

Relazione finale programma di ricerca

Short Term Mobility 2016

Fruitore: Alfredo Ronca

Istituto di afferenza: Istituto per i Polimeri, Compositi e Biomateriali (IPCB)

Qualifica: Ricercatore TD III livello

Istituzione ospitante: Department of Materials, Loughborough University, Loughborough, LE11 3TU, United Kingdom

Titolo del programma

Highly reactive, photo-crosslinkable polymers for 3D-printing of biomedical devices

1. Introduzione

L'ingegneria tissutale è un campo multidisciplinare che si avvale dei principi della scienza della vita e dell'ingegneria per realizzare sostituti biologici contenenti cellule viventi e funzionali per la rigenerazione, il mantenimento o il miglioramento delle prestazioni dei tessuti [1,2]. L'ingegneria tissutale si occupa della progettazione e della realizzazione di organi e protesi dal punto di vista dell'interazione materiale sintetico/sito biologico con lo scopo di realizzare la rigenerazione del tessuto originario in modo che il supporto bioartificiale si degradi in tempi rapidi, venendo sostituito con un tessuto del tutto simile a quello originale [2-4]. La prima fase della costruzione di un tessuto ingegnerizzato comincia con la progettazione e la costruzione di una struttura polimerica (scaffold) che faccia da substrato alla crescita delle cellule che daranno origine al nuovo tessuto [5,6]. Le caratteristiche ideali di uno scaffold sono:

- appropriate caratteristiche chimiche;
- struttura porosa tridimensionale;
- biocompatibilità;
- biorisorbibilità;
- proprietà meccaniche adeguate;

Diversi metodi sono stati sviluppati per creare scaffold altamente porosi; i metodi tradizionali sono: Fiber bonding, solvent casting, gas foaming, phase separation [3]. Questa categoria di tecnologie permette la realizzazione di strutture 3D porose biodegradabili ma presenta numerosi limiti come: incompleta interconnessione dei pori, mancato controllo su forma e distribuzione della porosità all'interno della struttura, mancanza di riproducibilità delle strutture 3D [5-7]. Questi obiettivi sembrano attualmente meglio perseguibili grazie allo sviluppo delle recenti tecnologie basate su sistemi di elaborazione automatica delle immagini (CAD, "computer-aided design") e fabbricazione assistita dal calcolatore (CAM, "computer-aided manufacturing"). In campo clinico, infatti, sono disponibili immagini accurate delle parti interne del corpo (tessuti e organi) grazie alla risonanza magnetica (MRI) e alla tomografia computerizzata (TAC) : queste possono essere elaborate con tecnologie denominate Rapid Prototyping (RP) o "Solid Freeform Fabrication" (SFF), che consentono di predefinire al calcolatore la forma sia microscopica che macroscopica dello scaffold per ottenere il prodotto finito con le forme desiderate [6-8]. In commercio esistono diversi sistemi di prototipazione rapida che hanno trovato applicazione nel campo dell'ingegneria tissutale, i principali sono: 3D printing, Fused deposition modelling (FDM), Stereolitografia (SL), Selective laser sintering (SLS), Laminated object manufacturing (LOM). La nostra attenzione durante il progetto è stata rivolta in

