

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA CAMPUS DI CESENA  
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E  
DELL'INFORMAZIONE "GUGLIELMO MARCONI"**

**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**TITOLO DELL'ELABORATO**

**NUOVI COPOLI(ESTERI URETANI) TRIBLOCCO A  
BASE DI PLLA 100% BIO-BASED PER IMPIEGHI IN  
INGEGNERIA TISSUTALE**

*Elaborato in Fondamenti di Chimica*

**Relatore**

**Prof.ssa Nadia Lotti**

**Correlatori**

**Dott.ssa Michelina Soccio**

**Ing. Giulia Guidotti**

**Presentata da**

**Chiara Casadei**

**Anno Accademico 2017/2018**

## INDICE

1	INTRODUZIONE .....	pag. 1
1.1	Biomateriali.....	pag. 1
1.1.1	Definizione.....	pag. 1
1.1.2	Caratteristiche.....	pag. 2
1.1.3	Classificazione.....	pag. 2
1.2	Biomateriali polimerici.....	pag. 6
1.2.2	struttura dei polimeri.....	pag. 7
1.2.3	proprietà dei poliesteri.....	pag. 9
1.2.4	strategie di sintesi.....	pag. 14
1.3	Copolimeri.....	pag. 19
1.3.2	copolimeri statistici.....	pag. 19
1.3.3	copolimeri a blocchi.....	pag. 21
1.4	Poliesteri alifatici.....	pag. 22
1.4.1	poli(butilene succinato) PBS.....	pag. 23
1.4.2	acido poli(lattico) PLA.....	pag. 25
1.5	Ingegneria tissutale.....	pag. 28
2	SCOPO DELLA TESI .....	pag. 31
3	MATERIALI E METODI .....	pag. 33
3.1	Sintesi.....	pag. 33
3.1.1	Strumentazione per la sintesi.....	pag. 33
3.1.2	Sintesi del copolimero idrossil terminato.....	pag. 34
3.1.3	Sintesi del copolimero triblocco mediante chain extension.....	pag. 35
3.1.4	Purificazione dei polimeri.....	pag. 35
3.2	Caratterizzazione molecolare.....	pag. 36
3.2.1	Risonanza magnetica nucleare NMR.....	pag. 36
3.2.2	Cromatografia a permeazione su gel GPC.....	pag. 41
3.3	Preparazione dei Film.....	pag. 44
3.4	Caratterizzazione termica.....	pag. 46
3.4.1	TGA.....	pag. 46
3.4.2	Analisi calorimetrica DSC.....	pag. 47
3.5	Analisi diffrattometrica a Raggi X WAXS.....	pag. 51
3.6	Caratterizzazione meccanica.....	pag. 53
3.7	Studi di degradazione idrolitica .....	pag. 56
4	RISULTATI E DISCUSSIONI .....	pag. 57

4.1 Sintesi e caratterizzazione molecolare.....	pag. 57
4.2 Caratterizzazione termica e diffrattometrica.....	pag. 60
4.3 Caratterizzazione meccanica.....	pag. 66
4.4 Studi di degradazione idrolitica.....	pag. 68
5 CONCLUSIONI .....	pag. 70
6 BIBLIOGRAFIA .....	pag. 72
7 RINGRAZIAMENTI .....	pag. 75

# **CAPITOLO 1:**

## **INTRODUZIONE**

### **1.1 BIOMATERIALI**

#### **1.1.1 DEFINIZIONE**

Con il termine biomateriale viene definito: “ogni sostanza o combinazione di sostanze, diverse da un farmaco, di origine naturale o sintetica che può essere impiegato per qualsiasi periodo di tempo da solo o come parte di un sistema che tratta o sostituisce una qualsiasi tessuto, funzione o organo del corpo”. Questa definizione del 1982 comprendeva anche tessuti e organi trapiantati, materiali di apparecchiature a contatto con il corpo, dispositivi extracorporei non medici. Così nel 1986 si è arrivati ad un'altra definizione, che viene ancora oggi usata: “sostanza non vivente utilizzata nella fabbricazione di un dispositivo medico che ha in qualche punto un'interfaccia con il tessuto vivente” [1].

