

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**NUOVO COPOLIMERO TRIBLOCCO PER APPLICAZIONI
BIOMEDICALI A BASE DI POLILATTICO E CONTENENTE
SEQUENZE “PEG-LIKE”: SINTESI E CARATTERIZZAZIONE
ALLO STATO SOLIDO**

**Tesi in
Fondamenti Di Chimica**

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa Nadia Lotti

Presentata da

Caterina Boghi

Correlatore

Dr.ssa Michelina Soccio

**II Sessione, II Appello
Anno Accademico 2015/2016**

Indice

1. Capitolo 1: Introduzione	5
1.1. Polimeri: definizione e classificazione.....	5
1.2. Biomateriali polimerici	8
1.2.1. Degradazione	9
1.2.1.1. Idrolisi chimica.....	10
1.2.1.2. Idrolisi enzimatica	11
1.2.1.3. Fattori che influenzano l'idrolisi	12
1.2.2. Polimeri nel biomedicale	13
1.3. Copolimeri.....	15
1.3.1. Copolimeri statistici.....	16
1.3.2. Copolimeri a blocchi.....	17
1.4. Poliesteri alifatici.....	18
1.4.1. Sintesi dei poliesteri.....	19
1.4.2. Proprietà fisiche	20
1.4.3. Cristallinità.....	20
1.4.4. Proprietà termiche	21
1.5. L'acido polilattico	22
1.5.1. Produzione	22
1.5.2. Proprietà.....	23
1.5.3. Copolimeri	25
1.5.4. Applicazioni.....	26
1.5.4.1. Ingegneria tissutale	27
1.6. Il polibutilene succinato	29
1.6.1. Produzione	30
1.6.2. Proprietà.....	31
1.6.3. Applicazioni.....	31
1.6.4. Copolimeri	32
1.6.4.1. Poli(Butilene/trietilene Succinato) P(BSTES).....	33
1.6.4.1.1. Proprietà.....	35
2. Scopo della tesi	37
3. Materiali e metodi	41
3.1. Sintesi.....	41
3.1.1. Reagenti	41
3.1.2. Sintesi dei polimeri	43
3.1.2.1. Sintesi del PBS-OH	43

3.1.2.2.	Sintesi del PTES-OH	43
3.1.2.3.	Sintesi del copolimero P(BSTES)-OH	44
3.1.2.4.	Sintesi dell'omopolimero PLLA	44
3.1.2.5.	Sintesi del copolimero PLLAP(BSTES)	46
3.2.	Purificazione dei polimeri ottenuti	48
3.3.	Preparazione di film polimerici	48
3.4.	Caratterizzazione molecolare	49
3.4.1.	Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)	49
3.4.2.	Cromatografia a permeazione di gel (GPC)	51
3.5.	Caratterizzazione termica	53
3.5.1.	Analisi termogravimetrica (TGA)	53
3.5.2.	Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	54
3.6.	Analisi diffrattometrica a raggi X (WAXS)	57
3.7.	Caratterizzazione meccanica	59
3.8.	Studi di degradazione idrolitica	62
4.	Risultati e discussione	63
4.1.	Sintesi	63
4.2.	Caratterizzazione molecolare e termica dei materiali ottenuti	64
4.2.1.	Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)	64
4.2.2.	Cromatografia a permeazione di gel (GPC)	66
4.2.3.	Analisi termogravimetrica (TGA)	66
4.2.4.	Calorimetria differenziale a scansione (DSC) e analisi diffrattometrica (WAXS)	67
4.3.	Comportamento meccanico	72
4.4.	Studi di degradazione idrolitica	74
5.	Conclusioni	77
	Bibliografia	79
	Ringraziamenti	83

CAPITOLO 1

Introduzione

1.1 POLIMERI: DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE

I polimeri sono un'ampia classe di materiali utilizzati quotidianamente in applicazioni di uso domestico e industriale. Essi sono composti ottenuti, tramite polimerizzazione, dall'unione di una o più molecole semplici, dette monomeri. Se i monomeri che costituiscono un polimero sono tutti dello stesso tipo, il composto si chiama omopolimero; al contrario, se i monomeri variano, il composto si chiama copolimero e il processo di polimerizzazione prende il nome di copolimerizzazione. I polimeri si distinguono anche in base al numero di monomeri che li costituiscono: si hanno quindi dimeri, trimeri, tetrameri (ecc...), se le loro molecole sono formate rispettivamente da due, tre, quattro (o più) molecole di monomero. Se sono costituiti da centinaia o migliaia di monomeri prendono il nome di macromolecole.

Inoltre, i polimeri possono presentare quattro tipi di strutture (Figura 1.1):

- Struttura lineare, in cui le molecole di monomero si susseguono l'una all'altra formando lunghe catene che si aggrovigliano tra loro formando dei gomitoli (tra le catene macromolecolari si instaurano interazioni deboli, tra cui interazione dipolo-dipolo, legami ad idrogeno, forze di Van der Waals) (Figura 1.1 a);
- Struttura ramificata, che è simile a quella lineare tranne per il fatto che alcune unità monomeriche, invece di susseguirsi linearmente, si diramano anche in catene laterali, riducendo la capacità di impacchettamento del polimero e quindi abbassandone la densità. Le singole catene laterali interagiscono tramite legami deboli (Figura 1.1 b);
- Struttura a legami trasversali o intermolecolari, nella quale le molecole di polimero risultano unite da catene trasversali tramite legami covalenti (Figura 1.1 c);
- Struttura reticolata, caratterizzata da unità monomeriche trifunzionali che possiedono tre legami covalenti attivi, i quali danno origine a reti

tridimensionali. Il polimero che possiede questa struttura può essere considerato una sola grande macromolecola. (Figura 1.1 d)

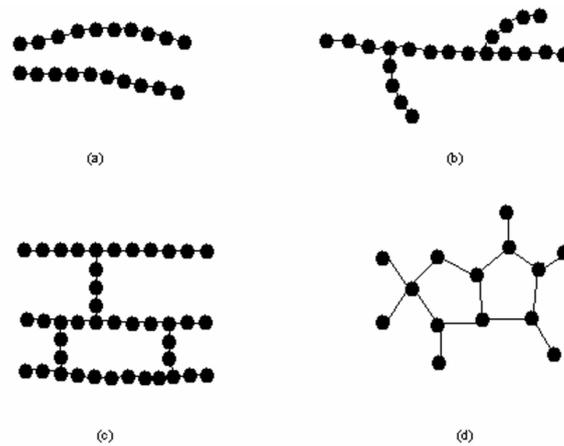


Figura 1.1: Strutture molecolari dei polimeri. Tratta da: P. Anadão, *Polymer/ Clay Nanocomposites: Concepts, Researches, Applications and Trends for The Future*, "Nanocomposites - New Trends and Developments", 2012, book edited by Farzad Ebrahimi

I polimeri sono classificabili anche in base alla loro origine:

- I polimeri naturali sono i polimeri presenti in natura (Figura 1.2). Tra essi si ricordano, a titolo di esempio, la cellulosa, le proteine e la gomma naturale (caucciù);
- I polimeri artificiali, che sono ottenuti modificando i polimeri naturali, come ad esempio l'acetato di cellulosa (Figura 1.2);

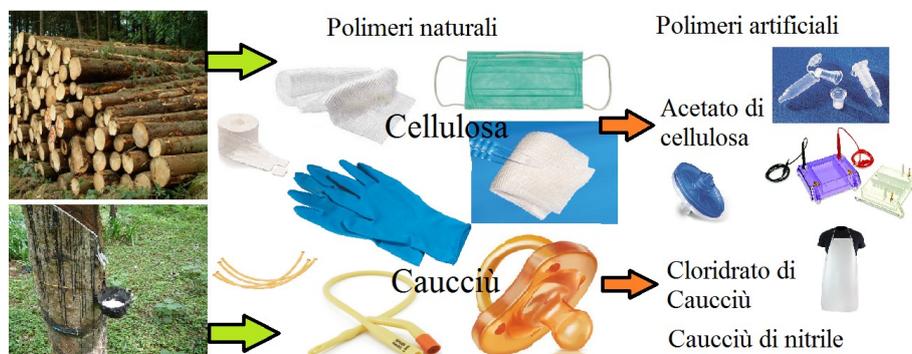


Figura 1.2: Esempi di polimeri naturali e artificiali

- I polimeri sintetici, che sono prodotti artificialmente su scala industriale. Si annoverano tra essi le materie plastiche come PVC e PET (Figura 1.3).



Figura 1.3: Esempi di polimeri sintetici

I polimeri possono essere divisi ulteriormente in termoplastici e termoindurenti, in base al loro comportamento quando sottoposti a calore:

- I polimeri termoplastici acquisiscono malleabilità, cioè rammolliscono, sotto l'azione del calore; possono essere modellati o formati in diversi manufatti per un numero teoricamente illimitato di volte. Sono costituiti prevalentemente da macromolecole lineari;
- I polimeri termoindurenti invece, dopo una fase iniziale di rammollimento per riscaldamento, induriscono a causa della reticolazione; nella fase di rammollimento, per effetto combinato di calore e pressione risultano formabili, ma se vengono riscaldati dopo l'indurimento non rammolliscono più (poiché aumentano le reticolazioni), ma si decompongono carbonizzandosi.

1.2 BIOMATERIALI POLIMERICI

Si definisce biomateriale una sostanza non vivente utilizzata nella fabbricazione di un dispositivo medico che ha in qualche punto si interfaccia con un tessuto vivente [1].

Tra i biomateriali si elencano quelli metallici, quelli ceramici, i compositi, i materiali biologici e quelli polimerici. Per ogni classe di biomateriali cambiano le aree di applicazione, le proprietà e le caratteristiche. Tuttavia, esistono dei requisiti che tutti i materiali per uso biomedico, devono possedere:

- Biocompatibilità, ovvero capacità del dispositivo di continuare a svolgere quella determinata funzione durante tutta la vita utile dell'impianto ed è strettamente connessa, quindi, alle interazioni tra i biomateriali ed i tessuti con cui vengono a contatto;
- Biofunzionalità, che si riferisce alle proprietà che un dispositivo deve avere per riprodurre una determinata funzione dal punto di vista fisico e meccanico;
- Atossicità, cioè nessun rilascio di sostanze nocive per l'organismo da parte del materiale;
- Proprietà meccaniche, quali la resistenza alla trazione, resistenza allo snervamento, modulo elastico, resistenza alla corrosione e al *creep* e durezza, che devono essere idonee per l'applicazione prevista;
- Mantenimento della struttura e della funzionalità previste;
- Lavorabilità, poiché un materiale deve poter essere forgiato nella forma finale desiderata.

Considerando singolarmente le diverse classi di biomateriali, è possibile affermare in maniera generale che i biomateriali metallici presentano elevate caratteristiche meccaniche e resistenza all'usura, ma allo stesso tempo scarsa biocompatibilità, alta rigidità e facile corrosione in ambiente biologico. I ceramici hanno invece buona biocompatibilità, inerzia chimica e resistenza alla corrosione, tuttavia presentano bassa affidabilità meccanica, fragilità e difficile lavorabilità. I materiali biologici sono i più biocompatibili tra tutti, ma sono estremamente difficili da processare e conservare e presentano scarsa

affidabilità. I compositi, pur non essendo facilmente lavorabili, mostrano caratteristiche intermedie rispetto a quelle dei materiali che li compongono, e variabili anche in funzione della composizione. I materiali polimerici, che verranno ampiamente trattati successivamente, presentano bassi coefficienti d'attrito, una buona resistenza all'usura ed una facile lavorabilità; una caratteristica peculiare di questa classe è l'ampia variabilità di composizione, grazie alla quale è possibile ottenere proprietà fisico-meccaniche ottimali in funzione della destinazione d'uso.

Negli ultimi anni la ricerca di nuovi materiali polimerici ha subito un notevole incremento, soprattutto per la necessità di risolvere i problemi ambientali che derivano dalla non degradabilità della maggior parte dei materiali plastici al termine del loro ciclo di vita e dalla loro produzione, che risulta spesso ad alto impatto ambientale e che utilizza fonti non rinnovabili quali petrolio e derivati. Considerato tale scenario, attenzione crescente è stata rivolta ai "biopolimeri", polimeri biodegradabili ottenuti da fonte fossile, oppure polimeri non biodegradabili ma prodotti utilizzando monomeri *biobased*, o polimeri *biobased* biodegradabili. Tra tali materiali spiccano i poliesteri alifatici che risultano in molti casi biocompatibili e biorisorbibili.

1.2.1 DEGRADAZIONE

Con il termine degradazione si intende una reazione di scissione di una specie chimica (ad esempio una molecola) in più specie chimiche diverse. In alcuni ambiti la degradabilità del materiale rappresenta un limite, mentre in altri, come il *packaging* o il settore delle plastiche "*eco-friendly*", dove a fine vita il materiale non deve permanere nell'ambiente, o in campo biomedicale, un valore aggiunto. La stabilità di un composto chimico è influenzata dalle condizioni ambientali come calore, radiazioni, umidità o acidità di un solvente. La degradazione può avvenire secondo diversi meccanismi: fotodegradazione, degradazione meccanica, termica e chimica.

Per i biomateriali polimerici, gli effetti della fotodegradazione sono di minore importanza rispetto a quelli della degradazione termica, mentre la degradazione meccanica influenza i polimeri che sono sottoposti a sollecitazioni meccaniche (ad esempio quelli usati come fili di sutura) [2]. Tutti i polimeri biodegradabili

contengono legami idrolizzabili, pertanto, il meccanismo di degradazione più importante è quello di tipo chimico. Per i polimeri che degradano in ambienti biologici, esistono principalmente due modi con cui i legami polimerici possono essere scissi: attivamente tramite reazione enzimatica, o passivamente mediante idrolisi, che risulta anche il processo più comune. La suscettibilità di un polimero all'idrolisi è legata alla sua natura chimica, alla struttura, alle dimensioni e all'ambiente. La degradazione può essere monitorata misurando i cambiamenti di peso molecolare, che insorgono a causa della scissione dei legami inter- e intracatena, misurando la perdita di peso gravimetrico, oppure valutando altri parametri come la perdita di resistenza meccanica, la degradazione in monomeri o il rilascio dei monomeri stessi. Il biorisorbimento si differenzia dalla biodegradazione in quanto è un processo metabolicamente passivo, che non richiede energia, ma dipende solo dall'equilibrio cinetico e dalla composizione superficiale delle cellule con cui il materiale entra in contatto [3]. Esso infatti si può definire come il processo di dissoluzione o di rimozione, dovuto ad attività cellulare, di un materiale inserito in un ambiente biologico [1].

1.2.1.1 IDROLISI CHIMICA

Per poter essere degradato dall'acqua, il polimero deve contenere legami idrolizzabili, quali ad esempio esteri, ortoesteri, eteri, anidridi, ammidi, uree e uretani. Esistono due modalità attraverso cui i legami polimerici possono essere scissi: l'erosione in *bulk*, se la diffusione dell'acqua all'interno del polimero è più veloce della degradazione dei legami del polimero stesso, e la degradazione limitata alla superficie, che avviene quando la degradazione dei legami è più veloce rispetto alla diffusione di acqua (Figura 1.4) [4]. Per i poliesteri alifatici la degradazione idrolitica avviene per erosione in *bulk*: l'ingresso di acqua innesca la degradazione chimica del polimero, portando alla formazione di oligomeri e monomeri [5]. Da un punto di vista macroscopico, questo processo di idrolisi avviene in due fasi: in primo luogo, si verifica una rottura casuale dei legami della catena polimerica con una sostanziale diminuzione di peso molecolare, portando ad una riduzione delle proprietà meccaniche, quali

resistenza a trazione, allungamento a rottura e resistenza all'urto, mentre le perdite di peso sono trascurabili [6]. Nella seconda fase di degradazione, i frammenti di catena passano in soluzione, con conseguente perdita di peso gravimetrico [7].

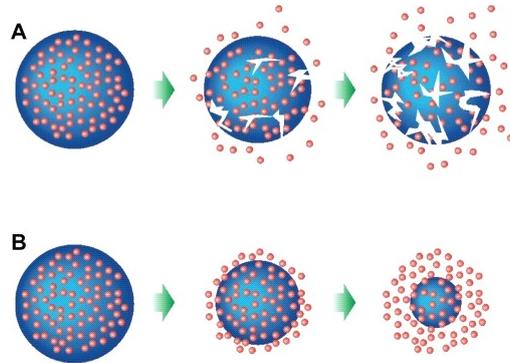


Figura 1.4: Degradazione polimerica della massa (A), degradazione della superficie (B). Tratta da “Dinarvand R. et al. *Poly lactide-co-glycolide Nanoparticles for Controlled Delivery of Anticancer Agents*, International Journal of Nanomedicine, 2011”

1.2.1.2 IDROLISI ENZIMATICA

Le reazioni di idrolisi nei sistemi biologici sono catalizzate da numerosi enzimi, differenti a seconda del tipo di legame che viene idrolizzato: legami glicosidici, legami peptidici, e legami esterei sono interessati da questo tipo di reazione. In un sistema biologico la biodegradazione è efficace quando l'enzima entra nella conformazione stereochimica del substrato della molecola: questa azione è simile ad un meccanismo chiave-serratura (Figura 1.5), in cui ciascun enzima esegue una funzione chimica specifica.

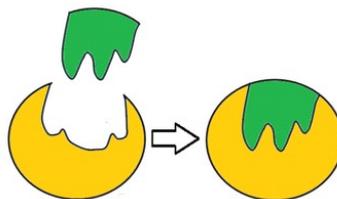


Figura 1.5: Meccanismo chiave-serratura. Immagine tratta da <http://study.com>

La degradazione enzimatica procede solo sulla superficie del substrato, poiché l'enzima non può penetrare nella matrice polimerica; essa dunque comporta una perdita di peso gravimetrico, mentre la massa molecolare e la sua distribuzione non variano significativamente, a differenza di quanto avviene in caso di idrolisi chimica [7]. I prodotti di degradazione a basso peso molecolare vengono rimossi dal substrato mediante solubilizzazione nel mezzo acquoso circostante.

1.2.1.3 FATTORI CHE INFLUENZANO LA DEGRADAZIONE

Il meccanismo di degradazione idrolitica dipende sia dalla struttura del polimero, sia dall'ambiente in cui si trova [8]. In effetti, numerose variabili controllano il processo di degradazione: la composizione chimica, la struttura stereochimica, la distribuzione delle sequenze, il peso molecolare e la sua distribuzione, la morfologia e l'orientamento della catena, l'eventuale presenza di monomeri residui, oligomeri e altri prodotti a basso peso molecolare, la dimensione e la forma del campione. La cristallinità risulta uno dei fattori più importanti; infatti, entrambi i tipi di degradazione hanno luogo prima nelle regioni amorfe, caratterizzate da mobilità superiore e densità inferiore rispetto alle regioni cristalline. Occorre sottolineare inoltre come la presenza di imperfezioni nelle regioni cristalline influenzi positivamente la degradazione; lo stesso dicasi per la porosità, ovvero se una superficie porosa è esposta agli enzimi, la velocità di degradazione aumenta a causa dell'elevato rapporto superficie/volume, che si traduce in una maggiore disponibilità per l'attacco enzimatico. Anche l'orientamento della catena è importante: ad esempio, nel caso di fibre, l'orientamento delle catene lungo l'asse del filamento impedisce la penetrazione dell'acqua e migliora la resistenza all'attacco idrolitico. Fra i polimeri biodegradabili, poi, quelli aventi un punto di fusione inferiore sono generalmente più sensibili alla biodegradazione rispetto a quelli aventi un punto di fusione più elevato. Inoltre, un polimero sintetico, affinché possa essere degradato da un catalizzatore enzimatico, deve possedere una catena polimerica sufficientemente flessibile per adattarsi al sito attivo dell'enzima [6]: questo spiega perché i poliesteri alifatici, più flessibili rispetto a quelli aromatici

(bioinerti) e con una T_m generalmente inferiore, risultino più facilmente degradabili [6]. Occorre ricordare che anche la composizione chimica del materiale influenza notevolmente la velocità di degradazione: infatti, introducendo un secondo monomero in catena si modificano alcune proprietà, come il grado di cristallinità, il punto di fusione e la temperatura di transizione vetrosa, fattori che hanno effetti indiretti sui processi degradativi [5].

Infine, tra le caratteristiche dell'ambiente che influenzano di più tale processo, figurano la presenza di umidità, ossigeno, microrganismi ed enzimi, pH e la temperatura.

1.2.2 POLIMERI NEL BIOMEDICALE

Alla luce di quanto sopra riportato, i polimeri risultano biomateriali molto interessanti per applicazioni in ambito biomedicale. I principali vantaggi che i polimeri presentano rispetto alle altre classi di materiali sono una maggiore biocompatibilità, la possibilità di modificarne ampiamente composizione e proprietà fisico-meccaniche, bassi coefficienti di attrito, facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture complesse, possibilità di modificarne chimicamente e/o fisicamente la superficie, possibilità di immobilizzare cellule o biomolecole al loro interno o sulla superficie. Gli svantaggi principali sono la presenza di sostanze che possono essere rilasciate nell'organismo (monomeri, catalizzatori, additivi, ecc.), la facilità di assorbimento di acqua e biomolecole dall'ambiente circostante (anche nelle applicazioni in cui non è richiesto), le basse proprietà meccaniche e, in alcuni casi, la difficoltà di sterilizzazione.

Ciononostante, i materiali polimerici trovano impiego in svariati ambiti (Figura 1.6): in cardiologia vengono realizzati numerosi dispositivi medici impiantabili, quali cateteri, protesi vascolari, valvole cardiache, *stents* (Figura 1.7), sistemi di assistenza cardiaca come le apparecchiature di assistenza esterna (ossigenatori). In nefrologia tali materiali vengono impiegati nella realizzazione di apparecchiature per emodialisi ed emofiltrazione, in particolare per la realizzazione di membrane piane e fibre cave per la purificazione extracorporea del sangue; altri usi riguardano l'oftalmologia, ovvero realizzazione di lenti a contatto rigide e morbide, realizzazione di lenti intraoculari, e l'ortopedia, come

componenti delle protesi articolari (in particolare delle protesi d'anca e di ginocchio), placche e chiodi intramidollari per la fissazione delle fratture, e cemento per ossa (Figura 1.8). Tra le altre applicazioni si annoverano suture, tendini e legamenti artificiali, rinforzo per tessuti danneggiati in casi di ernie addominali e inguinali, organi bioartificiali e *scaffold* per la rigenerazione tissutale. La biodegradabilità è una proprietà chiave in campo biomedicale: può essere sfruttata per creare dispositivi che degradando rilasciano medicinali, o che una volta espletate le proprie funzioni vengono riassorbiti dall'organismo: ciò consente di evitare al paziente un secondo intervento chirurgico. Tra i polimeri più usati e studiati si annoverano l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA), il poli(ϵ -caprolattone) (PCL) e i loro copolimeri.