particolare alla tecnica stereolitografica. La stereolitografia (SL) è stato il primo sistema di prototipazione rapida commercialmente disponibile ed è attualmente il più diffuso nel mercato mondiale. La tecnica è basata sulla fotopolimerizzazione di una resina liquida sensibile alla radiazione ultravioletta emessa da una sorgente laser focalizzata sulla superficie liquida con un sistema di specchi. Gli oggetti sono ottenuti polimerizzando sezione per sezione una resina fotoattivabile di bassa viscosità con un fascio laser [5,6]. La tecnica permette di realizzare in tempi brevi oggetti di forme anche molto complesse attraverso l'ausilio della computer grafica (CAD) per supportare l'attività di design di strutture 3D porose. Nonostante la stereolitografia presenti la migliore risoluzione nel campo della stampa 3D, risulta essere caratterizzata da una scelta limitata di biomateriali fotopolimerizzabili che presentino le caratteristiche richieste di biocompatibilità, biodegradabilità e stabilità meccanica [6,9]. Le prime resine sviluppate per applicazioni in stereolitografia erano basate su oligomeri acrilati o epossidici che formano dei network vetrosi e fragili dopo essere stati foto-reticolati [6]. Nonostante siano state sviluppate numerose resine biocompatibili per applicazioni in stereolitografia, la maggior parte risulta sempre essere basata su polimeri funzionalizzati con gruppi acrilati o metacrilati. Purtroppo la diffusione all'interno del corpo di suddetti gruppi può causare risposte infiammatorie generando forti irritazioni nel tessuto ospite [9-14]. Lo scopo di questo progetto era superare questi limiti cercando di sviluppare una resina fotopolimerizzabile, che non contenesse gruppi acrilici e che risultasse biocompatibile e altamente reattiva. Un Policaprolattone divinil-fumarato è stato sintetizzato attraverso una polimerizzazione ad apertura di anello utilizzando 2-hydroxyethyl vinyl ether (HEVE) come iniziatore. Successivamente il policaprolattone vinilico è stato fatto reagire con cloruro di fumarile per ottenere un policaprolattone che presentasse tre gruppi funzionali: 2 gruppi vinilici ad estremo di catena e un gruppo fumarato nel mezzo della catena. Il polimero è stato successivamente caratterizzato dal punto di vista termico, spettroscopico e della foto-reattività. Il polimero così sintetizzato, reticolato in presenza di un solvente reattivo il 1-vinil-2-pirrolidone (NVP), è risultato una valida alternativa alle resine acriliche per la realizzazione di scaffold porosi per ingegneria dei tessuti attraverso tecnica stereolitografica.

2. Materiali e metodi

2.1 Sintesi del PCL tri-funzionale

Un catalizzatore a base di alluminio Al è stato utilizzato per la reazione di polimerizzazione del caprolattone (ϵ -CL) secondo la procedura descritta da Liow et al. Il 2-Hydroxyethyl vinyl ether è stato utilizzato sia come iniziatore della reazione sia come gruppo reattivo come mostrato in Figura 1.

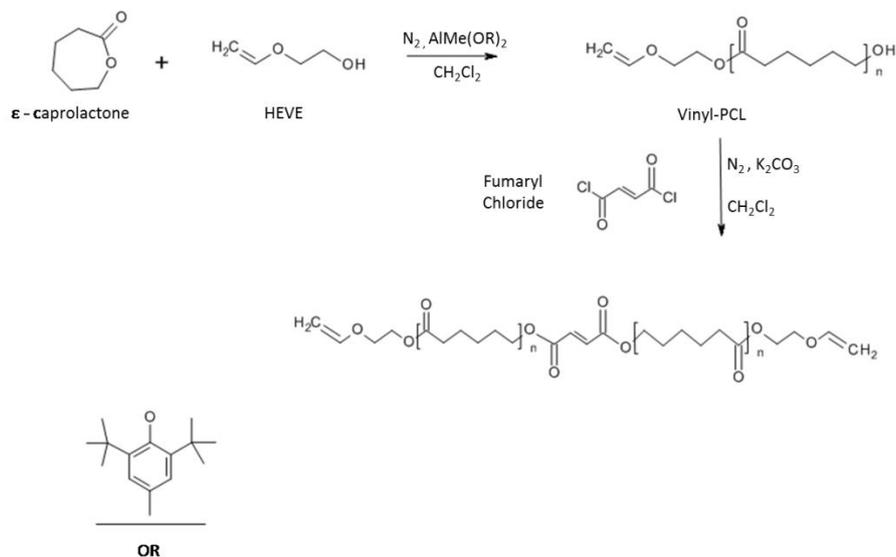


Figura 1: Schema di reazione per la reazione di polimerizzazione del PCL utilizzando HEVE come iniziatore e gruppo funzionale.

La polimerizzazione viene eseguita in una Schleck in atmosfera di N_2 a temperatura ambiente per circa 1 ora. Terminata la reazione il PCL vinilico (VPCL) viene precipitato in metanolo e successivamente recuperato attraverso filtrazione. Il polimero, dopo essere stato recuperato e asciugato in stufa, viene reagito con cloruro di fumarile (FuCl) per ottenere un PCL divinil-fumarato (VPCLF) come mostrato in Figura 1. Il polimero presenta tre gruppi funzionali: 2 gruppi vinilici ai terminali di catena e un gruppo fumarato al centro. Il peso molecolare del VPCL è stato ottenuto calibrando opportunamente il rapporto molare tra ϵ -CL e HEVE. Il Target che ci eravamo prefissati era di ottenere un VPCL con un peso molecolare (M_n) di circa 3500 Da in modo da ottenere VPCLF con $M_n \approx 7000$ Da. Siamo rimasti su pesi molecolari piuttosto bassi poiché le resine foto reticolanti per applicazioni in stereolitografia devono presentare viscosità non troppo elevate.