#### **1.1.2 CARATTERISTICHE DEI BIOMATERIALI**

Un biomateriale, per essere definito tale, deve soddisfare i seguenti requisiti [1]:

- **Biocompatibilità:** definita come “la capacità di un materiale di determinare una reazione favorevole del sistema vivente a cui è associato, alla sua presenza, in una specifica applicazione”. Oltre alla compatibilità biologica, occorre anche tenere conto di quella morfologica e di quella funzionale [2]. Con la prima si intende la capacità del materiale di interfacciarsi con il tessuto limitrofo sia dal punto di vista della geometria, sia da quello della massa e della forma. Il biomateriale, nella sua forma finale, deve inoltre essere compatibile funzionalmente: è necessario dunque che il ruolo svolto dall'impianto nel suo complesso presenti caratteristiche tali da rispondere alla funzione per cui è stato progettato;
- **Atossicità:** i materiali non devono rilasciare, durante il loro ciclo di vita, sostanze nocive per l'organismo;
- **Proprietà meccaniche,** quali durezza, modulo elastico, resistenza alla trazione, tenacità, compatibili con quelle del sito di impianto [3];

- Elevata resistenza alla corrosione: tale aspetto è importante soprattutto nella selezione dei biomateriali metallici, che possono andare incontro a corrosione se a contatto con i fluidi corporei, rilasciando ioni tossici per l'organismo. Tali ioni, infatti, se non vengono eliminati attraverso i normali processi metabolici, possono accumularsi nei tessuti in prossimità dell'impianto, oppure possono essere trasportati in altri punti del corpo mediante la circolazione sanguigna, provocando patologie acute o croniche. Inoltre, a causa della corrosione, si potrebbe ridurre la durata del dispositivo impiantato, situazione che richiederebbe un ulteriore intervento chirurgico;
- Elevata resistenza all'usura: anche questo aspetto è di fondamentale importanza, in quanto la bassa resistenza all'usura, accompagnata da un elevato coefficiente di attrito, si traduce in un allentamento dell'impianto. La corrosione dovuta all'attrito causa, oltre al rilascio di ioni metallici nocivi alla salute, una grave risposta infiammatoria, che potrebbe compromettere l'impianto stesso [3];
- Elevata resistenza a fatica: essa è correlata alla risposta del materiale ai carichi ciclici ripetuti, come avviene, ad esempio, nel caso della protesi d'anca. Le caratteristiche di resistenza a fatica sono fortemente influenzate dalle microstrutture presenti all'interno del materiale, che possono essere minimizzate con particolari trattamenti termici e superficiali [3];
- Progettazione e fabbricazione adeguate: i biomateriali devono essere facilmente lavorabili e modellabili, nelle forme e dimensioni richieste, ed un'adeguata progettazione è necessaria per garantire la qualità dei dispositivi [3].

### 1.1.3 CLASSIFICAZIONE

Le classi più comuni di materiali utilizzati in ambito biomedicale sono metalli, ceramiche, polimeri, materiali biologici e compositi (Figura 1.1). Queste quattro classi, suddivise in base a criteri chimici, sono utilizzate singolarmente e/o in combinazione per realizzare la maggior parte dei dispositivi impiantabili disponibili ad oggi sul mercato [3].

<i>Materiali</i>	<i>Vantaggi</i>	<i>Svantaggi</i>	<i>Applicazioni</i>
Metallici (acciai, titanio e leghe, leghe di cobalto)	Elevate caratteristiche meccaniche, resistenza alla usura	Scarsa biocompatibilità, alta densità di massa, facilità di corrosione in ambiente fisiologico	Mezzi di osteosintesi, protesi per ortopedia e odontoiatria
Polimerici (siliconi, poliuretani, polietilene, acrilati, fluorurati, poliesteri)	Tenacia, bassa densità, facilità di lavorazione	Bassa resistenza meccanica, degradabilità nel tempo	Suture, cateteri, drenaggi, protesi cardiovascolari, cementi per ossa, dispositivi per il trattamento del sangue
Ceramici (ossidi di alluminio, alluminati di calcio, ossidi di titanio, carboni)	Buona biocompatibilità, inerzia chimica, elevata resistenza alla compressione, resistenza alla corrosione	Bassa affidabilità meccanica, bassa resistenza alla trazione impulsiva, alta densità di massa, fragilità, difficoltà di lavorazione	Protesi d'anca, protesi dentali, dispositivi percutanei
Compositi (metalli rivestiti con ceramici, matrici rinforzate con fibre)	Buona biocompatibilità, inerzia chimica, buone caratteristiche meccaniche, resistenza alla corrosione	Scarsa coesione tra i componenti, difficoltà di lavorazione	Protesi valvolari cardiache, protesi di ginocchio
Biologici (vene, pericardio, valvole cardiache)	Ottima biocompatibilità	Scarsa affidabilità meccanica, difficoltà di trattamento e conservazione	Protesi vascolari, protesi valvolari, rivestimenti

