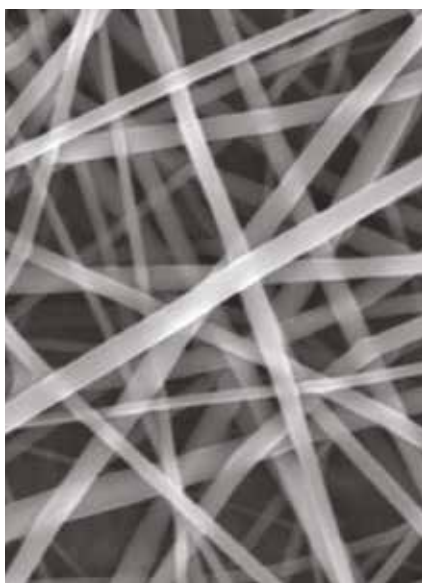


IRRAGGIAMENTO GAMMA DI NANOFIBRE

CAMPIONI DI NANOFIBRE IN POLICAPROLATTONE SONO STATI IRRAGGIATI CON RADIAZIONI GAMMA A DOSAGGI DIVERSI, ALLO SCOPO DI VERIFICARNE LA COMPATIBILITÀ CON UN PROCESSO DI TRATTAMENTO E DECONTAMINAZIONE GIÀ LARGAMENTE APPLICATO NEL CONTESTO BIOMEDICALE. LA DIMINUIZIONE DEL PESO MOLECOLARE MEDIO DEL POLIMERO DOPO IRRAGGIAMENTO NON HA PREGIUDICATO L'INTEGRITÀ DELLE NANOFIBRE E ANCHE LE PROPRIETÀ TERMICHE NON SONO STATE INFLUENZATE IN MODO SIGNIFICATIVO



Il policaprolattone (PCL) è un poliestere oggetto di molti studi e ricerche per valutare le sue potenziali applicazioni nel settore biomedicale [1, 2]. Il PCL è ben solubile in alcuni solventi organici, ha una bassa temperatura di fusione e può essere facilmente miscelato con altri polimeri. Poiché è biocompatibile e riassorbibile, tra il 1970 e il 1990 è stato impiegato, tra le altre applicazioni, per produrre dispositivi a rilascio controllato di farmaci. Il suo tempo di riassorbimento è però molto lungo e quindi è stato sostituito da polilattidi e poliglicolidi in questo tipo di applicazione.

Più recentemente, il PCL è tornato ad essere oggetto di interesse nel campo dell'ingegneria tissutale. Grazie alle sue proprietà reologiche e viscoelastiche, che sono migliori rispetto ad altri poliesteri riassorbibili, il PCL può essere usato per la produzione di scaffold con varie tecniche [3, 4]. Tra queste, l'elettrofilatura permette di preparare fibre con diametri inferiori al micron ad un costo abbastanza contenuto, con cui si possono preparare scaffold fibrosi che simulano la matrice extra cellulare di molti tessuti [5]. Un aspetto critico nel processo di sviluppo di scaffold in PCL è quello legato alla sterilizzazione necessaria per garantire la sicurezza dei dispositivi da impiantare. La sterilizzazione a vapore o con ossido di etilene non appare adatta al PCL [5]. Infatti, il vapore a 121 o 115 °C ha una temperatura molto superiore a quella di fusione del PCL (59-64 °C). È noto altresì che l'ossido di etilene è parzialmente solubile in PCL e lo plasticizza, riducendone la resistenza meccanica. Per queste ragioni, la sterilizzazione con raggi gamma si presta particolarmente bene al trattamento di dispositivi realizzati in PCL, anche se in letteratura sono presenti pochi studi sugli effetti dei raggi gamma su tale materiale. Narkis *et al.* hanno descritto reazioni di rottura di catena e reticolazione per azione dei raggi gamma ma ad elevati dosaggi, superiori a quello richiesto per la sterilizzazione [6]. Masson *et al.* hanno usato dosi di 25 kGy, però irraggiando nanosfere di PCL [7]. Gorna e Gogolewski

