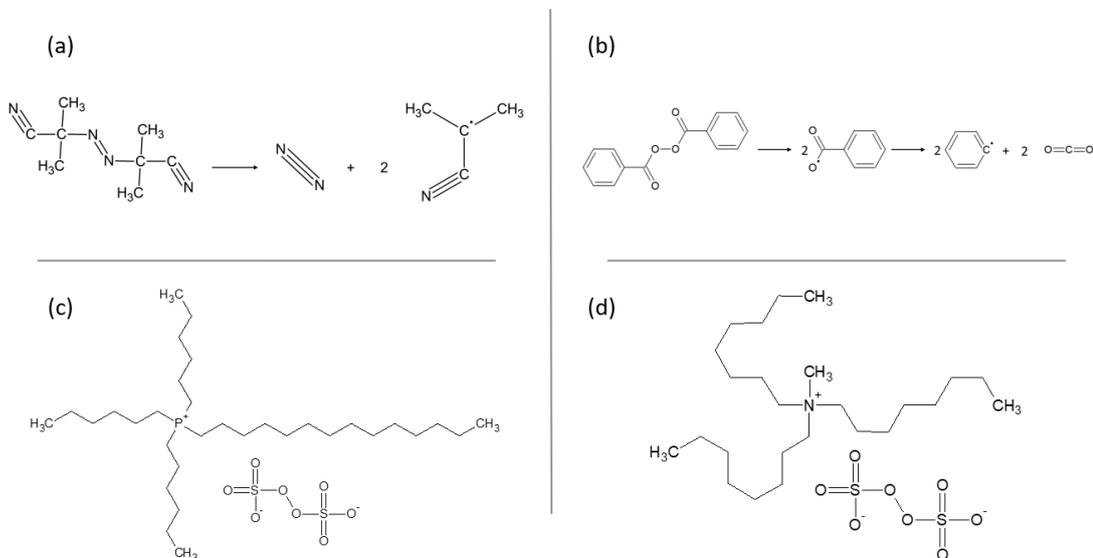


Figura 13: (a) azobisisobutirronitrile (AIBN), (b) benzoilperossido (BPO), (c) triesil tetradecil fosfonio persolfato (TETDPPS), (d) aliquat persolfato (APS)

Sono state effettuate prove su un sistema costituito da 1g di NIPAAm, 0.6ml di DMSO e 20mg di PE-TA (0.66mol% rispetto alla NIPAAm). Ciascun iniziatore è stato aggiunto al sistema in concentrazione pari a 0.25mol% rispetto alla NIPAAm, quindi sono stati utilizzati 5mg di BPO, 4mg di AIBN, 12mg di APS e 15mg di TETDPPS.

BPO e AIBN hanno portato alla formazione di bolle e difetti nel sistema, problematici in quanto possono compromettere la stabilità della polimerizzazione e le proprietà meccaniche del prodotto finale, di conseguenza sono stati esclusi. Utilizzando come iniziatore un persolfato si evita la formazione delle bolle, poiché non vengono prodotte sostanze volatili durante la decomposizione. A tal fine, sono stati utilizzati l'APS e il TETDPPS. L'aliquat persolfato, testato due volte, non ha permesso un corretto svolgimento della polimerizzazione frontale: nel primo caso, non si è formato il fronte di reazione, mentre, nel secondo caso, il fronte si è formato, ma la reazione non è stata in grado di autosostenersi. Quindi, anche questo iniziatore è stato scartato. Infine, è stata effettuata una prova con il TETDPPS, che si è dimostrato efficace, nonostante una bassa velocità di propagazione del fronte di reazione, pari a 0.231cm/min. Per ovviare a questo problema è stata raddoppiata la quantità di iniziatore; quindi, è stata utilizzata una quantità di TETDPPS pari a 0.5mol% rispetto alla NIPAAm, raggiungendo così un risultato ottimale, con una velocità di propagazione del fronte pari a 0.452cm/min.

4.1.3 Studio dei parametri caratteristici della reazione

Durante la fase di sintesi e preparazione dei campioni, sono state effettuate misure di velocità del fronte di reazione e di temperatura. In particolare, è stata misurata la temperatura massima raggiunta nel sistema, corrispondente al passaggio del fronte, mediante l'utilizzo di una termocoppia posta a circa metà dell'altezza delle diverse provette. In *Tabella 6* sono stati riassunti i risultati ottenuti.

Tabella 6: velocità di propagazione del fronte e temperatura massima misurate per i campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F

Sample code	Velocità del fronte [cm/min]	Temperatura massima [°C]
PNIP_F	0.469	135
PNIP_PCL_10_F	0.401	133
PNIP_PCL_20_F	0.318	131
PNIP_PCL_25_F	0.199	93

È stato osservato che durante la reazione di polimerizzazione del campione PNIP_F sono stati raggiunti i più elevati valori di velocità e temperatura, mentre tali valori hanno mostrato una diminuzione nei campioni contenenti PCL, in maniera direttamente proporzionale alla concentrazione di PCL-COOH presente. Infatti, non è stato possibile raggiungere concentrazioni più elevate di PCL: è stata effettuata una prova di polimerizzazione con un sistema contenente il 30% m/m di PCL rispetto alla PNIPAAm, ma non è stato possibile portare a termine la realizzazione del campione, in quanto la propagazione del fronte non è stata in grado di autosostenersi. Di conseguenza, è stato stabilito il 25% m/m come percentuale massima di PCL-COOH utilizzabile.

Per poter verificare il corretto svolgimento di tale reazione, è stata registrata la posizione del fronte in funzione del tempo. In *Figura 14* è stato illustrato, a titolo esemplificativo, l'andamento così ottenuto per il campione PNIP_F.

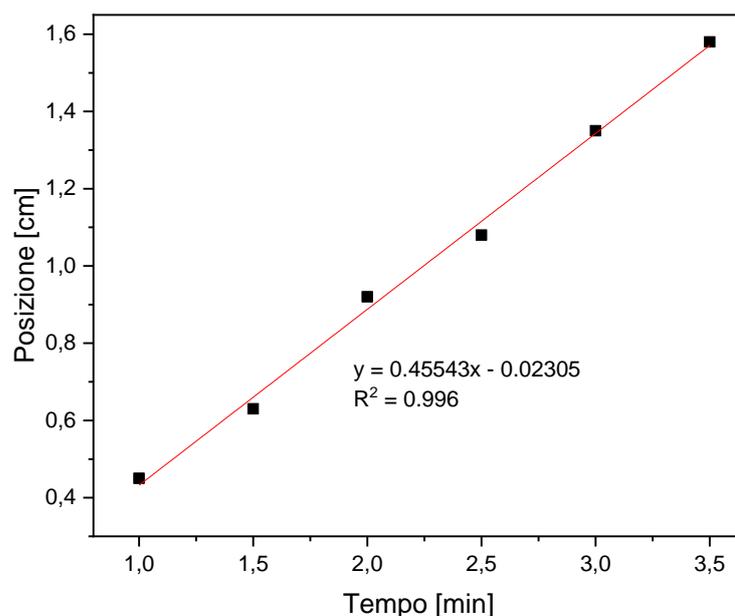


Figura 14: andamento della velocità di propagazione del fronte per il campione PNIP_F

La velocità di propagazione del fronte di reazione si è dimostrata costante nel tempo, di conseguenza è stato possibile confermare che la reazione di polimerizzazione attuata per la preparazione degli idrogeli corrisponde effettivamente ad una polimerizzazione frontale⁶².

4.1.4 Confronto tra campioni sintetizzati tramite polimerizzazione frontale e polimerizzazione in massa

Al fine di verificare l'influenza del tipo di polimerizzazione, frontale e massa, sulla morfologia di blend a base di PNIPAAm e PCL-COOH, è stato preparato tramite polimerizzazione in massa un campione contenente il 25% m/m di PCL-COOH rispetto alla PNIPAAm (PNIP_PCL_25_B), quindi analogo in termini di composizione al campione PNIP_PCL_25_F. Nel caso del processo in massa, come riportato in letteratura⁶⁸, per poter ottenere il materiale finale è stato necessario mantenere una temperatura di 50°C e lasciar reagire il sistema per circa 6 ore. In *Figura 15* sono state riportate due immagini di confronto fra i due campioni e le rispettive micrografie SEM.

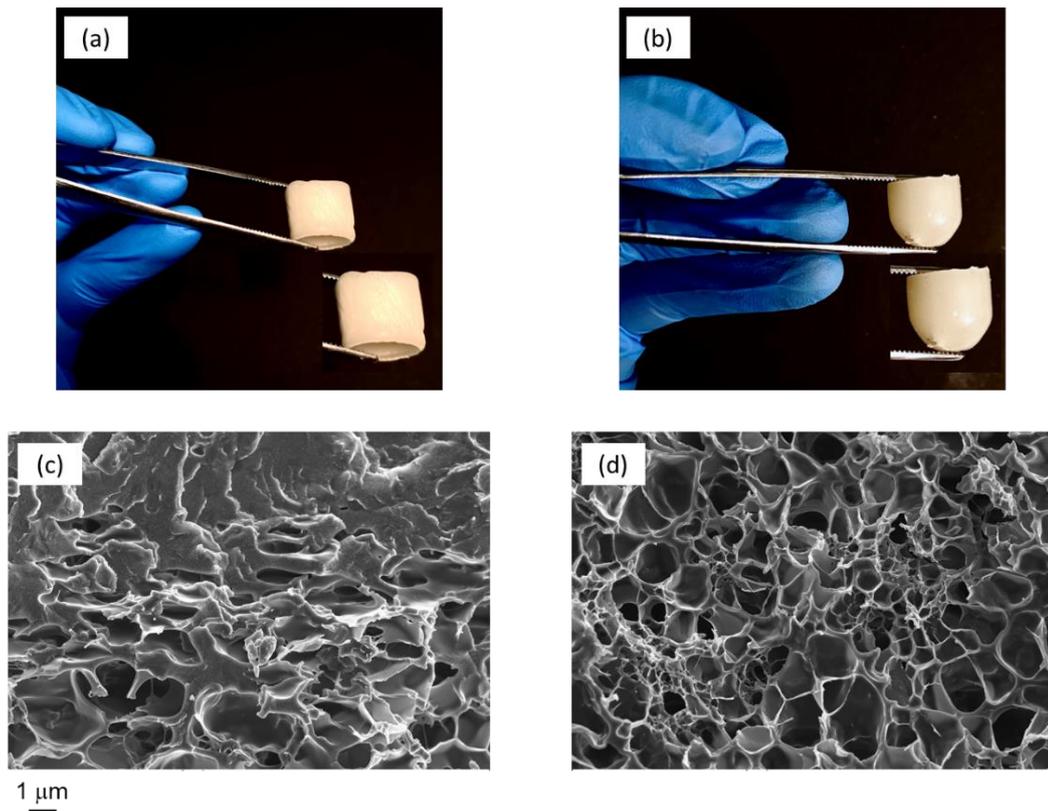


Figura 15: (a) fotografia PNIP_PCL_25_B, (b) fotografia PNIP_PCL_25_F, (c) micrografia SEM PNIP_PCL_25_B, (d) micrografia SEM PNIP_PCL_25_F

Dalle immagini 15.a e 15.b, ottenute fotografando i campioni a seguito del lavaggio in acqua Milli-Q e successivo essiccamento, è possibile osservare una differenza a livello superficiale: il campione PNIP_PCL_25_B presenta rugosità ed irregolarità sulla superficie, mentre il campione PNIP_PCL_25_F si presenta liscio ed omogeneo. Tali differenze sono rese ancora più evidenti dalle micrografie SEM riportate in Figura 15.c e 15.d. L'idrogelo sintetizzato mediante polimerizzazione frontale mostra una morfologia spugnosa e piuttosto regolare, inoltre non sono distinguibili domini di PCL-COOH, quindi il polimero risulta ben disperso nella matrice di PNIPAAm. Al contrario, la micrografia relativa al campione PNIP_PCL_25_B mostra una porosità molto eterogenea, con pori di forme e dimensioni irregolari. Inoltre, per tale campione è osservabile una zona priva di porosità, una regione compatta probabilmente legata alla presenza di PCL ed indice del fatto che, sfruttando la polimerizzazione in massa, non è stato possibile disperdere efficacemente il poliestere.

Di conseguenza, la polimerizzazione frontale si è dimostrata una tecnica di sintesi più efficiente per la preparazione degli idrogeli, portando ad una migliore dispersione del PCL *star-shaped* nella matrice di PNIPAAm poiché, grazie all'elevata velocità della reazione, il sistema viene congelato ed il PCL rimane quindi bloccato, cioè disperso come nella soluzione. Inoltre, anche i ridotti tempi di reazione ed il risparmio dal punto vista energetico, sono aspetti vantaggiosi che portano nuovamente a preferire la polimerizzazione frontale rispetto alla sintesi in massa.

4.2 Caratterizzazione FT-IR per idrogeli a base PNIPAAm

In *Figura 16* è riportato lo spettro IR registrato per il campione PNIP_F.