*Figura 1.1 Classificazione di biomateriali.*

- **Materiali metallici:** essi sono usati quasi esclusivamente per protesi portanti, come quelle d'anca e ginocchio (Figura 1.2), e per realizzare dispositivi di fissazione di fratture come perni, viti e piastre. Presentano eccellenti conduttività elettrica e termica, elevate proprietà meccaniche, resistenza all'usura e costi ragionevoli; di contro, si corrodono facilmente in ambiente biologico e presentano una densità molto maggiore di quella di gran parte dei tessuti umani. Anche se a volte vengono utilizzati metalli puri, spesso vengono preferite le leghe, in quanto più resistenti alla corrosione. I principali metalli utilizzati in ambito biomedico sono: acciaio inossidabile, leghe di cobalto-cromo (CoCrMo, CoNiCrMo) e leghe di titanio (alfa, alfa-beta e beta) [3].



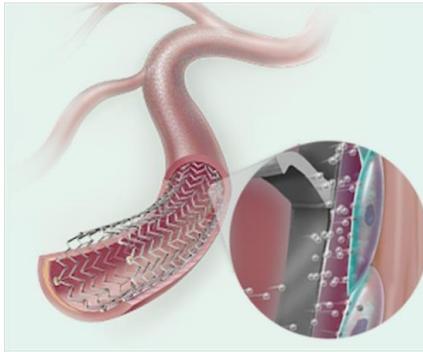
*Figura 1.2 Protesi d'anca in materiale metallico.*

- **Materiali ceramici:** trovano impiego in ambito ortopedico, otorinolaringoiatrico, odontoiatrico e cardiocircolatorio (Figura 1.3). Sono caratterizzati da elevate durezza, rigidità e fragilità, ma anche ottima resistenza alla corrosione e all'usura. Riescono inoltre a resistere a grandi forze di compressione, e sono buoni isolanti elettrici e termici. Le ceramiche ad uso biomedicale possono essere suddivise in tre classi: bioinerti, se non suscitano alcun tipo di risposta da parte dell'organismo, bioattive, se possono interagire, ad esempio mediante la formazione di legami chimici, con i tessuti corporei, e biorisorbibili, se capaci di biodegradarsi all'interno del corpo, lasciando spazio al tessuto in fase di rigenerazione. Alla prima appartengono ad esempio l'allumina (impiegata in protesi d'anca e impianti dentali), la zirconia (utilizzata per le teste sferiche di protesi articolari) ed il carbonio pirolitico (impiegato negli impianti ortopedici).



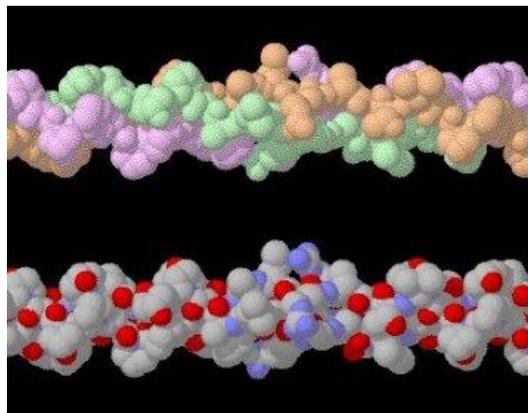
*Figura 1.3* Protesi dentale in materiale ceramico.

- **Materiali polimerici:** sono materiali incredibilmente versatili, in quanto disponibili in un'ampia gamma di composizioni, ciascuna con determinate proprietà fisiche e meccaniche. Esempi di applicazioni includono innesti vascolari, valvole cardiache, cuori artificiali, protesi mammarie, lenti a contatto, lenti intraoculari, componenti di ossigenatori extracorporei, rivestimenti per compresse e capsule farmaceutiche, suture, cemento osseo, cateteri, dispositivi di assistenza cardiaca, pompe impiantabili, protesi articolari, pacemaker, e tanto altro (Figura 1.4). I materiali polimerici verranno ampiamente trattati successivamente.