hanno studiato l'effetto di dosi da 25 kGy su poliuretani contenenti dioli a base di PCL [8]. Cottam *et al.* hanno studiato l'effetto di dosi da 30,8 kGy su film di PCL di spessore 0,5-1,5 mm. A fronte di una diminuzione del peso molecolare medio numerico e di un aumento del peso molecolare medio ponderale dopo l'irraggiamento, il carico di snervamento e quello di rottura dei film aumentano. La velocità di degradazione enzimatica dei film risulta invece diminuita [9]. Bosworth *et al.* hanno studiato per primi l'effetto dei raggi gamma su nanofibre elettrofilate a base di PCL e hanno osservato una diminuzione del peso molecolare del polimero in funzione della dose [10]. L'irraggiamento influisce negativamente sulle proprietà meccaniche; infatti alla dose di 40 kGy la resistenza a trazione diminuisce del 68%. Nel quadro di un accordo di collaborazione tra il CIRI-MAM dell'Università di Bologna e Gammarad Italia, è stato realizzato questo studio sull'irraggiamento gamma di elettrofilati realizzati in PCL. Gli obiettivi dello studio sono quelli di comprendere meglio il comportamento dei campioni di nanofibre sottoposti a dosi crescenti, per valutare un loro possibile uso in ambito biomedicale (e.g. scaffold per il rigenerazione del tessuto epidermico).

Attività sperimentale

Gli elettrofilati in policaprolattone sono stati utilizzati a partire da fogli in formato A4, con uno spessore di 40 micron circa. Per le prove



di irraggiamento i provini rettangolari (tagliati in formato rettangolare 6x2 cm) sono stati inseriti tra due vetrini da laboratorio per facilitarne la manipolazione e per evitare possibili danni durante le fasi di trasporto e trattamento. I trattamenti a dosaggi crescenti (10, 25 e 50 kGy) sono stati eseguiti sia in presenza di ossigeno (in aria) sia in assenza di ossigeno, chiudendo i campioni in palloni di vetro a tenuta sotto vuoto. I trattamenti sono stati eseguiti presso l'impianto industriale di irraggiamento gamma di Gammarad Italia a Minerbio (Bologna). I campioni di nanofibre irraggiate sono stati caratterizzati con tecniche spettroscopiche, cromatografiche, calorimetriche e con prove meccaniche a trazione, insieme a campioni non trattati utilizzati come riferimento.

Le analisi spettroscopiche sono state eseguite tramite un microscopio FTIR munito di un cristallo in germanio per micro ATR. Gli spettri Raman sono stati registrati con un microscopio Raman con laser a 532 nm. Gli spettri Raman sono stati registrati focalizzando il fascio laser su una singola fibra elettrofilata. La cromatografia per permeazione su gel (GPC) è stata utilizzata per determinare il peso molecolare medio numerico (Mn), il peso molecolare medio ponderale (Mw) e l'indice di polidispersità (PD) come rapporto Mw/Mn. Lo strumento usato per queste prove è un cromatografo munito di colonna caratterizzata da 250 mm di lunghezza, 4 mm di diametro, riempita con gel da 5 micron, cloroformio come eluente e detector a indice di rifrazione. La colonna è stata calibrata con standard di polistirene a peso molecolare noto.

Le prove calorimetriche DSC in atmosfera inerte, sono state eseguite mediante l'impiego di un flusso di azoto. Il ciclo termico impostato è il seguente: isoterma a 10 °C per 5 minuti, quindi riscaldamento a 10 °C/min. fino a 100 °C, isoterma per 2 minuti seguita dal raffreddamento a 10 °C/min. fino a 10 °C, isoterma per 5 min. e infine riscaldamento a 10 °C/min. fino a 100 °C. Sono stati considerati i dati calorimetrici misurati nella prima scansione in riscaldamento per evidenziare cambiamenti nel materiale tal quale, sotto forma di nanofibre. Successivamente, nella seconda scansione in riscaldamento, il PCL non è più sotto forma di singole fibre, ma di materiale uniforme (*o bulk*). La percentuale di cristallinità è stata calcolata come rapporto fra l'entalpia di fusione del campione e l'entalpia di