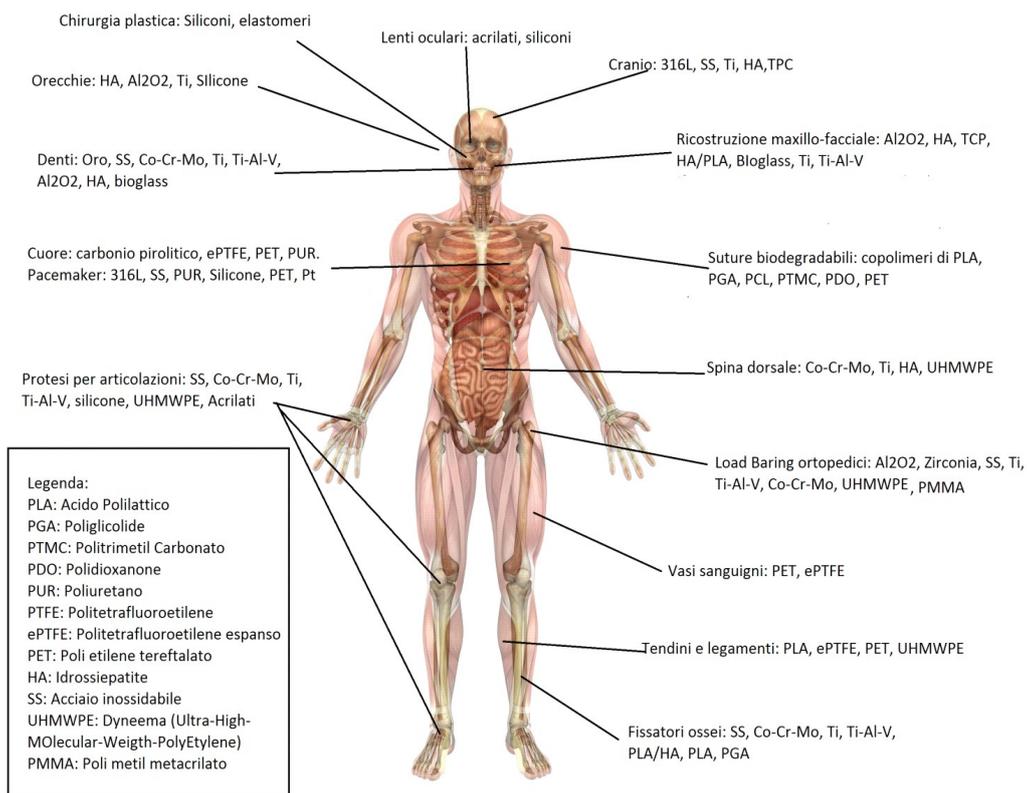


Figura 1.6: Panoramica sulle principali applicazioni di biomateriali polimerici

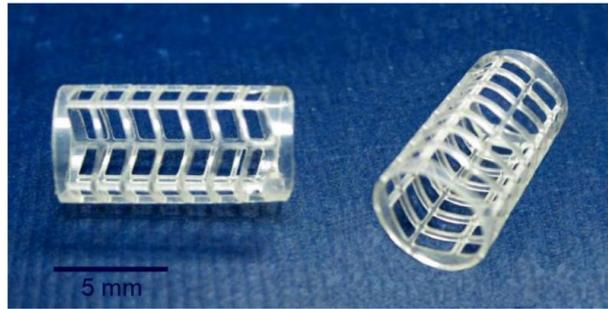


Figura 1.7: Esempio di *stent*. Tratta da "Jianting Dong, Lan Liao, Zhongyong Fan, Suming Li, and Zhiqian Lu, *Totally bioresorbable stents with improved properties for cardiovascular disease*; 2013 Society of Plastics Engineers (SPE)"



Figura 1.8: Esempio di protesi d'anca. Tratta da <https://www.exac.com/products/spacers/interspace-hip>

1.3 COPOLIMERI

I copolimeri sono macromolecole che si formano dall'unione di due o più monomeri differenti. Il processo di copolimerizzazione rappresenta un approccio di notevole interesse sia accademico, che industriale, poiché permette di modulare le proprietà finali del materiale per una specifica applicazione. Tale modulazione è possibile agendo, sul tipo, quantità relativa, distribuzione delle unità monomeriche lungo la catena del copolimero.

In base alla disposizione dei diversi monomeri all'interno della catena si possono riconoscere diverse situazioni (Figura 1.9):

- Copolimeri statistici o random, in cui i monomeri si susseguono in modo casuale, secondo statistica Bernoulliana;

- Copolimeri alternati, in cui i monomeri si dispongono in maniera alternata tra loro;
- Copolimeri a blocchi, in cui vi sono “blocchi” di monomeri dello stesso tipo che si alternano a “blocchi” dell’altro monomero, collegati tramite legami covalenti;
- Copolimeri graffati (*graft*) o ad innesto, costituiti da ramificazioni di uno dei due monomeri innestate su una catena principale costituita dall’altro monomero.

Nei paragrafi successivi verranno trattati più ampiamente i copolimeri statistici e a blocchi, oggetto della parte sperimentale.

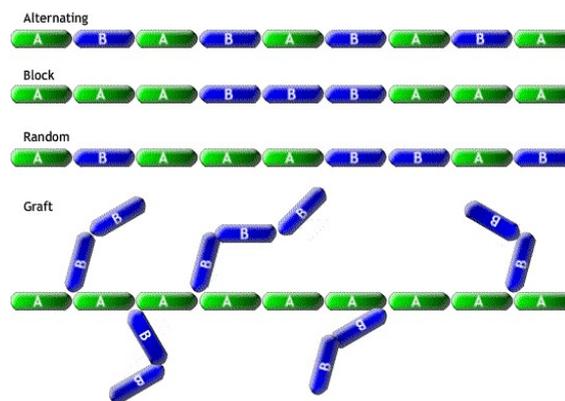


Figura 1.9: Struttura dei copolimeri. Immagine tratta da <http://www.doitpoms.ac.uk>

1.3.1 COPOLIMERI STATISTICI

La transizione vetrosa dei copolimeri statistici nella maggioranza dei casi varia in maniera monotona con la composizione e si manifesta ad una temperatura T_g intermedia rispetto a quelle caratteristiche dei due omopolimeri [9]. Inoltre, quando una o entrambe le unità monomeriche possono cristallizzare, tali copolimeri esibiscono un comportamento di cristallizzazione molto complesso. Per ciò che concerne la fase cristallina dei copolimeri, occorre precisare che se nella catena di un omopolimero (A) cristallizzabile vengono introdotte unità chimicamente o strutturalmente diverse (B) è prevedibile che la capacità di cristallizzazione del polimero A venga modificata.

In generale, le unità B possono:

- Venire totalmente escluse dal reticolo cristallino.
- Entrare nel reticolo cristallino in condizioni di equilibrio.
- Entrare nel reticolo cristallino sotto forma di difetto, ossia in condizioni di non-equilibrio.

Nel caso di comonomeri esclusi dal reticolo cristallino, entrambe le fase cristalline risultano pure.

1.3.2 COPOLIMERI A BLOCCHI

I copolimeri costituiti da blocchi di sequenze A e B incompatibili e non cristallizzabili formano, come conseguenza di una separazione di fase, microdomini amorfi. Se uno o entrambi i blocchi sono cristallizzabili, si ha segregazione di fase con formazione di domini cristallini.

Le transizioni termiche in tali sistemi multifasici microsegregati sono fortemente influenzate dalla morfologia, che a sua volta dipende, oltre che dalle caratteristiche molecolari del copolimero a blocchi, dal metodo di preparazione del campione (effetto della storia termica, meccanica, del solvente, ecc.).

Si distinguono quindi due tipologie di copolimeri a blocchi che verranno descritte in seguito: quelli con blocchi non cristallizzabili e quelli con blocchi cristallizzabili.

- **Blocchi non cristallizzabili**

Ad ogni fase amorfa presente corrisponde una transizione vetrosa che, in linea di principio e nell'ipotesi di una separazione di fase che porti a microdomini nettamente distinti, è facilmente correlabile alla T_g dell'omopolimero corrispondente. La situazione reale si avvicina a quella descritta solo quando il peso molecolare dei blocchi è elevato e l'incompatibilità tra i blocchi è molto marcata. In verità, la piccola dimensione dei domini porta ad un elevato rapporto superficie/volume con conseguente aumento delle interazioni tra fasi diverse. Conseguentemente, le transizioni termiche caratteristiche subiscono spostamenti e variazioni di intensità ed ampiezza.

- **Blocchi cristallizzabili**

Se nel copolimero uno o entrambi i blocchi sono cristallizzabili, la segregazione di fase comporta anche la formazione di domini cristallini. Questi possono dare luogo a strutture organizzate con un arrangiamento periodico, come avviene nel caso di copolimeri a due o tre blocchi, oppure a strutture prive di organizzazione, come nel caso di polimeri multi-blocchi.

Quando entrambi i blocchi sono cristallizzabili, la morfologia è dettata dal blocco che cristallizza per primo; il secondo componente deve adattarsi a cristallizzare in presenza delle restrizioni steriche imposte dai domini cristallini già formati.

Nel caso di un solo blocco cristallizzabile (A), il componente amorfo (B) può inibire la cristallizzazione di A se B vetrifica prima che A abbia potuto cristallizzare. In caso contrario A cristallizza formando strutture regolari alternate di strati amorfi e cristallini.

Nel caso dei copolimeri multi-blocco che danno luogo a domini cristallini, si formano microdomini cristallini dispersi in una fase amorfa, costituita dai segmenti flessibili e da una frazione più o meno cospicua del componente “rigido” che non riesce a cristallizzare.

1.4 POLIESTERI ALIFATICI

I poliesteri sono una classe di polimeri identificati dal ricorrere dell'unità funzionale esterea (Figura 1.10) nella catena carboniosa.

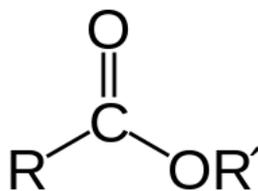


Figura 1.10: Un estere carbossilico. R ed R' denotano un gruppo alchilico o arilico. Immagine tratta da <https://it.wikipedia.org/wiki/Esteri>

I poliesteri possono essere aromatici o alifatici se presentano rispettivamente anelli aromatici all'interno della struttura oppure no. Alla classe dei poliesteri alifatici appartengono i polimeri biodegradabili di maggior successo, diffusione

e importanza soprattutto per quanto riguarda il loro utilizzo nel campo del *packaging* e in quello biomedicale. Di seguito verranno presi in esame in maniera più specifica due poliesteri alifatici, rispettivamente l'acido polilattico e il poli(butilene succinato), gli omopolimeri di riferimento del copolimero trattato nel presente lavoro di Tesi.

1.4.1 SINTESI DEI POLIESTERI

I poliesteri alifatici possono essere sintetizzati mediante due tipi di processo: la policondensazione e la polimerizzazione ad apertura d'anello (ROP).

Le reazioni di polimerizzazione per condensazione richiedono che i monomeri di partenza presentino determinati gruppi funzionali quali il gruppo alcolico, il gruppo amminico e il gruppo carbossilico. In tale processo di polimerizzazione un monomero bifunzionale reagisce chimicamente con un altro che possiede, a sua volta, due gruppi funzionali, rendendo possibile la formazione di oligomeri con massa molecolare crescente (contenenti ancora le funzionalità necessarie per il proseguimento della reazione), attraverso l'eliminazione di molecole di piccole dimensioni, come acqua, metanolo, ammoniaca o acidi inorganici. In particolare, i poliesteri sono ottenuti attraverso la formazione di legami esterei tra i gruppi funzionali carbossilici ed ossidrilici dei monomeri. In alcuni casi i monomeri possiedono più di due funzionalità: il polimero ottenuto risulterà ramificato. La policondensazione, oltre ad essere un processo piuttosto lento, consente di ottenere polimeri con peso molecolare non particolarmente elevato. Tale limite può essere superato grazie alla polimerizzazione ad apertura di anello (ROP) di lattoni, diesteri ciclici ed acetali chetonici ciclici: negli ultimi anni sono state condotte numerose ricerche finalizzate all'ottimizzazione del processo [8]. Si tratta di una poliaddizione che genera un numero limitato di reazioni secondarie, consentendo quindi il controllo del peso molecolare, della distribuzione del peso molecolare, e della tipologia di gruppi funzionali terminali. La ROP prevede l'apertura dell'anello, con conseguente formazione di una molecola lineare contenente un gruppo estereo. In base al tipo di meccanismo, si parla di ROP radicaliche, cationiche, anioniche, di coordinazione; i pesi molecolari più alti si ottengono tramite questi ultimi due

meccanismi. I dati termodinamici relativi alla polimerizzazione di lattoni di piccole e medie dimensioni hanno evidenziato come tale processo sia caratterizzato da una variazione negativa di entalpia; la presenza di sostituenti sull'anello carbonioso rende la reazione ancora più esoterma. E' possibile tenerla sotto controllo utilizzando opportuni iniziatori, quali i composti organometallici (ossidi, carbossilasi o alcossidi) [10].

1.4.2 PROPRIETÀ FISICHE

Le proprietà fisiche di un poliestere alifatico dipendono principalmente dal tipo di unità ripetitive, dalla presenza di gruppi polari, dalla flessibilità delle catene e dall'eventuale presenza di ramificazioni, dalla massa molecolare, così come dal grado di cristallinità. Come già accennato, è possibile modulare queste proprietà tramite copolimerizzazione, agendo sul tipo, quantità, disposizione delle unità comonomeriche lungo la catena macromolecolare. Per esempio, tramite copolimerizzazione è possibile ottenere polimeri innovativi, con le caratteristiche fisiche desiderate, modulabili in una gamma che si estende dalle plastiche rigide agli elastomeri. A titolo di esempio, l'introduzione di unità etere-estere lungo la catena dei poliesteri alifatici, permette di ottenere un materiale flessibile e pieghevole [8].

1.4.3 CRISTALLINITÀ

Come noto, lo stato cristallino è caratterizzato da una disposizione ordinata tridimensionalmente delle particelle costitutive. Il grado di cristallinità di un materiale misura la percentuale in peso di fase cristallina presente, e dunque varia da zero (materiale completamente amorfo) a 100% (materiale completamente cristallino). I poliesteri, in generale tutti i polimeri, non sono mai totalmente cristallini, contenendo al loro interno porzioni amorfe caratterizzate da una struttura disordinata tipica dello stato fuso: durante il raffreddamento da fuso le catene si muovono e si riallineano in una struttura ordinata, ma se la velocità di raffreddamento risulta troppo rapida, il polimero non ha il tempo di riorganizzarsi completamente e mantiene dunque una

porzione disordinata, cioè amorfa. La cristallinità dipende anche dalla struttura del polimero: catene non ramificate o reticolate danno luogo a polimeri maggiormente cristallini [11]. La cristallizzazione può essere favorita tramite stiro, come avviene ad esempio durante la formazione di film o fibre, che allinea le catene macromolecolari. Un maggior grado di cristallinità implica un maggior impacchettamento delle macromolecole, con conseguente aumento della densità e della rigidità, della resistenza al *creep*, migliore resistenza all'usura e all'aggressione ambientale. I materiali cristallini risultano generalmente anche più fragili, quindi in alcuni casi è preferibile mantenere una consistente porzione amorfa che possa assicurare elasticità e resistenza agli urti. Ad un'analisi visiva, i polimeri semicristallini sono generalmente opachi a causa della dispersione di luce sui numerosi confini tra cristallino e le regioni amorse [12]. Il grado di cristallinità può essere calcolato tramite misure di densità, dai diagrammi di diffrazione ai raggi X, spettri infrarossi, risonanza magnetica nucleare e da misure calorimetriche.

1.4.4 PROPRIETÀ TERMICHE

Le proprietà termiche di un polimero, ed in generale di un materiale, sono di fondamentale importanza dal punto di vista tecnologico e applicativo: per esempio, in caso di biomateriali polimerici da utilizzare all'interno del corpo umano, è necessario conoscere il loro comportamento alle temperature corporee, che sono solitamente superiori a quelle ambientali. Le principali temperature che caratterizzano un materiale sono la temperatura di transizione vetrosa (T_g), la temperatura di fusione (T_m), la temperatura di rammollimento (T_r) e la temperatura limite di stabilità chimica (T_l). La temperatura di transizione vetrosa T_g è la temperatura a cui avviene il passaggio dallo stato vetroso rigido allo stato gommoso, duttile e malleabile. La T_m , identificativa del punto di fusione della porzione cristallina del polimero, rappresenta il limite inferiore dell'intervallo termico entro cui il materiale risulta fuso; nel caso di polimeri amorfi, la grandezza termodinamica utilizzata è la T_r , che costituisce la soglia alla quale si verifica il passaggio dallo stato gommoso a quello liquido.

Infine, la T_L rappresenta il limite oltre il quale il polimero inizia a degradare in seguito alla rottura dei legami chimici.

1.5 L'ACIDO POLILATTICO

L'acido polilattico (o PLA) è uno dei poliesteri alifatici maggiormente studiati e impiegati a livello mondiale, grazie alle sue proprietà di biodegradabilità e biocompatibilità, e in quanto può essere ottenuto da risorse rinnovabili.

Il monomero di base dell'acido polilattico è l'acido lattico. Esso fu isolato per la prima volta nel 1780, grazie al lavoro del chimico svedese Scheele, e commercializzato a partire dal 1881 [13]. Il PLA è stato invece sintetizzato per la prima volta da Théophile-Jules Pelouze nel 1845, tramite policondensazione dall'acido lattico [14]. Nel 1932, Wallace Hume Carothers, affinò il metodo di produzione del PLA utilizzando il dimero dell'acido lattico, il lattide [15].

1.5.1 PRODUZIONE

La produzione ecosostenibile del PLA prevede in un prima fase la conversione dell'amido contenuto in sostanze organiche (mais, canna da zucchero, grano, barbabietole, tapioca,..) in glucosio, attraverso idrolisi enzimatica. Successivamente, attraverso un processo di fermentazione, lo zucchero viene scisso in acido lattico grazie a microrganismi, prevalentemente del tipo *Lactobacilli* [13]. L'acido lattico presenta due stereoisomeri otticamente attivi: quello destrogiro (D-) e quello levogiro (L-) come mostrato in Figura 1.11.

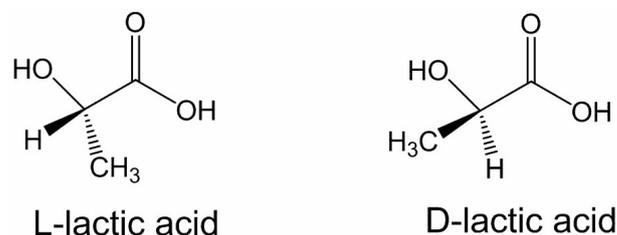


Figura 1.11: stereoisomeri dell'acido lattico

Gli esseri umani ed i mammiferi producono soltanto l'enantiomero L, mentre nei batteri si possono trovare entrambi [13].

A partire dall'acido lattico, la sintesi del PLA può avvenire tramite due processi di polimerizzazione, come mostrato in Figura 1.12.

Nel primo caso (Figura 1.12 b), la polimerizzazione avviene tramite policondensazione diretta dell'acido lattico: con tale metodo si ottengono polimeri caratterizzati da basso peso molecolare e scarse proprietà meccaniche. Per ottenere un PLA con caratteristiche migliori, è necessario ricorrere alla polimerizzazione con apertura di anello (Figura 1.12 a), effettuata a partire dal lattide, in presenza di opportuni catalizzatori. Il lattide è il dimero dell'acido lattico e anch'esso presenta la configurazione destrogira (D) e la configurazione levogira (L), oltre a quella di meso-lattide (Figura 1.13). I polimeri prodotti tramite ROP presentano pesi molecolari più elevati.

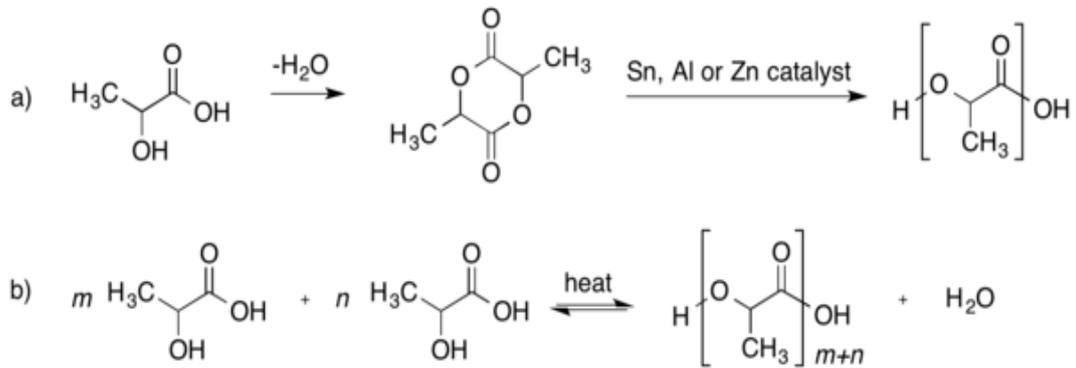


Figura 1.12 b: polimerizzazione a condensazione.

1.12 a: polimerizzazione con apertura di anello.

Tratta da: https://en.wikipedia.org/wiki/Biodegradable_polymer

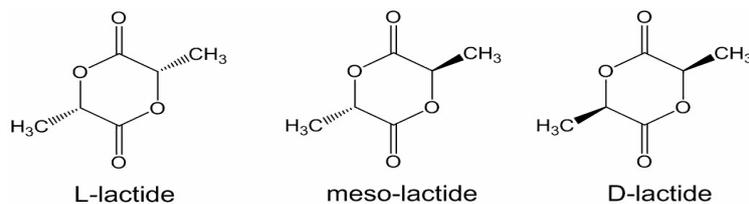


Figura 1.13: configurazioni della molecola di lattide. Tratta da: <http://14.139.172.204/nptel/CSE/Web/116102006/module6/chapter%206.1.html>

1.5.2 PROPRIETÀ

Le proprietà meccaniche, il grado di cristallinità, il punto di fusione e la transizione vetrosa dei polimeri a base di acido lattico dipendono fortemente dal

rapporto e dalla distribuzione dei due stereoisomeri, oltre che dal processo di polimerizzazione. Utilizzando una composizione di L-lattide e D-lattide in rapporto 50:50, si ottiene il PDLLA, un materiale amorfo e otticamente inattivo, poiché i due isomeri sono distribuiti casualmente lungo la catena, che risulta perciò incapace di arrangiarsi in una struttura cristallina organizzata; viceversa, i polimeri ottenuti solamente da L-lattide, o comunque contenenti meno del 15% di D-isomero, risultano cristallini e otticamente attivi [16].