*Figura 1.4 Esempio di stent in materiale polimerico per il rilascio di farmaci.*

- **Materiali biologici:** sono tessuti di origine umana o animale, sia duri che molli (Figura 1.5). I primi vengono principalmente impiegati nel settore cardiovascolare, per la realizzazione di protesi valvolari e di tratti di vasi sanguigni. Naturalmente, prima dell'utilizzo, tali materiali devono essere sottoposti ad una complessa serie di trattamenti di devitalizzazione cellulare, al fine di non innescare alcuna risposta immunitaria nell'organismo ospite. I tessuti duri, invece, sono utilizzati prevalentemente in ortopedia, per il riempimento di lacune derivanti da difetti ossei o conseguenti all'asportazione di tumori. Va comunque ricordato che l'utilizzo di materiali di origine biologica rimane confinato in un ambito relativamente ristretto di applicazioni, sia per i limiti intrinseci dei materiali stessi, sia per le difficoltà di approvvigionamento.



*Figura 1.5 Esempio di fibra di collagene in una ricostruzione virtuale.*

- **Materiali compositi:** sono formati da due o più costituenti chimicamente distinti e separati da un'interfaccia, che a seconda della funzione prendono il nome di matrice e rinforzo. Godono di buona compatibilità, inerzia chimica, buone caratteristiche meccaniche e resistenza alla corrosione tuttavia spesso sono soggetti a scarsa coesione tra i componenti e difficile lavorabilità. La matrice contiene il rinforzo, il quale si trova

in fase dispersa ed ha il compito di assorbire la maggior parte del carico esterno, essendo anche il materiale caratterizzato da maggior rigidità e resistenza meccanica. Esempi di materiali compositi per applicazioni biomedicali sono il polietilene rinforzato con fibre di carbonio e i polimeri di acido lattico rinforzati con particelle di idrossiapatite, entrambi utilizzati per curare fratture ossee.

## 1.2 BIOMATERIALI POLIMERICI

Con il termine polimeri si designano composti organici le cui molecole sono ottenute dall'unione di due o più molecole dette monomeri; la reazione chimica che permette di realizzare un polimero a partire dai suoi monomeri costituenti è detta polimerizzazione. I polimeri possono essere classificati in base al numero di monomeri da cui sono composte: si parla così di omopolimeri, ovvero composti dall'unione di molecole di monomero dello stesso tipo, copolimeri se l'unione avviene tra due o più monomeri diversi.

Inoltre, i polimeri possono essere suddivisi in naturali e artificiali. Ai primi appartengono tutte quelle macromolecole presenti in natura quali:

- Proteine (collagene, elastina, cheratina, ecc...);
- Polisaccaridi (chitosano, chitina, alginati, ecc...);
- Poliisopreni;
- Acidi nucleici (DNA e RNA).

I polimeri artificiali, al contrario, sono prodotti mediante sintesi. Tra le principali classi si ricordano:

- Poliolefine (polietilene PE, polipropilene PP, polimetilpentene PMP, ecc...);
- Poliesteri (polietilene tereftalato o PET, polibutilene succinato o PBS, acido polilattico PLA, ecc...);
- Poliammidi (Nylon 6, Nylon 66, Kevlar, ecc...);
- Poliuretani (in forma di schiume leggere o dense, pannelli, lastre o fibre).

I principali vantaggi che i polimeri presentano rispetto alle altre classi di materiali sono una grande varietà di composizione, che permette di modulare le proprietà fisico-meccaniche in maniera ottimale per le specifiche applicazioni, 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.

Nonostante presentino alcuni limiti dati dalla presenza di sostanze che possono essere rilasciate nell'organismo (monomeri, catalizzatori, additivi, ecc...), dalla facilità di assorbimento di acqua e biomolecole dall'ambiente circostante (anche nelle applicazioni in cui non è richiesto) e, in alcuni casi, dalla difficoltà di sterilizzazione, essi presentano vantaggi rilevanti: oltre, come già detto, alla possibilità di modulare *ad hoc* le loro proprietà in funzione della destinazione d'uso, per mezzo di opportune procedure è possibile ottenere polimeri dalla struttura molto simile ai polimeri naturali presenti nei tessuti, garantendo un'ottima biocompatibilità.