2.2 Caratterizzazione del PCL

2.2.1 Cromatografia a permeazione di Gel (GPC)

Il peso molecolare del PCL sintetizzato e la relativa distribuzione dei pesi molecolari sono stati ottenuti attraverso GPC (Agilent Technologies 1260 Infinity). I campioni

per la GPC sono stati ottenuti sciogliendo il PCL in Tetraidrofurano (THF) con un rapporto polimero/solvente pari a 1mg/1ml.

2.2.2 Analisi Spettroscopiche

Per controllare l'effettiva presenza dei gruppi vinilici e del gruppo fumarato in catena sono state utilizzate due tecniche spettroscopiche diverse: la spettroscopia in trasformata di Fourier (FTIR- Nicolet 5700, FTIR spectrometer) e la risonanza magnetica nucleare (NMR- Bruker Ascend 400). Per l'FTIR sono stati realizzati dei dischetti Polimero/KBr attraverso una pressa idraulica utilizzando 2mg di PCL e 200mg di KBr. Per l'NMR pochi mg di VPLC e VPCLF sono stati sciolti in cloroformio deuterato (CDCl_2) ed analizzati.

2.2.3 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

Le proprietà termiche del polimero sono state investigate attraverso calorimetria a scansione differenziale. Il campione di polimero (8-10 mg) è stato sottoposto ad una doppia scansione. Il campione è stato riscaldato da 30°C a 80°C a 10°C/min, alla fase di riscaldamento è seguita una isoterma a 80°C per 2 min, successivamente è stato raffreddato fino a -80°C a 10°C/min e poi riscaldato nuovamente fino a 80°C a 10°C/min. La temperatura e l'entalpia di fusione sono state calcolate dai picchi della seconda scansione.

2.2.4 Fotopolimerizzazione del VPCLF

La fotoreticolazione del VPCL e del VPCLF è stata ottenuta utilizzando due set di campioni sciogliendo il PCL in due solventi diversi: un sovente non reattivo (1-metil-2-pirrolidone – NMP) e un solvente reattivo (1-Vinil-2-pirrolidone – NVP) utilizzando Lucirin TPO come foto iniziatore biocompatibile. Il campioni così ottenuti sono stati analizzati con un fotocalorimetro DSC. La fotocalorimetria DSC permette di determinare i cambiamenti dell'entalpia nei materiali per misurarli durante e dopo l'esposizione alla luce di alcune lunghezze d'onda per diversi periodi di tempo a diverse temperature. Prima di essere esposti agli UV i campioni vengono sottoposti ad un trattamento isotermico a 60°C per 5 min in modo da assicurare una temperatura costante nella cella di misura. Dopo il trattamento isotermico viene accesa la luce UV e la resina viene irradiata per 10 min ad una temperatura di 60°C..

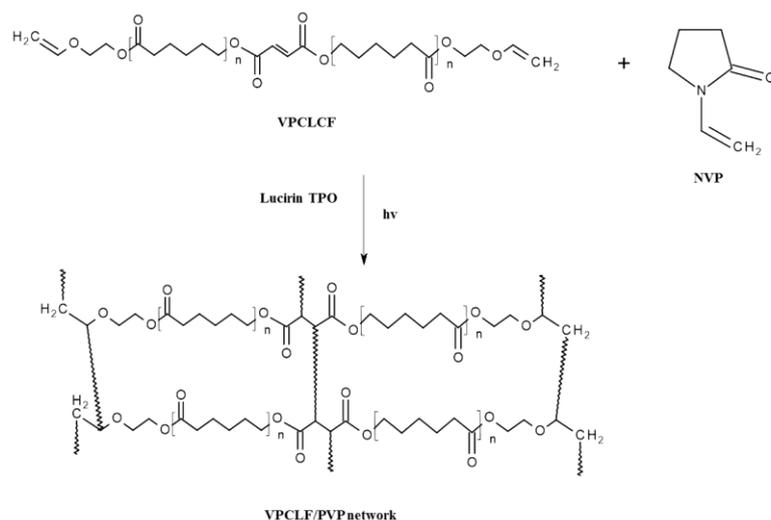


Figura 2: reazione di reticolazione del VPCLF utilizzando NVP come agente reticolante.