fusione riferita ad un policaprolattone 100% cristallino (142 J/g) riportata in letteratura [11]. Lo strumento è stato calibrato con standard a temperatura ed entalpia di fusione noti. Per la caratterizzazione meccanica delle nanofibre in PCL non è stato possibile usare dinamometri con afferraggi adatti a normali provini "macro". Infatti, a causa dello spessore molto sottile (40 micron) e per la natura stessa delle nanofibre elettrofilate, i provini vengono in tal caso parzialmente incisi o strappati già durante la fase di serraggio. Pertanto, abbiamo effettuato le misure con un analizzatore dinamico-meccanico adattato alle esigenze specifiche delle prove meccaniche considerate in questa sede, impiegando afferraggi più adatti a provini "micro" che non hanno danneggiato i campioni di nanofibre durante il serraggio. Tuttavia, per i motivi ed i vincoli descritti, sono state riprodotte prove a trazione limitatamente alla prima parte della curva sforzo-deformazione, senza raggiungere l'allungamento a rottura. I test a trazione eseguiti a tre diverse velocità di allungamento (1,5, 3 e 5 mm/min.) hanno comunque permesso di ricavare informazioni sulla risposta elastica delle nanofibre.

Osservazioni sperimentali

Il decadimento di ⁶⁰Co genera una radiazione gamma ad elevata energia, comportando l'emissione di due fotoni rispettivamente a 1,17 e 1,33 MeV. L'irraggiamento gamma a cui sono stati sottoposti i campioni considerati, utilizzato a livello industriale (fra l'altro) per la sanificazione o la sterilizzazione di materiali e prodotti, è quindi in grado di indurre la scissione dei legami covalenti nei materiali polimerici sottoposti a irraggiamento. I macroradicali formati dalle reazioni di scissione delle catene polimeriche possono ricombinarsi e formare quindi catene ramificate ed

eventualmente anche reticolate.

Queste reazioni influenzano i pesi molecolari medi Mn e Mw e la distribuzione dei medesimi pesi molecolari. La solubilità stessa risulta modificata perché le reazioni di reticolazione portano alla formazione di geli nei solventi in cui invece si scioglie il polimero iniziale.

In questo studio, nei campioni di PCL irraggiati non è stata osservata la formazione di geli. Le soluzioni in cloroformio usate per l'analisi GPC sono risultate perfettamente omogenee e la filtrazione su membrane da 0,45 micron non ha evidenziato la presenza di geli.

I pesi molecolari medi Mn e Mw e l'indice di polidispersità per i campioni di PCL irraggiati a dosi crescenti in aria e in assenza di ossigeno (sotto vuoto) sono riportati nella Tab. 1. Dall'esame dei dati sperimentali appare evidente che il peso molecolare Mn e Mw dei campioni diminuisce al crescere della dose, mentre cresce di poco la polidispersità. Mn risulta quasi dimezzato alla dose di 50 kGy. Questi risultati sono in accordo con quelli riportati in un precedente studio sull'irraggiamento di nanofibre di PCL [10]. Altri autori hanno invece riportato un aumento di Mw irraggiando film di PCL [9]. Si può spiegare questo risultato soltanto se i macroradicali formati a seguito della scissione primaria delle catene reagiscono con altre catene formando macromolecole ramificate. I risultati del nostro studio indicano quindi che l'irraggiamento gamma delle nanofibre di PCL determina prevalentemente la rottura delle catene polimeriche rispetto alla ricombinazione. Il processo di scissione di catena per azione dei raggi gamma è di tipo statistico, ovvero può essere attaccato un punto qualsiasi lungo la catena polimerica. Quelle a peso molecolare maggiore subiscono l'attacco con maggiore probabilità e così la distribuzione dei pesi molecolari risulta allargata verso i bassi pesi molecolari.