### 1.2.1 STRUTTURA DEI POLIMERI

Le proprietà di un polimero sono legate non soltanto alla sua composizione chimica, ma anche dalla lunghezza e dall'architettura macromolecolare. In termini di architettura, le molecole polimeriche possono essere classificate in quattro diverse categorie:

- Struttura lineare (Figura 1.6): le diverse catene sono unite tra loro agli estremi, creando delle lunghe macromolecole filiformi. Tra le catene si formano legami di tipo Van der Waals, legami a idrogeno ed interazioni dipolo-dipolo.



Figura 1.6. Struttura lineare dei polimeri.

- Struttura ramificata (Figura 1.7): in questo caso dalla catena principale, di tipo lineare, partono delle ramificazioni laterali, legate per mezzo di legami deboli alla struttura filiforme. Le ramificazioni limitano l'impaccamento delle catene, riducendo di conseguenza la densità del polimero.



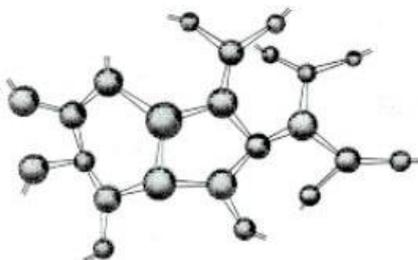
Figura 1.7 Struttura ramificata dei polimeri.

- Struttura a legami trasversali o intermolecolari (Figura 1.8): è caratterizzata dall'unione delle catene lineari adiacenti, tramite ramificazioni che formano legami covalenti, creando in questo modo una struttura tridimensionale. Lo sviluppo dei legami incrociati si può avere sia durante la sintesi, sia in un secondo momento con reazioni chimiche non reversibili.



*Figura 1.8. Struttura a legami trasversali dei polimeri.*

- Struttura reticolata (Figura 1.9): i monomeri multifunzionali formano tre o più legami covalenti attivi, creando reti tridimensionali. Il polimero assume la forma di un'unica macromolecola reticolata.



*Figura 1.9 Struttura reticolata dei polimeri.*

I polimeri a catena lineare o ramificata sono caratterizzati in genere da proprietà meccaniche peggiori rispetto a quelle dei polimeri reticolati. I primi, infatti, avendo catene legate fra loro da legami deboli, se sottoposti a sollecitazioni sono soggetti allo scorrimento delle catene l'una rispetto all'altra. Tale scorrimento, di tipo viscoso, è responsabile del comportamento viscoelastico. Nei polimeri a catena ramificata, la particolare conformazione delle catene fa sì che esse scorrano con maggiore difficoltà a causa degli impedimenti fisici che si generano. I polimeri reticolati, infine, possiedono proprietà di rigidità e resistenza meccanica superiori: i legami covalenti tra le catene, infatti, impediscono totalmente lo scorrimento viscoso.

### 1.2.2. PROPRIETA' DEI POLIMERI

Dal punto di vista dell'organizzazione delle catene all'interno del materiale, i polimeri presentano una struttura a due fasi, una amorfa ed una cristallina. Nelle zone cristalline le catene di polimero sono ripiegate ordinatamente secondo una disposizione che si ripete nello spazio, mentre nella porzione amorfa, sempre presente, le catene presentano una disposizione disordinata, tipica dello stato fuso. Si definisce quindi come grado di cristallinità il rapporto percentuale del peso di sostanza in forma cristallina rispetto al peso totale. Nei materiali polimerici questo valore è compreso tra il 5% ed il 95%, e risulta maggiore per polimeri a catena lineare. Per questo motivo le macromolecole reticolate o che presentano gruppi funzionali stericamente ingombranti che ostacolano l'allineamento delle catene polimeriche presentano un minor grado di cristallinità.

Dal punto di vista delle proprietà i materiali cristallini sono caratterizzati da un'elevata rigidità e durezza grazie al maggior impaccamento delle catene, da più elevate resistenza meccanica e all'usura e risultano soggetti in misura minore a fenomeni viscoelastici quali rilassamento e *creep*.