In figura 2 è rappresentato lo schema della reazione di reticolazione del VPCLF in presenza di un solvente reattivo NVP. Nella reazione di reticolazione l’NVP funge da agente reticolante formando dei ponti tra i gruppi funzionali del VPCLF.

3. Risultati e discussioni

3.1 Sintesi del VPCLF

La polimerizzazione del PCL utilizzando tri-metil alluminio fenolato come catalizzatore procede molto velocemente a temperatura ambiente e va a completamento in meno di 1h. il polimero che si ottiene presenta una distribuzione dei pesi molecolari piuttosto stretta da come si evince dalla tabella 1. Il polimero viene precipitato in una miscela di H₂O/Metanolo (50/50 vol/vol) e asciugato in stufa per 24 h sotto vuoto a 40°C. Il PCL vinilico così ottenuto viene reagito con cloruro di fumarile per 24 h in atmosfera di N₂. Dalla tabella 1 si evince che la reazione di fumarazione è andata a buon fine in quanto il peso molecolare del PCL fumarato risulta essere quasi il doppio rispetto al vinilico di partenza.

Sample	Ratio			GPC			DSC	
	ε-CL/HEVE	ε-CL/Al	VPCL/Fu Cl	M _n Theor (Da)	M _n GPC (Da)	PDI(GPC)	T _m (°C)	Δ _m (J/g)
VPCL (1)	31/1	31/0,3	-	3500	6100	2,01	50,84	79,88
VPCL (2)	31/1	31/0,3	-	3500	6200	1,61	50,62	78,81
VPCLF(1)	-	-	2/1	-	12700	1,68	52,65	82,70
VPCLF(2)	-	-	2/1	-	12100	1,52	53,01	83,03

Tabella 1: Rapporti molari per la reazione di polimerizzazione e fumarazione e relativi pesi molecolari e temperature di fusione per il VPCL e VPCLF.

Ad ulteriore conferma che la reazione di fumarazione sia andata a buon fine sono state effettuate delle analisi spettroscopiche, FTIR e NMR, per verificare l’effettiva

presenza dei gruppi funzionali in catena. In figura 2 sono riportati due spettri NMR protonici, per il VPCL (figura 2 a) e per il VPCLF (figura 2 b) utilizzando cloroformio deuterato (CDCl_3) come solvente. Analizzando i picchi presenti nello spettro possiamo affermare che i chemical shift presenti a 3.88ppm e a 4.31ppm di figura 2a sono dovuti ai terminali vinilici di catena. Guardando alla figura 2b invece si può affermare che i chemical shift presenti a 6.6 e 4.31 ppm sono dovuti ai protoni del gruppo fumarato. Questi due picchi infatti sono assenti in figura 2a e cioè nello spettro del VPCL.