Tab. 1

Effetto della dose crescente di raggi gamma sui pesi molecolari medi

pressione atmosferica				sottovuoto			
Dose (kGy)	Mn (kDa)	Mw (kDa)	PD (Mw/Mn)	Dose (kGy)	Mn (kDa)	Mw (kDa)	PD (Mw/Mn)
0	131	227	1,7	0	131	227	1,7
10	110	203	1,9	10	105	197	1,9
25	88	169	1,9	25	97	183	1,8
50	69	147	2,2	50	70	174	2,5

*i dati sono mediati su una serie di tre ripetizioni

Va precisato che i test condotti a 50 kGy hanno inteso completare l'indagine sperimentale circa gli effetti limite del trattamento sul materiale, sottoponendo quest'ultimo ad uno stress da irraggiamento particolarmente in-

tenso e di per sé non significativo dal punto di vista industriale. Infatti i dosaggi utilizzati nei servizi di sterilizzazione, e tanto più se l'obiettivo è quello della sanificazione, sono nettamente inferiori rispetto a tale valore di prova.

Tab. 2

Entalpia di fusione (λ), temperature di fusione (Tf) e percentuale di cristallinità (X) in funzione della dose

1^a scansione termica

pressione atmosferica

dose (kGy)	λ (J/g)	Tf (°C)	X (%)
0	61,0	58,9	43
10	60,9	59,8	43
25	68,2	59,7	48
50	62,7	59,4	44

1^a scansione termica

sottovuoto

dose (kGy)	(J/g)	Tf (°C)	X (%)
0	61,0	58,9	43
10	59,2	59,7	42
25	66,2	59,6	47
50	63,4	59,7	45

2^a scansione termica

pressione atmosferica

dose (kGy)	(J/g)	Tf (°C)	X (%)
0	41,0	54,8	29
10	40,1	54,9	28
25	44,9	55,1	32
50	44,9	55,1	32

2^a scansione termica

sottovuoto

dose (kGy)	(J/g)	Tf (°C)	X (%)
0	41,0	54,8	29
10	40,2	54,9	28
25	45,8	55,0	32
50	46,7	55,1	33

*i dati sono mediati su una serie di tre ripetizioni

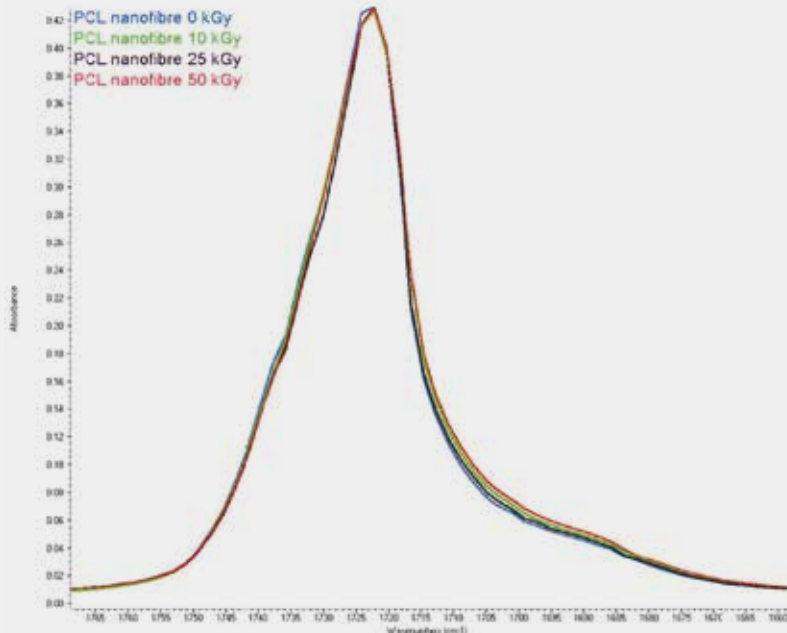


Fig. 1

Espansione della zona del C=O degli spettri FTIR (assorbanza vs lunghezza d'onda) dei campioni di nanofibre di PCL irraggiati in aria a dosi crescenti

Il confronto tra i pesi molecolari nelle prove in aria rispetto a quelle sotto vuoto in assenza di ossigeno, mostra solo piccole e poco significative differenze nei valori.