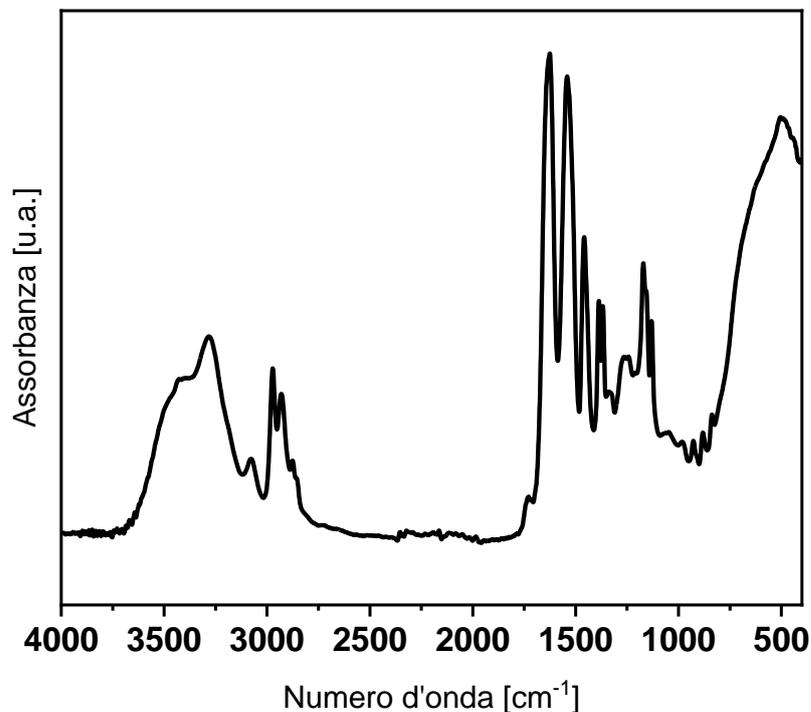


Figura 16: spettro FT-IR relativo al campione PNIP_F

I risultati ottenuti si sono dimostrati in linea con quanto riportato in letteratura⁶⁹, poiché è possibile osservare tutti i picchi caratteristici della PNIPAAm: a 3410cm⁻¹ è presente una banda larga dovuta allo *stretching* dei gruppi O-H ascrivibile all'acqua adsorbita, a 3283cm⁻¹ si ha un picco dovuto allo *stretching* del legame N-H, a 2973cm⁻¹ si osserva il picco caratteristico dello *stretching* del legame C-H, mentre a 2877cm⁻¹ è osservabile il

picco relativo allo *stretching* del legame C-H del gruppo isopropile; a numeri d'onda inferiori, sono visibili la banda dell'ammide I a 1626cm^{-1} e la banda dell'ammide II a 1542cm^{-1} , mentre a 1386cm^{-1} e 1369cm^{-1} si osservano picchi relativi allo *stretching* del legame C-H del gruppo $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ed infine a 1164cm^{-1} è visibile la banda dell'ammide III.

In *Figura 17* è mostrato il confronto fra gli spettri registrati per i campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F e PNIP_PCL_25_F.

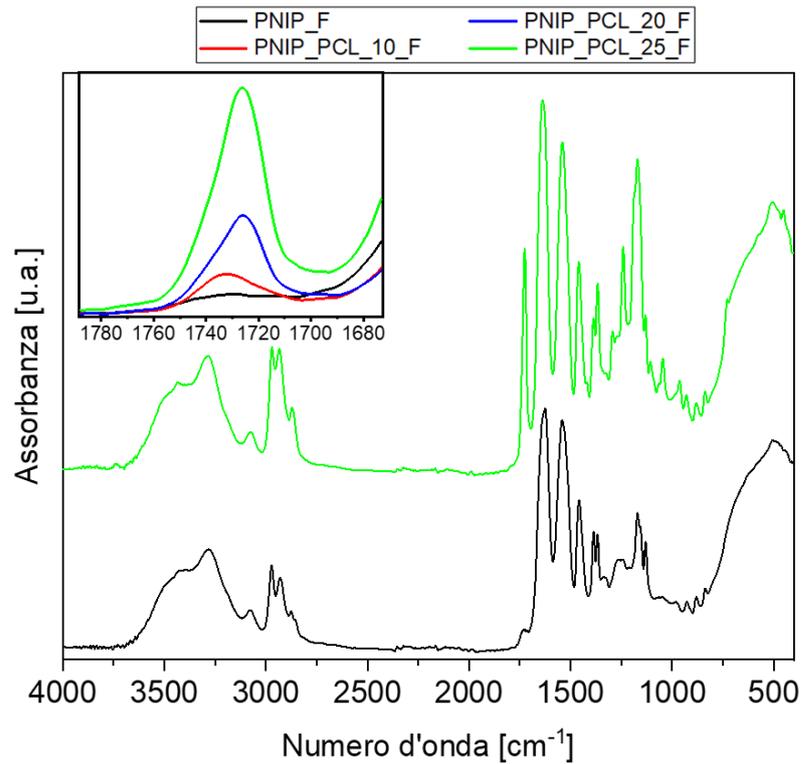


Figura 17: spettri FT-IR relativi ai campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F

Gli spettri relativi agli idrogeli contenenti PCL-COOH presentano picchi aggiuntivi rispetto al PNIPAAm tal quale, attribuibili al PCL stesso. In particolare, l'attenzione è stata focalizzata sul picco presente a 1725cm^{-1} , relativo allo *stretching* del legame C=O, la cui intensità aumenta all'aumentare del contenuto di PCL. Inoltre, ad una maggiore concentrazione di PCL corrisponde una diminuzione del picco a 3410cm^{-1} , riconducibile allo *stretching* del legame O-H, in quanto il PCL-COOH, idrofobo e semicristallino, tende a sfavorire l'adsorbimento e le interazioni con molecole d'acqua. Il campione PNIP_PCL_25_F rappresenta un'eccezione per il segnale restituito a 3410cm^{-1} , più intenso anche di quello mostrato dal gelo PNIP_F: questo campione non è stato

sottoposto ad un essiccamento abbastanza efficace prima di essere analizzato all'FT-IR, al suo interno è rimasta umidità e questo ha causato diverse discrepanze nel suo spettro se confrontato agli spettri misurati per gli altri geli.

Inoltre, al fine di evidenziare la frazione di PCL-COOH legata covalentemente alla PNIPAAm, i campioni sono stati sottoposti ad un lavaggio con diclorometano (DCM) per 17h. I campioni lavati in DCM ed essiccati per 24h sotto cappa e per 72h in stufa sottovuoto a temperatura ambiente, sono stati analizzati e ne è stato registrato lo spettro FT-IR. In *Figura 18* sono riportati i confronti fra il picco osservabile a 1725cm^{-1} prima e dopo il lavaggio in DCM per ciascun campione.

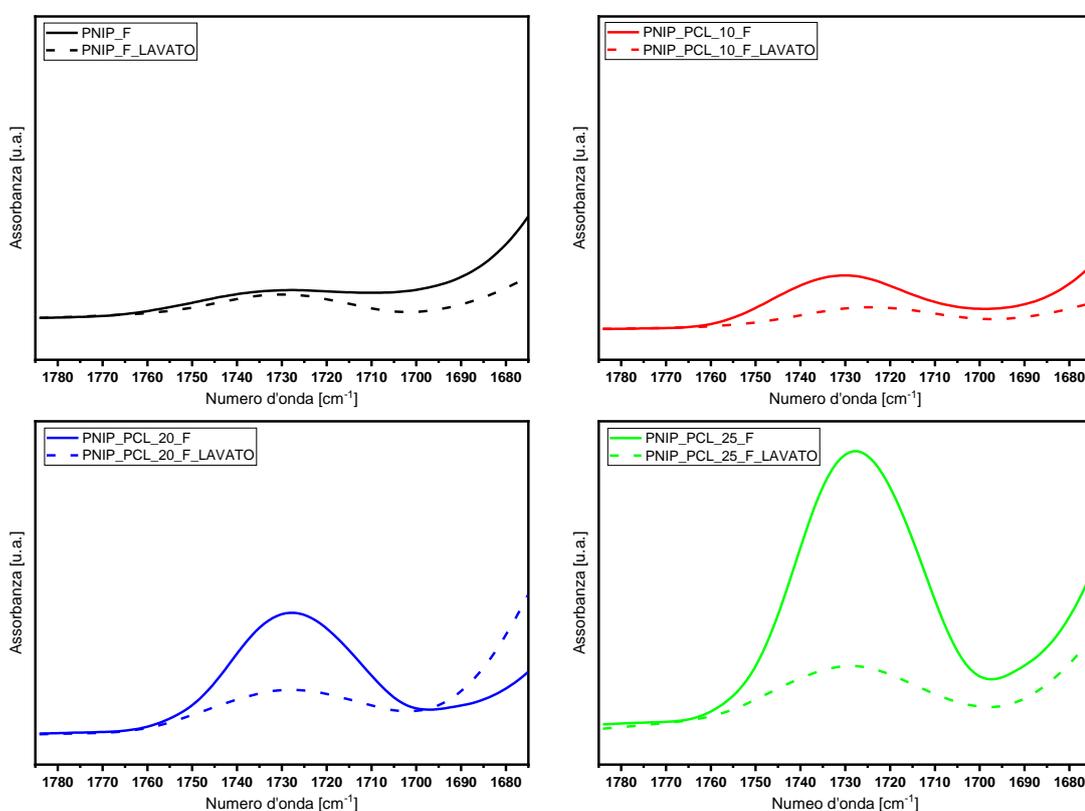


Figura 18: picco a 1725cm^{-1} prima e dopo il lavaggio in DCM per i campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F

Analizzando gli spettri, si osserva una diminuzione nell'intensità del picco per tutti i campioni, ad eccezione del PNIP_F, che non presenta alcun picco relativo allo *stretching* del gruppo C=O. Per i campioni PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F e PNIP_PCL_25_F è stata misurata l'area sottesa al picco osservabile nello spettro registrato prima del lavaggio. Quindi, è stata costruita una retta di calibrazione riportando l'area misurata in

funzione della concentrazione di PCL-COOH. Successivamente, sono stati presi in esame gli spettri relativi ai campioni in seguito al lavaggio ed è stata misurata l'area sottesa al picco. Mediante la curva di calibrazione, è stato quindi possibile risalire alla quantità di PCL rimasto legato all'interno degli idrogeli dopo il trattamento con DCM. In *Tabella 7* sono riportati i risultati.

Tabella 7: risultati confronto prima e dopo il lavaggio in DCM per i campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F

Sample code	PCL-COOH prima del lavaggio [m/m%]	PCL-COOH dopo il lavaggio [m/m%]	Variazione qtà. PCL-COOH [m/m%]	Frazione PCL-COOH legata [%]
PNIP_F	0	0	0	0
PNIP_PCL_10_F	10	2	-8	20
PNIP_PCL_20_F	20	5	-15	25
PNIP_PCL_25_F	25	7.5	-17.5	30

È stato quindi possibile dimostrare che non tutto il PCL-COOH presente nel sistema ha partecipato alla formazione di un copolimero con la PNIPAAm, bensì la maggior parte di esso non risulta essere legato covalentemente alla matrice di PNIPAAm. Una rappresentazione schematica della struttura degli idrogeli è riportata in *Figura 19*.

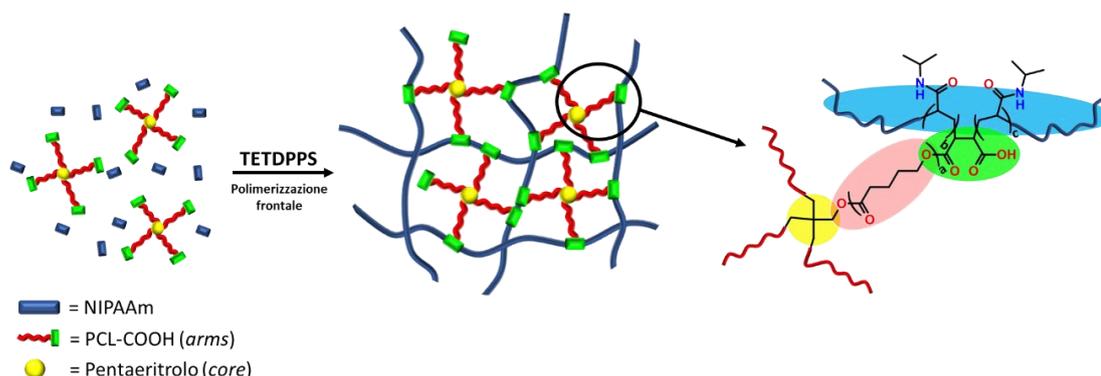


Figura 19: rappresentazione schematica della struttura degli idrogeli preparati per polimerizzazione frontale

Dall'immagine qui riportata è possibile osservare come non tutti i gruppi maleici terminali del PCL-COOH siano impegnati nella formazione di legami covalenti con la PNIPAAm, bensì rimangano liberi.

4.3 Analisi termiche (DSC, TGA) per idrogeli a base PNIPAAm

Gli idrogeli sono stati caratterizzati effettuando analisi termiche mediante calorimetria a scansione differenziale (DSC) e analisi termogravimetrica (TGA). In *Figura 20* sono stati riportati i termogrammi relativi al raffreddamento e al secondo riscaldamento dei geli, mentre in *Figura 21* sono stati riportati i termogrammi del PCL-COOH, che sono stati utilizzati per effettuare un confronto con i campioni.

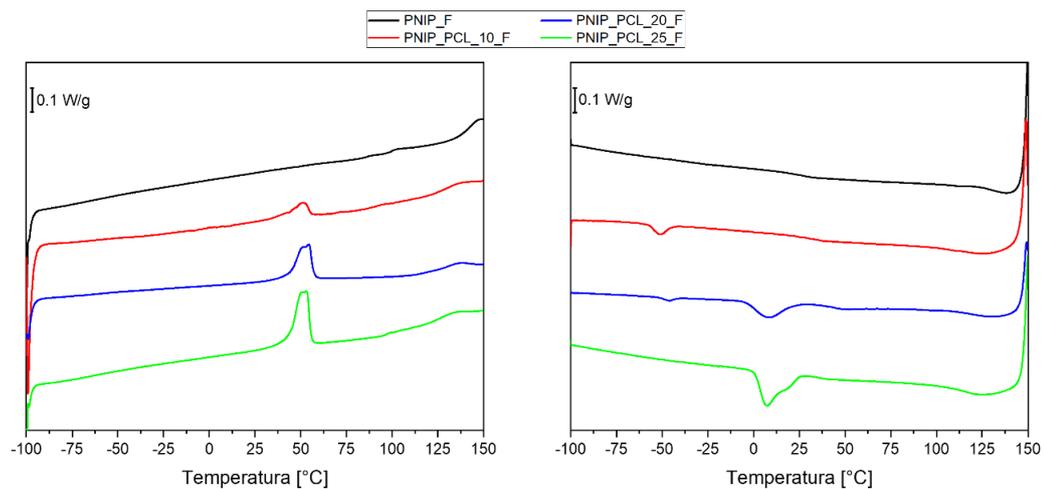


Figura 20: termogrammi relativi al secondo riscaldamento (SX) e al raffreddamento (DX) per i campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F