Il peso molecolare è un altro parametro di notevole importanza nella caratterizzazione di un materiale polimerico, in quanto da questo dipendono le proprietà fisiche e meccaniche: ad esempio, le proprietà meccaniche aumentano linearmente all'aumentare del peso molecolare e raggiungono un valore di plateau in corrispondenza di alti pesi molecolari (Figura 1.10).

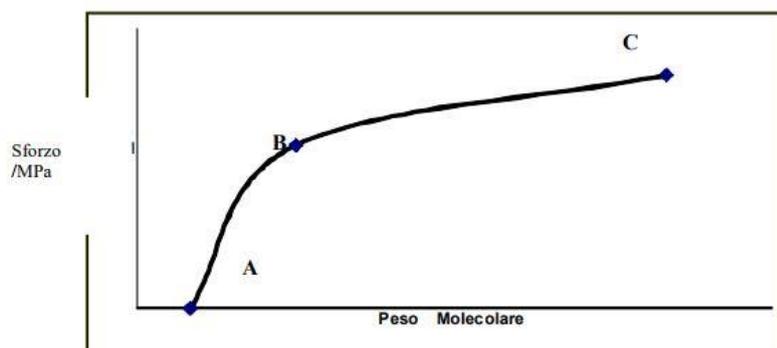


Figura 1.10. Andamento che descrive le proprietà meccaniche in funzione del peso molecolare.

Le macromolecole che costituiscono i polimeri sono caratterizzate da lunghezza, e quindi da pesi molecolari diversi tra loro, in quanto durante processo di polimerizzazione è inevitabile che si formino molecole di diversa lunghezza, a causa di eventi che intercorrono nel corso della reazione.

A causa di questa diversità al polimero viene assegnato un peso molecolare medio e non assoluto; per stimare tale peso molecolare si deve calcolare dapprima il grado di polimerizzazione medio, dato dal rapporto tra il numero di unità monomeriche di un certo tipo ed il numero totale di macromolecole polimeriche presenti nel sistema. Da questo è poi ottenibile il peso molecolare di una singola macromolecola, moltiplicando la massa dell'unità ripetitiva per il grado di polimerizzazione.

Per calcolare il peso molecolare medio delle macromolecole si può far riferimento a due diversi valori:

- Peso molecolare medio numerale ( $M_n$ ): è definito come il rapporto tra il peso di una certa quantità di polimero ed il numero di macromolecole in esso presenti, ed esprime la media numerica dei pesi molecolari

$$M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$$

dove  $N_i$  indica il numero di molecole di peso molecolare  $M_i$ .

- Peso molecolare medio ponderale ( $M_w$ ): esprime la media pesata sulla massa delle macromolecole presenti.

$$M_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}$$

- Peso molecolare medio viscosimetrico ( $M_v$ ): esprime la relazione tra il peso molecolare e la viscosità; infatti le molecole polimeriche più grandi rendono la soluzione più viscosa di quanto lo facciano le molecole piccole.

Nel caso reale di polimeri polidispersi risulta che:

$$M_w > M_v > M_n$$

$M_w$  infatti viene influenzato soprattutto dalle molecole di grandi dimensioni, mentre  $M_n$  da quelle più piccole. Le differenze tra i valori delle medie statistiche dipendono dall'ampiezza e dalla forma della distribuzione dei pesi molecolari, come mostrato in Figura 1.11.

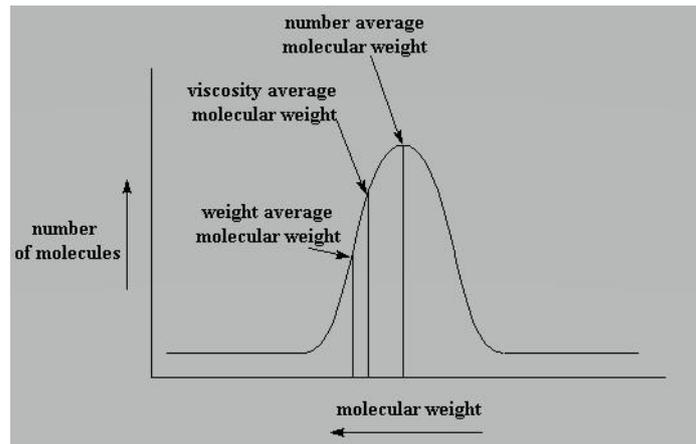


Figura 1.11 Distribuzione del peso molecolare.