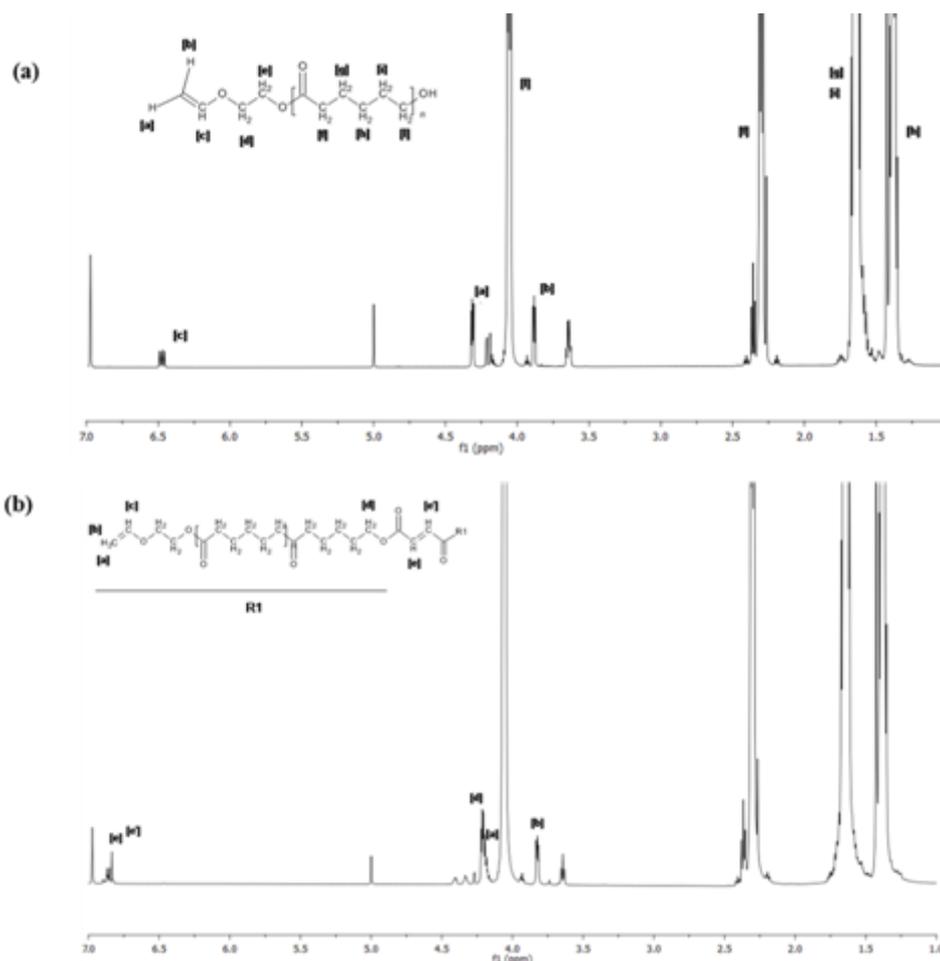


Figura 3: Spettro NMR protonico per il VPCL (a) e VPCLF (b)

Similmente dagli spettri FTIR di figura 4 si possono ottenere informazioni sulla presenza dei gruppi funzionali in catena. La figura 4 mostra gli spettri FTIR del VPCL e del VPCLF. La banda di assorbimento che presenta i picchi a 2947 e 2866 cm^{-1} è dovuta allo stretching dei gruppi CH_2 presenti in catena sia per il VPCL sia per il VPCLF. La banda di assorbimento presente a 1730 cm^{-1} è dovuta alla vibrazione del gruppo carbonile ($\text{C}=\text{O}$). Il picco risulta essere più marcato per il VPCLF in quanto oltre al carbonile presente nel PCL risuona anche il carbonile legato al gruppo fumarato. Le bande di assorbimento presenti a 1240 e 1367 cm^{-1} sono dovute alla

vibrazione del gruppo C-H del fumarato mentre il picco a 1646 cm^{-1} è dovuto allo stretching del doppio legame C=C ad ulteriore conferma della presenza in catena sia del gruppo vinilico che del fumarato.

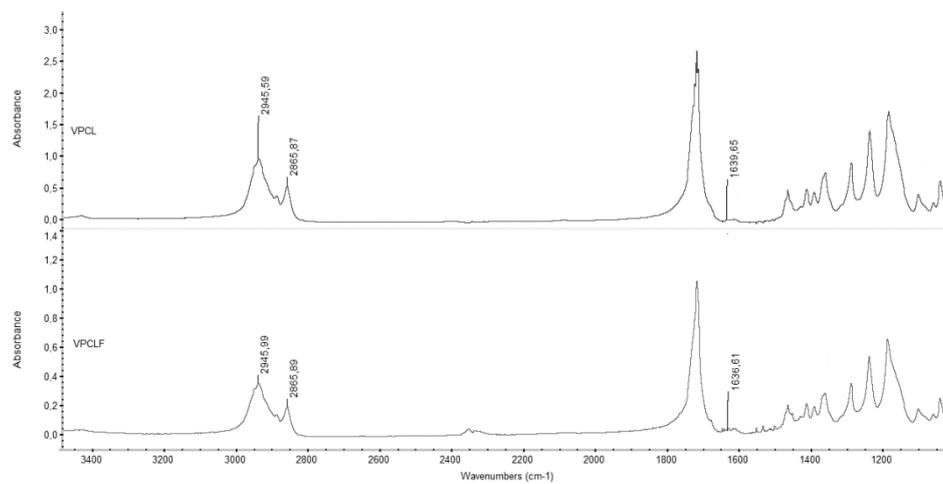


Figura 4: Spettro FTIR del VPCL e VPCLF

I valori di entalpia e temperatura di fusione dei polimeri sintetizzati sono riportati in figura 5.