Nella Tab. 2 sono riportati i risultati delle prove di caratterizzazione termica dei campioni di PCL irraggiato. I valori nella tabella sono relativi alla prima e alla seconda scansione in riscaldamento, rispettivamente. Di solito i risultati della prima scansione sono scartati perché influenzati da differenze nella storia termica dei campioni prima dell'analisi DSC. Tali differenze sono annullate sottoponendo allo stesso ciclo termico tutti i campioni da analizzare. In questo caso, però, i campioni hanno avuto tutti lo stesso trattamento termico prima dell'analisi DSC e quindi abbiamo considerato anche i dati della prima scansione per mettere in evidenza il comportamento delle nanofibre di PCL rispetto al PCL in "bulk". L'analisi termica ha evidenziato che:

- a) la cristallinità aumenta al crescere della dose fino a 25 kGy e poi decresce a 50 kGy;
- b) le nanofibre hanno una maggiore cristallinità rispetto al PCL in "bulk";
- c) la temperatura di fusione varia di poco in funzione della dose e quindi le differenze tra i valori a dosi diverse sono poco significative;
- d) i risultati in aria e senza ossigeno sotto vuoto sono praticamente identici.

L'aumento della cristallinità con l'irraggiamento si giustifica con la diminuzione del peso molecolare delle catene, che, quindi, possono cristallizzare più rapidamente. Durante il processo di elettrofilatura delle nanofibre da soluzione, le catene possono più facilmente allinearsi a formare domini cristallini rispetto ad un processo di cristallizzazione dal fuso (2^a scansione).

Gli spettri FTIR dei campioni di nanofibre registrati con la tecnica micro ATR (micro cristallo di germanio) mostrano i picchi caratteristici del C=O dei gruppi estere (1.722 cm⁻¹, il picco più intenso dell'intero spettro) insieme ai picchi dei legami C-O nella regione 1.240-1.000 cm⁻¹ e infine i picchi dei legami C-H nella zona 2.950-2.850 cm⁻¹. Confrontando gli spettri dei campioni irraggiati in aria tra 4.000 e 650 cm⁻¹, al crescere della dose non si osservano nuovi picchi che indicano la formazione di gruppi funzionali diversi da quelli presenti nel PCL non irraggiato. La composizione chimica delle nanofibre non viene pertanto modificata dall'irraggiamento.



Espandendo singole zone dello spettro si possono evidenziare piccole differenze nella banda del C=O a 1.722 cm^{-1} . Come si può osservare dalla Fig. 1, negli spettri espansi si nota una spalla a circa 1.690 cm^{-1} più evidente nel campione trattato a 50 kGy e ben poco evidente nel campione non irraggiato. La spalla ha intensità confrontabile nei campioni a 10 e 25 kGy. Nello spettro del campione trattato in assenza di ossigeno a 50 kGy la spalla è ancora più evidente, come si può osservare negli spettri FTIR riportati in Fig. 2. I dati disponibili non consentono al momento di determinare esattamente le cause della reazione, ma essi suggeriscono la possibilità che l'ossigeno sia coinvolto nel processo di rottura delle catene. Negli spettri Raman di campioni irraggiati a dosi crescenti non sono stati evidenziati nuovi picchi, quindi sono confermati i risultati ottenuti con l'analisi micro FTIR. La spettroscopia Raman può comunque dare in più indicazioni sulle fasi cristallina e amorfa, grazie a bande sensibili all'organizzazione spaziale delle catene polimeriche. Le bande del PCL utili per questa analisi sono diverse, in particolare alcune bande strette a 1.720 , 1.470 - 1.415 , 1.303 - 1.281 , 1.107 - 1.003 e 912 cm^{-1} sono caratteristiche della fase cristallina [12]. Una banda allargata a 868 cm^{-1} è invece associata alla fase amorfa [12]. In particolare, le bande a 1.303 - 1.281 cm^{-1} sono quelle caratteristiche del moto di "wagging" dei gruppi $-\text{CH}_2-$. La Fig. 3 mette a confronto questa porzione dello spettro Raman dei campioni di nanofibre di PCL trattate a dosi crescenti (le bande caratteristiche del wagging cadono a 1.307 e 1.285 cm^{-1} nei nostri spettri). Le differenze di intensità della banda a 1.285 cm^{-1} sono in linea con i valori di cristallinità misurati con l'analisi calorimetrica.