Si definisce infine l'indice di polidispersità  $D$ , rappresentativo della larghezza della distribuzione dei pesi molecolari, il rapporto:

$$D = M_w / M_n$$

Se  $D=1$  si parla di polimero monodisperso, ovvero costituito interamente da molecole con lo stesso peso molecolare. Nella pratica, per i polimeri sintetici il limite inferiore della polidispersità difficilmente arriva ad 1, ma solitamente è compreso tra 1.5 e 2.5. In campo biomedicale si richiedono polimeri ad alto peso molecolare e con un indice  $D$  relativamente basso, fattori che assicurano buone proprietà meccaniche e una bassa distribuzione dei pesi molecolari.

I polimeri possono anche essere classificati, in base al loro comportamento termo-meccanico, in termoplastici e termoindurenti. In particolare, si definiscono:

- Termoplastici: polimeri a catena lineare o ramificata che se riscaldati rammolliscono, permettendo il modellamento plastico, per poi riacquistare consistenza solida a bassa temperatura, secondo un ciclo che può essere teoricamente ripetuto infinite volte, a condizione che si rimanga in un intervallo di temperature ben definito. Ciò risulta possibile poiché all'interno delle loro catene sono presenti soltanto legami a bassa resistenza termica.
- Termoindurenti: polimeri a catena reticolata che all'aumentare della temperatura dapprima rammolliscono, ma poi, sempre a causa del calore, reticolano definitivamente senza poter più riacquistare fluidità.

Per determinare le proprietà meccaniche di un materiale risulta di fondamentale importanza conoscere lo stato del materiale stesso alla temperatura d'esercizio. A tale proposito, è possibile individuare alcune temperature caratteristiche:

- Temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ): in corrispondenza di tale valore si verifica il passaggio da stato vetroso, ossia fragile e scarsamente deformabile, a stato gommoso, caratterizzato da bassa rigidità ed elevata deformabilità e tenacità. Il valore di questa temperatura risulta inferiore per i materiali termoplastici rispetto a quelli termoindurenti.
- Temperatura di rammollimento ( $T_r$ ): per i polimeri amorfi, privi di struttura cristallina, segna il confine tra lo stato gommoso, comunque solido, e lo stato liquido.
- Temperatura di fusione ( $T_m$ ): identifica il punto di fusione termodinamico della fase cristallina, in corrispondenza del quale si verifica il cedimento del reticolo.
- Temperatura limite di stabilità chimica ( $T_l$ ): temperatura oltre la quale il materiale si degrada a causa della rottura dei suoi legami chimici.

Se si rappresenta la variazione del modulo elastico in funzione della temperatura si possono individuare tre curve, una riferita ai polimeri a struttura reticolata, le altre due a polimeri lineari e ramificati in condizioni rispettivamente completamente amorfe o di parziale cristallinità (Figura 1.12).

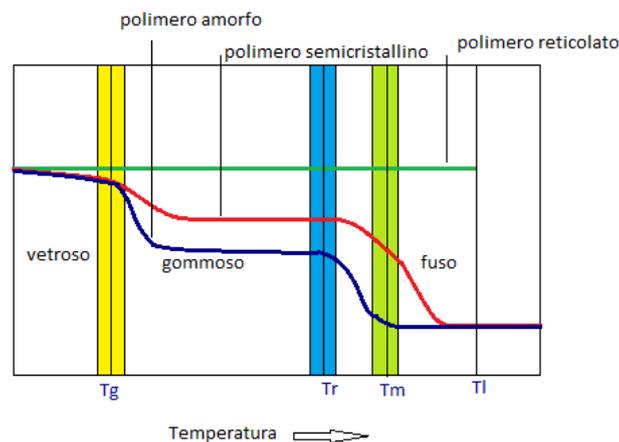


Fig.1.12 Andamento del modulo elastico in funzione della temperatura.