L'acido polilattico utilizzato nel presente lavoro di Tesi è stato sintetizzato a partire da L-lattide, e viene indicato brevemente con PLLA. Da letteratura risulta che generalmente il PLLA presenta un grado di cristallinità del 37% circa, temperatura di transizione vetrosa (T_g) a 60–65 °C, temperatura di fusione (T_m) variabile tra 170 e 180 °C, e un modulo elastico tra i 2.7 e i 16 GPa [17][18][19]. Risulta piuttosto resistente a compressione e trazione, con una bassa deformazione a rottura, contrariamente al PDLLA, che essendo amorfo presenta basso carico a rottura ed elevata deformabilità.

Per quanto riguarda la degradabilità, il PLA è caratterizzato da tempi di degradazione variabili a seconda del grado di cristallinità [20]: è stato infatti dimostrato come un PLA altamente cristallino richiede mesi o anni per essere completamente degradato ad acido lattico, mentre un polimero amorfo può essere degradato in poche settimane [13]. Come già trattato nel paragrafo 1.2.1.3, nei polimeri contenenti legami di tipo estereo, la degradazione avviene prevalentemente per via idrolitica (Figura 1.14 a; Figura 1.14 b), a partire dalla componente amorfa: una maggiore cristallinità comporta dunque un maggiore ostacolo per l'acqua, che fatica a penetrare all'interno del reticolo. Il PLA può essere inoltre degradato da batteri ed enzimi: tra i primi si annoverano *Amycolatopsis* e *Saccharotrix*, mentre il più efficace tra gli enzimi risulta essere la proteinasi K [21].

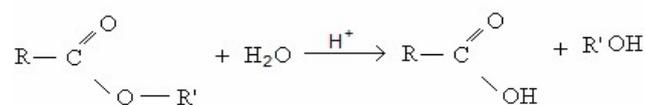


Figura 1.14 a: La degradazione idrolitica del legame estere

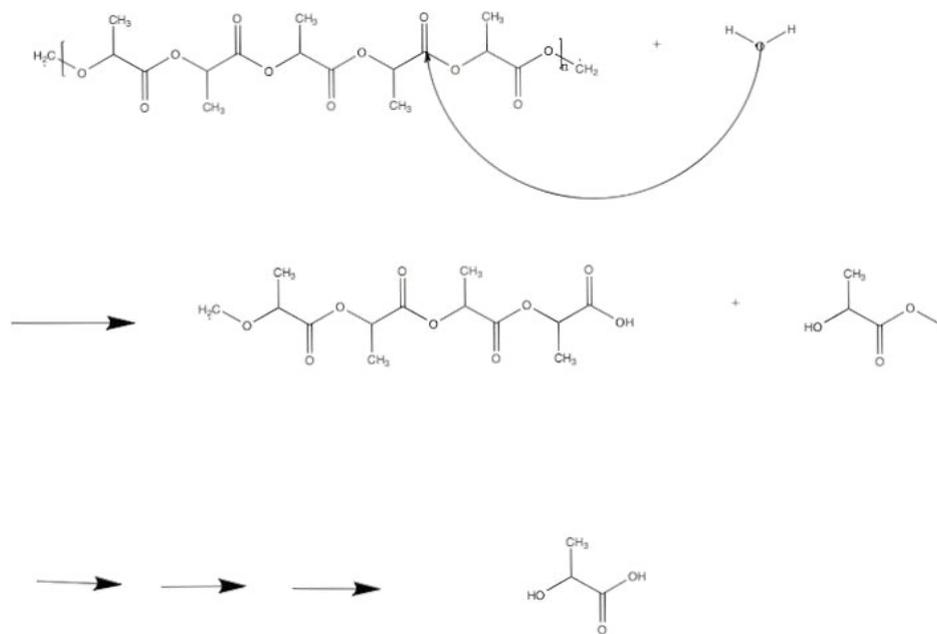


Figura 1.14 b: La degradazione del PLA attraverso l'idrolisi e la ripartizione del legame estere.
 Tratta da: Albertsson, Ann-Christine. *Degradable Aliphatic Polyesters*. Vol. 157. Berlin: Springer, 2002

Alla luce delle proprietà sopraelencate, il PLA trova impiego nel *packaging*, per la realizzazione di stoviglie usa e getta e altri manufatti che vengono compostati dopo l'uso: esposti all'umidità iniziano a degradare per via idrolitica e successivamente tramite l'azione di microrganismi. Una caratteristica che rende il PLA uno dei materiali più utilizzati in ambito biomedicale è la sua completa riassorbibilità all'interno del corpo umano: i prodotti finali della sua degradazione sono i monomeri di acido lattico, i quali vengono convertiti dal fegato in acido piruvico e quindi in glucosio. Questo fa sì che il materiale, una volta inserito all'interno del corpo, non debba essere rimosso con una seconda operazione chirurgica, come è prassi invece con protesi metalliche o impianti compositi non riassorbibili.

1.5.3 COPOLIMERI

La letteratura riporta numerosi studi sulla copolimerizzazione del PLA, mediante cui è possibile modificare la struttura chimica e quindi le proprietà del

materiale finale: l'acido lattico può essere copolimerizzato con altri omopolimeri, quali ad esempio l' ϵ -caprolattone, mediante policondensazione (che generalmente porta a copolimeri a basso peso molecolare), o alternativamente attraverso la ROP del lattide con altri monomeri ciclici tra cui glicolide, δ -valerolattone, trietilene carbonato, nonché con monomeri come ossido di etilene (EO), per la produzione di copolimeri al alto peso molecolare [20]. Il poli(ossido di etilene), detto anche PEO, ed il PEG vengono comunemente copolimerizzati con il PLA, per la loro elevata biocompatibilità, idrofilicità e atossicità [20]. Copolimeri a blocchi PLA-PEG e copolimeri triblocco PLA-PEG-PLA permettono di modulare la velocità di biodegradazione, l'idrofilicità e le proprietà meccaniche [20]. Nel 2003, Li e Vert [22] hanno preparato una serie di copolimeri di-blocco e tri-blocco mediante polimerizzazione ad apertura di anello di D-lattide con mono- e di-idrossil PEO, ottenendo copolimeri semicristallini dalla composizione e dal peso molecolare controllati e modulati. Fu et al. [23] hanno realizzato una serie di poliuretani a base di acido lattico modificati aggiungendo olio di ricino, con proprietà meccaniche controllabili. Fabbri et al, nel 2015 hanno sintetizzato copolimeri tri-blocco con PLA e poli(esteri/uretani) in proporzioni variabili, ottenendo copolimeri dalle proprietà meccaniche migliori rispetto a quelle del PLA, e caratterizzati da una maggiore velocità di degradazione [24].

1.5.4 APPLICAZIONI

Il PLA, già approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA), per le sue proprietà di biocompatibilità e biodegradabilità viene largamente impiegato in ambito biomedico. Importanti sono i suoi utilizzi nell'ingegneria tissutale, in cui è utilizzato per realizzare gli *scaffold*, e nell'ambito dei sistemi a rilascio controllato di farmaci. Viene anche impiegato per la realizzazione di viti, placche di diffusione e di sostegno, anche se in questi casi va precisato che può sostenere solo carichi moderati a causa della sua fragilità. Per superare questo problema viene spesso utilizzato insieme ad altri polimeri o materiali di rinforzo [25]: ad esempio costituisce la matrice in materiali compositi contenenti fibre di calcio-fosfato e vetro, oppure viene copolimerizzato con

componenti più flessibili [26]. Il PLA è utilizzato anche sotto forma di microsferi iniettabili, che fungono da riempitivi temporanei nel caso di chirurgia ricostruttiva facciale. Interessante risulta inoltre il suo uso nella realizzazione di dispositivi che rilasciano farmaci in modo controllato [25].

1.5.4.1 INGEGNERIA TISSUTALE

L'ingegneria tissutale, il cui concetto venne per la prima volta introdotto nel 1998, è una tecnica innovativa che ha attirato grande attenzione nel campo della scienza, dell'ingegneria e della medicina, e costituisce una potenziale alternativa al trapianto di tessuti e organi; essa ha come scopo la ricostruzione tissutale, mediante l'utilizzo di un'"impalcatura" tridimensionale, lo *scaffold*, su cui le cellule possono crescere e proliferare in condizioni fisiologiche. Rispetto a quelli metallici o a quelli realizzati con altri materiali più resistenti, gli *scaffold* a base polimerica sono biodegradabili, flessibili e facilmente lavorabili anche in forme complesse [20]. Nei più recenti studi su polimeri, tra cui anche il PLA, si è focalizzata l'attenzione sulla possibilità di ingegnerizzare tessuti artificiali stampando tramite stampanti 3D *scaffold* con pori di dimensioni variabili, in modo che le cellule impiantate al loro interno possano crescere e nello stesso tempo espellere i rifiuti metabolici (Figura 1.15): ad esempio, con pori di dimensione maggiore di 300 micron si ha vascolarizzazione e formazione dell'osso [26]. Utilizzando, invece, *scaffold* di PDLLA con dimensione dei pori tra 325 e 420 micron è possibile ottenere una rete di collagene che costituisce la matrice organica dell'osso [27]. Tuttavia, la tecnica attualmente utilizzata dall'industria e dai laboratori di ricerca per creare *scaffold* 3D risulta essere l'*electrospinning*, che permette di sintetizzare strutture fibrose tridimensionali complesse caratterizzate da un preciso allineamento delle fibre (Figura 1.16).

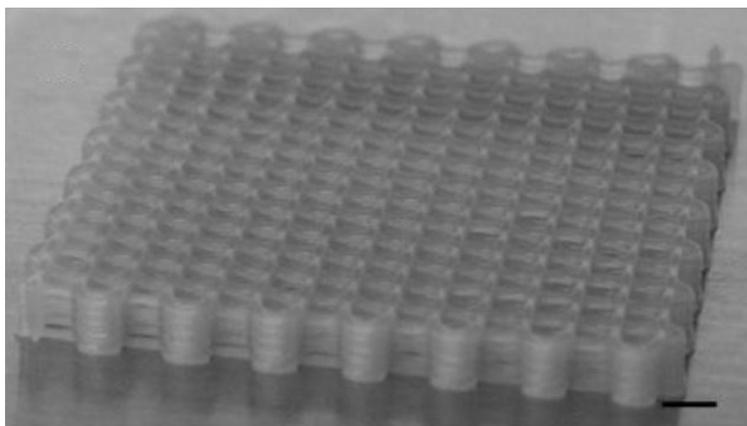


Figura 1.15: Esempio di *scaffold* stampato 3D. Tratta da: Seyednejad, Hajar, Debby G., Wouter JA D., Cornelus F. van Nostrum, Vermonden T. and Wim E. H.; “*Preparation and Characterization of a 3D-printed Scaffold Based on a Functionalized Polyester for Bone Tissue Engineering Application*”; *Functionalized Polyesters* 7, no.5 2012: 87

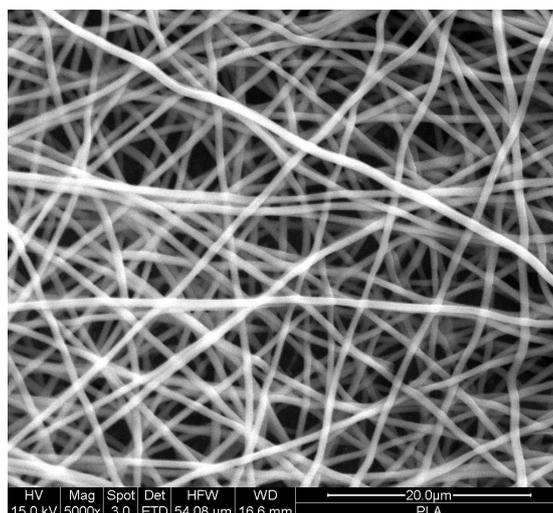


Figura 1.16: Fibre di uno *scaffold* in PLLa ottenuto per electrospinning. Tratta da <http://electrospintech.com/fibersterilization.html#.WDytGVyQvi8>

Generalmente, i polimeri utilizzati per la realizzazione di *scaffold* sono poliammidi, polianidridi e poliesteri, tra cui PLA, acido poliglicolico (PGA) e loro copolimeri (PLGA): uno *scaffold* polimerico impiegato per uso clinico, in particolare per la riparazione della cartilagine, è quello costituito dal copolimero PGA/PLA (Polyglactin, Vicryl) e polidiossano, commercializzato con il nome di BioSeed®-B e BioSeed®-C (Biotissue Technologies AG, Friburgo, Germania) [20]. Una varietà di idrogeli ottenuta tramite copolimeri biodegradabili diblocco o triblocco di PEO e acido polilattico è stata proposta

per utilizzi in ingegneria tissutale: questi gel possono essere facilmente formulati in unione con farmaci proteici o cellule, e successivamente veicolati al sito desiderato in maniera minimamente invasiva [28]. Come riportato da Saito et al., copolimeri costituiti da omopolimeri di acido polilattico e PLLDA con glicol polietilene (PEG) a blocchi, sono liquidi viscosi che possono essere utilizzati in ingegneria tissutale come sistemi di trasporto e rilascio delle proteine morfogenetiche dell'osso: è stato dimostrato come tutti gli impianti contenenti tali proteine abbiano indotto la formazione di nuovo tessuto osseo [29]. Noriyuki Tamai et al, hanno utilizzato un copolimero a base di PLA e PEG come vettore per la somministrazione di proteine morfogenetiche per la ricostruzione di ossa e cartilagini [30]. Inoltre, come riportato da Hao-Yang et al, copolimeri costituiti da acido polilattico e poliuretano termoplastico presentano caratteristiche compatibili per la realizzazione di scaffold per tessuti umani [31].

1.6 II POLIBUTILENE SUCCINATO

Il polibutilene succinato (o PBS) è un poliestere alifatico, formato dalla ripetizione dell'unità butilene succinato, $C_8H_{12}O_4$, come riportato in Figura 1.17.

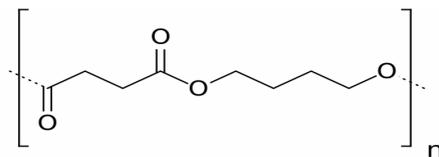


Figura 1.17: unità di PBS ripetuta. Tratta da: Gualandi et al, *Easily synthesized novel biodegradable copolyesters with adjustable properties for biomedical applications*, Soft Matter, 2012,8, 5466-5476

Anche questo materiale, così come il PLA, possiede caratteristiche di biocompatibilità e biodegradabilità. La sintesi di poliesteri a base di acido succinico venne eseguita per la prima volta nel 1863 dal portoghese Agostinho Vicente Lourençoche [32]. Negli anni '30, Carothers iniziò a studiare poliesteri a base di acido succinico, con lo scopo di trovare un'alternativa sintetica alle

fibre di seta naturale; riuscì ad ottenere il PBS con un peso molecolare significativamente maggiore rispetto a quello ottenuto sino ad allora, tuttavia il prodotto finale non aveva ancora le caratteristiche richieste dal mercato [33]. Successivamente, l'interesse verso questo tipo di polimero si affievolì, finché negli anni '90 iniziò a ricevere nuovamente attenzioni, grazie alla crescente domanda di polimeri biodegradabili e ottenibili da materie prime rinnovabili.

1.6.1 PRODUZIONE

Generalmente il PBS viene sintetizzato tramite policondensazione dell'acido succinico e dell'1,4-butandiolo. Il processo di sintesi consiste in una policondensazione in massa a due stadi: il primo consiste nell'esterificazione dell'acido succinico con formazione di oligomeri e rimozione di acqua (Figura 1.18); nella seconda fase, condotta sottovuoto, gli oligomeri formati nella prima subiscono trans-esterificazione con ottenimento del polimero ad alto peso molecolare ed eliminazione del glicole in eccesso (Figura 1.19) [34]. L'acido succinico può derivare sia da fonti fossili che da risorse rinnovabili. Per esempio, può essere ottenuto dalla fermentazione di zuccheri catalizzata da *Candida Antarctica* [35].

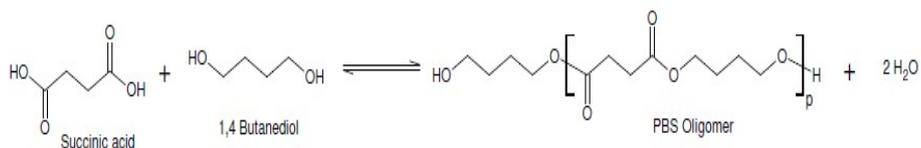


Figura 1.18: Esterificazione di acido succinico e 1,4-butandiolo

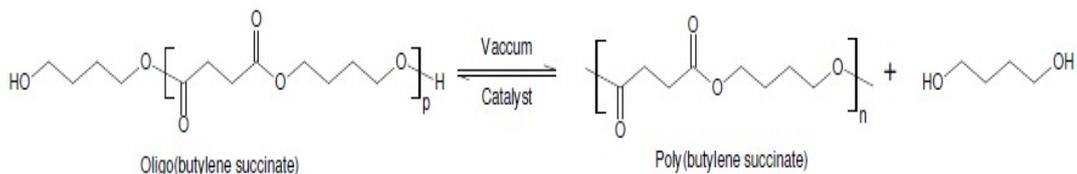


Figura 1.19: trans-esterificazione degli oligomeri

1.6.2 PROPRIETÀ

Il PBS è un polimero semicristallino (grado di cristallinità tra il 35% e il 45%) con modulo di Young di 300 - 500 MPa [34][36]. La temperatura di fusione (T_m) è di circa 130 °C e quella di transizione vetrosa (T_g) si assesta tra -34 °C e -15 °C [37].

La degradazione idrolitica del PBS è molto lenta in condizioni fisiologiche (37 °C e pH=7,4) e in assenza di enzimi: il processo viene accelerato grazie a variazioni di PH e aumento di temperatura [36]; tuttavia la degradazione più efficace risulta essere quella enzimatica [38][39][40]. Il PBS può degradare anche grazie a microrganismi, come quelli della classe dei *Firmicutes* e dei *Proteobacteria* [41]. Il prodotto della degradazione primaria è l'acido succinico, che è un intermedio del ciclo di Krebs: esso quindi, può essere degradato all'interno del corpo umano in acqua e biossido di carbonio [42]. Un importante fattore che limita l'applicazione di PBS in campo biomedicale è la sua idrofobicità (con valori di angolo di contatto di circa 96°), che è causa di una bassa interazione con le cellule [36][42].

Il basso valore di temperatura di transizione vetrosa del PBS, ben al di sotto di temperatura ambiente, permette una facile lavorabilità mediante estrusione, stampaggio ad iniezione e termoformatura [43][44].

Ciononostante, il PBS non è ancora competitivo rispetto al PLA, per non parlare delle poliolefine.

1.6.3 APPLICAZIONI

Il PBS trova principalmente impiego nella realizzazione di film per pacciamatura, sacchetti compostabili, fogli di tessuto non tessuto, prodotti per la ristorazione, schiume, componenti a basso peso nell'industria automobilistica. Attualmente, in ambito biomedicale, sono commercializzati da Bionolle® *stents*, involucri compatibili con la sterilizzazione a vapore, e componenti per la diagnostica a immagini [42].

L'uso del poli(butilene succinato) in alternativa alle plastiche commerciali sta attirando una crescente attenzione, in ragione delle sue interessanti proprietà fisico-chimiche, dei bassi costi di produzione, e della possibilità di ottenere sia l'acido succinico che l'1,4-butandiolo da fonti rinnovabili (ciò rende il PBS un polimero completamente *bio-based*). Il PBS mostra d'altro canto una velocità di degradazione sia idrolitica che enzimatica piuttosto bassa e proprietà meccaniche non particolarmente soddisfacenti, quando è richiesto un materiale flessibile. Come già anticipato sopra, la miscelazione fisica e/o reattiva e la copolimerizzazione rappresentano approcci vincenti per migliorare le performance non soddisfacenti, modulandole *ad hoc* per l'applicazione di interesse. Da menzionare, oltre ai copolimeri, i compositi e nanocompositi a base di PBS, come ad esempio chitosano e idrossiapatite [38]

La copiosa letteratura comprova che il PBS omopolimero può essere considerato un candidato davvero promettente per la fabbricazione di *scaffold* per l'ingegneria tissutale e per la realizzazione di micro e nano particelle per il rilascio controllato di farmaci [36, 38], a dispetto a tutt'oggi della mancata approvazione FDA.

1.6.4 COPOLIMERI

Per quanto concerne i copolimeri del PBS, va segnalato che esistono prodotti già disponibili sul mercato, a cui vanno aggiunti i nuovi materiali sintetizzati nei laboratori di ricerca di tutto il mondo. Per quanto concerne i prodotti commerciali, è opportuno segnalare innanzitutto l'omopolimero prodotto industrialmente dalla Showa-Denko sotto il nome commerciale di Bionolle®, cui vanno aggiunti i copolimeri ottenuti per policondensazione di acido succinico e acido adipico con 1,4-butandiolo (PBSA). Recentemente, la Mitsubishi Chemical Corporation ha immesso sul mercato un nuovo poliesteri biodegradabile a base di PBS, il poli (butilene succinato-co-lattato), commercializzato come GS Pla™ [45].

Se non ci limitiamo ai soli prodotti commerciali, allora non si possono non citare i copolimeri con l'acido dilinoleico, l' ω -pentadecalactone, l'acido itaconico e alcuni carbonati ciclici [46][47][48]. Non vanno dimenticati i

copolimeri poli(butilene tereftalato/succinato) contenenti il poli(etilene glicole) [49]. Il gruppo di ricerca della Prof.ssa Lotti, relatrice della presente Tesi, da circa 20 anni si occupa della sintesi e caratterizzazione di copolimeri del PBS: il gruppo di ricerca ha dedicato attenzione particolare alla preparazione di copolimeri del PBS contenenti eteroatomi in catena, in particolare ossigeno o zolfo. Allo scopo, sono state impiegate diverse strategie sintetiche, che hanno permesso di controllare l'architettura molecolare: *i*) policondensazione in massa a partire da miscele di glicoli o miscele di acidi per ottenere copolimeri statistici [40][50]; *ii*) miscelazione reattiva *solvent-free* per ottenere copolimeri a blocchi con lunghezza modulabile semplicemente variando il tempo di mescolamento in fuso dei due omopolimeri di riferimento [36][51][52]; *iii*) copoliesteri-uretani ottenuti chain estendendo blocchi poliestere idrossil terminati designati ad hoc in opportune proporzioni [53]. Copoliesteri-uretani ad architettura triblocco contenenti PLA e PBS sono stati ottenuti in massa utilizzando un copolimero del PBS idrossil terminato per aprire l'anello del lattide [17, 36, 40, 51, 52, 54, 55]

1.6.4.1 POLI(BUTILENE/TRIETILENE SUCCINATO) P(BSTES)

Tra i copolimeri precedentemente sintetizzati dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Lotti presso i laboratori LAMAC del DICAM dell'Università degli Studi di Bologna, meritano particolare attenzione i copolimeri a blocchi poli (butilene/trietilene succinato) (P(BSTES)) (Figura 1.20) [36, 52].