La Fig. 4 riporta infine le curve sforzo deformazione registrate, usando l'analizzatore dinamico-meccanico come dinamometro adatto a misurare le forze applicate a campioni di piccole dimensioni. Questa puntualizzazione è importante perché i dati che abbiamo raccolto in questa modalità sperimentale possono non essere direttamente correlabili a quelli ottenibili con un dinamometro. Le curve dei campioni irraggiati in aria si discostano maggiormente dalla curva del campione non irraggiato e lo scostamento aumenta con la dose. Al contrario, i campioni irraggiati in assenza di ossigeno riescono a mantenere quasi inalterata la loro rigidità anche a dosaggi

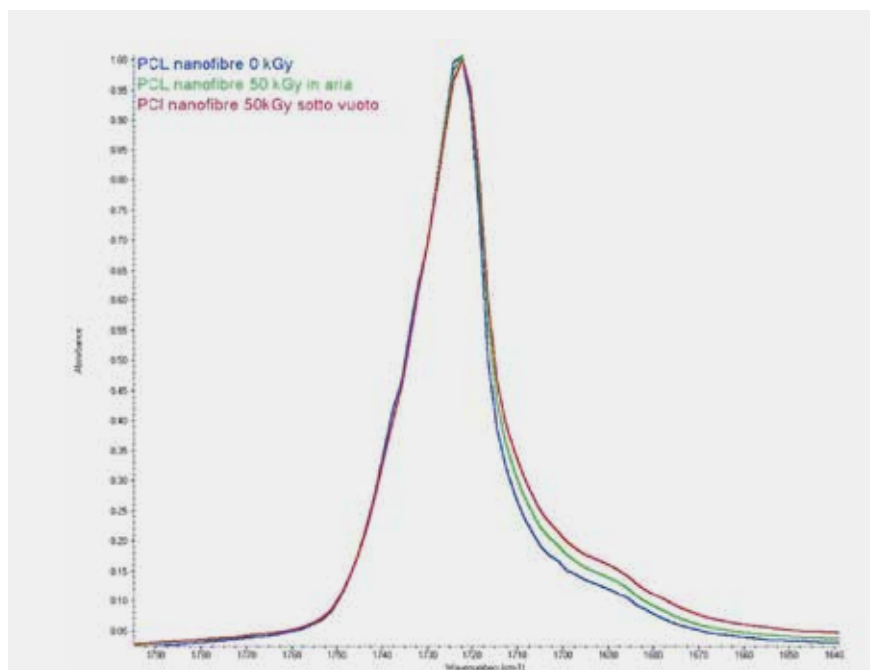


Fig. 2
Espansione della zona del C=O degli spettri FTIR (assorbanza vs lunghezza d'onda) dei campioni di nanofibre di PCL irraggiati a 50 kGy in aria e sottovuoto