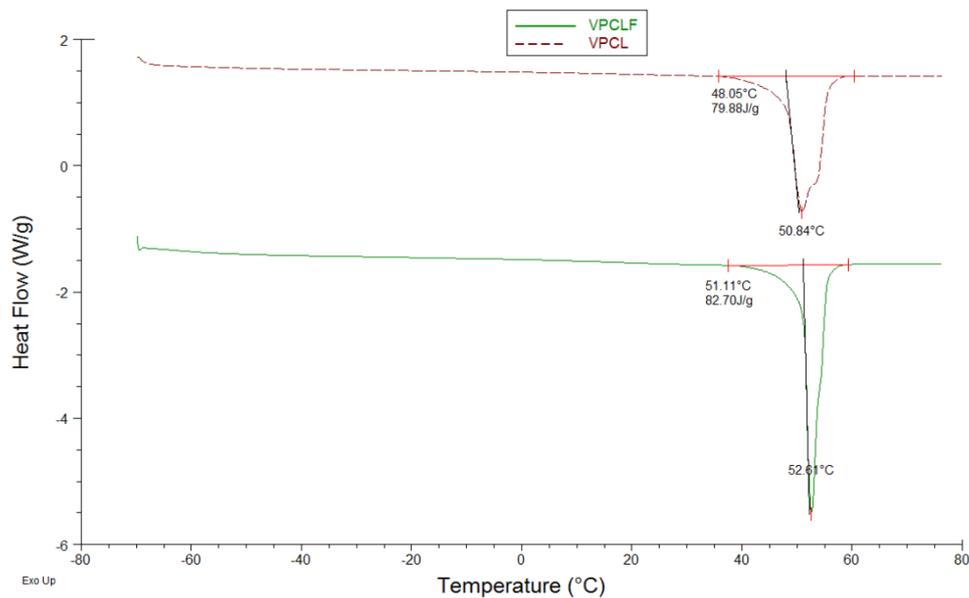


Figura 5: Confronto tra temperature (T_m) ed entalpia di fusione (ΔH_m) del VPCL e VPCLF

Il termogramma di figura 5 mostra come l'aumento del peso molecolare passando dal VPCL al VPCLF causa sia un aumento nella temperatura di fusione che passa da 50.84°C per il VPCL a 52.65°C per il VPCLF. Questa è un'ulteriore prova che la reazione di fumarazione è andata a buon fine in quanto il VPCLF presenta un peso molecolare doppio rispetto al VPCL.

3.2 Fotopolimerizzazione del PCL

L'entalpia di reticolazione per i diversi set di campioni viene registrata dalla macchina ed è riportata in Tabella 2.

Sample	Enthalpy		Peak maximum		Reacted at peak	
	(J/g)		(s)		(%)	
	NMP	NVP	NMP	NVP	NMP	NVP
VPCL	5,9	256,3	0,59	0,39	18,33	40,83
VPCLF	15,7	250,4	0,48	0,22	16,94	39,08

Tabella 2: Principali parametri cinetici per la reazione di foto-polimerizzazione del VPCL e del VPCLF.

Dalla tabella si evince che la presenza di un solvente reattivo come l'NVP modifica completamente la cinetica di reticolazione del polimero. Infatti in presenza del solvente non reattivo (NMP) il polimero presenta un'entalpia di reticolazione molto bassa che suggerisce poca reattività del polimero. Questo comportamento era ampiamente atteso in quanto il gruppo vinilico ha una reattività molto più bassa se confrontata con quella degli acrilati. Questo rende necessario l'uso di un solvente reattivo, biocompatibile come l'NVP per l'utilizzo del polimero con la stereolitografia.