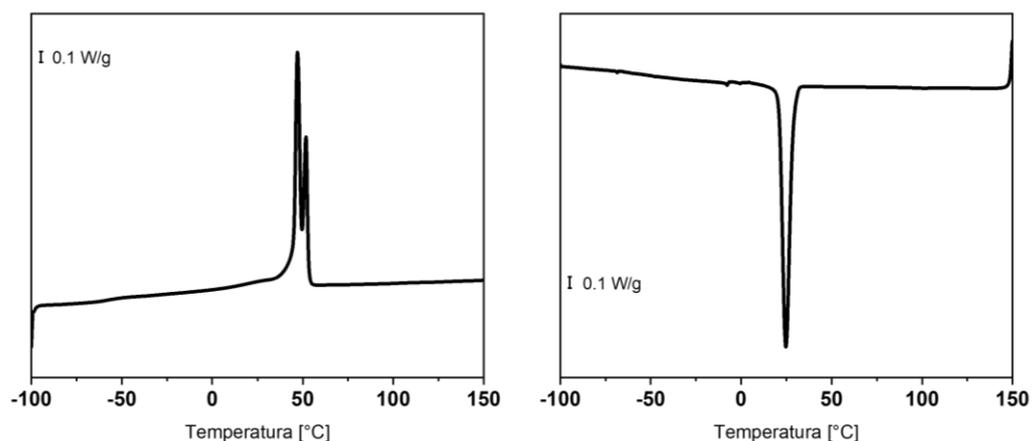


Figura 21: termogrammi relativi al secondo riscaldamento (SX) e al raffreddamento (DX) per il PCL-COOH

In *Tabella 8* sono stati riassunti i valori di temperatura ed entalpia associati alle transizioni di fase caratteristiche dei campioni in esame. In tabella vengono riportati i

valori di entalpia di cristallizzazione e fusione ricalcolati in funzione della frazione in massa di PCL-COOH, come riportato nelle equazioni (2) e (3):

$$\Delta H_c^{\text{cor}} = \frac{\Delta H_c}{\Phi_{\text{PCL-COOH}}} \quad (2)$$

$$\Delta H_m^{\text{cor}} = \frac{\Delta H_m}{\Phi_{\text{PCL-COOH}}} \quad (3)$$

ΔH_c e ΔH_m rappresentano i valori di entalpia di cristallizzazione e fusione riportati dallo strumento e $\Phi_{\text{PCL-COOH}}$ rappresenta la frazione in massa di PCL-COOH. Inoltre, è stato calcolato il grado di cristallinità per ciascun campione, seguendo l'equazione (4):

$$\chi_c(\%) = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0 \cdot \Phi_{\text{PCL-COOH}}} \cdot 100 \quad (4)$$

Con ΔH_m^0 si indica l'entalpia di fusione associata ad un campione di PCL completamente cristallino ed il suo valore è pari a 139J/g.

Tabella 8: proprietà termiche e grado di cristallizzazione per i campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F

Sample code	T _g [°C]	ΔH _c ^{cor} [J/g]	T _c [°C]	ΔH _m ^{cor} [J/g]	T _m [°C]	χ _c [%]
PNIP_F	140	-	-	-	-	-
PNIP_PCL_10_F	135	-20	-51	44	51	31
PNIP_PCL_20_F	121	-30	-45 / 8	46	54	33
PNIP_PCL_25_F	115	-45	7	52	53	38
PCL-COOH	-	-71	25	70	47	50

Per il campione PNIP_F si osserva una temperatura di transizione vetrosa (T_g) pari a 140°C, in accordo con quanto riportato in letteratura⁷⁰ per la PNIPAAm. Gli idrogeli mostrano T_g decrescenti all'aumentare della quantità di PCL-COOH presente: si arriva ad una temperatura pari a 115°C per il campione PNIP_PCL_25_F, ossia l'idrogelo caratterizzato dalla maggiore percentuale di PCL, e questo dimostra una parziale miscibilità fra i due polimeri coinvolti. Infatti, è possibile ipotizzare che durante il processo di polimerizzazione, il copolimero formatosi tra PCL e PNIPAAm sia stato in

grado di agire come compatibilizzante posizionandosi all'interfaccia fra le due fasi polimeriche.

Il grado di cristallinità percentuale, nullo per il campione PNIP_F, aumenta per gli idrogeli più ricchi in PCL, avvicinandosi al valore osservato per il PCL-COOH tal quale (50%). Tuttavia, tale valore non viene mai raggiunto, poiché, come dimostrato mediante l'analisi FT-IR, parte del PCL viene coinvolto nella formazione di un copolimero e di conseguenza viene limitata la mobilità delle catene, che non riescono ad organizzarsi ed ordinarsi in maniera tale da permettere la cristallizzazione. Pertanto, è possibile ipotizzare che la cristallinità sia dovuta soltanto alla frazione di PCL non legato covalentemente alla PNIPAAm.

È stato quindi calcolato il grado di cristallinità percentuale seguendo l'equazione (4) e considerando soltanto la frazione di PCL-COOH non legato covalentemente alla PNIPAAm, riportata in *Tabella 7*. In *Tabella 9* sono stati riportati i risultati.

Tabella 9: grado di cristallinità ricalcolato per i campioni PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F

Sample code	Frazione PCL-COOH non legata [%]	χ_c [%]
PNIP_PCL_10_F	80	39
PNIP_PCL_20_F	75	44
PNIP_PCL_25_F	70	54

Per tutti i campioni i valori di χ_c (%) sono più elevati rispetto a quelli calcolati in precedenza dai dati ricavati dai termogrammi. Il campione PNIP_PCL_25_F mostra un grado di cristallinità addirittura superiore al PCL-COOH tal quale (χ_c (%)=50%). La causa è da ricercarsi probabilmente nelle approssimazioni fatte per effettuare questo calcolo a partire da misure FT-IR.

Analizzando il termogramma relativo al raffreddamento si osserva un comportamento particolare. Il campione PNIP_PCL_10_F presenta un picco esotermico, ossia un picco di cristallizzazione, alla temperatura di -51°C, mentre il campione PNIP_PCL_25_F presenta

una temperatura di cristallizzazione pari a 7°C, più vicina alla T_c del PCL-COOH (25°C). Di conseguenza, una maggiore percentuale di PCL comporta un incremento nella temperatura di cristallizzazione. Tuttavia, il campione PNIP_PCL_20_F presenta due picchi di cristallizzazione, a -45°C e 8°C. Questo comportamento peculiare viene generalmente osservato nel caso di polimeri semicristallini distribuiti in domini di piccole dimensioni, capaci di cristallizzare a seguito di un fenomeno di nucleazione che ha luogo solo per elevati sottoraffreddamenti. Nel caso degli idrogeli analizzati, teoricamente privi di impurezze a livello dei domini cristallini e nei quali il PCL risulta finemente disperso nella matrice di PNIPAAm, la cristallizzazione è controllata da un fenomeno di nucleazione omogenea che si innesca a livello del massimo sottoraffreddamento raggiungibile, ossia per temperature prossime alla T_g . Quindi, i valori di temperatura di cristallizzazione osservati dipendono non soltanto dalla concentrazione di PCL, ma anche dalla dimensione dei domini cristallini.

La stabilità termica dei geli è stata analizzata mediante TGA: le curve sono state riportate in *Figura 22*, mentre i risultati sono stati riassunti in *Tabella 10*.

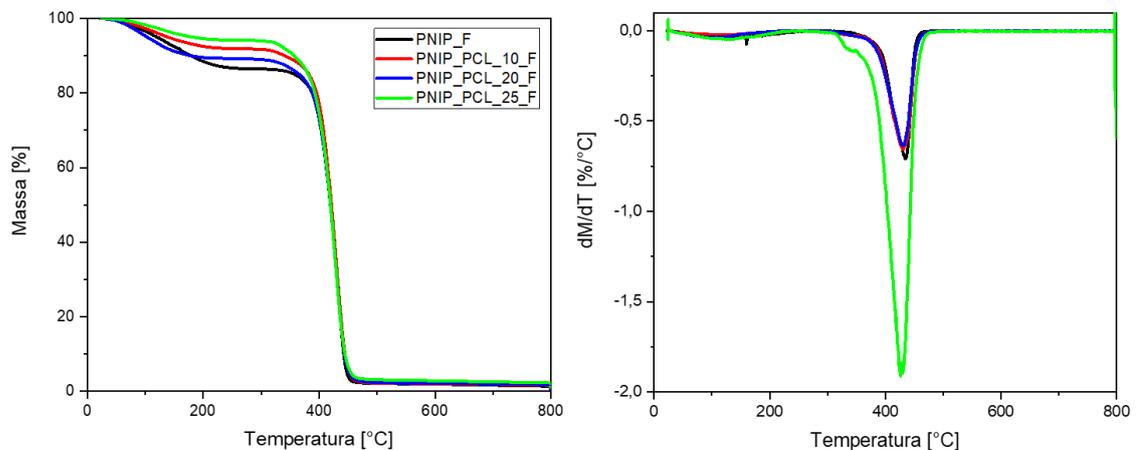


Figura 22: curve TGA (SX) e DTG (DX) relative ai campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F

Tabella 10: confronto dei dati relativi alle curve TGA e DTG per i campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F

Sample code	T _{onset} [°C]	T _{max1} [°C]	Δm ₁ [%]	T _{max2} [°C]
PNIP_F	80	160	13	435
PNIP_PCL_10_F	88	121	8	430
PNIP_PCL_20_F	71	106	11	431
PNIP_PCL_25_F	107	128	6	426

Con T_{onset} si indica la temperatura alla quale si osserva una perdita di massa pari al 2%, con Δm₁ si indica la variazione in massa percentuale associata al primo fenomeno degradativo, mentre con T_{max1} e T_{max2}, ricavate dalla curva DTG, si indicano le temperature alle quali si ha la massima velocità di perdita in peso relativa al primo e al secondo fenomeno di degradazione, rispettivamente.

Come riportato in letteratura, la perdita in massa iniziale, al di sotto dei 200°C, può essere legata alla perdita di molecole d'acqua legate tramite legami ad idrogeno alle catene di PNIPAAm^{71,72}. Gli idrogeli più ricchi in PCL mostrano una perdita in massa minore, testimoniando l'effetto del poliestere che, a causa della sua idrofobicità e cristallinità, rende più difficoltosa l'interazione con l'acqua. L'unica eccezione è rappresentata dal campione PNIP_PCL_20_F, il quale presenta un Δm₁=11% contro l'8% del PNIP_PCL_10_F, ma tale risultato potrebbe essere dovuto semplicemente ad un essiccamento poco efficace o ad una esposizione troppo prolungata del campione all'aria prima della misura, con conseguente adsorbimento di umidità.

Il secondo fenomeno di degradazione è legato alla scissione dei legami C-C delle catene di PNIPAAm. Per il campione PNIP_F è stata individuata una T_{max2} pari a 435°C, in accordo con quanto riportato in letteratura⁷³. Con l'aumentare della quantità di PCL-COOH nei geli, la temperatura T_{max2} diminuisce, in quanto influenzata dal fenomeno degradativo di β-scissione caratteristico del PCL, che avviene a circa 425°C⁷⁴.

4.4 Misure di *swelling ratio* per idrogeli a base PNIPAAm

In Figura 23 sono stati riportati i risultati relativi alle misure del grado di *swelling* degli idrogeli, espressi come *swelling ratio* percentuale (SR%) in funzione della temperatura.

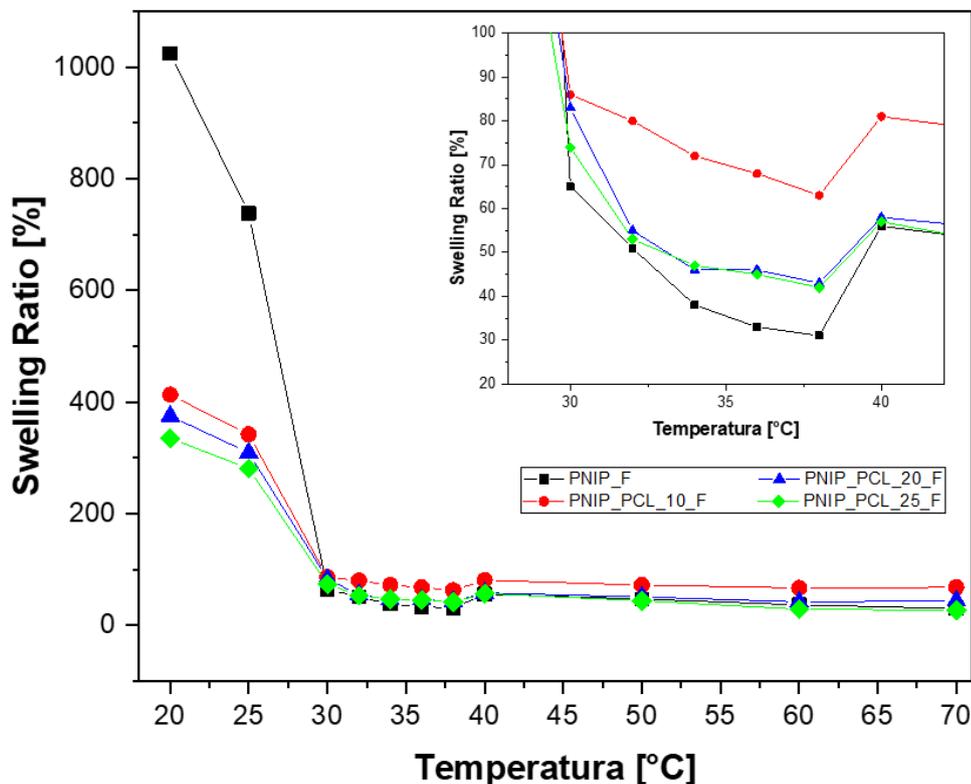


Figura 23: grado di *swelling* % in funzione della temperatura per i campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F

I risultati ottenuti si sono dimostrati in linea con le aspettative: la presenza di PCL-COOH ha portato ad una diminuzione del grado di *swelling* sempre più marcata all'aumentare della concentrazione di PCL che, essendo un polimero idrofobo e semicristallino, ha limitato la capacità della PNIPAAm di interagire con l'acqua. Tuttavia, i campioni presentano elevati valori di *swelling ratio* che mostrano una significativa diminuzione con l'aumentare della temperatura, quindi è stato possibile confermare il comportamento termoresponsivo degli idrogeli, anche in presenza di PCL.

Analizzando i risultati relativi al campione PNIP_F è stata osservata una rilevante diminuzione del grado di *swelling* ad una temperatura di circa 32°C, corrispondente alla *Lower Critical Solution Temperature* (LCST). Per temperature superiori alla LCST la

PNIPAAm assume un comportamento idrofobico e le catene collassano, conferendo al polimero una configurazione globulare⁵⁶.