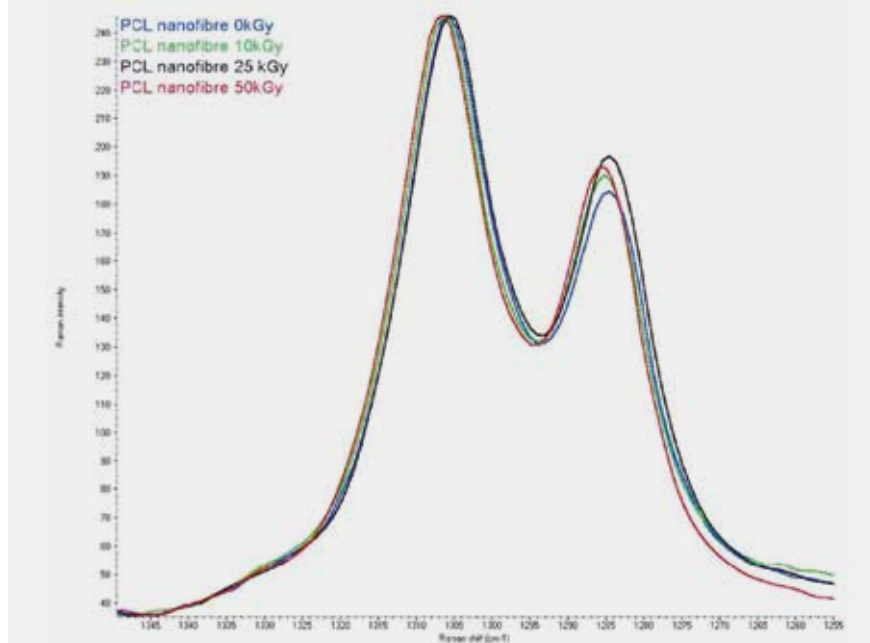


Fig. 3
Espansione della regione dello spettro Raman (intensità vs lunghezza d'onda) caratteristica dei picchi di "wagging" dei gruppi $-\text{CH}_2-$ per i campioni di nanofibre di PCL irraggiati in aria a dosi crescenti

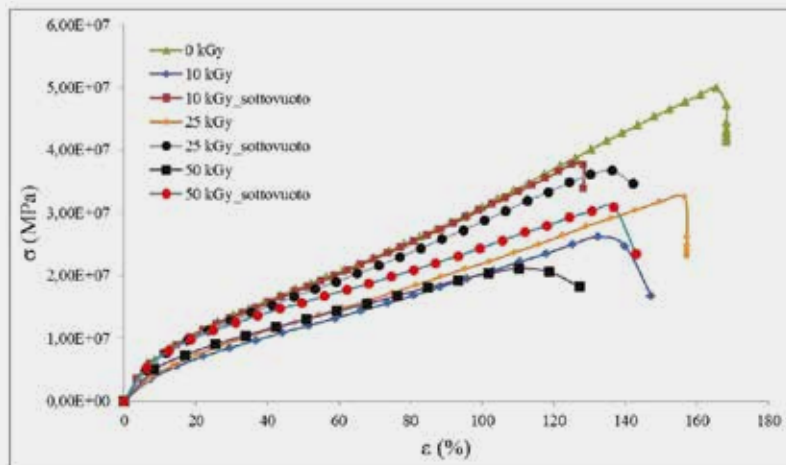


Fig. 4
Curve sforzo/deformazione per elettrofilati irraggiati in aria e sottovuoto (velocità di deformazione 5 mm/min.)

doppi rispetto a quelli necessari per la sterilizzazione prevista dalla farmacopea (Ph.Eur) avente 25 kGy come dose minima.