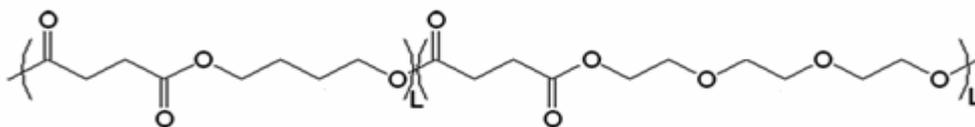


Figura 1.20: Struttura chimica del PBSPTES. "L" indica la lunghezza della sequenza (blocco) di BS e di TES. Tratta da Gualandi et al. [36]

Il PTES ha una struttura chimica simile al PBS: entrambi sono caratterizzati da gruppi estere distribuiti lungo una catena alifatica satura. La differenza consiste

nella presenza nel TES di una sub-unità *PEG-like* contenente due atomi di ossigeno etereo (Figura 1.21).

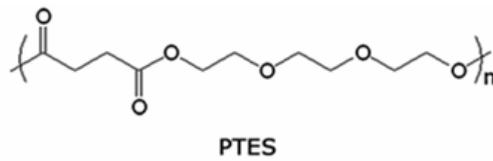


Figura 1.21: unità ripetitiva di PTES

La sub-unità viene chiamata *PEG-like* poiché presenta una struttura simile al glicole polietilenico, ovvero il PEG, e può dare vita al processo di PEGilazione (Figura 1.22).

Il PTES risulta completamente amorfo, con temperatura di transizione vetrosa (T_g) di $-33\text{ }^{\circ}\text{C}$. L'incapacità a cristallizzare può essere ascritta alla presenza degli atomi di ossigeno etereo che riducono la simmetria della catena. Il PTES risulta inoltre molto idrofilico, proprio grazie alla presenza della sub-unità *PEG-like*.

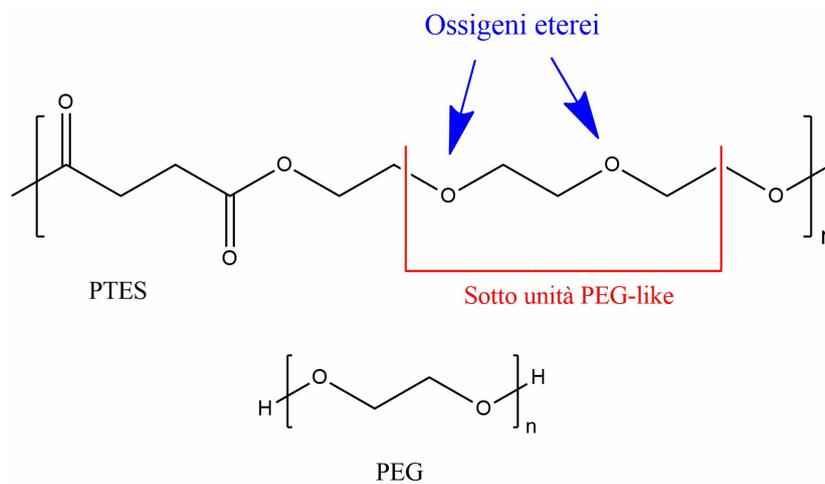


Figura 1.22: unità di TES dove si evidenziano gli ossigeni eterei e la sotto unità PEG-like comparata alla struttura di PEG

Tali copolimeri sono stati ottenuti per miscelazione reattiva: tempi di mescolamento brevi permettono di ottenere copolimeri a blocchi, la cui lunghezza può essere facilmente modulata allungando il tempo di reazione, fino ad arrivare, per tempi sufficientemente lunghi, ad una distribuzione statistica delle unità comonomeriche (copolimero random).

1.6.4.1.1 PROPRIETÀ'

I copolimeri PBSPTES risultano semicristallini, con la fase cristallina del PBS. La temperatura di transizione vetrosa risulta intorno ai -30 °C, mentre la temperatura di fusione decresce al diminuire della lunghezza dei blocchi [36, 52]. Le proprietà meccaniche cambiano significativamente per copolimerizzazione: il PBS è il materiale più rigido, con un elevato modulo elastico ed una bassa deformazione a rottura; l'introduzione delle sequenze PTES provoca una significativa diminuzione del modulo elastico e un parallelo significativo aumento dell'allungamento a rottura; il copolimero con le sequenze più corte (copolimero random) si comporta come un elastomero con allungamenti a rottura che arrivano al 700% [36]. Le sequenze TES contribuiscono ad aumentare l'idrofilicità del materiale finale e l'effetto risulta più marcato per sequenze lunghe. Tale comportamento può essere spiegato assumendo una veloce riorganizzazione spaziale delle sequenze, che porta quelle TES a contatto con l'acqua [36]. Anche la cinetica di degradazione idrolitica dei copolimeri PBSPTES risulta dipendere marcatamente dalla lunghezza dei blocchi. In particolare, la velocità di degradazione è massima per il copolimero a blocchi più lunghi [36].

I copolimeri non sono risultati citotossici, al contrario si sono rilevati in grado di supportare l'adesione e la crescita cellulare di fibroblasti. Studi di cinetica di rilascio da film pressofusi di una molecola modello hanno mostrato come questi nuovi materiali siano particolarmente interessanti per la realizzazione di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci [36].

CAPITOLO 2

Scopo

La medicina e la chirurgia fanno ricorso, in maniera crescente, a materiali estranei all'organismo al fine di porre rimedio, in via provvisoria o definitiva, al deficit di un funzione fisiologica. Tali materiali, denominati *biomateriali* proprio per la loro capacità di sostituire parzialmente o completamente funzioni di un organismo vivente, devono possedere il requisito fondamentale della biocompatibilità, vale a dire devono interagire in maniera non dannosa con l'organismo. Tra i vari materiali impiegati in campo biomedicale il 50% risulta essere di natura polimerica. I principali vantaggi che i polimeri di sintesi presentano rispetto alle altre classi di materiali (metalli, ceramiche, compositi, etc.) sono una maggiore biocompatibilità, la possibilità di modificarne ampiamente composizione e proprietà fisicomeccaniche, bassi coefficienti di attrito, facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture complesse, possibilità di modificarne chimicamente e/o fisicamente la superficie, possibilità di immobilizzare cellule o biomolecole al loro intorno o sulla superficie. In questo ambito, i poliesteri costituiscono una classe di polimeri davvero promettente, in quanto le variegata strutture chimiche che li caratterizzano permettono di soddisfare un'ampia gamma di esigenze. Tra i poliesteri alifatici risultano già commercializzati per la realizzazione di dispositivi biomedicali l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA), il poli(ϵ -caprolattone) (PCL) e i loro copolimeri, gli unici approvati dalla Food and Drug Administration (FDA). Questi ultimi, tuttavia, risultano troppo rigidi per la realizzazione di dispositivi deputati alla rigenerazione dei tessuti molli e sono, inoltre, caratterizzati da un profilo di degradazione idrolitica non sempre idoneo rispetto all'applicazione.

In quest'ottica, la copolimerizzazione è senza dubbio lo strumento più interessante per modulare e migliorare le proprietà del PLA, senza andare a detrimento di quelle già soddisfacenti. Mediante copolimerizzazione è, infatti, possibile ottenere una nuova classe di polimeri con un'ampia gamma di

proprietà, modulabili in base alla quantità e alla distribuzione delle unità comonomeriche lungo la catena macromolecolare.

Il presente lavoro di ricerca si è focalizzato sulla sintesi e sulla caratterizzazione di un nuovo copoliestere alifatico a base di PLA, caratterizzato da un'architettura triblocco **A-B-A**, dove **A**, rappresenta l'acido polilattico (PLA) e **B**, è un copolimero statistico alifatico "*PEG-like*" ad elevata flessibilità a base di poli(butilene succinato) (PBS) biodegradabile e biocompatibile, precedentemente studiato dal gruppo di ricerca presso cui è stata condotta la Tesi. Per raggiungere pesi molecolari che possano garantire buone proprietà meccaniche, al sistema di reazione è stato aggiunto l'esametilendiisocianato (HDI), noto estensore di catena. Grazie ad esso, si realizzano legami di tipo uretanico tra i gruppi terminali ossidrilici delle catene.

Al fine di ridurre la rigidità e i tempi di degradazione del PLA si è scelto di introdurre lungo la sua catena principale atomi di ossigeno etero.

Il gruppo di ricerca presso il quale è stata svolta la presente tesi vanta, infatti, una notevole esperienza circa la modifica di poliesteri alifatici e/o aromatici tramite introduzione di eteroatomi in catena. Tale modifica può avere diversi effetti sulle proprietà allo stato solido del materiale:

- la temperatura di transizione vetrosa (T_g) può:
 - diminuire perché la catena polimerica diventa più flessibile;
 - aumentare, a causa di forti interazioni intercatena.

Il primo effetto prevale se gli eteroatomi vengono introdotti lungo la catena polimerica di un polimero rigido.

- il punto di fusione e la tendenza a cristallizzare diminuiscono, a causa di una riduzione della simmetria della catena;
- l'idrofilicità superficiale aumenta, poiché la maggiore elettronegatività degli atomi di ossigeno rispetto a quelli di carbonio comporta la formazione di legami polari C-O.

L'attività di ricerca di seguito illustrata è stata svolta presso i laboratori LAMAC del Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali (DICAM) dell'Università di Bologna e si è articolata nelle seguenti fasi:

- Ricerca bibliografica su studi condotti in passato per acquisire conoscenza sull'argomento ed essere aggiornati sui vari processi di sintesi e di caratterizzazione;
- Sintesi dei due omopolimeri di riferimento mediante policondensazione in massa a due stadi da cui sarà sintetizzato il copolimero **B**;
- Sintesi del copolimero random **B** idrossil terminato tramite miscelazione reattiva in fuso;
- Sintesi dei copolimeri triblocco **A-B-A**;
- Caratterizzazione molecolare dei campioni sintetizzati, tramite risonanza magnetica nucleare (NMR) e cromatografia a permeazione su gel (GPC);
- Caratterizzazione termica mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC), analisi termogravimetrica (TGA);
- Analisi strutturale mediante diffrattometria a raggi X (WAXS);
- Caratterizzazione meccanica dei film tramite misure di trazione;
- Studi di degradazione idrolitica in condizioni fisiologiche;
- Caratterizzazione dei film parzialmente degradati mediante valutazione gravimetrica delle perdite di peso, cromatografia a permeazione su gel (GPC), analisi NMR e analisi termica (DSC);
- Analisi dei risultati ottenuti ed estrapolazione di correlazioni proprietà-struttura.

CAPITOLO 3

Materiali e metodi

Il presente lavoro di Tesi di Laurea è stato svolto presso i laboratori di Sintesi e Caratterizzazione di Materiali Macromolecolari (LAMAC) del Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali dell'Università di Bologna (DICAM).

3.1 SINTESI

3.1.1 REAGENTI

I reagenti ed i catalizzatori utilizzati per la sintesi, riportati di seguito sono:

- DIMETIL SUCCINATO, diestere che a temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore, e la cui struttura chimica è riportata in Figura 3.1;

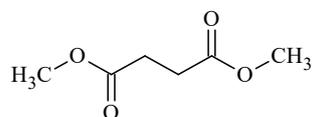


Figura 3.1: Struttura del dimetilsuccinato

- TRIETILENE GLICOLE, diolo ottenuto dalla condensazione di tre glicoli etilenici, la cui struttura chimica è riportata in Figura 3.2. A temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore e inodore;

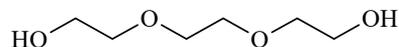


Figura 3.2: Struttura del trietilenglicole

- 1,4-BUTANDIOLO, diolo costituito da quattro atomi di carbonio (Figura 3.3);

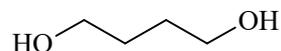


Figura 3.3: 1,4-butandiolo

- STAGNO OTTANOATO ($\text{Sn}(\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_2)_2$, Figura 3.4), uno dei catalizzatori più utilizzati per effettuare ROP, in quanto presenta un'elevata attività ed una notevole efficacia nel ridurre l'insorgenza di reazioni di transesterificazione parallele innescate dall'elevata temperatura;

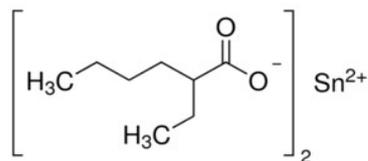


Figura 3.4: Stagno ottanoato

- TITANIO TETRABUTOSSIDO (TBOT, Figura 3.5), catalizzatore che a temperatura ambiente si presenta come un liquido trasparente di colore giallo chiaro;

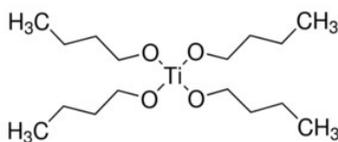


Figura 3.5: Titanio tetrabutossido

-ESAMETILENEDIISOCIANATO (HDI, Figura 3.6), estensore di catena contenente due gruppi isocianato alle proprie estremità che, reagendo con i gruppi ossidrilici terminali delle catene polimeriche, rendono possibile l'estensione della catena attraverso formazione del legame uretanico.

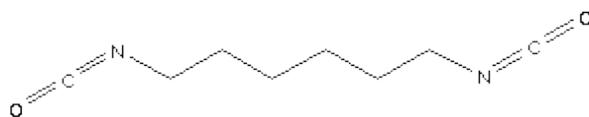


Figura 3.6: Esametilenediisocianato

3.1.2 SINTESI DEI POLIMERI

3.1.2.1 SINTESI DEL PBS-OH

La sintesi è stata eseguita tramite policondensazione in massa a due stadi, utilizzando come monomeri di partenza il dimetil succinato (DMS) e l'1,4-butandiolo. Si è lavorato in condizioni di eccesso (50%) del diolo rispetto al diestere. Tutti i reagenti e il catalizzatore sono stati caricati nel reattore di polimerizzazione simultaneamente all'inizio del processo di sintesi.

Il primo stadio della reazione è stato condotto alla temperatura di 185°C, sotto flusso controllato di azoto e con un'agitazione di 100 giri al minuto. In questa prima fase hanno luogo le reazioni di esterificazione diretta con successiva eliminazione di specie a basso peso molecolare, nel caso in esame molecole di metanolo, allo scopo di spostare l'equilibrio della reazione verso i prodotti. Il secondo stadio ha inizio quando almeno il 90% del metanolo teorico è raccolta nella trappola di condensazione mediante distillazione. Qui avvengono le reazioni di transesterificazione che, mantenendo i tempi di reazione non molto lunghi, portano alla formazione di polimeri a basso peso molecolare. Durante questa fase la temperatura viene aumentata di 10°C ogni 30 minuti, fino al raggiungimento di 220°C. Contemporaneamente, la pressione all'interno del reattore viene ridotta fino a 0,07 mbar grazie all'impiego di una pompa da vuoto, al fine di rimuovere, tramite distillazione, l'eccesso di diolo. Una volta raggiunti i valori desiderati di temperatura e pressione, questi vengono mantenuti costanti fino al termine della reazione.

3.1.2.2 SINTESI DEL PTES-OH

Il procedimento è identico a quello descritto per il PBS-OH ad eccezione della tipologia di glicole che viene fatto reagire con il dimetil succinato. In questo caso, infatti, è stato usato il trietilenglicole e non il butandiolo.

3.1.2.3 SINTESI DEL COPOLIMERO P(BSTES)-OH

Il copolimero statistico poli(butilene/trietilene succinato) è stato ottenuto mediante miscelazione reattiva degli omopolimeri PBS e PTES (in rapporto molare 1 : 1) in un reattore di vetro da 250 mL a 225°C. Sono stati applicati un flusso controllato di azoto, per prevenire la degradazione, e un'agitazione costante di 100 rpm. I reagenti ed il catalizzatore (titanio tetrabutossido) sono stati caricati nel reattore di polimerizzazione simultaneamente all'inizio del processo di sintesi. Il processo è durato 135 minuti.

3.1.2.4 SINTESI DELL'OMOPOLIMERO PLLA

L'omopolimero acido poli-L-lattico (PLLA) è stato sintetizzato a partire dal L-lattide (LL) e dal butandiolo (BD), utilizzando come catalizzatore stagno ottanoato ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$). Sono stati inseriti nel reattore 30 g di LL e circa 10 mg di BD, in modo da avere un rapporto in mole di 1/2000 e 100 ppm per grammo di polimero teorico di catalizzatore. La sintesi è stata condotta all'interno di un reattore in vetro, immerso in un bagno caldo di olio di silicone, con temperatura e torque costantemente controllati. All'interno del reattore viene fatto fluire azoto per rendere inerte l'ambiente. Il reattore utilizzato per la sintesi è riportato in Figura 3.7.

Lo schema della sintesi è riportato in Figura 3.8: inizialmente sono stati inseriti LL, BDe ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) a 170 ° e lasciati a reagire per 3 ore. Il butandiolo consente l'apertura dell'anello del lattide, che è agevolata dallo stagno ottanoato che fa "avvicinare" le due molecole. Successivamente è stato effettuato il processo di *chain-extension* inserendo esametilendiisocianato (HDI) in modo da avere un eccesso del 20% rispetto alle moli di BD, quindi circa 60 µl. Questa seconda fase è durata circa 2 ore. L'HDI possiede due gruppi isocianato -NCO che reagiscono con i gruppi -OH presenti nella catena dell'acido lattico. Questo consente alle catene distinte di PLLA, di potersi congiungere e formare una catena ancor più lunga, a più alto peso molecolare. In questo stadio si osserva

che il torque, azzerato prima dell'inserimento del HDI, raggiunge circa 9-10 N·cm, a conferma dell'aumento di peso molecolare.

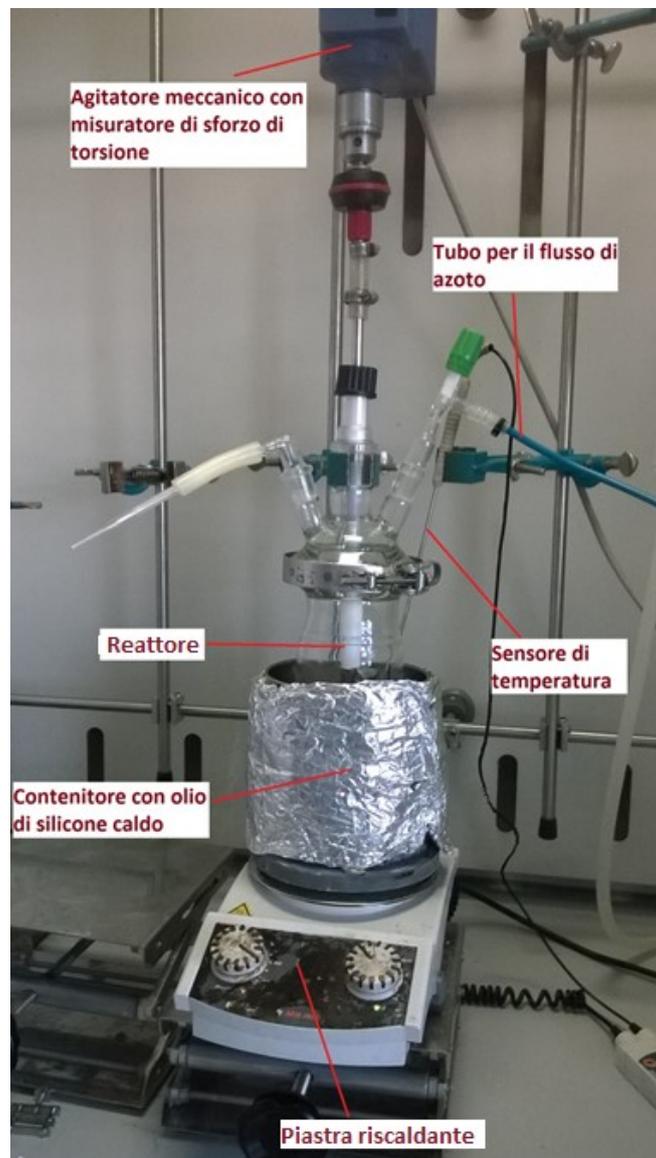


Figura 3.7: strumentazione utilizzata per la sintesi del PLLA

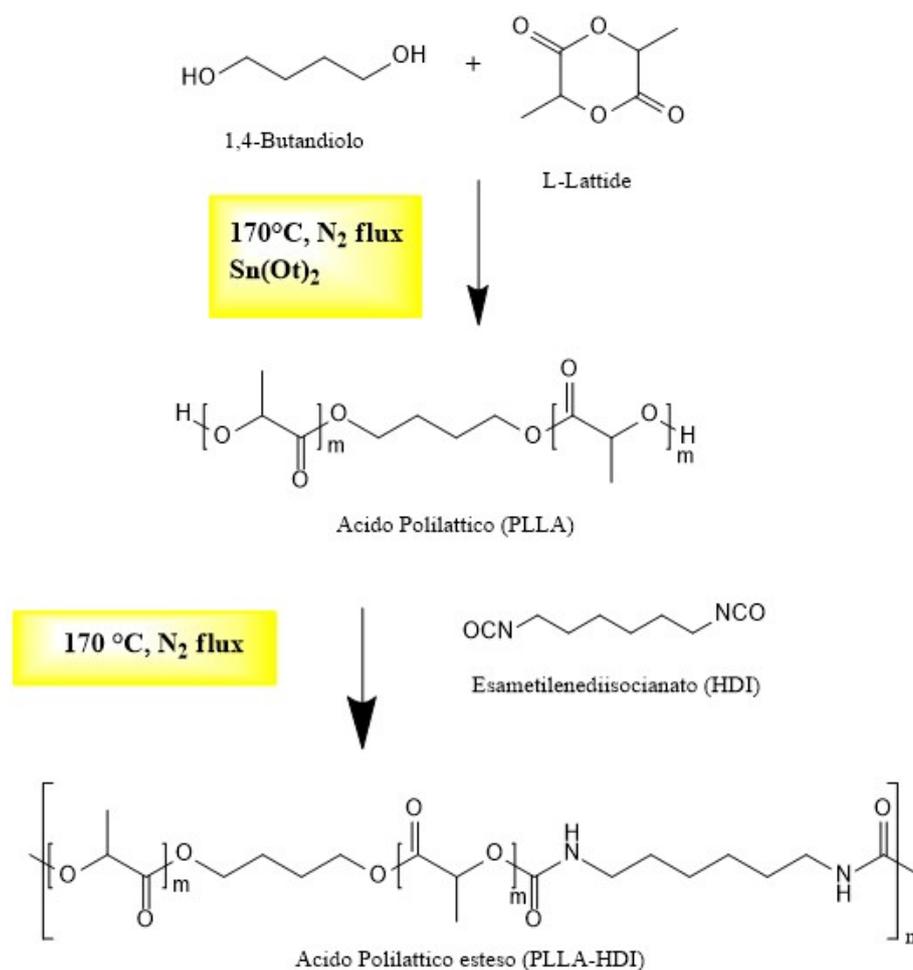


Figura 3.8: schema delle reazioni per la sintesi del PLLA

3.1.2.5 SINTESI DEL COPOLIMERO PLLAP(BSTES)

Il copolimero PLLAP(BSTES) è un copolimero triblocco con struttura A-B-A, dove A indica le unità di PLLA e B il copolimero P(BSTES) precedentemente descritto.