4. Conclusioni

In questo progetto è stato sviluppato un approccio alternativo per la sintesi di un policaprolattone fotoreticolante biocompatibile per applicazioni in ingegneria dei tessuti. Per la reazione di polimerizzazione del ϵ -CL è stato utilizzato 2-Hydroxyethyl vinyl ether sia come iniziatore della reazione sia come gruppo funzionale all'estremo di catena. Solitamente in letteratura per le reazioni di polimerizzazione ad apertura di anello viene utilizzato lo Stagno(II)-2-Etilsesanoato (Sn(Oct)) come catalizzatore della reazione. Nel nostro approccio per evitare la presenza di Sn nel polimero finale è stato sintetizzato un nuovo catalizzatore a base di Al che ha portato ad un miglior controllo del peso molecolare del polimero. Alla reazione di polimerizzazione è seguita una reazione di fumarazione del polimero ottenuta facendo reagire il polimero vinilico con cloruro di fumarile. In questo modo è stato ottenuto un PCL trifunzionale che presentava 2 gruppi vinilici agli estremi di catena e un gruppo fumarato al centro della catena. Alla fase di sintesi è seguita una fase di caratterizzazione del polimero utilizzando diverse tecniche tra cui: cromatografia a permeazione di gel (GPC), spettroscopia ai raggi infrarossi, risonanza magnetica nucleare, calorimetria a scansione differenziale e fotocalorimetria. Il polimero presenta pesi molecolari coerenti con quelle che erano le condizioni di reazione con indici di polidispersità

piuttosto bassi. Inoltre dalla caratterizzazione spettroscopica si evince che sia la reazione di polimerizzazione del ϵ -CL che la successiva fumarazione del VPCL sono andate a buon fine. Per incrementare la fotoreattività del polimero è stato necessario l'utilizzo di un solvente reattivo come l'NVP. I risultati portano ad affermare che è stato sintetizzato con successo un PCL fotoreticolante adatto per applicazioni in stereolitografia. Successive analisi di biocompatibilità saranno realizzate per testare la possibilità di utilizzare il polimero per la rigenerazione di tessuti umani attraverso la realizzazione di strutture 3D porose. Inoltre il presente lavoro è oggetto di pubblicazione su rivista internazionale (Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine) con un articolo dal titolo:” *Synthesis and characterization of divinyl-fumarate Poly- ϵ -caprolactone for scaffolds with controlled architectures*”.

Bibliografia

- (1) Park, S.H.; Park, D.S.; Shin, J.W.; Kang, Y.G.; Kim, H.K.; Yoon, T.R.; Shin, J.W. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2012, 23, 2671–2678.
- (2) Dhariwala, B.; Hunt, E.; Boland, T.; *Tissue engineering.* 2004, 10, 1316-1322
- (3) Hutmacher, D.W.; Sittinger, M.; Risbud, N.V.; *Trends Biotechnol.* 2004, 22, 354.
- (4) Yang, S.; Leong, K.F.; Du, Z.; Chua, C.K.; *Tissue Eng.* 2001, 7, 679-689.
- (5) Ronca, A.; Ambrosio, L.; Grijpma, D.W.; *Acta Biomaterialia* 2013, 9, 5989–5996.
- (6) Melchels, F.P.W.; Feijen, J.; Grijpma, D.W.; *Biomaterials* 2009, 30, 3801–3809.
- (7) Gloria, A.; Russo, T.; De Santis, R.; Ambrosio, L.; *JABB*, 2009, 7, 141-152.
- (8) Yeong, W.Y.; Chua, C. K.; Leong, K. F.; *Trends in Biotechnol.* 2004, 22, 643–652.
- (9) De Santis, R.; Gloria, A.; Russo, T.; D'Amora, U.; D'Antò, V.; Bollino, F.; Catauro, M.; Mollica, F.; Rengo, S.; Ambrosio, L.; *Poly. Composites* 2013, 34, 1413-1417.
- (10) De Santis, R.; Gloria, A.; Russo, T.; Zeppetelli, S.; Dionigi, C.; Sytcheva, A.; Herrmannsdörfer T.; Dediu, V.; Ambrosio, L.; *J. Appl. Polym. Sci.* 2011, 122, 3599-3605.
- (11) Eloma, L.; Kokkari, A.; Närhi, T.; Seppälä, J.V.; *Compos. Sci. Technol.* 2013, 74, 99–106.
- (12) Guarino, V.; Gloria, A.; Raucci, M.G.; De Santis, R.; Ambrosio, L.; *Int. Mater. Rev.* 2012, 57, 256-275.
- (13) Ronca, A.; Ambrosio, L.; Grijpma, D.W.; *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* 2012, 10, 249-258.
- (14) Melchels, F.P.W.; Feijen, J.; Grijpma, D.W.; *Biomaterials* 2010, 31, 6121–6130.