Conclusioni

Questo studio sull'irraggiamento gamma di nanofibre di policaprolattone ha confermato l'effetto di attivazione di reazioni di rottura delle catene polimeriche con conseguente diminuzione del peso molecolare. L'effetto diventa più marcato mano a mano che la dose applicata aumenta. La caratterizzazione spettroscopica con microscopia Raman e FTIR non ha evidenziato variazioni della composizione chimica delle nanofibre anche a dosi elevate di 50 kGy. L'analisi calorimetrica ha rivelato alcune piccole variazioni della cristallinità e della temperatura di fusione del PCL in funzione della dose applicata. La presenza o meno di ossigeno durante l'irraggiamento non ha influenzato le proprietà delle nanofibre, se non per quanto riguarda l'andamento delle curve sforzo-deformazione a trazione. Infine, anche dosi di 50 kGy non hanno pregiudicato l'integrità delle nanofibre, ricordando ancora una volta che tale dosaggio è stato considerato solo come condizione di stress del materiale, essendo esso largamente superiore ai valori standard per processi industriali di sterilizzazione.

I dati raccolti finora indicano la compatibilità dell'irraggiamento gamma con le necessità di sterilizzazione di nanofibre a base di PCL.

Questo risultato è importante perché il pieno sviluppo di nuove applicazioni di materiali avanzati nel settore biomedicale implica lo studio e la definizione di adeguati processi di sterilizzazione, efficaci ed affidabili. Gli studi di laboratorio per la caratterizzazione del comportamento in vitro di nanofibre possono avvalersi di metodi di abbattimento della contaminazione microbica mediante trattamenti superficiali con raggi UV o immersione in etanolo, che non sono tuttavia comparabili con i processi considerati in questa sede e normati per i dispositivi medici. La ricerca qui esposta, di cui sono stati presentati alcuni risultati, potrà proseguire con ulteriori studi sulle proprietà meccaniche delle nanofibre, specialmente in relazione ad ambiti di utilizzo che richiedano particolari prestazioni in termini di resistenza ai carichi. D'altro canto, per altre applicazioni (quali ad esempio quelle orientate a prodotti capaci di supportare il rilascio di principi attivi), le prove eseguite forniscono esiti che incoraggiano a proseguire nella sperimentazione, in vista di interessanti possibili evoluzioni sui prodotti.

BIBLIOGRAFIA

[1] C.G. Pitt, Poly-gamma-caprolactone and its copolymers, in Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems, M. Chasin, R. Langer (Eds.), Marcel Dekker, New York, 1990, 71.
[2] R. Chandra, R. Rustgi, *Progr. Polym.*

Sci., 1998, **23**, 1273.
[3] A. Luciani *et al.*, *Biomaterials*, 2008, **29**, 4800.
[4] M.A. Woodruff, D.W. Hutmacher, *Prog. Polym. Sci.*, 2010, **35**, 1217.
[5] L. Bosworth, *Nano Biomaterials*, 2008, **1**, 263.
[6] M. Narkis *et al.*, *Polymer*, 1985, **26**, 50.
[7] V. Masson *et al.*, *Biomaterials*, 1997, **18**(4), 327.
[8] F. Gorna, S. Gogolewski, *Polym. Degrad. Stabil.*, 2003, **79**, 465.
[9] E. Cottam *et al.*, *Med. Eng. Phys.*, 2009, **31**, 221.
[10] L.A. Bosworth *et al.*, *J. Polym. Sci. Polym. Phys.*, 2012, **50**, 870.
[11] T. Elzein *et al.*, *J. Coll. Interf. Sci.*, 2004, **273**, 381.
[12] G. Kister *et al.*, *Polymer* 2000, **41**, 925.

Nanofibres Gamma Irradiation

Samples of polycaprolactone nanofibers have been irradiated with gamma rays at different dose, in order to verify their compatibility with a treatment and decontamination process, already widely applied in the biomedical context. The average molecular weight decreased after irradiation, but nanofibers did not lose their integrity. Chemical structure and thermal properties of polymer were not significantly affected.

RAFFAELE MORELLI¹ - MAURIZIO FIORINI¹
REZIO ANTONIO BUSCAROLI² - ANDREA BORELLA²

¹CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCA INDUSTRIALE MECCANICA AVANZATA E MATERIALI, CIRI-MAM UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

²GAMMARAD ITALIA SPA (ORA STERIGENICS ITALY)

ABORELLA@STERIGENICS.COM