Il copolimero PLLAP(BSTES) è stato sintetizzato a partire dal L-Lattide e dal P(BSTES) con Sn(Oct)₂ come catalizzatore. La sintesi è stata condotta anche questa volta all'interno di un reattore in vetro, immerso in un bagno caldo di olio di silicone, con temperatura e torque costantemente controllati (Figura 3.9). Lo schema della sintesi è riportato in Figura 3.10: all'interno del reattore sono stati inseriti 4,5 g di copolimero P(BSTES) e la temperatura è stata portata a 170°C, in atmosfera inerte. Una volta che il materiale è risultato fuso è stato

applicato il vuoto, in modo che il solvente residuo presente nel copolimero P(BSTES) fosse eliminato dal reattore. Sono stati poi aggiunti 4g di lattide ed il catalizzatore, in quantità pari a 100 ppm per grammo di polimero teorico. Durante questa fase, della durata di 3 ore, avviene la reazione di apertura dell'anello *in situ* del L-Lattide, ad opera dei gruppi terminali -OH del blocco centrale B (P(BSTES)). Nella seconda fase, della durata di circa 90 minuti, per favorire la crescita del peso molecolare è stata effettuata la *chain-extension*, inserendo 60 μ l di HDI; anche in questo caso, dopo l'inserimento del HDI, il torque è aumentato sino a circa 7 N·cm.

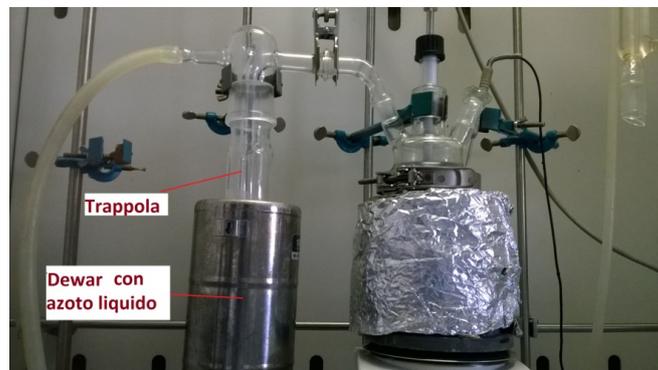


Figura 3.9: strumentazione utilizzata per la sintesi del PLLAP(BPTES)

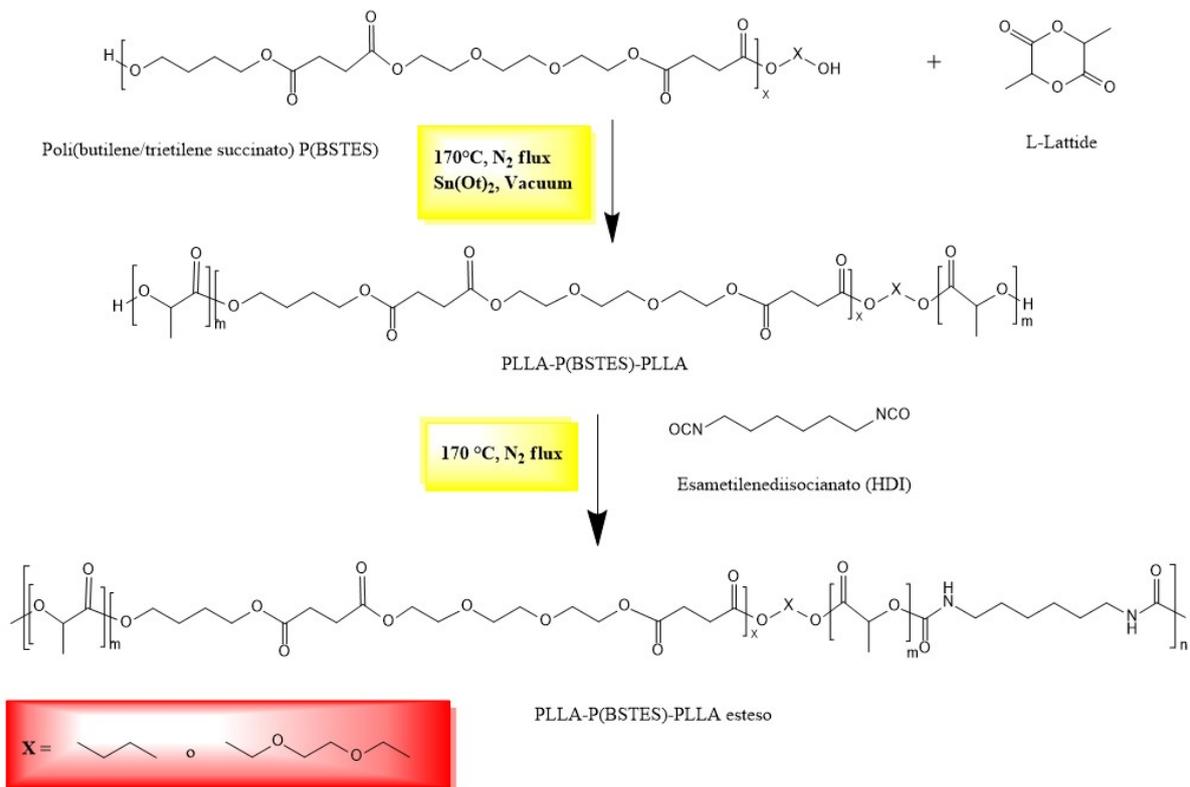


Figura 3.10: schema delle reazioni per la sintesi del copolimero PLLAP(BSTES)

3.2 PURIFICAZIONE DEI POLIMERI OTTENUTI

Per eliminare residui monomerici, oligomeri e sottoprodotti indesiderati, i polimeri sono stati sciolti in cloroformio, mantenendo la soluzione in agitazione. Tale soluzione è stata poi fatta sgocciolare in un becher contenente un largo eccesso di metanolo, un non solvente: le catene più lunghe del polimero, a contatto con il metanolo, precipitano sul fondo del becher, mentre in soluzione restano le catene a più basso peso e le impurezze. Per recuperare il precipitato si è proceduto alla filtrazione con l'utilizzo di un filtro Büchner, collegato ad una pompa per l'applicazione del vuoto (Figura 3.11). Il polimero filtrato è stato infine lasciato a riposo per qualche giorno, in modo tale da permettere l'evaporazione del metanolo residuo.



Figura 3.11: Filtro Büchner con PLLA

3.3 PREPARAZIONE DI FILM POLIMERICI

La preparazione dei campioni sotto forma di film sottili è stata effettuata tramite pressofusione, utilizzando una pressa idraulica da laboratorio dotata di piastre in alluminio raffreddate ad acqua (*Carver Laboratory Press*, Figura 3.12). Circa 2,5 g di polimero sono stati inseriti tra due piastre di teflon con interposta una maschera di alluminio teflonato (per garantire film dallo spessore uniforme di circa 0,2 mm), le quali a loro volta sono state posizionate nella pressa precedentemente scaldata ad una temperatura di circa 30°C superiore alla temperatura di fusione del materiale (190°C per l'omopolimero PLLA e 80°C per il copolimero triblocco PLLAP(BSTES)). Una volta fuso, il materiale è stato

sottoposto all'effetto di una pressione costante del valore di $1,5 \text{ ton/m}^2$, applicata per tre minuti; successivamente le piastre, mantenute in pressione, sono state raffreddate con acqua corrente fino a temperatura ambiente, in modo da garantire una veloce solidificazione del campione nella nuova forma. Prima delle prove di caratterizzazione e degradazione, il film del copolimero triblocco è stato tenuto a temperatura ambiente in essiccatore per almeno 4 settimane, per consentire al materiale di sviluppare una fase cristallina stabile.



Figura 3.12: pressa da laboratorio Carver® su cui sono stati preparati i film

3.4 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

3.4.1 SPETTROSCOPIA DI RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE (NMR)

La struttura molecolare e la composizione effettiva dei polimeri sono state determinate mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR). Essa sfrutta il principio per cui i nuclei degli atomi di alcuni elementi, in particolare quelli che possiedono un numero quantico di spin (I) non intero, se

sottoposti a un campo magnetico esterno intenso e stazionario, si orientano nella direzione del campo imposto, alla stregua di piccoli magneti.

Quando un nucleo dotato di spin non intero viene immerso in un campo magnetico esterno B , le possibili orientazioni che esso può assumere sono governate dal numero quantico m , che può assumere $2I+1$ valori diversi. Nel caso dei nuclei maggiormente utilizzati, come ^{13}C e ^1H , che presentano spin pari a $1/2$, sono quindi possibili 2 orientazioni: una parallela (\uparrow), corrispondente al più basso livello di energia, ed una antiparallela (\downarrow), corrispondente al più alto livello di energia.

La differenza di energia tra i due livelli risulta però essere molto piccola, dell'ordine di qualche kcal/mol, e di conseguenza la popolazione di nuclei nei due stati è praticamente identica, con una leggerissima prevalenza per lo stato a bassa energia. Grazie però a questo esiguo numero di nuclei in eccesso allineati con il campo magnetico B è possibile estrarre il segnale NMR, dal momento che a ragione di tale piccola discrepanza la risultante di tutti i momenti magnetici nucleari risulta diversa da zero, ed esprimibile mediante un vettore di debole intensità, allineato con il campo magnetico primario B .

Il passaggio del nucleo da una possibile orientazione all'altra è il risultato dell'assorbimento o dell'emissione di una quantità discreta di energia:

$$\Delta E = h\nu = 2\mu B$$

dove ν è la frequenza della radiazione emessa o assorbita e h è la costante di Plank. In corrispondenza di queste transizioni i nuclei si dicono in "risonanza" con la radiazione applicata. È possibile osservare lievi differenze nel segnale NMR di uno stesso atomo al variare del suo intorno chimico: questo accade perché gli elettroni sono particelle cariche e, come tali, quando vengono immersi in un campo magnetico B , si muovono generando un piccolo campo magnetico opposto a quello molto più forte applicato. Questo campo magnetico secondario scherma il nucleo dalla piena forza del campo applicato, in maniera direttamente proporzionale alla densità elettronica, in modo che i nuclei che si trovano in un intorno ricco di elettroni sentiranno un campo magnetico più basso, e quindi subiranno la transizione ad una frequenza applicata più bassa, rispetto ai nuclei situati in intorni poveri di elettroni. Lo spostamento risultante

nel segnale NMR per un dato nucleo viene detto spostamento chimico, o *chimica shift*. Dal momento che lo spostamento chimico assoluto risulta direttamente proporzionale al campo applicato, per superare tale limitazione, si preferisce utilizzare lo spostamento chimico relativo δ , misurato in ppm [Hz/MHz], e definito dall'equazione:

$$\delta(\text{ppm}) = \frac{\nu_r - \nu}{\nu_r} * 10^6$$

Dove ν_r è la frequenza di risonanza di un particolare nucleo di riferimento (il tetrametilsilano), e ν è la frequenza di risonanza del campione considerato.

Tipicamente per il nucleo dell'atomo di ^1H δ risulta compresa nell'intervallo 0-10 ppm.

Inoltre, considerando l'area sottesa da ogni picco, valutata in termini relativi, è possibile determinare il rapporto tra i vari tipi di atomi di idrogeno presenti. L'area di un picco infatti, è indipendente dalla struttura a cui è legato l'idrogeno corrispondente, ma dipende solo dalla frequenza con cui tale atomo è ripetuto all'interno della molecola. Dividendo poi l'area di ogni picco per il numero di idrogeni a cui corrisponde, si ottengono valori confrontabili con quelli dati dalla formula chimica del polimero analizzato.

Gli spettri sono stati ottenuti usando uno spettrometro NMR Varian XL-400. Le soluzioni sono state preparate sciogliendo circa 10 mg di polimero in cloroformio deuterato (0.03%). Gli spettri sono stati acquisiti a temperatura ambiente con concentrazione dei polimeri pari al 0.5 wt%, con tempo di rilassamento pari a 0 secondi e tempo di acquisizione di 1 secondo per 100 ripetizioni.

3.4.2 CROMATOGRAFIA A PERMEAZIONE SU GEL (GPC)

La cromatografia a permeazione su gel (GPC) è una tecnica di separazione fisica che consente di determinare il peso molecolare di un polimero. Lo strumento si compone di una pompa volumetrica, una colonna (costituita di particelle di polistirene a granulometria differente impaccate in modo da generare una porosità controllata) (Figura 3.13), ed un rivelatore. La sostanza,

sciolta in un determinato solvente, viene iniettata in colonna, in cui circola lo stesso solvente. I gel utilizzati per l'impaccamento delle colonne utilizzano il principio del "setaccio molecolare": il soluto subisce dunque un rallentamento proporzionale alle dimensioni delle particelle e alle dimensioni dei pori. Poiché non vi è alcun tipo di legame chimico tra soluto e gel, le prime molecole ad uscire dalla colonna sono quelle a peso molecolare maggiore (che non passano attraverso i pori e quindi escono rapidamente), mentre per ultime usciranno quelle di peso inferiore le quali, permeando nelle porosità del gel, impiegheranno un tempo maggiore a percorrere la colonna. Il detector è solitamente a indice di rifrazione, mentre per campioni che presentano assorbimento nel visibile si può utilizzare un detector UV-Vis. La soluzione uscente viene analizzata da un sensore che fornisce, istante per istante, un segnale la cui intensità è proporzionale alla concentrazione del soluto. Il risultato dell'analisi è un grafico che riporta l'andamento dell'intensità del segnale in funzione del tempo; per convertire i tempi in pesi molecolari si fa riferimento alle curve di taratura, ottenute analizzando campioni polimerici standard di peso molecolare noto.

Le misure GPC sono state effettuate a temperatura di 30°C con un cromatografo HP Series 1100 HPLC utilizzando una colonna PL gel 5 μ Mini MIX-C (rapporto lunghezza/diametro in mm interno 250/4,6). La registrazione dei cromatogrammi è avvenuta su HP Chemstation versionato A.05.04 e l'elaborazione con il GPC Calculator 7.6 della General Electric Company. Come solvente iniettato a portata costante è stato scelto il cloroformio (flusso in colonna 0.3 mL/min). La concentrazione delle soluzioni previo filtraggio era pari a 2 mg/mL. Nella costruzione delle curve di taratura (scelte del terzo ordine), sono stati utilizzati diversi standard di polistirene con peso molecolare compreso tra 2'000 e 100'000 u.m.a.

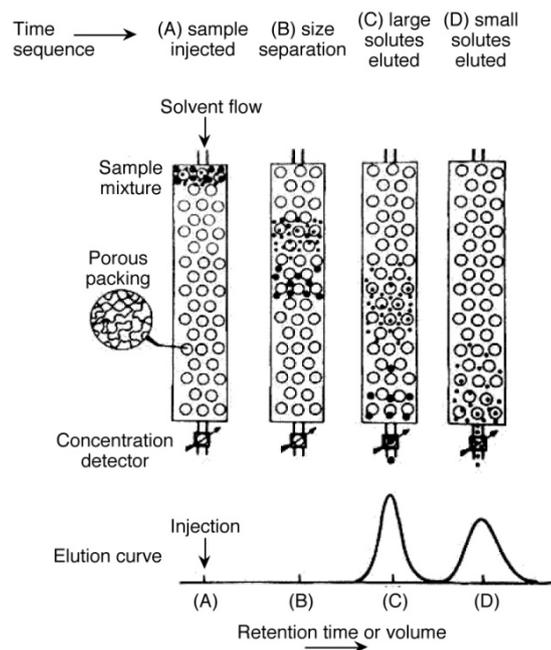


Figura 3.13: principio di funzionamento delle colonne con gel. Tratta da <http://archive.cnx.org/contents/>

3.5 CARATTERIZZAZIONE TERMICA

3.5.1 ANALISI TERMOGRAVIMETRICA (TGA)

La termogravimetria è una tecnica che permette di ottenere informazioni sulla stabilità termica di un materiale e sulla sua cinetica di decomposizione. Tali informazioni sono di fondamentale importanza per definire il valore di temperatura che non deve essere oltrepassato durante il trattamento del polimero, per non incorrere nella sua degradazione.

La strumentazione consiste di:

- Bilancia termica ad elevata sensibilità;
- Forno che riscalda con una velocità programmabile;
- Sistema di gas di spurgo che garantisce un'atmosfera controllata;
- Elaboratore per il controllo dello strumento, l'acquisizione e la visualizzazione dei dati.

Durante l'analisi si effettua una registrazione continua delle variazioni di peso di un campione in atmosfera controllata (N_2 , O_2 , aria), in funzione dell'aumento di temperatura. I cambiamenti di peso sono dovuti alla perdita di sostanze volatili in seguito a processi fisici o chimici che modificano la natura del materiale: per quanto riguarda i polimeri, i prodotti di decomposizione risultano

essere anidride carbonica e acqua. Un esempio di termogramma è riportato in Figura 3.14; da esso è possibile ricavare:

- $T_{5\%}$: temperatura in corrispondenza della quale è avvenuta una perdita di peso pari al 5% del peso totale;
- T_{max} : temperatura alla quale si rileva la massima velocità di perdita di peso.

Le curve TGA sono state ottenute usando la bilancia termo gravimetrica PerkinElmer TGA 4000, in atmosfera di azoto partendo da circa 5 mg di campione. La velocità di riscaldamento impostata è di $+10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e la temperatura varia nell'intervallo $[40-800^{\circ}\text{C}]$.

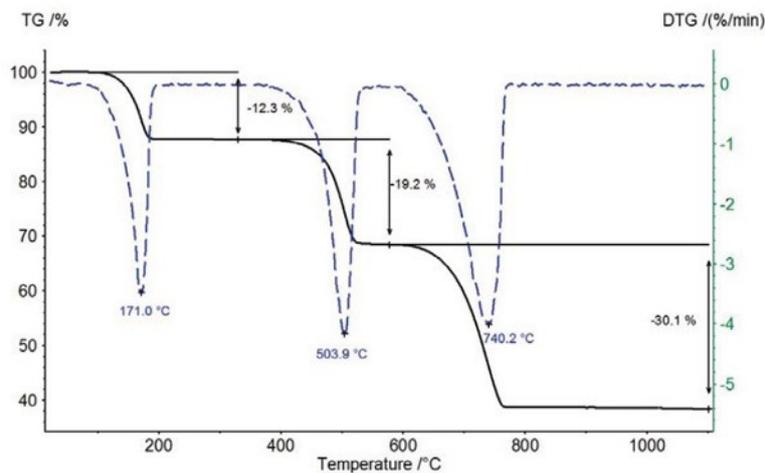


Figura 3.14: esempio di termogramma

3.5.2 CALORIMETRIA DIFFERENZIALE A SCANSIONE (DSC)

La calorimetria differenziale a scansione è una tecnica impiegata per studiare le transizioni termiche di un materiale e le sue proprietà termodinamiche, tra cui la temperatura di transizione vetrosa, il punto di fusione ed il calore di fusione. Come riportato in Figura 3.15, la strumentazione è costituita da due piatti dedicati all'alloggiamento di altrettante capsule, una contenente il campione (10 mg circa) e una contenente il riferimento. Le celle calorimetriche, che costituiscono microcalorimetri, sono mantenute in atmosfera di azoto inerte durante le misure e sono soggette allo stesso programma termico. In assenza di

transizioni di fase, campione e riferimento si trovano pertanto alla stessa temperatura, mentre in caso di variazioni di fase si verifica uno squilibrio termico, rilevato da termoresistenze: queste permettono di controllare la potenza elettrica fornita ai microcalorimetri, affinché venga annullata la differenza di temperatura tra campione e riferimento. L'impiego di un calcolatore interfacciato con il calorimetro consente l'impostazione del programma termico, la rilevazione e la successiva elaborazione dei dati.

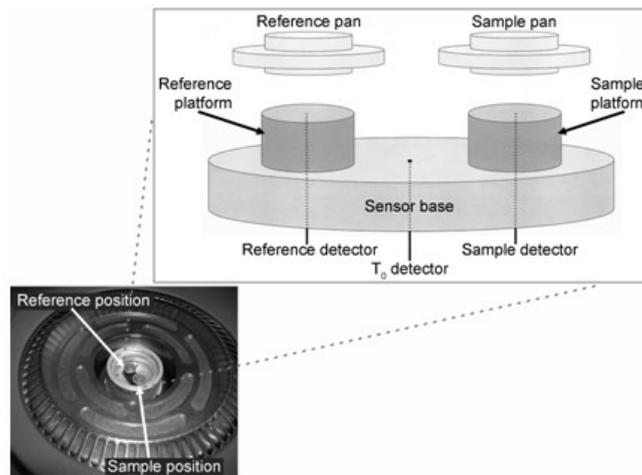


Figura 3.15: Schema degli alloggiamenti della DSC. Tratta da <http://lipidlibrary.aocs.org/Biochemistry/content.cfm?ItemNumber=40884>

La temperatura di transizione vetrosa (T_g) è una temperatura caratteristica dei solidi polimerici alla quale si verifica il passaggio da uno stato solido vetroso ad uno gommoso; si manifesta come una variazione endoterma della linea di base, ed il valore di T_g è determinato in corrispondenza della metà della variazione di calore specifico associata alla transizione (Figura 3.16).