È stato osservato un comportamento analogo anche per gli idrogeli contenenti PCL-COOH, nei quali la LCST è rimasta inalterata. Il PCL, quindi, ha influenzato la capacità di rigonfiamento della PNIPAAm, ma non ha causato cambiamenti nella struttura chimica delle catene e di conseguenza non ha avuto alcun effetto nei riguardi delle interazioni del polimero con l'ambiente circostante. Ciò è causato dal fatto che, come dimostrato grazie alle analisi FT-IR, soltanto una minima parte del PCL è stato in grado di legarsi covalentemente alla PNIPAAm, e per poter ottenere una modifica significativa della LCST è necessaria la formazione di copolimeri, come osservato in precedenza nel caso dei copolimeri PNIPAAm/metilcellulosa⁷⁵ e PNIPAAm/acido acrilico⁷⁶.

4.5 Analisi morfologica (FE-SEM) di idrogeli a base PNIPAAm

È stata analizzata la morfologia superficiale dei campioni mediante l'utilizzo di un microscopio elettronico a scansione. In *Figura 24* sono riportate le micrografie SEM relative alle sezioni dei campioni sottoposti a liofilizzazione.

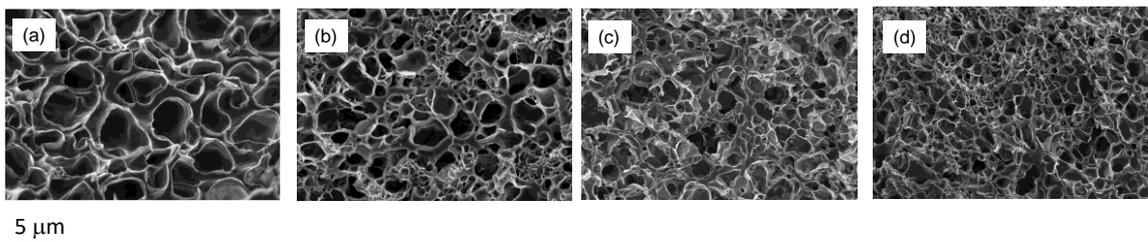


Figura 24: micrografie SEM (a) PNIP_F, (b) PNIP_PCL_10_F, (c) PNIP_PCL_20_F, (d) PNIP_PCL_25_F

Si nota come tutti i campioni mostrino una struttura spugnosa, sebbene siano evidenti alcune differenze tra di essi. Il campione PNIP_F presenta una struttura porosa molto omogenea, costituita da pori piuttosto grandi, di diametro circa $4.1 \pm 1.3 \mu\text{m}$. I campioni PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F e PNIP_PCL_25_F mostrano invece una morfologia più disomogenea, con pori più piccoli rispetto alla PNIPAAm tal quale e aventi varie forme e dimensioni. Nel dettaglio si ha: PNIP_PCL_10_F $2.6 \pm 0.8 \mu\text{m}$, PNIP_PCL_20_F $2.3 \pm 0.7 \mu\text{m}$,

PNIP_PCL_25_F $1.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$. La dimensione dei pori diminuisce all'aumentare del contenuto di PCL e questo fornisce un'ulteriore spiegazione all'andamento del grado di *swelling* precedentemente analizzato: la capacità di rigonfiare dei geli non è influenzata soltanto dal carattere idrofobo e semicristallino del poliestere, bensì anche la morfologia gioca un ruolo importante, in quanto la ridotta dimensione dei pori incrementa la difficoltà nel processo di adsorbimento dell'acqua.

Inoltre, dalle micrografie è stata constatata l'assenza di aggregati o domini di grandi dimensioni di PCL-COOH, quindi è stato possibile confermarne l'efficiente dispersione nella matrice di PNIPAAm, ottenuta grazie all'utilizzo della tecnica di polimerizzazione frontale per la preparazione degli idrogeli.

4.6 Prove meccaniche in compressione per idrogeli a base PNIPAAm

Le proprietà meccaniche dei campioni sono state analizzate in termini di modulo elastico effettuando prove in compressione. In *Figura 25* ed in *Tabella 11* sono stati riportati i risultati.

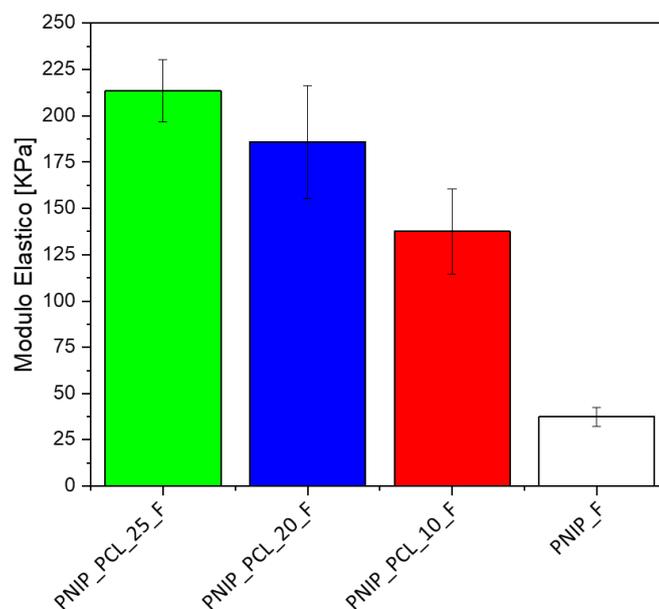


Figura 25: risultati prove meccaniche in compressione per i campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F

Tabella 11: modulo elastico e deviazione standard per i campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F

Sample code	Modulo elastico [KPa]	Deviazione standard
PNIP_F	37	5
PNIP_PCL_10_F	137	23
PNIP_PCL_20_F	186	30
PNIP_PCL_25_F	214	17

I valori di modulo elastico hanno dimostrato l'effetto rinforzante del PCL-COOH nei confronti della PNIPAAm. Il campione PNIP_F ha restituito un modulo elastico pari a 37 ± 3 KPa, mentre il campione PNIP_PCL_25_F, il più ricco in PCL, presenta un modulo elastico di 214 ± 9 KPa, quindi c'è stato un forte miglioramento nella resistenza alla compressione. I risultati ottenuti si dimostrano in accordo con quanto riportato in letteratura da Haq e collaboratori⁷⁷, i quali hanno esaminato le proprietà meccaniche di idrogeli a base PNIPAAm e le relative variazioni associate a modifiche nel sistema (concentrazione di monomero, condizioni operative, concentrazione di agente reticolante, ecc.).

4.7 Prove di adsorbimento e rilascio colorante per idrogeli a base PNIPAAm

Gli idrogeli sono stati sottoposti a prove di adsorbimento di pararosanilina cloridrato, una molecola organica utilizzata come modello poiché in grado di mimare il comportamento di farmaci ed agenti inquinanti, caratterizzati da gruppi amminici. Al fine di dimostrare il potenziale utilizzo dei campioni come sistemi adibiti al rilascio controllato di farmaci, è stata studiata la loro capacità di adsorbire ed in seguito rilasciare nel tempo il colorante.

Per la prova di adsorbimento i campioni sono stati immersi in una soluzione acquosa di concentrazione $5 \mu\text{g/ml}$ ed è stata analizzata la concentrazione del surnatante dopo 24

ore, misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 539nm mediante lo spettrometro UV-VIS. I valori di concentrazione sono stati corretti considerando la capacità di rigonfiamento di ciascun gel e in *Tabella 12* sono stati riportati i risultati. In *Figura 26* sono stati riportati invece lo spettro UV-VIS misurato ed un istogramma riassuntivo della concentrazione di colorante adsorbita.

Tabella 12: risultati prove di adsorbimento del colorante pararosanilina cloridrato per i campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F ed il controllo (CTRL)

Sample code	Peso secco [mg]	Assorbanza 24h	Swelling ratio [%]	Concentrazione 24h [µg/ml]	Qtà. adsorbita [µg/g secco]
CTRL	-	1.142	-	-	-
PNIP_F	9.1	1.186	1024	5.155	0
PNIP_PCL_10_F	15.5	1.162	413	5.098	3.7
PNIP_PCL_20_F	11.9	1.099	375	4.847	68
PNIP_PCL_25_F	20.5	1.048	335	4.578	79

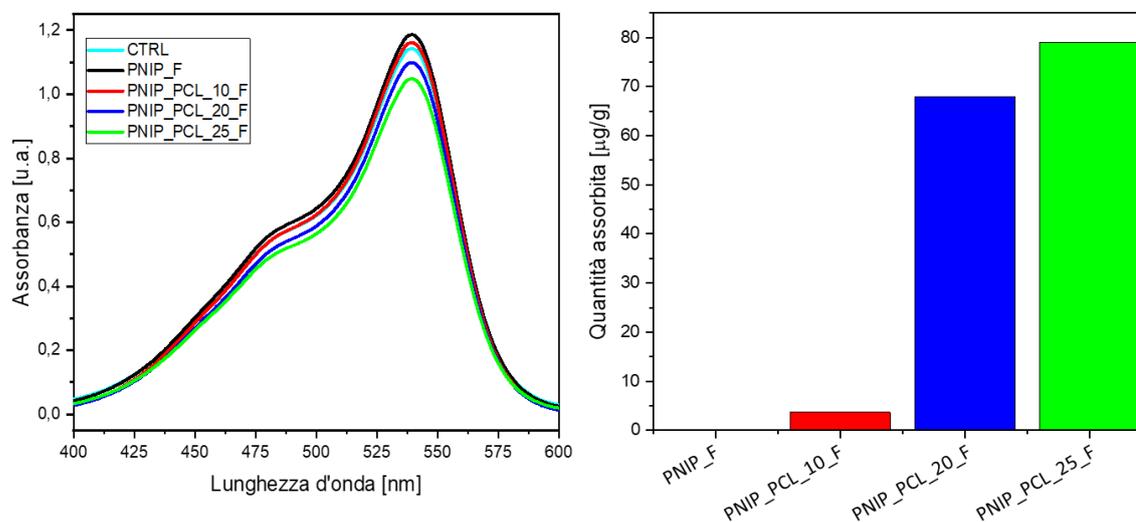


Figura 26: a SX spettro UV-VIS per i campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F ed il controllo (CTRL), a DX quantità di colorante adsorbita dai campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F

Dai risultati ottenuti si nota come il campione PNIP_F non riesca ad interagire e quindi ad adsorbire il colorante, restituendo valori di assorbanza pressoché invariati rispetto alla soluzione di partenza (CTRL). La concentrazione di colorante adsorbito aumenta

invece all'aumentare della quantità di PCL-COOH presente nei geli, testimoniando l'avvenuta interazione fra i gruppi carbossilici ionizzati ed il colorante, legati tra loro attraverso interazioni ioniche.

In seguito, è stata analizzata la capacità degli idrogeli di rilasciare il colorante in maniera controllata nel tempo. A tal fine, è stata effettuata una prova di rilascio utilizzando una soluzione acquosa di pararosnilina cloridrato con concentrazione pari a 100µg/ml. I campioni sono stati immersi nella soluzione per 24h ed in seguito in 5ml di acqua Milli-Q; il surnatante è stato quindi analizzato a diversi tempi misurando nuovamente l'assorbanza in corrispondenza di 539nm. In questo caso è stato necessario utilizzare una soluzione maggiormente concentrata per poter garantire una risposta strumentale attendibile anche dopo brevi periodi di rilascio. In *Figura 27* sono stati riportati gli andamenti relativi alla cinetica di rilascio di ciascun campione, mentre in *Figura 28* viene riportato un istogramma nel quale viene messo in evidenza il tempo necessario per raggiungere il *plateau*, ossia il massimo valore di rilascio.

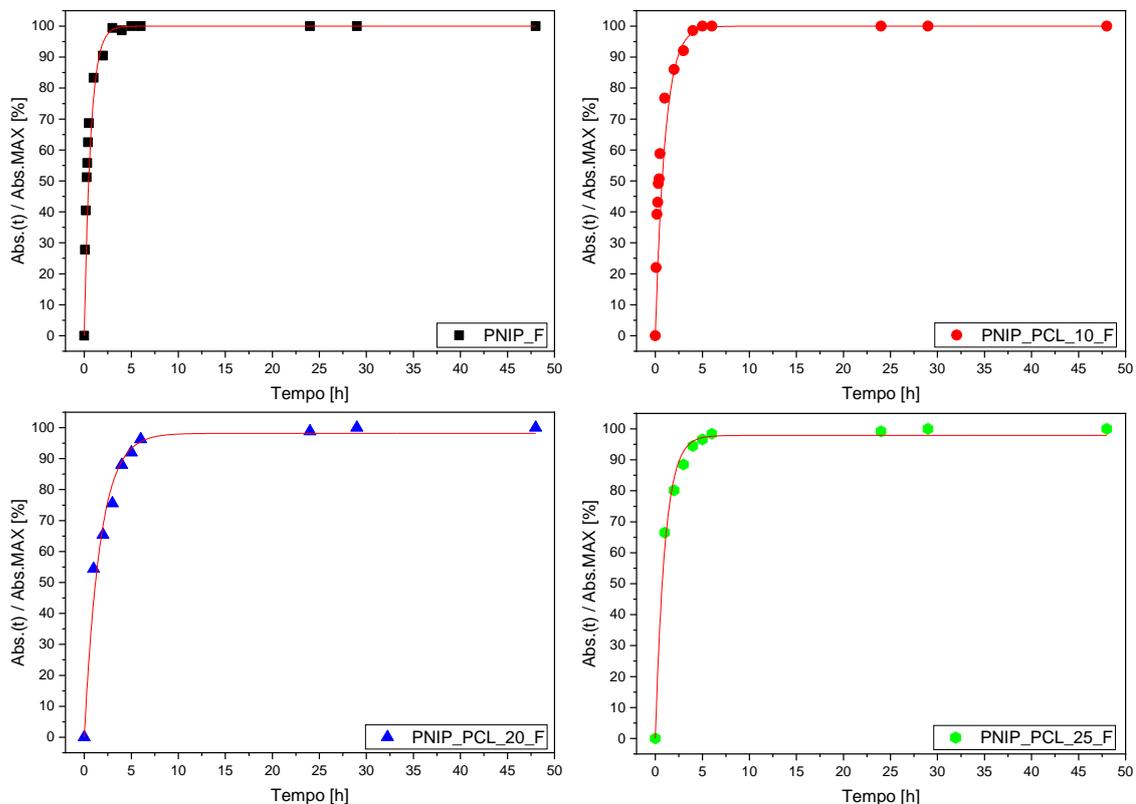


Figura 27: risultati prove di rilascio di pararosanilina cloridrato per i campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F

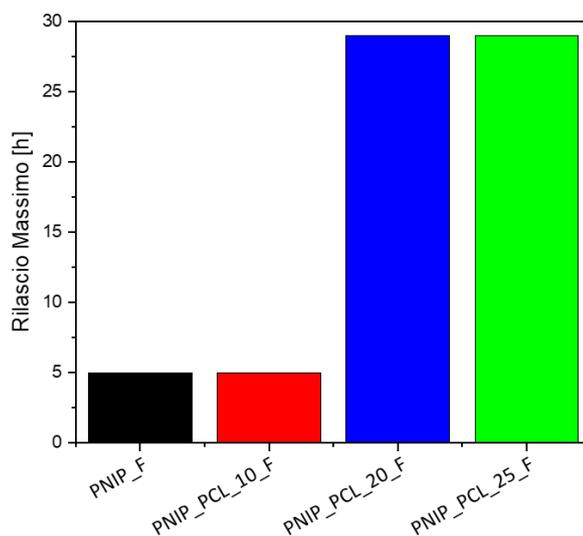


Figura 28: rilascio massimo di pararosnilina cloridrato per i campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F

I campioni PNIP_F e PNIP_PCL_10_F hanno raggiunto il *plateau* dopo 5 ore, di conseguenza sono state effettuate misure di assorbanza a tempi molto brevi (5, 10, 15, 20, 25 e 30 minuti). I campioni PNIP_PCL_20_F e PNIP_PCL_25_F, invece, hanno mostrato un valore massimo di assorbanza dopo 29h, un tempo molto più elevato.