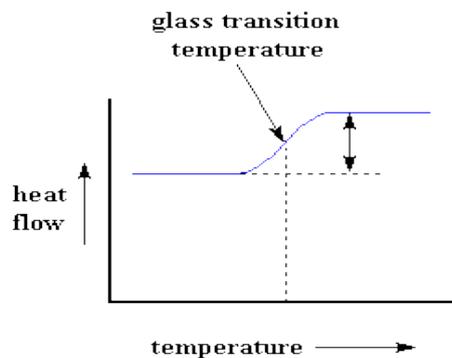


Figura 3.16: calcolo della T_g

L'entità della variazione di calore specifico associato alla transizione vetrosa, proporzionale alla componente amorfa presente nel materiale, è pari alla distanza verticale tra le linee di base estrapolate alla Tg:

$$\Delta c_p = \Delta \left(\frac{dQ}{dT} \right) = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \left(\frac{dT}{dt} \right)^{-1}$$

Dove dT/dt è la velocità di scansione.

La temperatura di fusione (T_m), è la temperatura alla quale si verifica il passaggio dallo stato solido a quello fuso e, nel tracciato DSC, si presenta come un picco endotermico (Figura 3.17). Il valore di T_m si riferisce all'ascissa del picco, mentre l'area sottesa da esso, proporzionale alla cristallinità del polimero, corrisponde al calore di fusione ΔH_m (J/g). Il rapporto tra quest'ultima grandezza ed il calore di fusione del polimero completamente cristallino costituisce il grado di cristallinità del materiale.

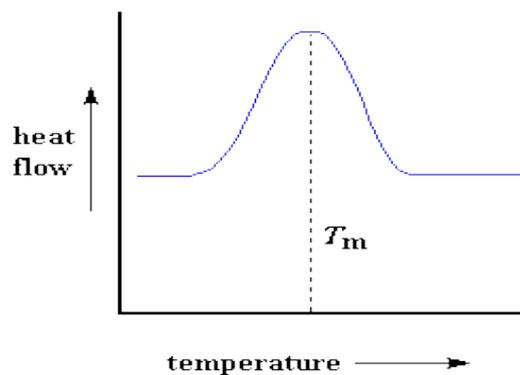


Figura 3.17: calcolo della T_m

Se il polimero tende a formare delle strutture cristalline ordinate, si verifica una cessione di calore da parte del materiale, che si evidenzia come una diminuzione del flusso di calore, come mostrato in Figura 3.18.

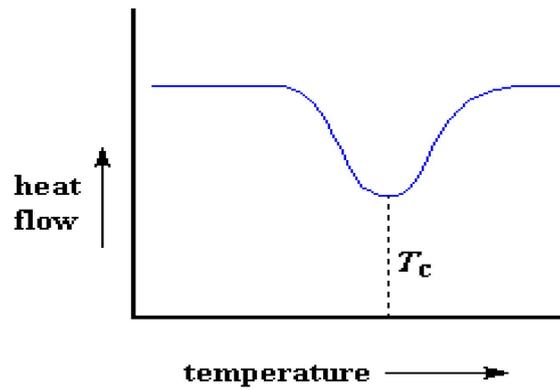


Figura 3.18: calcolo della T_c

Le misure DSC sono state ottenute con un DCS6 Perkin-Elmer equipaggiato di accessori per il raffreddamento a temperature minori di 0 °C e calibrato con standard ad elevata purezza.

La capsula campione è stata riempita con circa 10 mg di materiale e, insieme alla capsula di riferimento lasciata vuota, è stata sottoposta ad un programma termico ben definito:

- prima scansione: isoterma della durata di 1 min a -70 °C, riscaldamento da -70°C a 200°C con velocità di 20°C/min, raffreddamento rapido con velocità di 100 °C/min (il raffreddamento veloce impedisce la ricristallizzazione, perciò la seconda scansione verrà effettuata sullo stesso materiale ma in uno stato completamente amorfo) fino a -70°C;
- seconda scansione: riscaldamento in analoghe condizioni di temperatura e velocità.

Per il copolimero PLLAP(BSTES) le misure sono state ripetute 3 volte: subito dopo la realizzazione del film, dopo una settimana e dopo un mese.

3.6 ANALISI DIFFRATTOMETRICA A RAGGI X (WAXS)

La diffrazione a raggi X (XRD o WAXS) è una tecnica analitica non distruttiva che permette la misura della distanza tra i piani reticolari di un materiale, parametro peculiare di ogni sostanza cristallina; tale tecnica fornisce informazioni, quindi, sulla struttura cristallina di un materiale (grado di cristallinità, parametri della cella elementare, possibili polimorfismi e

isomorfismi) studiando gli effetti dell'interazione tra un fascio di raggi X e la materia.

L'analisi viene condotta con l'ausilio di un diffrattometro, che emette una radiazione indirizzata verso il cristallo, dove si diffonde in tutte le direzioni grazie al contributo degli elettroni. Il principio di funzionamento di tale tecnica si basa sulla Legge di Bragg (Figura 3.19):

$$n\lambda = 2 d \sin \theta$$

Dove d è la distanza interplanare, λ la lunghezza d'onda radiazione incidente, θ l'angolo di incidenza, ed n un numero intero positivo. Tale legge descrive l'interazione tra la radiazione incidente ed il cristallo permettendo, sotto le ipotesi di raggi paralleli e in fase, di ricavare la distanza di legame d imponendo la lunghezza d'onda λ della radiazione utilizzata e misurando l'angolo di incidenza θ .

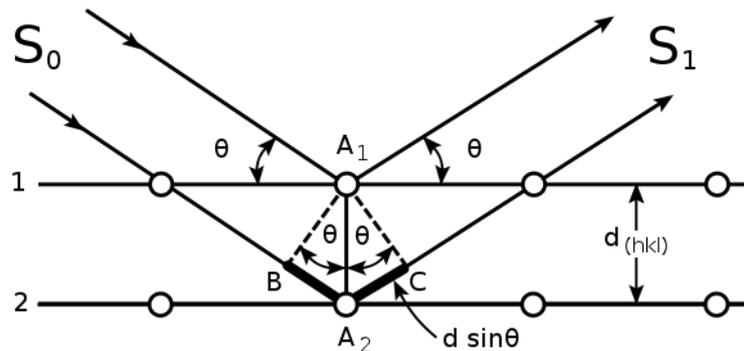


Figura 3.19: schema che rappresenta la legge di Bragg

Il risultato finale di un'analisi XRD è uno spettro di diffrazione, o diffrattogramma, costituito da una serie di picchi aventi diverse intensità e posizioni angolari relative alle varie fasi presenti nel campione indagato. Graficando le intensità dei picchi di diffrazione in funzione della posizione angolare θ si ottiene un pattern caratteristico del campione esaminato.

I pattern di diffrazione a Raggi X dei film polimerici sono stati ottenuti per mezzo di un diffrattometro X'PertProPANalitycal (Figura 3.20) che utilizza la lunghezza d'onda del rame ($\lambda = 0.15418$ nm), equipaggiato con un detettore allo stato solido X'Celerator. I dati sono stati acquisiti nell'intervallo 2θ da 5 a

60° con passo di 0.1°, e tempo di conteggio pari a 100 secondi per punto. Gli indici di cristallinità χ_c sono stati calcolati in base ai diagrammi di diffrazione, effettuando il rapporto tra l'area di diffrazione cristallina, ovvero l'area data dalla frazione di materiale cristallino (A_C), e l'area totale del profilo di diffrazione (A_T), tenendo conto della radiazione diffusa:

$$\chi_c = A_C / A_T$$

L'area di diffrazione cristallina è stata ottenuta sottraendo all'area totale la curva dovuta alla diffusione del materiale amorfo, modellata come picco a campana sulla linea di base.

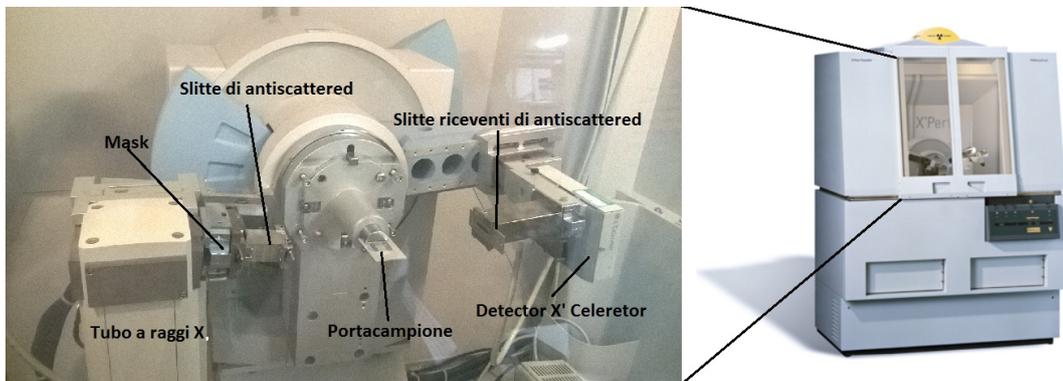


Figura 3.20: diffrattometro PANalytical® X' PRO con dettaglio della struttura interna

3.7 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA

Le misure di resistenza meccanica vengono utilizzate per studiare il comportamento dei materiali polimerici in presenza di sollecitazioni di diverso tipo. Nelle prove tensili si definisce *stress* (tensione) il rapporto tra lo sforzo normale e l'area della sezione del provino a riposo:

$$\sigma = \frac{N}{A}$$

Lo *strain* (deformazione) viene invece definito come l'allungamento del provino, rapportato alla lunghezza iniziale:

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l}$$

Durante le prove meccaniche si misura l'allungamento in funzione del carico applicato. Il risultato viene riportato in un grafico tensione-deformazione, dove nell'asse delle ascisse si trova la deformazione ε , mentre nelle ordinate la tensione applicata σ . La curva ottenuta, di cui un esempio è riportato in Figura 3.21, è caratteristica del tipo di materiale e consente di estrapolarne informazioni quali il modulo elastico, la tensione e l'allungamento a rottura, la tensione di snervamento e la tenacità.

Durante la prima parte della curva l'andamento risulta sempre lineare: il materiale in questo tratto segue la legge di Hooke:

$$\sigma = E \cdot \varepsilon$$

dove E è il modulo elastico o modulo di Young, il cui valore dà indicazione della "rigidezza" di un materiale. Il valore massimo della tensione per cui vale la legge di Hooke è detto limite di proporzionalità del materiale. Nel caso di materiali duttili, il limite di proporzionalità coincide con il limite di snervamento, che è il punto in cui il materiale inizia a deformarsi in maniera permanente, anche dopo la rimozione del carico, a causa dello scorrimento dei piani reticolari. Se il materiale duttile non supera questo limite, tolto il carico, torna alla sua forma originaria. Nel caso di materiali fragili, invece, la rottura si verifica in assenza di deformazione significativa. Se al campione continua ad essere applicato un carico crescente, si giunge a rottura, e la tensione corrispondente viene detta tensione di rottura.

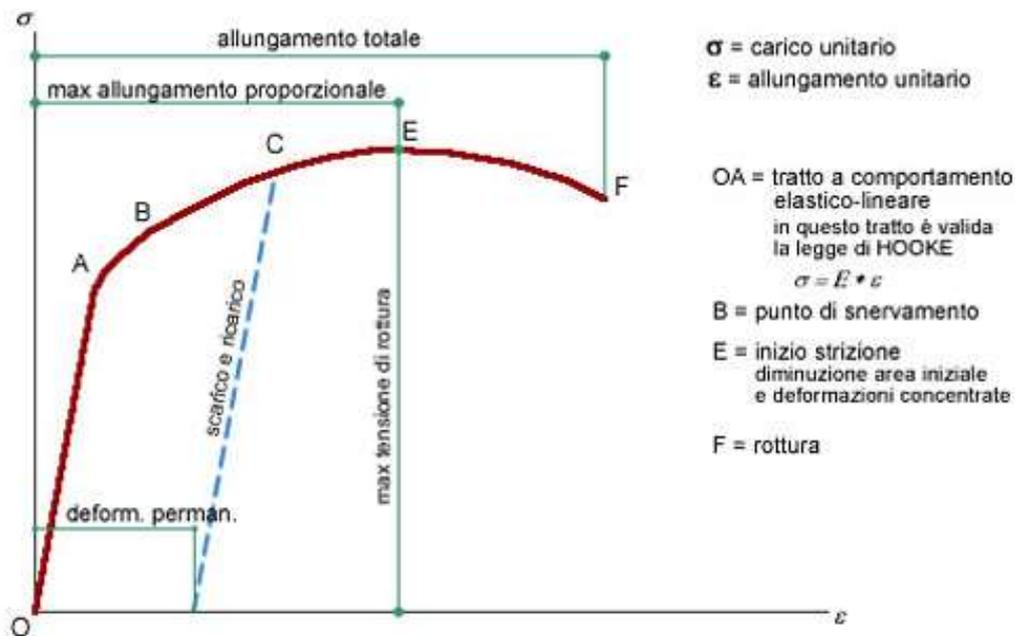


Figura 3.21: esempio di curva *stress-strain*

Dall'area sottesa alla curva σ - ϵ ottenuta è possibile determinare la tenacità del materiale. Occorre tenere presente che i dati ottenuti, oltre ad essere funzione del materiale, risentono anche delle condizioni ambientali, quali temperatura e umidità, e delle condizioni sperimentali, come velocità di scorrimento, forma e dimensioni dei provini.

Le prove meccaniche sono state condotte utilizzando un dinamometro Instron 4465 con cella di carico di 100 N. Lo strumento è costituito da una struttura rigida di base e una traversa mobile posta nella parte superiore. A partire dai film polimerici, sono state ottenute striscioline rettangolari dalle dimensioni di 5x41 mm, il cui spessore è stato misurato in tre punti diversi per mezzo di un micrometro: lo spessore utilizzato ai fini dell'analisi è stato ottenuto operando una media sulle tre misure. I provini sono stati dunque fissati per mezzo di agganci, in modo tale da presentare un tratto utile di 20 mm, e l'applicazione del carico è avvenuta tramite il movimento verso l'alto della struttura superiore; il valore della forza impressa è stato misurato dalla cella di carico, mentre l'allungamento è stato determinato sulla base della distanza percorsa dalla traversa mobile.

Le prove sono state condotte a temperatura ambiente, su 5 provini diversi per ogni campione, con velocità pari a 5 mm/min. Il modulo elastico, calcolato dalla pendenza del tratto iniziale della curva sforzo-deformazione ottenuta, è stato riportato come valore medio \pm deviazione standard delle 5 prove.

3.8 STUDI DI DEGRADAZIONE IDROLITICA

Gli studi di degradazione idrolitica permettono di verificare il comportamento dei polimeri, in particolare la loro velocità di degradazione, in un ambiente simile a quello corporeo (37°C e pH 7.4). Gli esperimenti sono stati effettuati sui film polimerici purificati, che sono stati pesati (15-20 mg circa) e poi inseriti in 4ml di tampone fosfato (preparato aggiungendo a 800 ml di acqua distillata 8g di NaCl, 0.2g di KCl, 1.44g di Na₂HPO₄ e 0.24g di KH₂PO₄; il pH della soluzione è stato aggiustato al valore di 7.4 per aggiunta di HCl e il volume finale portato ad 1 litro). I campioni sono stati inseriti all'interno di un incubatore (Julabo SW22) e mantenuti a 37 °C con agitazione di 100 rpm per periodi di tempo variabili. Nel presente lavoro di tesi sono state preparate e incubate 18 provette per ciascun polimero.

Periodicamente i campioni sono stati rimossi dalla soluzione, lavati con acqua distillata ed essiccati sotto vuoto a temperatura ambiente fino a raggiungere un peso costante. I campioni, prelevati in triplicato a diversi tempi di degradazione, sono stati pesati per misurare la perdita di peso e analizzati tramite GPC, NMR e DSC.

CAPITOLO 4

Risultati e discussione

4.1 SINTESI

A temperatura ambiente l'acido poli-L-lattico (PLLA) appena sintetizzato si presenta come un solido bianco semitrasparente e piuttosto rigido. Dopo la purificazione, lo stesso materiale assume una forma a “fiocchi” sempre di colore bianco, come evidente dalla Figura 3.11 del capitolo 3. Il film ottenuto dai “fiocchi” di PLLA per pressofusione risulta un solido bianco, rigido e molto fragile.

Il copolimero triblocco PLLAP(BSTES) appena sintetizzato è invece un solido gommoso, opaco e di colore marrone chiaro. Come si può notare dalla Figura 4.1, il materiale stirato si allunga notevolmente, dopo il rilascio ha un buon recupero di forma anche se non ritorna del tutto alla sua dimensione originaria. Il processo di purificazione nel caso del PLLAP(BSTES) ha determinato uno schiarimento del materiale: da marrone chiaro a giallo. Il film ottenuto per pressofusione risulta estremamente flessibile.



Figura 4.1: PLLAP(BSTES) appena scaricato dal reattore e stirato a temperatura ambiente

4.2 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E TERMICA DEI MATERIALI OTTENUTI

4.2.1 SPETTROSCOPIA DI RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE (NMR)

La struttura chimica dei polimeri oggetto della presente Tesi è stata verificata tramite spettroscopia di risonanza magnetica nucleare $^1\text{H-NMR}$; nel caso del copolimero ci si è avvalsi della stessa tecnica per determinare anche la composizione effettiva e l'architettura molecolare. In Figura 4.2 è riportato lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del PLLA *chain* esteso, con relativa assegnazione dei picchi. Oltre ai segnali dovuti al cloroformio (CDCl_3) e al riferimento (TMS), risultano ben visibili, il quadrupletto a δ 5.19 ppm e il doppietto a δ 1.57 ppm relativi ai protoni **g** e **h** dell'unità ripetitiva di acido lattico. Molto meno intensi, ma comunque visibili, i segnali ascrivibili all'iniziatore butandiolo, **b** e **c**, che cadono rispettivamente a δ 3.76 e δ 1.74 ppm, e i picchi dovuti all'estensore esametilene diisocianato, **i**, **k** e **j**, che si manifestano rispettivamente a δ 3.18 e a δ 1.55 ppm.

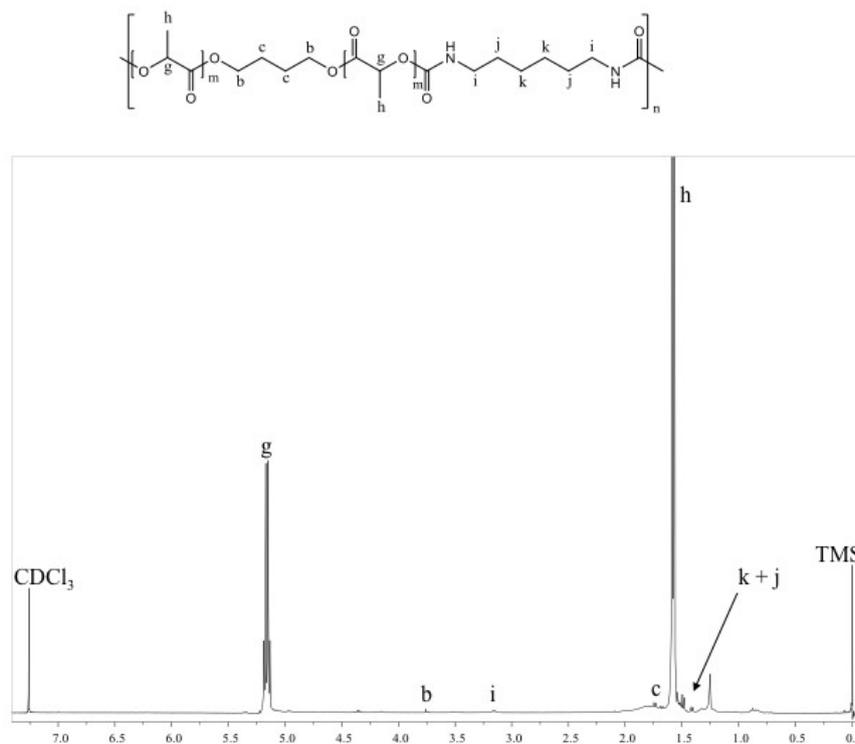


Figura 4.2: Spettro $^1\text{H-NMR}$ dell'acido poli-L-lattico PLLA con assegnazione dei picchi

In Figura 4.3 è riportato lo spettro del copolimero PLLAP(BSTES) insieme all'attribuzione dei segnali. Per il copolimero triblocco, oltre alla presenza dei picchi caratteristici dell'unità ripetitiva di acido lattico (**g** e **h**) e ai segnali dovuti ai protoni **i**, **k** e **j**, ascrivibili al HDI, si distinguono anche i picchi dovuti alle unità butilene succinato (BS) e trietilene succinato (TES). In particolare, è possibile rilevare i multipletti **b** e **c** dell'unità butilenica a δ 4.19 e a δ 1.73 ppm, insieme ai tripletti **d** ed **e**, e il singoletto **f** dell'unità trietilenica a δ 4.25, a δ 3.70 e a δ 3.65 ppm, rispettivamente. Per quanto riguarda la componente acida, il segnale degli idrogeni **a** relativi alla subunità succinica, presente sia nei segmenti BS che in quelli TES, è localizzato nella zona tra 2.65 e 2.61 ppm. L'analisi NMR ha permesso di determinare la composizione del blocco centrale P(BSTES) dall'area dei picchi dei protoni **b** della subunità butandiolo a δ 4.19 ppm e dall'area del segnale dei metileni **d** della subunità trietileneglicole a δ 4.25 ppm. La percentuale molare delle due unità ripetitive all'interno del blocco centrale è risultata essere: BS 53 mol% e TES 47 mol%.

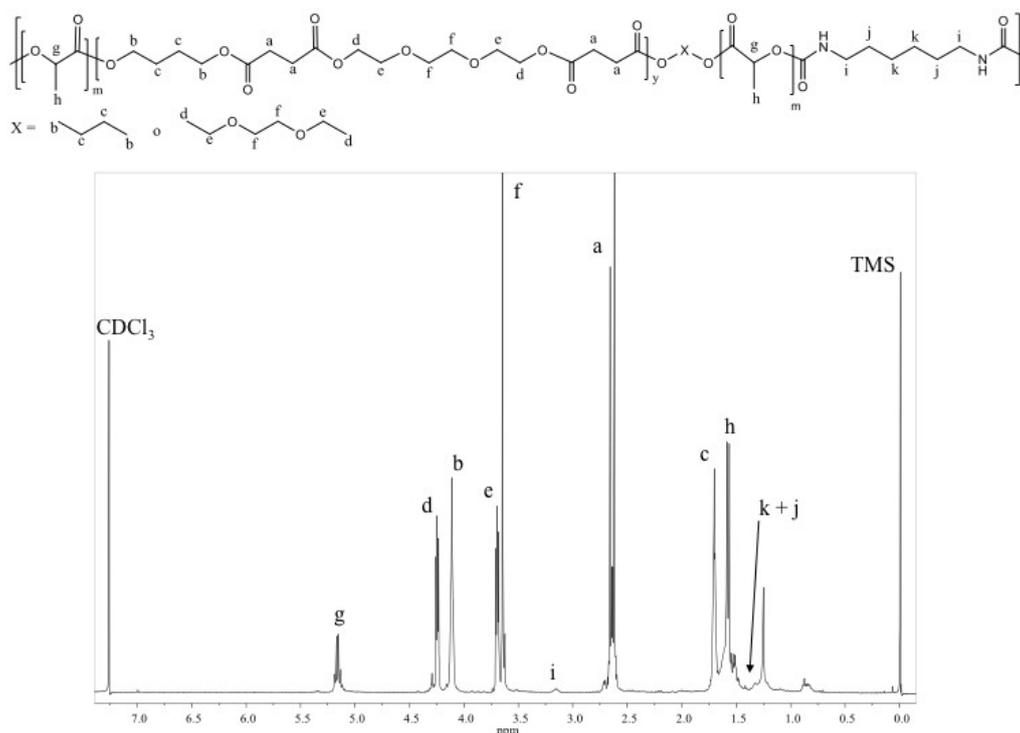


Figura 4.3: Spettro del PLLAP(BSTES) con assegnazione dei picchi

Mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ è stata calcolata anche la composizione del blocco centrale P(BSTES) rispetto ai blocchi PLLA. In questo caso si è fatto riferimento all'area dei picchi di risonanza dei protoni **g** della sub-unità LLA (localizzati a δ 5.19 ppm) e dei protoni **a** della sub-unità succinica dei segmenti BS e TES (localizzati nella zona tra 2.65 e 2.61 ppm). La composizione molare del blocco PLLA e del blocco P(BSTES) è riportata in tabella 4.1.

4.2.2 CROMATOGRAFIA A PERMEAZIONE SU GEL (GPC)

I valori di peso molecolare medio numerico M_n e di indice di polidispersità D per l'omopolimero PLLA e il copolimero PLLAP(BSTES), ottenuti tramite GPC, sono riportati in Tabella 4.1: come si può notare i polimeri sono caratterizzati da un peso molecolare accettabilmente alto a riprova di un buon controllo delle condizioni di reazione.

Polimero	M_n (g/mol)	D	%mol PLLA	%mol P(BSTES)
PLLA	31200	1.17	100	-
PLLAP(BSTES)	36200	1.23	47	53

Tabella 4.1: dati di caratterizzazione molecolare

4.2.3 ANALISI TERMOGRAVIMETRICA (TGA)

Tramite l'analisi termogravimetrica (TGA), condotta in atmosfera inerte di azoto, è stato possibile valutare la stabilità termica dei campioni in esame nella presente Tesi. Determinare la temperatura di inizio decomposizione è di fondamentale importanza dal punto di vista tecnologico, in quanto consente di processare il materiale senza incorrere in problemi legati a processi di degradazione termica. Le curve TGA del PLLA e del copolimero PLLAP(BSTES) sono riportate in Figura 4.4.

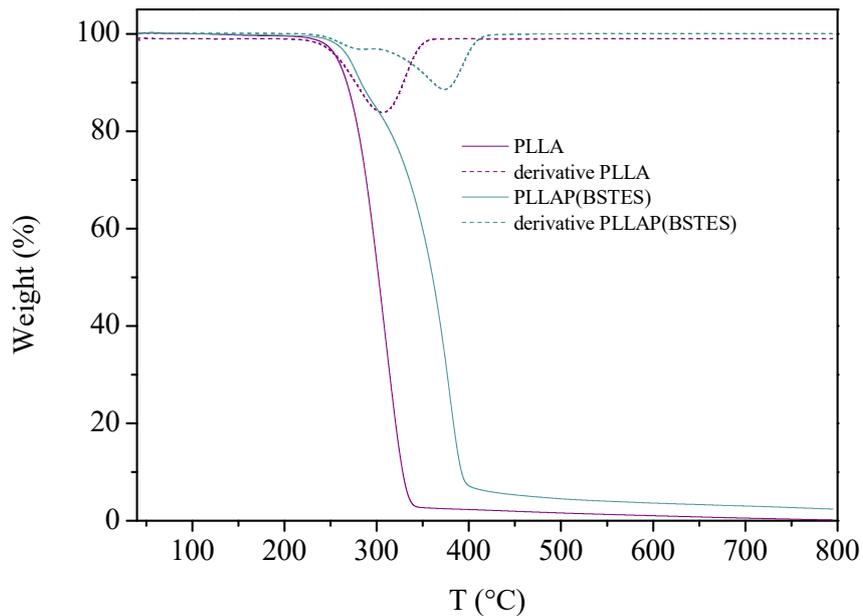


Figura 4.4: Curve TGA del PLLA e del copolimero triblocco PLLAP(BSTES) con relative derivate

I polimeri hanno entrambi una buona stabilità termica che risulta però diversa nei due casi: il PLLA risulta meno stabile (temperatura di inizio decomposizione pari a 250°C) del copolimero che inizia a degradare superati i 300°C. Inoltre, mentre nel caso dell'omopolimero la perdita di peso avviene in un unico stadio, nella TGA del copolimero si osservano due step. L'altezza di tali step è legata alla composizione del copolimero. Il primo stadio è riconducibile alla degradazione del PLLA, mentre il secondo a quella del blocco centrale poli(butilene/trietilene succinato). In conclusione, la copolimerizzazione del PLLA ne migliora la stabilità termica.

4.2.4 CALORIMETRIA DIFFERENZIALE A SCANSIONE (DSC) E ANALISI DIFFRATTOMETRICA (WAXS)

Nel caso del PLLA, l'analisi calorimetrica è stata effettuata subito dopo purificazione e filmatura. Come ben noto, infatti, l'acido poli-L-lattico è caratterizzato da una temperatura di transizione vetrosa ben al di sopra di temperatura ambiente e pertanto a questa temperatura le sue catene polimeriche risultano bloccate nello stato vetroso e non possono riorganizzarsi durante la

permanenza a T_{amb} . Il copolimero PLLAP(BSTES) risulta invece caratterizzato da una temperatura di transizione vetrosa inferiore a temperatura ambiente e pertanto le catene macromolecolari possono cristallizzare per permanenza a T_{amb} . Si è dunque ritenuto importante analizzare il comportamento termico dei film dopo 0, 7 e 30 giorni di permanenza a temperatura ambiente. In Figura 4.5 sono riportate le corrispondenti curve calorimetriche di I scansione. La curva calorimetrica del campione appena filmato è tipica di un polimero semicristallino con un'intensa variazione endotermica della linea di base intorno a -20°C , associata al fenomeno della transizione vetrosa, seguita da un doppio picco di fusione a temperatura più alta; dopo 7 giorni la forma del tracciato DSC è notevolmente cambiata: l'altezza del gradino in corrispondenza alla T_g risulta più basso e spostato a temperature più alte, mentre il picco di fusione diventa più intenso con i due massimi ben definiti. Entrambi gli effetti indicano un incremento di cristallinità all'interno del materiale. Infatti, come si evince dall'insero del grafico in Figura 4.5, l'area sottesa dal picco di fusione, cioè il calore di fusione ΔH_m , proporzionale alla porzione di fase cristallina, aumenta, mentre la variazione di calore specifico ΔC_p diminuisce. L'evoluzione della curva calorimetrica dopo 30 giorni è molto simile a quella ottenuta dopo 7 giorni di permanenza a T_{amb} , benché si osservi un ulteriore aumento del valore di ΔH_m e una diminuzione del ΔC_p (insetto figura 4.5).

La forma a doppio picco del processo di fusione può essere dovuto a fenomeni di fusione/ricristallizzazione/fusione dei cristalli previamente formati che fondono e ricristallizzano in forme più perfette durante la scansione calorimetrica.

Per quanto concerne il fenomeno della transizione vetrosa, si osserva nel copolimero un'unica e ampia variazione endotermica della linea di base, e ciò comprova la miscibilità dei blocchi PLLA e P(BSTES) nello stato amorfo.

La permanenza per tempi più lunghi a temperatura ambiente non comporta ulteriori variazioni della curva calorimetrica, permettendo di individuare in 30 giorni a T_{amb} un periodo sufficientemente lungo per permettere al materiale di sviluppare fasi stabili.

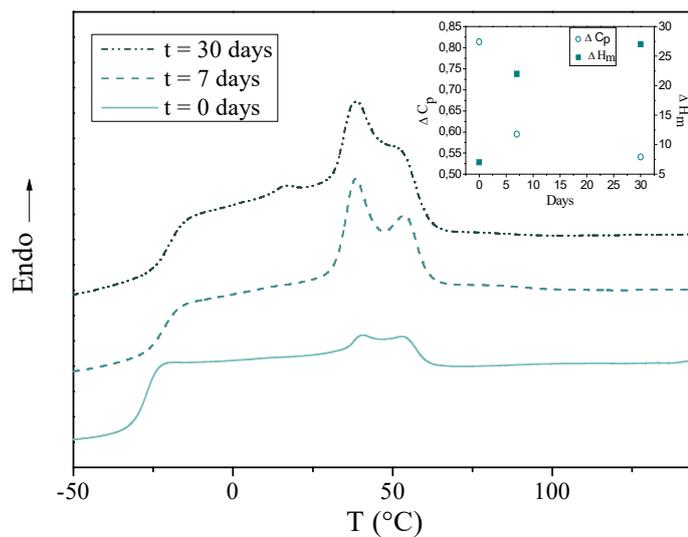


Figura 4.5: Curve DSC (I scan) del copolimero PLLAP(BSTES) in forma di film dopo diverso tempo di permanenza a temperatura ambiente

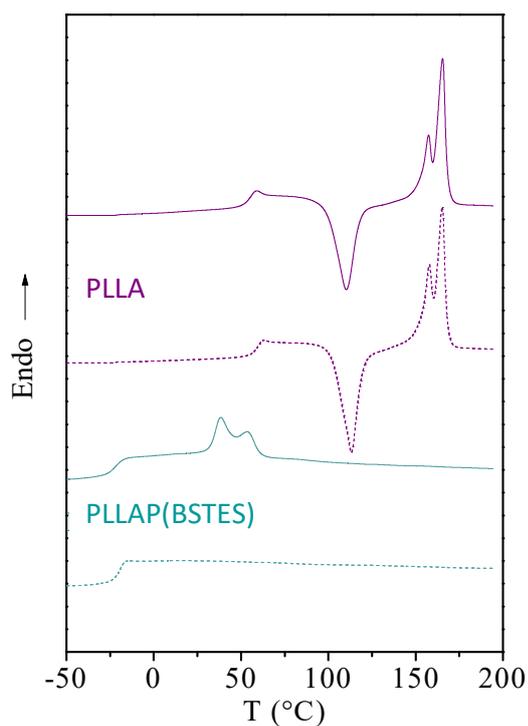


Figura 4.6: Curve DSC, di prima (curva continua) e seconda scansione (curva tratteggiata), del PLLA e del copolimero PLLAP(BSTES) mantenuto a 25°C per 30 giorni

In Figura 4.6 sono riportate le curve DSC, di primo e secondo scan, del PLLA e del copolimero PLLAP(BSTES) mantenuto a 25°C per 30 giorni. I risultati ottenuti sono riassunti in Tabella 4.2.

Dalla Figura 4.6 si nota che entrambi i materiali presentano un profilo tipico di un polimero semicristallino: una variazione endoterma della linea di base a bassa temperatura in corrispondenza della transizione vetrosa e un picco endotermico a temperatura più alta dovuto alla fusione della componente cristallina. Nel caso del PLLA, tra i due fenomeni sopracitati si evidenzia anche la presenza di un picco esotermico che indica un processo di cristallizzazione in scansione. Come si può notare dai dati in tabella 4.2, l'aria sottesa dal picco di cristallizzazione (ΔH_c) è comunque minore del calore di fusione (ΔH_m) a dimostrare la natura semicristallina dell'omopolimero. Pur essendo entrambi i materiali cristallini, sia la temperatura di transizione vetrosa (T_g) che la temperatura di fusione (T_m) del PLLA sono molto più elevate di quelle del copolimero. Queste differenze sono ascrivibili alla diversa struttura delle unità ripetitive dei segmenti PLLA e del blocco P(BSTES). In particolare, la T_g del copolimero si trova ad una temperatura intermedia rispetto a quella del PLLA e quella del copolimero statistico PBSPTES, mentre la T_m è molto simile a quella del copolimero random PBSPTES.

Polimero	1 st scan						2 nd scan						
	T_g (°C)	ΔC_p (J/g°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_g (°C)	ΔC_p (J/g°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	X_c (%)
PLLA	57	0.389	156 163	37	109	29	52	0.478	156 163	42	110	41	13
PLLAP (BSTES)	-20	0.541	39 54	27	-	-	-21	0.819	-	-	-	-	20

Tabella 4.2: Dati di caratterizzazione termica e diffrattometrica del PLLA e del copolimero triblocco PLLAP(BSTES)

Allo scopo di determinare la natura della fase cristallina presente nel copolimero e calcolare il grado di cristallinità dei due polimeri oggetto della presente Tesi, i materiali sono stati sottoposti ad analisi diffrattometrica. I diagrammi di diffrazione dei polimeri in esame sono riportati in Figura 4.7, mentre il grado di cristallinità X_c è riportato in Tabella 4.2.

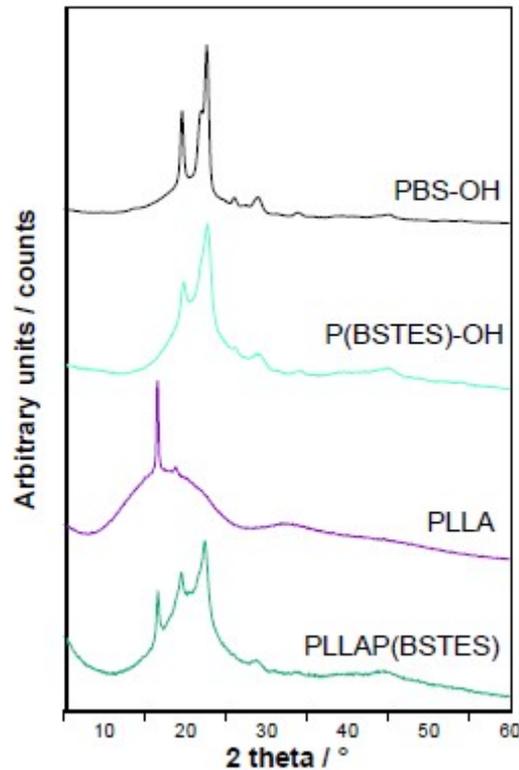


Figura 4.7: Curve diffrattometriche dei campioni in esame (PLLA e PLLAP(BSTES)) e dei polimeri di riferimento idrossil-terminati PBS-OH e P(BSTES)-OH, aggiunti per necessità di confronto

Nella figura per necessità di confronto sono riportati anche gli spettri dei polimeri di riferimento idrossil-terminati PBS-OH e P(BSTES)-OH. Il diffrattogramma dei campioni analizzati è tipico dei materiali semicristallini: sono infatti presenti alcuni riflessi dovuti alla componente ordinata del materiale, sovrapposti ad una linea di base a campana dovuta alla porzione di materiale amorfo.

Lo spettro del copolimero statistico P(BSTES)-OH presenta il profilo caratteristico della fase cristallina α del PBS. Non si osservano ulteriori picchi, a dimostrazione del fatto che è presente un'unica fase cristallina. La presenza della co-unità TES determina un aumento della larghezza complessiva dei picchi, che allo stesso tempo diventano meno intensi. La posizione dei riflessi rispetto all'omopolimero PBS-OH non varia e ciò porta ad ipotizzare la completa esclusione della co-unità amorfa dal reticolo cristallino che si sviluppa.

L'omopolimero PLLA presenta uno spettro caratterizzato da un unico riflesso intenso a 17° ed ha un grado di cristallinità pari al 13%.

Come evidente dalla Figura 4.7, il diffrattogramma del copolimero triblocco PLLAP(BSTES) è caratterizzato dalla contemporanea presenza dei picchi tipici sia della fase cristallina del PBS che di quella del PLLA, con un grado di cristallinità complessivo del 20%. Il grado di perfezione delle due fasi cristalline, come peraltro indicato dal basso valore di T_m , risulta però inficiato dalla presenza delle co-unità.

I campioni sono stati anche sottoposti a una seconda scansione calorimetrica dopo rapido raffreddamento dal fuso “*quenching*”. Questo trattamento ha come obiettivo l'ottenimento di un materiale amorfo in seconda scansione. Come si evidenzia sia dai dati riportati in Tabella 4.2 che dalle curve DSC di Figura 4.6, entrambi i polimeri dopo tempra risultano amorfi ad indicare che la velocità di cristallizzazione dei due polimeri è inferiore alla velocità di raffreddamento del calorimetro. Tuttavia, dalle curve DSC si evidenzia una diversa capacità a cristallizzare dei materiali in esame. Infatti, le catene polimeriche del PLLA una volta superata T_g hanno sufficiente energia e mobilità per cristallizzare in scansione.

Per quanto riguarda invece la componente amorfa, anche nei campioni amorfi la differenza di temperatura di transizione vetrosa rimane molto elevata (52°C per il PLLA e -20°C per il copolimero triblocco PLLAP(BSTES)) a conferma della diversa mobilità delle unità di ripetizione nei due blocchi.

4.3 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA

Le misure meccaniche stress-strain sono state eseguite su film di forma $50 \times 5 \times 0.3$ mm, mediante misure di trazione, allungando un provino di forma rettangolare a velocità costante, e misurando la variazione dello sforzo in funzione della deformazione. Sono stati sottoposti a trazione solo i polimeri ottenuti dopo reazione di estensione di catena, e per ogni campione le misure sono state effettuate su cinque provini diversi, riportando il risultato come valore medio delle 5 prove \pm deviazione standard.

In Figura 4.8 sono rappresentate le curve sforzo-deformazione per i materiali oggetto di questa Tesi. In Tabella 4.3 sono raccolti i valori di modulo elastico (E), di sforzo (σ_b) e deformazione (ϵ_b) a rottura, registrati durante le prove meccaniche a trazione.

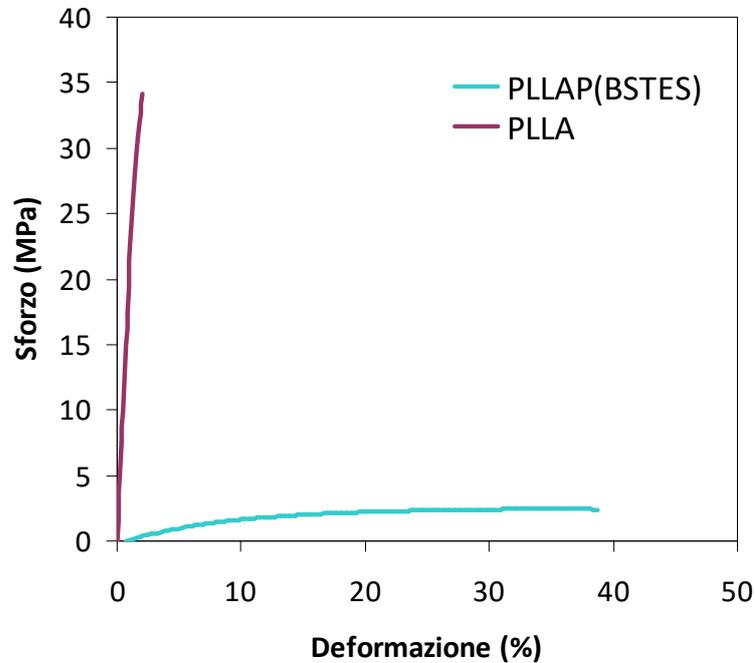


Figura 4.8: Grafico sforzo-deformazione per il PLLA e il copolimero triblocco PLLAP(BSTES)

Polimero	E(MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)
PLLA	2290±300	33.0±1.5	2.0±0.5
PLLAP(BSTES)	25.0±1.7	2.0±0.2	35.0±4.8

Tabella 4.3: Dati di caratterizzazione meccanica per il PLLA e il copolimero triblocco PLLAP(BSTES).

Si può notare come il campione PLLA mostri un valore di modulo elastico (E) e di sforzo a rottura (σ_b) molto elevati, insieme a una bassissima deformazione a rottura (ϵ_b), a conferma della notevole rigidità del materiale. Questi parametri risultano significativamente diversi nel copolimero triblocco PLLAP(BSTES). In particolare, la copolimerizzazione porta a una diminuzione di due ordini di grandezza del modulo elastico accompagnato da un importante abbassamento dello sforzo a rottura (un ordine di grandezza e mezzo). Allo stesso tempo, si

assiste ad un significativo miglioramento in termini di allungamento a rottura: dal 2% per l'omopolimero al 35% nel copolimero (un ordine di grandezza e mezzo). Il diverso comportamento del copolimero non può essere spiegato sulla base della diversa cristallinità, che risulta superiore nel copolimero rispetto l'omopolimero. La maggiore rigidità e fragilità del PLLA può essere ricondotta alla presenza in questo materiale di una fase amorfa vetrosa. Nel copolimero, al contrario, la fase amorfa è mobile ed è caratterizzata dalla presenza di atomi di ossigeno etero che, come noto, flessibilizzano particolarmente le catene.

E' interessante notare come la curva stress-strain del PLLAP(BSTES) sia priva di snervamento come nel caso degli elastomeri termoplastici, proprietà fondamentale per il tipo di applicazione per cui i materiali oggetto della presente Tesi sono stati pensati.

4.4 STUDI DI DEGRADAZIONE IDROLITICA

L'omopolimero di riferimento PLLA e il copolimero triblocco PLLAP(BSTES), sono stati sottoposti a esperimenti di degradazione idrolitica in condizioni fisiologiche di temperatura (37°C) e di pH (7.4). Tali esperimenti sono stati condotti al fine di valutare la tempistica di degradazione di questi polimeri nell'ottica di utilizzarli come biomateriali all'interno dell'organismo.

Lo studio del processo di degradazione idrolitica ha previsto di sottoporre ogni campione incubato per un certo tempo a misura di perdita di peso gravimetrico, analisi GPC per la determinazione del peso molecolare medio numerico, spettroscopia ¹H-NMR per valutare possibili variazioni della composizione, analisi DSC per determinare l'effetto della degradazione sul rapporto tra fase cristallina e amorfa. I test di degradazione sono stati condotti in duplicato. Di ciascun campione incubato a pH 7.4 e a 37°C è stata calcolato il peso residuo percentuale (sia gravimetrico che molecolare) attraverso la seguente equazione:

$$m_{res}(\%) = 100 - \left(\frac{m_{in} - m}{m_{in}} * 100 \right)$$

dove m è il peso (gravimetrico o molecolare) del campione registrata dopo il

processo di degradazione e m_{in} è il peso (gravimetrico o molecolare) iniziale del campione. Nella Figura 4.9 sono riportati i pesi residui percentuali dei campioni in funzione dei giorni di permanenza in soluzione tampone.