Di conseguenza, una maggiore concentrazione di PCL-COOH nei campioni ha portato ad una minore velocità di rilascio, a causa della struttura maggiormente cristallina legata alla presenza del poliestere, che ha reso più difficoltosi i fenomeni diffusivi, oltre alle interazioni ioniche formatesi tra il PCL e la pararosnilina cloruro, che sfavoriscono il processo di rilascio.

Il primo tratto di questi andamenti segue una cinetica del primo ordine, come è possibile osservare in *Figura 29*.

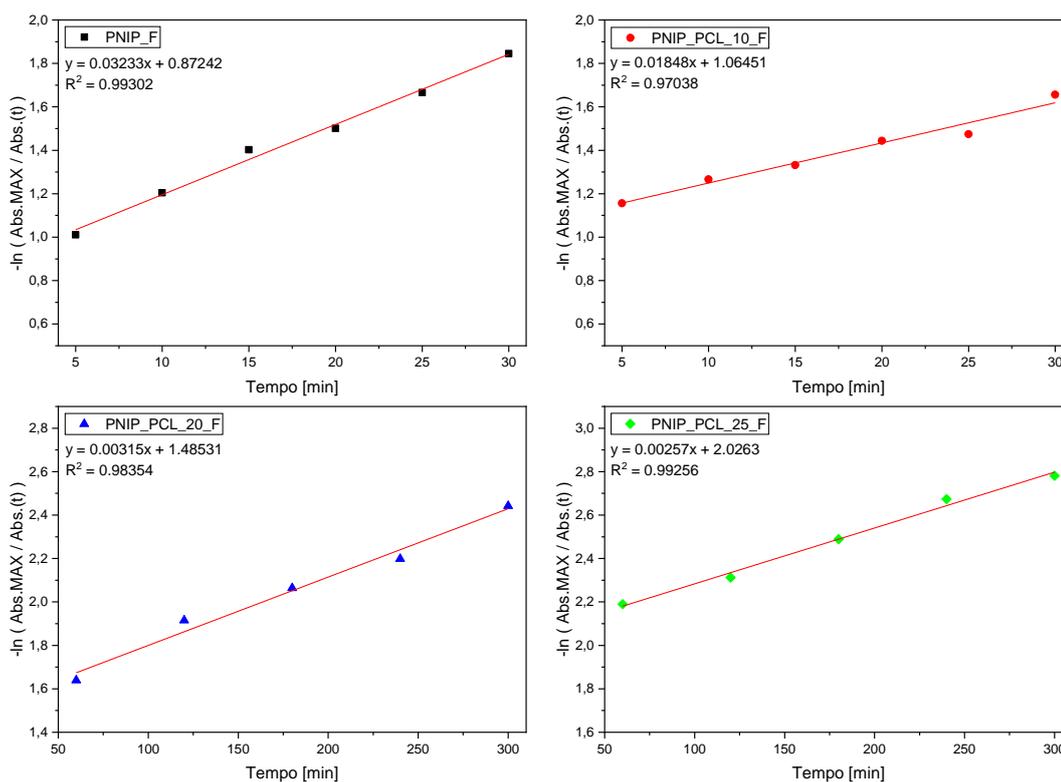


Figura 29: risultati di rilascio di colorante linearizzati per i campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F

Questo primo tratto delle curve è rappresentativo del *burst effect*, ossia un rilascio iniziale a velocità maggiore di quella stazionaria, che si verifica quando il campione, nella fase iniziale del rilascio, contiene una concentrazione di colorante maggiore di quella corrispondente allo stato stazionario. Tale velocità è stata determinata calcolando il rapporto fra la variazione di concentrazione ΔC e l'intervallo di tempo considerato Δt . I risultati sono stati riportati in *Tabella 13*.

Tabella 13: velocità di rilascio di colorante per i campioni PNIP_F, PNIP_PCL_10_F, PNIP_PCL_20_F, PNIP_PCL_25_F

Sample code	Velocità $\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}\cdot\text{min}}\right]$
PNIP_F	0.0281
PNIP_PCL_10_F	0.0173
PNIP_PCL_20_F	0.0027
PNIP_PCL_25_F	0.0019

I valori di velocità media confermano la ridotta cinetica nel processo di rilascio per i campioni caratterizzati da una maggiore concentrazione di PCL-COOH. Il campione privo di PCL-COOH, PNIP_F, ha dimostrato la maggiore velocità di rilascio, mentre il gelato PNIP_PCL_25_F è stato il più lento. In particolare, si ha una differenza di un ordine di grandezza fra le velocità calcolate per i campioni PNIP_F e PNIP_PCL_10_F ed i campioni PNIP_PCL_20_F e PNIP_PCL_25_F, i più ricchi in PCL. I risultati ottenuti si dimostrano in linea con quanto riportato in letteratura da Gan e collaboratori⁷⁸ in merito al rilascio controllato di levofloxacin da parte di idrogeli a base PNIPAAm e PCL diacrilato, in cui è stato osservato un rallentamento nel processo di rilascio all'aumentare della quantità di PCL nel sistema.

4.8 Valutazione citotossicità di idrogeli a base PNIPAAm

È stata valutata la tossicità degli idrogeli nei confronti di cellule appartenenti alla linea cellulare SH-SY5Y. Sono stati presi in esame i due campioni rappresentanti le condizioni più estreme, ossia PNIP_F, gelo costituito dalla sola PNIPAAm, e PNIP_PCL_25_F, il campione contenente la maggiore quantità di PCL-COOH in % m/m. Utilizzando un microscopio ottico, sono state acquisite immagini delle cellule prima dell'esposizione ai campioni, 24 ore dopo l'esposizione e cinque giorni dopo l'esposizione. Le immagini sono state riportate in *Figura 30*.

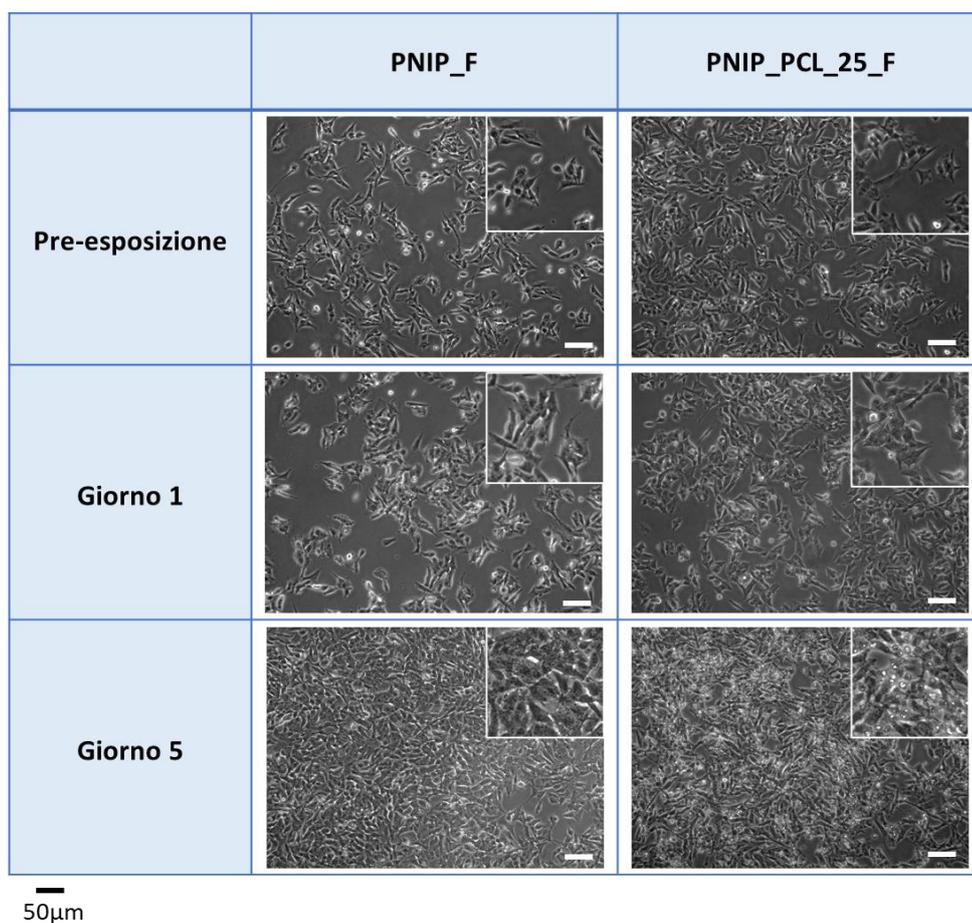


Figura 30: cellule pre- e post-esposizione ai campioni PNIP_F e PNIP_PCL_25_F

Osservando le immagini acquisite per i due sistemi si notano alcune differenze: i punti più luminosi corrispondono a cellule morte ed è possibile osservare che, dopo cinque giorni dall'esposizione, la concentrazione di cellule morte sia più elevata nel caso del campione PNIP_PCL_25_F. Tale osservazione è stata confermata dai risultati del saggio

live/dead™, riportati in *Figura 31*. Per poter ottenere i valori percentuali di vitalità cellulare è stato calcolato il rapporto tra il numero di cellule vive ed il numero totale di cellule, seguendo l'equazione (5), contandole manualmente da immagini come quelle riportate in *Figura 32*.

$$\text{Vitalità cellulare (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ cellule vive}}{n^{\circ} \text{ cellule vive} + n^{\circ} \text{ cellule morte}} \cdot 100 \quad (5)$$

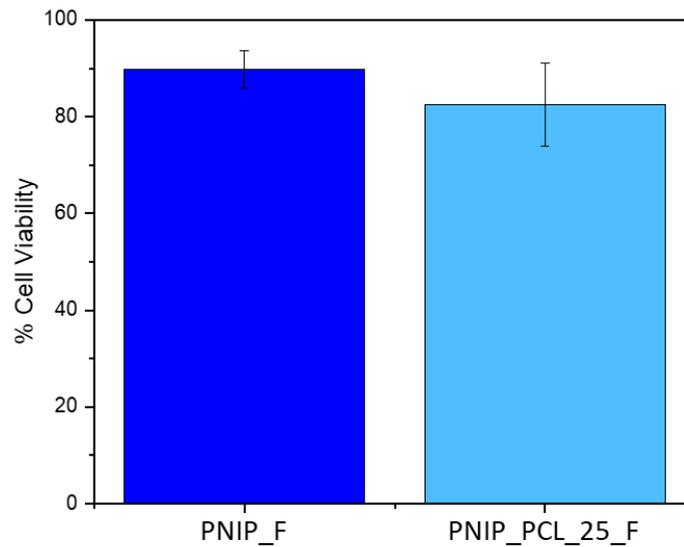


Figura 31: vitalità cellulare (%) a seguito dell'esposizione ai campioni PNIP_F e PNIP_PCL_25_F

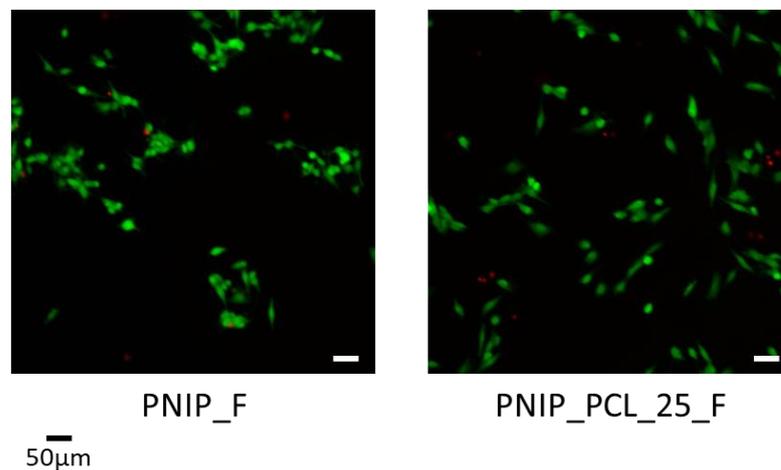


Figura 32: cellule a contatto con i campioni PNIP_F e PNIP_PCL_25_F: in verde cellule vive (Calceina AM), in rosso cellule morte (etidio omodimero)

La vitalità cellulare percentuale si è dimostrata superiore per le cellule esposte al campione PNIP_F, pari a 90±2%. Nel caso del campione PNIP_PCL_25_F la vitalità

cellulare è risultata pari a $82\pm 5\%$, confermando una maggiore concentrazione di cellule morte. Infatti, la struttura maggiormente cristallina dovuta alla presenza di PCL, rende più difficoltoso un lavaggio efficace, poiché viene sfavorito il rilascio di eventuali residui derivati dal sistema reagente, come monomero non reagito o solvente, nocivi per le cellule. Tuttavia, la vitalità cellulare risulta molto elevata in entrambi i casi, di conseguenza è possibile affermare che l'introduzione di PCL *star-shaped* nel sistema non abbia conferito tossicità al campione.

4.9 Analisi morfologica (FE-SEM) di membrane a base PLA/PCL-COOH

Il PCL-COOH precedentemente sintetizzato e caratterizzato, avente quattro braccia di massa molecolare 1000g/mol ciascuna, è stato impiegato nella produzione di membrane porose a base di PLA, preparate mediante la tecnica *phase-inversion*. L'aggiunta di PCL *star-shaped* al sistema ha consentito l'introduzione di funzionalità acide altrimenti assenti nel PLA tal quale. Tali funzionalità possono potenzialmente permettere una migliore interazione con molecole organiche specifiche, in particolare medicinali dotati di terminali amminici.

La morfologia superficiale delle membrane a base di PLA e PCL-COOH è stata analizzata mediante microscopia elettronica a scansione. In *Figura 33* sono state riportate le micrografie SEM relative ai campioni.

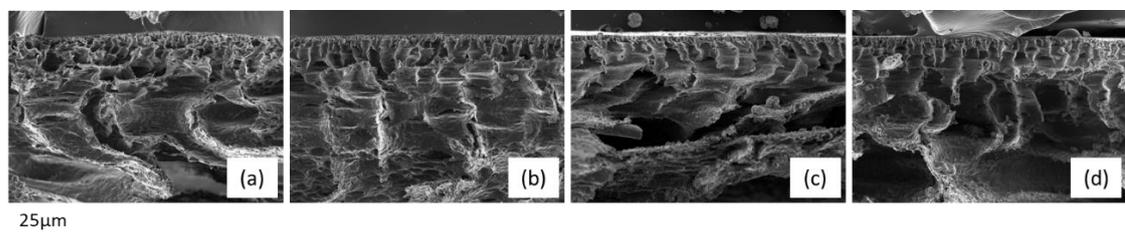


Figura 33: micrografie SEM (a) PLA_PCL_95_5, (b) PLA_PCL_90_10, (c) PLA_PCL_85_15, (d) PLA_PCL_80_20

In queste immagini è possibile osservare la tipica struttura *finger-like*, caratteristica delle membrane preparate mediante la tecnica *phase-inversion*. L'aggiunta del PCL-COOH

non ha portato a modifiche nella struttura delle membrane, infatti le micrografie SEM risultano tutte molto simili fra loro.

4.10 Prove di adsorbimento di colorante per membrane a base PLA/PCL-COOH

Sono state effettuate prove di adsorbimento di pararosanilina cloridrato sulle membrane a base PLA/PCL-COOH sintetizzate mediante la tecnica *phase-inversion*. I campioni sono stati immersi in 5ml di soluzione acquosa avente concentrazione 5µg/ml ed è stato registrato lo spettro UV-VIS del surnatante dopo 24 ore. Al fine di ricavare la concentrazione di colorante adsorbito, per ciascun campione sono stati preparati dischetti di uguale volume ed è stata calcolata la concentrazione mediante l'utilizzo di una retta di calibrazione opportunamente costruita. Una fotografia dei campioni è mostrata in *Figura 34*.



Figura 34: da SX, fotografie dei campioni PLA_100, PLA_PCL_95_5, PLA_PCL_90_10, PLA_PCL_85_15, PLA_PCL_80_20 a seguito della prova di adsorbimento di pararosanilina cloridrato

Gli spettri UV-VIS registrati sono stati riportati in *Figura 35*, mentre in *Tabella 14* sono stati riassunti i risultati.

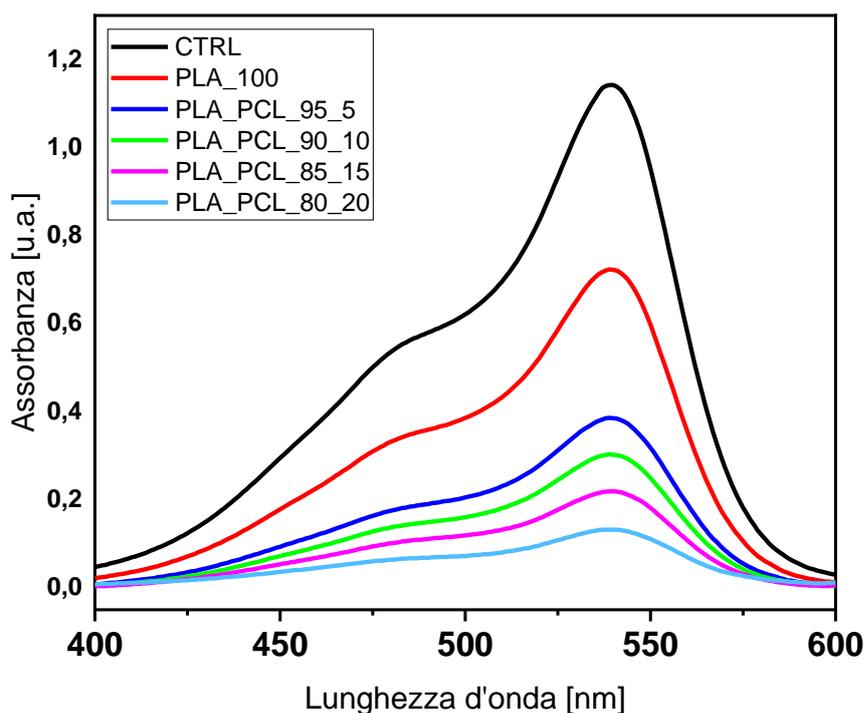


Figura 35: spettro UV-VIS per i campioni PLA_100, PLA_PCL_95_5, PLA_PCL_90_10, PLA_PCL_85_15, PLA_PCL_80_20 ed il controllo (CTRL)

Tabella 14: risultati prove di adsorbimento del colorante pararosanilina cloridrato per i campioni PLA_100, PLA_PCL_95_5, PLA_PCL_90_10, PLA_PCL_85_15, PLA_PCL_80_20 ed il controllo (CTRL)

Sample code	Volume [cm ³]	Assorbanza 24h	Concentrazione surnatante 24h [µg/ml]	Colorante adsorbito [µg/ml]
CTRL	-	1.142	-	-
PLA_100	0.054	0.722	3.187	1.813
PLA_PCL_95_5	0.054	0.386	1.643	3.357
PLA_PCL_90_10	0.054	0.302	1.257	3.743
PLA_PCL_85_15	0.054	0.219	0.871	4.129
PLA_PCL_80_20	0.054	0.132	0.381	4.619

Dai risultati ottenuti è possibile notare come l'aggiunta al sistema di funzionalità acide, dovuta alla presenza di PCL-COOH, abbia influito sulla sua capacità di interazione con molecole organiche recanti gruppi amminici e cariche positivamente. All'aumentare

della concentrazione di PCL nelle membrane, infatti, è stato registrato un valore di assorbanza sempre più basso, corrispondente ad una crescente quantità di colorante adsorbito. In particolare, il campione PLA_PCL_80_20, caratterizzato dalla più elevata percentuale di PCL-COOH, ha restituito un'assorbanza prossima allo zero, adsorbendo circa il 92% della pararosanilina cloridrato presente in soluzione. Di conseguenza, è stato possibile dimostrare l'avvenuta interazione fra le funzionalità carbossiliche del PCL *star-shaped* ed il colorante. Inoltre, osservando le micrografie SEM riportate in *Figura 33*, si nota come il PCL non abbia modificato la morfologia superficiale delle membrane, di conseguenza, le migliori prestazioni dimostrate durante le prove di adsorbimento di colorante per le membrane contenenti una maggiore quantità di PCL, sono dovute unicamente all'introduzione di funzionalità acide, che consentono una migliore interazione con la pararosanilina cloridrato.

È possibile concludere che l'introduzione di PCL-COOH possa conferire alle membrane a base PLA una maggiore applicabilità nel settore biomedico, in particolare nella produzione di dispositivi impiegati nel rilascio controllato di farmaci.

5. SVILUPPI FUTURI

5.1 Analisi morfologica (FE-SEM) di membrane elettrofilate a base PCL/PGS

Il PCL *star-shaped* avente terminali maleici e braccia di massa molecolare 2000g/mol, precedentemente sintetizzato, è stato impiegato nella preparazione di membrane elettrofilate a base di PCL lineare, PCL-COOH e PGS. Tali membrane potrebbero potenzialmente trovare impiego nel settore biomedico come *graft* vascolari e l'introduzione di funzionalità acide potrebbe portare ad una maggiore capacità del sistema di interagire ed immobilizzare proteine. A tal fine, è stato effettuato un confronto fra membrane elettrofilate contenenti PCL-COOH e membrane di controllo a base di PCL lineare e PGS.

Le proprietà morfologiche superficiali delle membrane sono state analizzate mediante la microscopia elettronica a scansione. Le membrane sono state ricoperte da un sottile strato di gelatina e le micrografie SEM relative alle sezioni dei campioni sottoposti a liofilizzazione sono riportate in *Figura 36*.

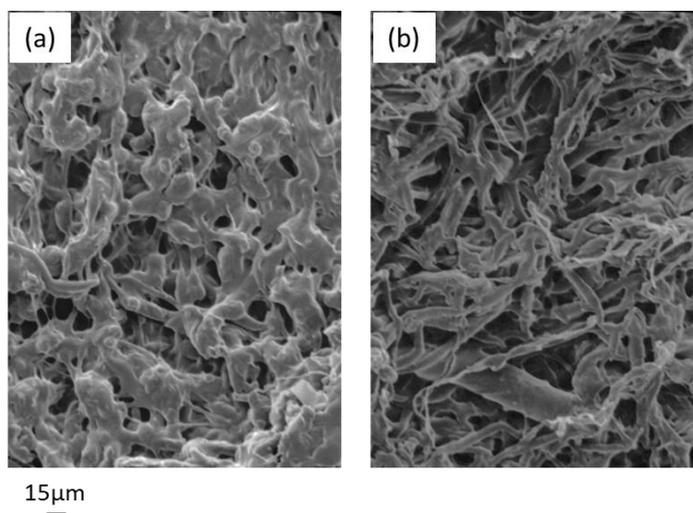


Figura 36: micrografie SEM (a) membrana PCL lineare, PCL-COOH e PGS, (b) membrana PCL lineare, PGS

Si nota come i campioni mostrino morfologie molto simili, caratterizzate da microfibre orientate in maniera casuale. L'aggiunta del PCL-COOH alla soluzione polimerica a base PCL/PGS non ne ha compromesso le proprietà morfologiche e strutturali, consentendo

l'ottenimento di un costrutto elettrofilato caratterizzato da un'architettura tridimensionale adeguata alle proprietà che il prototipo deve possedere. La membrana contenente PCL-COOH presenta una porosità piuttosto omogenea, costituita da pori di diametro di circa 10.5-20.5 μm , mentre nella membrana di controllo è osservabile una struttura porosa più irregolare, in cui i pori mostrano dimensioni e forme variabili, con diametri che vanno da 12 μm a 37.5 μm .

5.2 Analisi comparativa di saggi colorimetrici per la quantificazione di lisozima da membrane elettrofilate a base PCL/PGS

Il primo saggio colorimetrico utilizzato per quantificare il lisozima è stato il saggio BCA. La prima parte del lavoro ha previsto la costruzione di opportune rette di calibrazione utilizzabili per ricavare i valori di concentrazione a partire dai risultati in termini di assorbanza ottenuti a seguito dell'applicazione del saggio BCA. Di conseguenza, sono state analizzate soluzioni a base PBS e lisozima aventi diverse concentrazioni e ne è stata misurata l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 562nm. Per la costruzione della retta di calibrazione utilizzata per il saggio Macro BCA sono state analizzate soluzioni con concentrazione da 2.00mg/ml a 31.25 $\mu\text{g/ml}$, mentre per costruire la retta utilizzata per il saggio Micro BCA è stato analizzato l'intervallo di concentrazione che va da 31.25 $\mu\text{g/ml}$ a 1.95 $\mu\text{g/ml}$. Il lisozima è stato quantificato in maniera efficace, di conseguenza è stata effettuata una prima prova di adsorbimento aspecifico su campioni di circa 10mg ricavati dalle membrane a base PCL lineare, PCL-COOH e PGS e dalle membrane di controllo. Per verificare la buona riuscita della prova, sono stati analizzati sia campioni immersi in una soluzione contenente lisozima, sia campioni immersi in PBS. Il surnatante è stato analizzato mediante il saggio Macro BCA, il quale però non ha restituito risultati significativi, mostrando valori di assorbanza pressoché identici per il surnatante ricavato dalle membrane trattate con lisozima e per quello ricavato dalle membrane non trattate.

Di conseguenza, è stato adoperato il protocollo ECD/NHS per favorire l'adsorbimento specifico delle proteine sulla superficie delle membrane. Nuovamente, sono stati analizzati sia campioni trattati con lisozima, sia campioni non trattati, utilizzando il saggio Micro BCA al fine di individuare anche concentrazioni molto ridotte di lisozima in soluzione. Tuttavia, i risultati ottenuti non hanno permesso la quantificazione della proteina. Di conseguenza, è stato possibile concludere che il glicerolo, derivante dalla degradazione nel tempo del PGS impiegato per la preparazione delle membrane, abbia interferito con il saggio. Infatti, il glicerolo rientra fra le specie interferenti indicate per il saggio BCA ed è probabile che la degradazione del PGS abbia portato all'ottenimento di una quantità di glicerolo tale da interferire con i risultati del saggio ed impedire quindi la quantificazione del lisozima.

È stata effettuata una prova utilizzando il saggio Bradford, il quale però non si è dimostrato abbastanza sensibile per permettere la quantificazione del lisozima. Infatti, seguendo la metodica prevista per il saggio Bradford, non è stato possibile nemmeno costruire la retta di calibrazione.