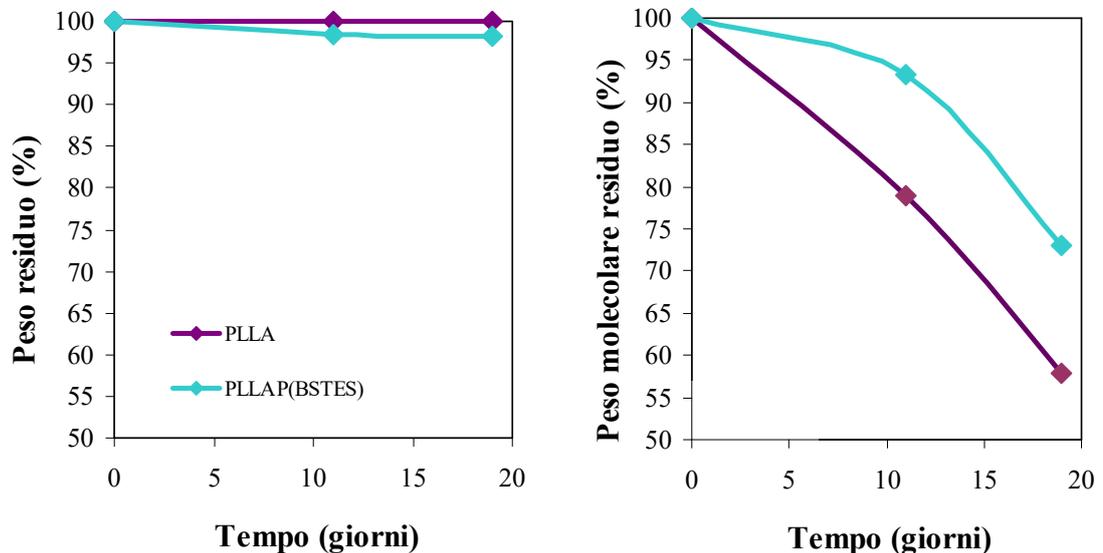


Figura 4.9: Peso residuo percentuale (pannello a sinistra) e peso molecolare residuo percentuale (pannello a destra) in funzione del tempo di incubazione in tampone fosfato.

Come si può notare dalla Figura 4.9 (pannello a sinistra), la perdita di peso gravimetrico dopo 19 giorni di permanenza in condizioni fisiologiche è nulla per il PLLA mentre è trascurabile ($\approx 2\%$) per il copolimero PLLAP(BSTES). Tuttavia, dall'analisi GPC (pannello a destra della Figura 4.9) si evince che le catene polimeriche sono state idrolizzate dall'acqua con conseguente diminuzione del peso molecolare. Tale riduzione risulta più marcata nel caso dell'omopolimero ($> 40\%$) rispetto al copolimero ($\approx 30\%$).

Come è noto, il processo di degradazione idrolitica è influenzato da diversi fattori quali: grado di cristallinità, idrofilicità e densità di gruppi esterei. Il bilancio di questi parametri determina la velocità di degradazione. Il PLLA, seppure più idrofobico del PLLAP(BSTES), è caratterizzato da un minore grado di cristallinità (vedi Tabella 4.2) e da una maggiore densità di gruppi esterei idrolizzabili rispetto al copolimero. Queste ultime caratteristiche sembrano avere un peso determinante e portano il PLLA a degradarsi più velocemente. L'analisi DSC condotta sui campioni sottoposti a degradazione

idrolitica, ha evidenziato per l'omopolimero un leggero aumento della porzione cristallina, a conferma dell'attacco preferenziale della porzione amorfa, mentre nel caso del copolimero non si è rilevata una variazione significativa del rapporto tra fase cristallina e porzione amorfa. Per quanto riguarda invece la composizione, come evidenziato tramite spettroscopia $^1\text{H-NMR}$, nei campioni sottoposti a degradazione idrolitica si osserva una leggera diminuzione (≈ 1 mol%) del blocco PLLA. Questo risultato è in linea con i dati GPC e calorimetrici. I risultati riportati in questa Tesi sono preliminari; gli esperimenti di degradazione sono tuttora in corso presso il laboratori LAMAC del DICAM dell'Università di Bologna e permetteranno di confermare i risultati preliminari.

CAPITOLO 5

Conclusioni

I biomateriali rivestono un ruolo di grande importanza nel settore biomedicale, in particolare in campi emergenti quali l'ingegneria tissutale ed il rilascio controllato di farmaci. I polimeri, ed in particolare i poliesteri alifatici, sono la classe di materiali che si è rivelata più interessante per le applicazioni sopracitate. Ad oggi però, solo pochi poliesteri sono stati approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per la realizzazione di dispositivi medici impiantabili nel corpo umano; tra questi si possono ricordare l'acido polilattico, l'acido poliglicolico, il policaprolattone e i loro copolimeri. Purtroppo, tali materiali non riescono a soddisfare gli stringenti requisiti fisico/meccanici per ogni diversa applicazione, per cui la sintesi di nuovi polimeri, che offrano garanzie di biocompatibilità e biodegradabilità, o la modifica chimica mirata di quelli già disponibili in commercio e già approvati per uso biomedico, come il PLLA, può aprire nuove prospettive in tali ambiti.

In questo contesto si inserisce il presente lavoro di Tesi finalizzato alla sintesi e caratterizzazione di nuovi copolimeri alifatici a base di PLLA con proprietà meccaniche migliorative rispetto a quelle dell'omopolimero di riferimento per applicazioni in ambito "*soft tissue engineering*". Il PLLA risulta infatti troppo rigido e fragile e caratterizzato da una cinetica di degradazione idrolitica troppo veloce per talune applicazioni.

Il gruppo di ricerca presso cui è stata condotta la presente Tesi, vanta una esperienza ventennale nella sintesi e modifica chimica di poliesteri, nonché nella estrapolazioni di correlazioni proprietà-struttura fondamentali per il design *ad hoc* di materiali per uso specifico. In particolare, sono stati recentemente sintetizzati poliesteri alifatici biodegradabili e biocompatibili contenenti sequenze *PEG-like*, che si sono rilevati particolarmente interessanti sia dal punto di vista delle proprietà meccaniche, modulabili con la lunghezza dei blocchi sino ad arrivare ad un elastomero con il copolimero a cortissime sequenze, sia dal punto di vista della cinetica di riassorbimento, anch'essa

controllabile agendo sull'architettura molecolare, e risultata tanto più lenta quanto minore la lunghezza delle sequenze.

Tenuto conto dello scenario sopra descritto e dei risultati precedentemente ottenuti, il lavoro della presente Tesi è specificamente consistito nella preparazione e caratterizzazione di un copolimero triblocco A-B-A ad elevato peso molecolare, dove A è PLLA e B è il copolimero statistico a composizione equimolare poli(butilene/trietilene succinato), precedentemente studiato e caratterizzato da un comportamento meccanico elastomerico e da una cinetica di degradazione idrolitica lenta. Il rapporto tra i due blocchi A e B è stato fissato in questo studio vicino all'equimolarità.

Dai risultati ottenuti nella presente Tesi si evince come gli obiettivi siano stati raggiunti pienamente: le proprietà meccaniche del copolimero triblocco sono risultate significativamente diverse dal PLLA sintetizzato per necessità di confronto e, soprattutto, migliorative in vista di impieghi del materiale nell'ingegneria dei tessuti molli: infatti, il modulo elastico si è ridotto di due ordini di grandezza, mentre l'allungamento a rottura è aumentato di un ordine e mezzo.

Per quanto concerne la cinetica di riassorbimento idrolitico, i risultati, seppure preliminari sembrano molto promettenti: la cinetica del PLLA risulta difatti rallentata per copolimerizzazione.

Da ultimo, ma non meno importante, è da segnalare un miglioramento della stabilità termica del PLLA per copolimerizzazione. Va ricordato che qualunque materiale polimerico per uso biomedico deve poter essere processabile senza incorrere in problemi di degradazione termica durante le fasi di lavorazione per la realizzazione del dispositivo.

I risultati della presente Tesi, seppure incoraggianti, sono da considerarsi preliminari:

- ✓ Sarà interessante andare a modificare il rapporto tra i blocchi A e B e valutare come ciò impatta sulle proprietà finali del materiale;
- ✓ Sarà utile andare a correlare le proprietà meccaniche con il comportamento delle cellule che verranno adese e fatte proliferare su costrutti ingegnerizzati tridimensionali preparati con questi materiali.

Bibliografia

- [1] Williams, D.F., "Definitions in Biomaterials. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials", Chester, England, 3–5 March 1986, Vol. 4; Elsevier, New York.
- [2] Brandwood A., Noble K.R., Schindhelm K., "Influences of stress on biodegradation of novel biomedical polyurethanes", *Adv Biomater*, 1992, 10:413.
- [3] Velásquez L., Dussan J., "Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*", *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 167, 713–716.
- [4] Von Burkersroda F., Schedl L., Göpferich A., "Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion", *Biomaterials*, 2002, 23:4221.
- [5] Göpferich A., "Mechanisms of polymer degradation and erosion", *Biomaterials*, 1996, 17- 103.
- [6] Mochizuki M., Hiramami M., "Structural Effects on the Biodegradation of Aliphatic Polyesters", *Polym. Adv. Technol.*, 1997, 8:203.
- [7] Grima S., Bellon-Maurel V., Feuilloley P., Silvestre F., "Aerobic biodegradation of polymers in solid-state conditions: A review", *Journal of Polymers and the Environment*, 2000, 8: 183.
- [8] Albertsson A.C., Varma I.K., "Recent developments in ring opening polymerization of lactones for biomedical applications", *Biomacromolecules*, 2003, 4: 1466.
- [9] <http://polymerdatabase.com/polymer%20physics/Fox.html>
- [10] Young, R. J. "Introduction to Polymers". CRC Press, terza edizione, 2011.
- [11] <http://pslc.ws/italian/crystal.htm>
- [12] Menges G., Haberstroh E., Michaeli W., Schmachtenberg E., "Plastics Materials Science", Hanser Verlag, 2002.
- [13] Garlotta D., "A Literature Review of Poly(Lactic Acid)", *Journal of Polymers and the Environment*, 2011, Vol. 9, No. 2.
- [14] Benninga H., "A History of Lactic Acid Making", Springer, New York, 1990.
- [15] Carothers W. H., Dorough G. L. and van Natta F. J., "J. Am. Chem. Soc.", 1932, 54, 761.
- [16] Ikada Y., Jamshidi K., Tsuji H., Hyu Hyon S., "Stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactides)" ; *Macromolecules*, 1987, 20 (4), 904–906
- [17] Fabbri M., Soccio M., Costa M., Lotti N., Gazzano M., Siracusa V., Gamberini R., Rimini B., Munari A., Garcia-Fernandez L., Vazquez-Lasa B., "New fully bio-based PLLA triblock copoly(ester urethane)s as potential candidates for soft tissue engineering". *Polymer Degradation and Stability*, 2016, 132, 169-180.
- [18] Södergård A.; Stolt M., "Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition". *Progress in Polymer Science* 2002, 27 (6): 1123–1163.
- [19] Yu Kyung J.; and Tae Yong K., "Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for the production of Polylactic Acid and Its Copolymers". *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 105 - 161.
- [20] Xiao L., Wang B., Yang G. and Gauthier M., "Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications", 2012. 249-250
- [21] Tokiwa Y., Buenaventurada P. Calabia, Charles U. Ugwu, Seiichi A., "Biodegradability of Plastics". *International Journal of Molecular Science*. 2009, 9, 3722–3742.
- [22] Li S. and Vert M., "Synthesis, characterization, and stereocomplex-induced gelation of block copolymers prepared by ring-opening polymerization of L (D)-lactide in the presence of poly(ethylene glycol)". *Macromolecules*, 2003, Vol.36, No.21, 8008-8014
- [23] Fu B. et al., "Preparation of lactic acid based polyurethanes modified by castor oil", *Advanced Materials Research*, Vols. 47-50, 2008, 1458-1461

- [24] Fabbri M., Soccio M., Costa M., Lotti N., Gazzano M., Siracusa V., Gamberini R., Rimini B., Munari A., García-Fernandez L., Vazquez-Lasa B., San Roman J., “New fully bio-based PLLA triblock copoly(ester urethane)s as potential candidates for soft tissue engineering”, *Polymer Degradation and Stability*, 2016, 1-10
- [25] Ramakrishna S., Mayer J., Wintermantel E., Kam W Leong, “Biomedical applications of polymer-composite materials: a review”, *Composites Science and Technology* 2001,61,1189-1224
- [26] Tormala P., Vasenius J., Vainionpaa S., Laiho J., Pohjonen T., Rokkanen P., “Ultra-high-strength absorbable self-reinforced polyglycolideSR-PGA, composite rods for internal fixation of bone fractures: In vitro and in vivo study”, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1991, 25, 1-22.
- [27] Bose S., Vahabzadeh S., and Bandyopadhyay A., “Bone tissue engineering using 3D printing”, *Materials Today*, Vol. 16, N. 12, 2013. 496 – 504
- [28] Kuen Yong L. and Mooney J. D., “Hydrogels for Tissue Engineering, chemical reviews”, vol 101, n.7, 2001, 1869-1881
- [29] Saito N., Okada T., Horiuchi H., Murakami N., Takahashi J., Nawata M., Ota H., Miyamoto S., Nozaki K., Takaoka K., J., “Bone Joint Surg Am. Biodegradable poly-D,L-lactic acid-polyethylene glycol block copolymers as a BMP delivery system for inducing bone”, 2001, 83-A, 92-8.
- [30] Tamai N., Myoui A., Hirao M., Kaito T., Ochi M.D T., Tanaka J., Takaoka K. and Yoshikawa H., “A new biotechnology for articular cartilage repair: subchondral implantation of a composite of interconnected porous hydroxyapatite, synthetic polymer (PLA-PEG), and bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2)”, *OsteoArthritis and Cartilage* (2005) 13, 405 – 417
- [31] Hao-Yang Mi, Max R. Salick, Xin Jing, R. Jacques B., Crone W., Xiang-Fang Peng, Lih-Sheng Turng, “Characterization of thermoplastic polyurethane/poly(lactic acid (TPU/PLA) tissue engineering scaffolds fabricated by microcellular injection molding”, *Materials Science and Engineering*, Volume 33 n.8, 2013, 4767–4776
- [32] Lourenço A.V. “Recherches sur les composés polyatomiques”, 1863, *Ann. Chim. Phys.* 67 (3).
- [33] Carothers W.H., "Studies on polymerization and ring formation II. Poly-esters", 1929, *Journ. Am. Chem. Soc.* 51: 10
- [34] Xu J., Guo B.H., “Poly(butylene succinate) and its copolymers: research, development and industrialization”, *Biotechnology Journal*, 2010, 5(11):1149-1163
- [35] Azim A., Dekhterman H., Jiang Z., Gross R.A., “Candida antarctica lipase B-catalyzed synthesis of poly(butylene succinate): shorter chain building blocks also work”, *Biomacromolecules*, 2006, 7:3093
- [36] Gualandi C., Soccio M., Saino E., Focarete M. L., Lotti N., Munari A., Moroni L. and Visai L., “Easily synthesized novel biodegradable copolyesters with adjustable properties for biomedical applications”, *Soft Matter*, 2012,8, 56-5476
- [37] Zhihua Gan, Hideki Abe, Haruhiko Kurokawa, and Yoshiharu Doi, “Solid-State Microstructures, Thermal Properties, and Crystallization of Biodegradable Poly(butylene succinate)(PBS) and Its Copolyesters”, *Biomacromolecules* 2001, 2, 605-613
- [38] Gigli M., Fabbri M., Lotti N., Gamberini R., Rimini B., Munari A., “Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: a review”, *European Polymer Journal*, 2016, 75, 431-460.
- [39] Gigli M., Negroni A., Soccio M., Zanaroli G., Lotti N., Fava F., Munari A., "Enzymatic hydrolysis studies on novel eco-friendly aliphatic thiocopolyesters", *Polymer Degradation and Stability*, 2013, 98, 934-942.
- [40] Gigli M., Negroni A., Soccio M., Zanaroli G., Lotti N., Fava F., Munari A., “Influence of chemical and architectural modifications on the enzymatic hydrolysis of poly(butylene succinate)”, *Green Chem.*, 2012, 14: 2885.
- [41] Suyama, T., Tokiwa, Y., Oichanpagdee, P., Kanagawa, T., Kamagata, Y. “Phylogenetic affiliation of soil bacteria that degrade aliphatic polyesters available

- commercially as biodegradable plastics". *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64, 5008-5011.
- [42] Manavitehrani I., Fathi A., Badr H., Daly S., Negahi Shirazi A. and Dehghani F., "Biomedical Applications of Biodegradable Polyesters", *Polymers* 2016, 8, 20
- [43] Miyata T., Masuko T., "Crystallization behavior of poly(tetramethylene succinate)", *Polymer*, 1998,39:1399.
- [44] Papageorgiou G.Z., Bikiaris D.N., "Crystallization and melting behavior of three biodegradable poly(alkylene succinates). A comparative study", *Polymer*, 2005, 46:12081.
- [45] Fabbri M., Gamberini R., Gigli M., Lotti N., Rimini B., "Biodegradable PBS-based aliphatic polyesters for biomedical applications: a comparative analysis in a life cycle thinking perspective", XVIII Summer School "Francesco Turco" - Industrial Mechanical Plants
- [46] Tallawi M., Rai R., Gleixner M.R., Roerick O., Weyand M., Roether J.A., Schubert D.W., Kozłowska A., El Fray M., Merle B., Goken M., Aifantis K., Boccacini A.R., "Poly(glycerol sebacate)/poly(butylene succinate-dilinoate) blends ad candidate materials for cardiac tissue engineering", *Macromol. Symp.*, 2013, 334:57.
- [47] Liu J., Jiang Z., Zhang S., Saltzman W.M., "Poly(ω -pentadecalactone-co-butylene-co-succinate) nanoparticles as biodegradable carriers for camptothecin delivery", *Biomaterials*, 2009, 30:5707
- [48] Gowsika J., Nanthini R., "Synthesis, characterization and cytotoxicity of certain itaconic acid based biodegradable aliphatic copolyesters", *J. Chem. Pharm. Res.*, 2014, 6:1452.
- [49] Wang L.C., Chen J.W., Liu H.L., Chen Z.Q., Zhang Y., Wang C.Y., Feng Z.G., "Synthesis and evaluation of biodegradable segment multiblock poly(ether ester) copolymers for biomaterial applications", *Polym. Int.*, 2004, 53:2145.
- [50] Gigli M., Lotti N., Gazzano M., Finelli L., Munari A., "Novel eco-friendly random copolyesters of poly(butylene succinate) containing ether-linkages", *Reactive & Functional Polymers*, 2012, 72, 303-310.
- [51] Soccio M., Lotti N., Gazzano M., Govoni M., Giordano E., Munari A., "Molecular architecture and solid-state properties of novel biocompatible PBS-based copolyesters containing sulphur atoms", *React. Funct. Polym.*, 2012, 72:856.
- [52] Soccio M., Lotti N., Gigli M., Finelli L., Gazzano M., Munari A., "Reactive blending of poly(butylene succinate) and poly(triethylene succinate): characterization of the copolymers obtained", *Polym Int*; 61: 1163-1169.
- [53] Fabbri M., Soccio M., Gigli M., Guidotti G., Gamberini R., Gazzano M., Siracusa V., Rimini B., Lotti N., Munari A., "Design of fully aliphatic multiblock poly(ester urethane)s displaying thermoplastic elastomeric properties", *Polymer*, 2016, 83, 154-161.
- [54] Matteo Gigli, Nadia Lotti, Massimo Gazzano, Lara Finelli and Andrea Munari, "Synthesis and characterization of novel poly(butylene succinate)-based copolyesters designed as potential candidates for soft tissue engineering", *Polymer Engineering & Science*, 2013, Volume 53, Issue 3, pages 491–501
- [55] Gualandi C., Soccio M., Govoni M., Valente S., Lotti N., Munari A., Giordano E., Pasquinelli G., Focarete M.L., "Poly(butylene/diethylene glycol succinate) multiblock copolyester ad a candidate biomaterial for soft tissue engineering: solid-state properties, degradability, and biocompatibility", *J. Bioact. Compat. Pol.*, 2012, 27:244.
- [56] Bautista M., Martínez de Ilarduya A., Alla A., Muñoz-Guerra S., "Poly(butylene succinate) Ionomers with Enhanced Hydrodegradability", *Polymers*, 2015, 7:1232.

Ringraziamenti

È doveroso da parte mia, in conclusione, ringraziare chi ha reso possibile la realizzazione di questo elaborato:

In primis, la mia relatrice Prof.ssa Nadia Lotti che con grande disponibilità e gentilezza mi ha proposto questa attività e che mi ha accolta nei laboratori del DICAM a Bologna, dove ho potuto acquisire tante nuove conoscenze per il mio futuro, consolidare quelle già apprese in questi tre anni e toccare con mano ciò che prima era solo teoria su libri e su appunti;

La mia correlatrice, Michelina Soccio che mi ha illustrato con dedizione e sempre col sorriso le conoscenze e i concetti necessari per portare avanti il lavoro, la sintesi, l'analisi ed è sempre stata disponibile per rispondere ad ogni mio dubbio e richiesta;

Giulia Guidotti per il suo prezioso aiuto avuto in molteplici occasioni, per la dolcezza e per il supporto morale nei giorni precedenti alla discussione;

Nicola Arlandini che ha condiviso con me parte di questo percorso in laboratorio e che con le sue conoscenze di chimica mi ha fornito nozioni e sostegno;

Laura Genovese per essersi resa disponibile ad aiutarmi nell'utilizzo della macchina per le prove meccaniche e per l'utilizzo di Origin per le figure;

Il dott. Massimo Gazzano che mi ha aiutata nelle prove WAXS e mi ha illustrato il funzionamento della macchina.

Un ringraziamento speciale va ovviamente a i miei genitori Nelli e Giovanni e a mio fratello Francesco, per avermi sostenuta sempre e in ogni modo in questi anni di studio impegnativi ma stimolanti, consigliandomi e aiutandomi ogni qualvolta ne avessi la necessità.

Grazie di cuore a Lorenzo che da alcuni anni mi sopporta e supporta in ogni momento, da quelli più bui a quelli più lieti, fornendomi sempre la giusta dose di coraggio e allegria.