Di conseguenza, non è stato possibile individuare il saggio colorimetrico adatto alla quantificazione del lisozima nei sistemi analizzati. In studi successivi le prove di verranno effettuate utilizzando diversi saggi colorimetrici, al fine di determinare quello maggiormente adatto alla rivelazione e alla quantificazione del lisozima.

5.3 Prove di degradazione a diverso pH e *fluid uptake* per membrane elettrofilate a base PCL/PGS

Lo studio del processo di degradazione è stato condotto a due differenti valori di pH, ossia 7.4 (neutro) e 2 (acido), al fine di ricreare, rispettivamente, le condizioni fisiologiche e patologiche. I risultati delle prove di degradazione sono stati riportati in *Figura 37*.

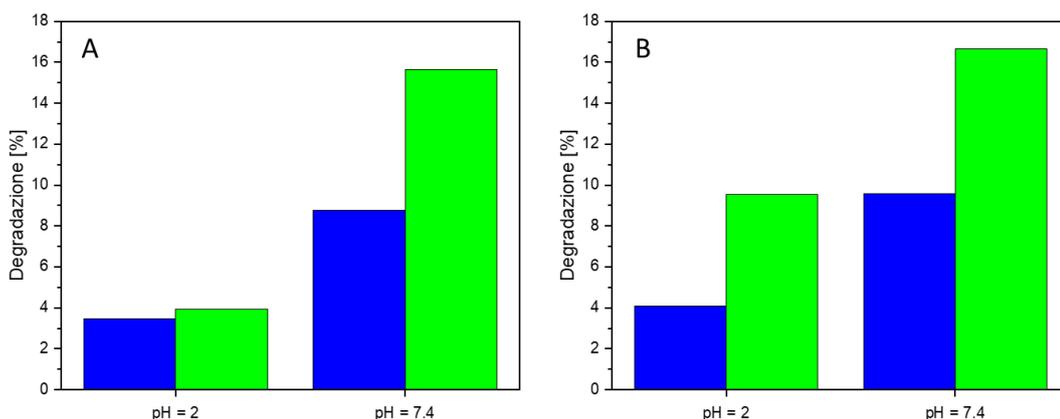


Figura 37: degradazione della membrana elettrofilata a base di PCL lineare, PCL-COOH e PGS (in verde) e della membrana a base di PCL lineare e PGS (in blu) dopo (A) una settimana e (B) due settimane

Dopo una settimana di sperimentazione (*Figura 37.A*), la membrana elettrofilata contenente PCL-COOH ha mostrato valori di degradazione leggermente superiori alla membrana di controllo per un pH neutro e valori simili per un pH acido. Nel dettaglio, la membrana funzionalizzata presenta una degradazione percentuale pari a 16% in pH neutro e 4% in pH acido, mentre la membrana di controllo mostra una degradazione pari a 9% e 3% in pH neutro e acido, rispettivamente. Dopo due settimane di incubazione (*Figura 37.B*), la membrana funzionalizzata ha presentato valori di degradazione maggiori sia in pH neutro (17%), sia in pH acido (10%).

Inoltre, è stata valutata la capacità della membrana funzionalizzata di adsorbire soluzioni acquose, così da determinare come possano cambiare le sue proprietà geometriche (diametro, spessore delle pareti, ecc.) a seguito dell'impianto nell'organismo. In *Figura 38* sono stati riportati i risultati della prova di *fluid uptake*.

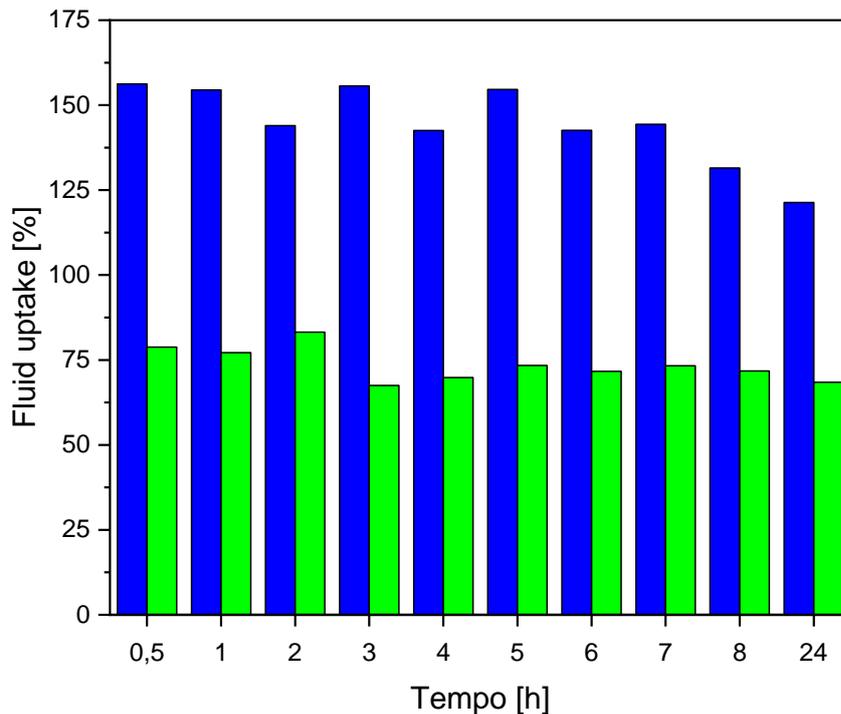


Figura 38: fluid uptake della membrana elettrofilata a base di PCL lineare, PCL-COOH e PGS (in verde) e della membrana a base di PCL lineare e PGS (in blu)

Si è osservato che la membrana costituita da PCL-COOH, PCL lineare e PGS ha raggiunto elevati valori di *fluid uptake* già dopo i primi 30 minuti di immersione, mantenendo poi un valore costante nel tempo. Per tutti i tempi studiati, il *fluid uptake* è risultato inferiore per la membrana funzionalizzata rispetto a quella di controllo, probabilmente a causa della sua morfologia che si è dimostrata maggiormente regolare ed omogenea e che ha quindi permesso una maggiore stabilità dal punto di vista geometrico e strutturale.

Le prove di degradazione e di *fluid uptake* sono state effettuate su un numero limitato di campioni a causa della ridotta quantità di materiale a disposizione, di conseguenza non è stato possibile determinare una deviazione standard significativa associata ai risultati ottenuti.

5.4 Prove meccaniche per membrane elettrofilate a base PCL/PGS

Lo studio delle proprietà meccaniche della membrana contenente PCL-COOH ha previsto l'analisi del modulo di Young, della resistenza alla trazione e dell'allungamento percentuale, utilizzando come riferimenti la membrana non funzionalizzata e l'arteria umana, le cui proprietà meccaniche sono riportate in letteratura⁷⁹. I risultati ottenuti sono stati riassunti in *Tabella 15*.

Tabella 15: proprietà meccaniche della membrana elettrofilata a base di PCL lineare, PCL-COOH e PGS, della membrana a base di PCL lineare e PGS e dell'arteria umana

Campione	Modulo elastico [MPa]	Resistenza alla trazione [MPa]	Allungamento [%]
PCL lineare / PGS	4.3	1.1	98
PCL lineare / PCL- COOH / PGS	1.6	0.4	50
Arteria umana	2.6	1.1	46

Non è stato possibile determinare la deviazione standard relativa ai valori di modulo elastico, resistenza alla trazione e allungamento a rottura a causa del numero limitato di prove effettuato, dovuto alla ridotta quantità di materiale disponibile. Dai risultati ottenuti si nota come la membrana contenente PCL-COOH possieda proprietà meccaniche simili a quelle presentate dall'arteria umana. Di conseguenza, l'aggiunta di questo componente alla soluzione da elettrofilare potrebbe portare alla produzione di membrane più adatte all'utilizzo nel settore biomedico.

6. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stata studiata l'applicabilità di PCL *star-shaped* con terminali maleici per la preparazione di dispositivi applicabili in campo biomedico.

Le analisi termiche effettuate sugli idrogeli a base PNIPAAm e PCL-COOH, preparati mediante la tecnica di polimerizzazione frontale, hanno dimostrato una parziale miscibilità tra i due materiali polimerici, testimoniata dai valori di T_g ricavati dai termogrammi, sempre più ridotti all'aumentare della quantità di PCL nel sistema. L'introduzione del PCL-COOH negli idrogeli ha portato al raggiungimento di più elevati valori di cristallinità, influenzando diverse proprietà caratteristiche della PNIPAAm, così come le sue prestazioni in prove di adsorbimento e rilascio controllato di colorante.

Nel dettaglio, il poliestere ha influito sulla capacità di rigonfiamento della PNIPAAm senza modificarne la struttura e quindi lasciando inalterata la sua *Lower Critical Solution Temperature*, prossima alla temperatura fisiologica. Gli idrogeli hanno mantenuto il carattere termoresponsivo nonostante la presenza di PCL *star-shaped*. Inoltre, i campioni caratterizzati da una più elevata concentrazione di PCL hanno dimostrato una maggiore capacità di adsorbimento di molecole organiche aventi terminali amminici, in grado di mimare il comportamento di farmaci ed inquinanti. Il maggiore grado di cristallinità, il carattere idrofobo e le interazioni ioniche stabilite tra le funzionalità acide del PCL-COOH ed il colorante hanno consentito un adsorbimento più efficiente ed un rilascio maggiormente controllato nel tempo.

L'introduzione di PCL-COOH ha consentito inoltre un miglioramento nelle proprietà meccaniche della PNIPAAm, dimostrato mediante prove in compressione, e non ha compromesso la biocompatibilità degli idrogeli. Infatti, le prove citotossicità hanno dimostrato elevati livelli di vitalità cellulare per cellule appartenenti alla linea SH-SY5Y esposte ai campioni.

Dai risultati delle prove di adsorbimento / desorbimento e di citotossicità si può concludere che gli idrogeli a base PNIPAAm e PCL-COOH potrebbero essere utilizzati come sistemi per il rilascio controllato di farmaci oppure come *scaffold* impiegabili nel

settore dell'ingegneria tissutale per la crescita cellulare e la rigenerazione di tessuti danneggiati.

Dalle micrografie SEM relative alle membrane a base PLA/PCL-COOH è stato osservato come l'introduzione del PCL non abbia comportato alcuna modifica alla morfologia superficiale, dimostrando che la migliore capacità di adsorbimento di molecole cariche positivamente, come la pararosanilina cloridrato, sia dovuta unicamente alle interazioni ioniche rese possibili dai terminali maleici del poliestere. L'aggiunta di PCL a stella alle membrane a base di PLA ha consentito l'ottenimento di materiali maggiormente performanti per l'applicazione nel campo biomedico, in particolare per la produzione di dispositivi utilizzabili nel settore del *drug delivery*.

7. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Rabiatal M.M., Kamal Y., *A review on the recent research of polycaprolactone (PCL)*, Adv. Mater. Res., 1134, 249-255 (2015)
- ² Pitt C.G., Chasalow F.I., Hibionada Y.M., Klimas D.M., et al., *Aliphatic polyesters. I. The degradation of poly(ϵ -caprolactone) in vivo*, J. Appl. Polym. Sci., 26, 3779-3787 (1981)
- ³ Gunatillake P., Mayadunne R., Adhikari R., *Recent developments in biodegradable synthetic polymers*, Biotechnol Annu Rev., 12, 301-47 (2006)
- ⁴ Bartnikowski M., Dargaville T.R., Ivanovski S., Hutmacher D.W., *Degradation mechanisms of polycaprolactone in the context of chemistry, geometry and environment*, Prog. Polym. Sci., 96, 1-20 (2019)
- ⁵ Woodruff M.A., Hutmacher D.W., *The return of a forgotten polymer – polycaprolactone in the 21st century*, Prog. Polym. Sci., 35, 1217-1256 (2010)
- ⁶ Coulembier O., Degée P., Hedrick J.L., Dubois P., *From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: especially poly(β -malic acid) derivatives*, Prog. Polym. Sci., 31, 723-747 (2006)
- ⁷ Ulery B.D., Nair L.S., Laurencin C.T., *Biomedical applications of biodegradable polymers*, J. Polym. Sci. B Polym. Phys, 49, 832-864 (2011)
- ⁸ Jenkins M., Stamboulis A., *Durability and reliability of medical polymers*, Woodhead Publishing, Cambridge, 119-139 (2012)
- ⁹ Guarino V., Gentile G., Sorrentino L., Ambrosio L., *Polycaprolactone: synthesis, properties and applications*, EPST, 1, 1-36 (2017)
- ¹⁰ Mahapatro A., Kumar A., Gross R.A., *Mild, solvent-free ω -hydroxy acid polycondensations catalyzed by Candida Antarctica lipase B*, Biomacromolecules, 5, 62-68 (2004)

-
- ¹¹ Mandal P., Shunmugam R., *Polycaprolactone: a biodegradable polymer with its application in the field of self-assembly study*, J. Macromol. Sci. Part A, 58, 111-129 (2021)
- ¹² Bailey W.J., Ni Z., Wu S.-R., *Free radical ring-opening polymerization of 4,7-dimethyl-2-methylene-1,3-dioxepane and 5,6-benzo-2-methylene-1,3-dioxepane*, Macromolecules, 15, 711-714 (1982)
- ¹³ Xu P., Huang X., Pan X., Li N., et al., *Hyperbranched polycaprolactone through RAFT polymerization of 2-methylene-1,3-dioxepane*, Polymers, 11, 1-13 (2019)
- ¹⁴ Chen T., Cai T., Ji J., *Design and fabrication of functional polycaprolactone*, e-Polym., 15, 3-13 (2015)
- ¹⁵ Khanna A., Sudha Y., Pillai S., Rath S., *Molecular modelling studies of poly lactic acid initiation mechanism*, J. Mol. Model., 14, 367-374 (2008)
- ¹⁶ Stridsberg K., Ryner M., Albertsson A., *Controlled ring-opening polymerization: polymers with designed macromolecular architecture*, Adv. Polym. Sci., 157, 41-65 (2002)
- ¹⁷ Kim M. S., Seo K. S., Khang G., Lee H. B., *Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone by poly(ethylene glycol) by an activated monomer mechanism*, Macromol. Rapid Commun., 26, 643-648 (2005)
- ¹⁸ Dubois P., Coulembier O., Raquez J.-M., *Handbook of ring-opening polymerization*, Wiley-VCH, Weinheim, 53-63 (2009)
- ¹⁹ Labet M., Thielemans W., *Synthesis of polycaprolactone: a review*, Chem. Soc. Rev., 38, 3484-3504 (2009)
- ²⁰ Kowalski A., Duda A., Penczek S., *Kinetics and mechanism of cyclic esters polymerization initiated with tin(II) octoate, 1. Polymerization of ϵ -caprolactone*, Macromol. Rapid Commun., 19, 567-572 (1998)

-
- ²¹ Duda A., *Polymerization of ϵ -caprolactone initiated by aluminum isopropoxide carried out in the presence of alcohols and diols. Kinetics and mechanism*, *Macromolecules*, 29, 1399-1406 (1996)
- ²² Raucci M., Guarino V., Ambrosio L., *Biomimetic strategies for bone repair and regeneration*, *J. Funct. Biomater.*, 3, 688-705 (2012)
- ²³ Guarino V., Scaglione S., Sandri M., Alvarez-Perez M.A., et al., *MgCHA particles dispersion in porous PCL scaffolds: in vitro mineralization and in vivo bone formation*, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 8, 291-303 (2014)
- ²⁴ Mensitieri G., Di Maio E., Buonocore G., Nedi I., et al., *Processing and shelf life issues of selected food packaging materials and structures from renewable resources*, *Trends Food Sci. Technol.*, 22, 72-80 (2011)
- ²⁵ Estellés J.M., Vidaurre A., Dueñas J.M., Cortázar I.C., *Physical characterization of polycaprolactone scaffolds*, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 19, 189-195 (2008)
- ²⁶ Guarino V., Causa F., Netti P.A., Ciapetti G., et al., *The role of hydroxyapatite as solid signal on performance of PCL porous scaffolds for bone tissue regeneration*, *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, 86, 548-557 (2008)
- ²⁷ Intranuovo F., Gristina R., Brun F., Mohammadi s., et al., *Plasma modification of PCL porous scaffolds fabricated by solvent-casting/particulate-leaching for tissue engineering*, *Plasma Process. Polym.*, 11, 184-195 (2014)
- ²⁸ Manholi S., Athiyathil S., *Poly(ϵ -caprolactone)-based porous membranes for filtration applications – effect of solvents on precipitation kinetics, performance and morphology*, *J. Appl. Polym. Sci.*, 139, 1-18 (2021)
- ²⁹ Dash T.K., Konkimalla V.B., *Poly(ϵ -caprolactone) based formulations for drug delivery and tissue engineering: a review*, *J. Control. Release*, 158, 15-33 (2012)
- ³⁰ Formhals A., *Method and apparatus for spinning*, US2349950A, United States Patent Office, 16 Aug. (1938)

-
- ³¹ Duling R.R., Dupaix R.B., Katsube N., Lannutti J., *Mechanical Characterization of electrospun polycaprolactone (PCL): a potential scaffold for tissue engineering*, J. Biomech. Eng., 130, 1-13 (2008)
- ³² Patlolla A., Collins G., Livingston Arinzeh T., *Solvent-dependent properties of electrospun fibrous composites for bone tissue regeneration*, Acta Biomater., 6, 90-101 (2010)
- ³³ Joseph B., Augustine R., Kalarikkal N., Thomas S., et al., *Recent advances in electrospun polycaprolactone based scaffolds for wound healing and skin bioengineering applications*, Mater. Today Commun., 19, 319-335 (2019)
- ³⁴ Zhong S.P., Zhang Y.Z., Lim C.T., *Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction*, WIREs Nanomed. Nanobiotechnol., 2, 510-525 (2010)
- ³⁵ Puiggali-Jou A., Cejudo A., Del Valle L.J., Alemán C., *Smart drug delivery from electrospun fibers through electroresponsive polymeric nanoparticles*, ACS Appl. Bio Mater., 1, 1594-1605 (2018)
- ³⁶ Aloorkar N.H., Kulkarni A.S., Patil R.A., Ingale D.J., *Star polymers: an overview*, IJPSN, 5, 1675-1684 (2012)
- ³⁷ Sarvari R., Akbari-Alanjaraghi M., Massoumi B., Beygi-Khosrowshahi Y., et al., *Conductive and biodegradable scaffolds based on a five-arm and functionalized star-like polyaniline-polycaprolactone copolymer with a D-glucose core*, New J. Chem., 41, 6371-6384 (2017)
- ³⁸ Irfan M., Oh J., Musharraf S.G., Shah M.R., et al., *Synthesis and meticulous molecular, morphological and thermal characterization of linear and star-shaped polycaprolactones*, RSC Adv., 6, 98117-98127 (2016)
- ³⁹ Ren J.M., McKenzie T.G., Fu Q., Wong E.H.H., et al., *Star polymers*, Chem. Rev., 116, 6743-6836 (2016)
- ⁴⁰ Tomuta A., Fernández-Francos X., Ferrando F., Serra À., et al., *New epoxy-anhydride thermosets modified with multiarm stars with hyperbranched polyester cores and poly(ϵ -caprolactone) arms*, Polym. Plast. Technol. Eng., 53, 645-654 (2014)

-
- ⁴¹ Tomuta A., Ferrando F., Serra À., Ramis X., *New aromatic-aliphatic hyperbranched polyesters with vinylic end groups of different length as modifiers of epoxy/anhydride thermosets*, *React. Funct. Polym.*, 72, 556-563 (2012)
- ⁴² Choi J., Kwak S.-Y., *Hyperbranched poly(ϵ -caprolactone) as a nonmigrating alternative plasticizer for phthalates in flexible PVC*, *Environ. Sci. Technol.*, 41, 3763-3768 (2007)
- ⁴³ Yong M.R.N.O., Saifzadeh S., Askin G.N., Labrom R.D., et al., *Establishment and characterization of an open mini-thoracotomy surgical approach to an ovine thoracic spine fusion model*, *Tissue Eng. Part C*, 20, 19-27 (2014)
- ⁴⁴ Mou L., Chen N., Zhu K., Chen Y., et al., *Copolymer of star poly(ϵ -caprolactone) and polyglycidols as potential carriers for hydrophobic drugs*, *Polym. Adv. Technol.*, 23, 748-755 (2012)
- ⁴⁵ Xue L., Dai S., Li Z., *Biodegradable shape-memory block co-polymers for fast self-expandable stents*, *Biomaterials*, 31, 8132-8140 (2010)
- ⁴⁶ Theiler S., Mela P., Diamantouros S.E., Jockenhoevel S., et al., *Fabrication of highly porous scaffolds for tissue engineering based on star-shaped functional poly(ϵ -caprolactone)*, *Biotechnol. Bioeng.*, 108, 694-703 (2011)
- ⁴⁷ Xia W., Jiang G., Chen W., *Synthesis and drug-release properties of hyperbranched polyesters grafted with biocompatible poly(ϵ -caprolactone)*, *J. Appl. Polym. Sci.*, 109, 2089-2094 (2008)
- ⁴⁸ Paul D.R., Newman S., *Polymer blends, volume 2*, AP, Cambridge, 369-389 (1978)
- ⁴⁹ Sarasam A., Madihally S.V., *Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications*, *Biomaterials*, 26, 5500-5508 (2005)
- ⁵⁰ Wang Y., Rodriguez-Perez M.A., Reis R.L., Mano J.F., *Thermal and thermomechanical behaviour of polycaprolactone and starch/polycaprolactone blends for biomedical applications*, *Macromol. Mater. Eng.*, 290, 792-801 (2005)
- ⁵¹ Garlotta D., *A literature review of poly(lactic acid)*, *J. Polym. Environ.*, 9, 63-84 (2001)

-
- ⁵² Patrício T., Bártolo P., *Thermal stability of PCL/PLA blends produced by physical blending process*, *Procedia Eng.*, 59, 292-297 (2013)
- ⁵³ Bai H., Xiu H., Gao J., Deng H., et al., *Tailoring impact toughness of poly(L-lactide)/poly(ϵ -caprolactone) (PLLA/PCL) blends by controlling crystallization of PLLA matrix*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 4, 897-905 (2012)
- ⁵⁴ Chee W.K., Ibrahim N.A., Zainuddin N., Rahman M.F.A., et al., *Impact toughness and ductility enhancement of biodegradable poly(lactic acid)/poly(ϵ -caprolactone) blends via addition of glycidyl methacrylate*, *Adv. Mater. Sci. Eng.*, 2013, 1-8 (2013)
- ⁵⁵ Schild H.G., *Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application*, *Prog. Polym. Sci.*, 17, 163-249 (1992)
- ⁵⁶ Malucelli G., Dore J., Sanna D., Nuvoli D., et al., *Sliding crosslinked thermoresponsive materials: polypseudorotaxanes made of poly(N-isopropylacrylamide) and acrylamide- γ -cyclodextrin*, *Front. Chem.*, 6, 1-8 (2018)
- ⁵⁷ Lanzalaco S., Armelin E., *Poly(N-isopropylacrylamide) and copolymers: a review on recent progresses in biomedical applications*, *Gels*, 3, 1-31 (2017)
- ⁵⁸ Mendelsohn J.D., Yang S.Y., Hiller J., Hochbaum A.I., et al., *Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films*, *Biomacromolecules*, 4, 96-106 (2003)
- ⁵⁹ Lee W.-F., Cheng T.-S., *Studies on preparation and properties of porous biodegradable poly(NIPAAm) hydrogels*, *J. Appl. Polym. Sci.*, 109, 1982-1992 (2008)
- ⁶⁰ Stoychev G., Puretskiy N., Ionov L., *Self-folding all-polymer thermoresponsive microcapsules*, *Soft Matter*, 7, 3277-3279 (2011)
- ⁶¹ Matyjaszewski K., Möller M., *Polymer science: a comprehensive reference, Vol 4*, Elsevier BV, Amsterdam, 957-980 (2012)
- ⁶² Li Q., Shen H.-X., Liu C., Wang C.-F., et al., *Advances in frontal polymerization strategy: from fundamentals to applications*, *Prog. Polym. Sci.*, 127, 1-32 (2022)

-
- ⁶³ Liu N., Shao H., Wang C.-F., Chen Q.-L., et al., *High performance of interpenetrating polymer network hydrogels induced by frontal polymerization*, Colloid Polym. Sci., 291, 1871-1879 (2013)
- ⁶⁴ Liu W., Zhang B., Lu W.W., Li X., et al., *A rapid temperature-responsive sol-gel reversible poly(N-isopropylacrylamide)-g-methylcellulose copolymer hydrogel*, Biomaterials, 25, 3005-3012 (2004)
- ⁶⁵ Feng Q., Yan Q., Ge C., *Frontal polymerization synthesis and characterization of temperature- and pH-sensitive hydrogels*, Colloid Polym. Sci., 291, 1163-1170 (2013)
- ⁶⁶ Alzari V., Monticelli O., Nuvoli D., Kenny J.M., et al., *Stimuli responsive hydrogels prepared by frontal polymerization*, Biomacromolecules, 10, 2672-2677 (2009)
- ⁶⁷ Feng Q., Zhao Y., Li H., Zhang Y., et al., *Frontal polymerization and characterization of interpenetrating polymer networks composed of poly(N-isopropylacrylamide) and polyvinylpyrrolidone*, Colloid Polym. Sci., 296, 165-172 (2018)
- ⁶⁸ Alzari V., Nuvoli D., Scognamillo S., Piccinini M., et al., *Graphene-containing thermoresponsive nanocomposite hydrogels of poly(N-isopropylacrylamide) prepared by frontal polymerization*, J. Mater. Chem., 21, 8727-8733 (2011)
- ⁶⁹ Milašinović N., Knežević-Jugović Z., Milosavljević N., Lučić Škorić M., et al., *Stimuli-Sensitive Hydrogel Based on N-Isopropylacrylamide and Itaconic Acid for Entrapment and Controlled Release of Candida rugosa Lipase under Mild Conditions*, Biomed Res. Int., 2014, 1–9 (2014)
- ⁷⁰ Sousa R.G., Magalhães W.F., Freitas R.F.S., *Glass transition and thermal stability of poly(N-isopropylacrylamide) gels and some of their copolymers with acrylamide*, Polym. Degrad. Stab., 61, 275–281 (1998)
- ⁷¹ Zhang M., Li Y., Yang Q., Huang L., et al., *Adsorption of methyl violet using pH- and temperature-sensitive cellulose filament/poly(NIPAM-co-AAc) hybrid hydrogels*, J. Mater. Sci., 53, 11837–11854 (2018)
- ⁷² Sosnik A., Imperiale J.C., Vázquez-González B., Raskin M.M., et al., *Mucoadhesive thermo-responsive chitosan- g -poly(N -isopropylacrylamide) polymeric micelles via a*

one-pot gamma-radiation-assisted pathway, *Colloids Surfaces Biointerfaces.*, 136, 900–907 (2015)

⁷³ Schild H.G., *Thermal decomposition of PNIPAAm: TGA-FTIR analysis*, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, 34, 2259–2262 (1996)

⁷⁴ Unger M., Vogel C., Siesler H.W., *Molecular Weight Dependence of the Thermal Degradation of Poly(ϵ -caprolactone): A Thermogravimetric Differential Thermal Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study*, *Appl. Spectrosc.*, 64, 805–809 (2010)

⁷⁵ Liu W., Zhang B., Lu W.W., Li X., et al., *A rapid temperature-responsive sol-gel reversible poly(N-isopropylacrylamide)-g-methylcellulose copolymer hydrogel*, *Biomaterials*, 25, 3005-3012 (2004)

⁷⁶ Feng Q., Yan Q., Ge C., *Frontal polymerization synthesis and characterization of temperature- and pH-sensitive hydrogels*, *Colloid Polym. Sci.*, 291, 1163-1170 (2013)

⁷⁷ Haq M.A., Su Y., Wang D., *Mechanical properties of PNIPAM based hydrogels: a review*, *Mat. Sci. Eng. C.*, 70, 842-855 (2017)

⁷⁸ Gan J., Guan X., Zheng J., Guo H., et al., *Biodegradable, thermoresponsive PNIPAM-based hydrogel scaffolds for the sustained release of levofloxacin*, *RSC Adv.*, 6, 32967-32978 (2016)

⁷⁹ Ferrari P.F., Aliakbarian B., Lagazzo A., Tamayol A., et al., *Tailored electrospun small-diameter graft for vascular prosthesis*, *Int. J. Polym. Mater.*, 66, 635-643 (2017)