Come si può notare dalla Figura 1.12, i polimeri reticolati, prima di raggiungere la temperatura che comporta la degradazione della struttura, non presentano nessuna caduta del modulo elastico in corrispondenza delle temperature prima elencate. Di conseguenza, risulta impossibile stabilire esattamente i valori di  $T_g$  e  $T_m$ , dal momento che le proprietà meccaniche

rimangono costanti all'interno dell'intervallo di stabilità. La curva associata al polimero amorfo presenta una prima caduta di modulo elastico in corrispondenza della  $T_g$ , corrispondente al raggiungimento dello stato gommoso ed una seconda in corrispondenza della  $T_r$ , oltre la quale il polimero può considerarsi a tutti gli effetti fuso. Il modulo elastico di un polimero semicristallino, invece, presenta una prima diminuzione in corrispondenza della  $T_g$  ed una seconda in corrispondenza della  $T_m$ , causata dalla rottura dei legami della fase cristallina. Si può inoltre notare che la diminuzione del modulo elastico in corrispondenza della  $T_g$  è inferiore rispetto al caso del polimero amorfo.

Un'altra caratteristica fondamentale, soprattutto per i polimeri impiegati in applicazioni biomedicali, è la biodegradabilità, definita come l'alterazione chimica della struttura del materiale, dovuta alla rottura dei legami chimici sia della catena principale sia dei gruppi laterali, che incide anche sulle caratteristiche fisiche. La biodegradabilità nei materiali polimerici dipende essenzialmente dalla struttura della catena principale, ed in particolare dalla presenza di legami idrolizzabili e/o ossidabili, come ad esempio il legame estereo.

Il processo di degradazione varia in funzione delle caratteristiche fisico-chimiche del materiale ma anche del sito di impianto, della risposta immunitaria e dalle condizioni generali dell'organismo ospite, quali età, stato di salute, eventuali farmaci assunti.

Per quanto riguarda i meccanismi di degradazione, esistono sostanzialmente due modalità: erosione di *bulk* (idrolitica), se la perdita di massa riguarda l'intero volume, poiché la penetrazione dell'acqua risulta più rapida del processo erosivo, ed erosione superficiale (enzimatica), che interessa solo le porzioni più esterne, dal momento che la velocità di penetrazione dell'acqua è comparabile a quella di erosione. Quest'ultima risulta preferibile, poiché più facilmente controllabile, anche se non sempre possibile da ottenere in quanto molti polimeri non sono sufficientemente idrofobi da evitare che l'acqua penetri all'interno e degradi il materiale più velocemente di quanto vengano erosi gli strati superficiali.

Oltre ai meccanismi, è importante considerare anche la velocità a cui la biodegradazione avviene: essa dipende, oltre che dal tipo di unità ripetitiva, composizione e lunghezza della sequenza, geometria, peso molecolare, area superficiale esposta e presenza di additivi, da quattro fattori fondamentali:

- $T_m$ : maggiore la differenza tra la temperatura di esercizio e quella di fusione del materiale, minore sarà la biodegradabilità. Questo perché in vicinanza della  $T_m$  le catene polimeriche presentano elevata mobilità e di conseguenza sono più facilmente

attaccabili. Analogamente, al di sopra della temperatura di transizione vetrosa  $T_g$  le catene risultano più mobili e quindi la velocità di biodegradazione aumenta;

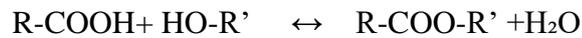
- Grado di cristallinità: una maggiore cristallinità causa una diminuzione della velocità di biodegradazione. Infatti, la porzione cristallina, dato l'elevato grado di ordine ed impacchettamento delle catene, risulta meno accessibile alle molecole di acqua, contrariamente alla fase amorfa, che dunque è la prima ad essere attaccata;
- Grado di perfezione dei cristalli: a parità di indice di cristallinità, cristalli piccoli e contenenti difetti vengono degradati più facilmente rispetto a strutture più impacchettate e perfette;
- Idrofilicità: una maggiore bagnabilità della superficie polimerica, infatti, implica una più alta velocità di degradazione.

### 1.2.3 STRATEGIE DI SINTESI

I polimeri vengono ottenuti dall'unione di più unità monomeriche dello stesso tipo (omopolimero) o di due o più tipi diversi (copolimero), tramite un processo detto polimerizzazione. Le principali tecniche di polimerizzazione impiegate per la sintesi dei polimeri sono:

**Policondensazione:** è una reazione che avviene tra monomeri contenenti due gruppi funzionali reattivi, ed è accompagnata dall'eliminazione di piccole molecole come acqua, cloruro di sodio, metanolo ed acido cloridrico (Figura 1.13). Questo fa sì che la composizione del polimero finale sia diversa da quella dei monomeri di partenza. Nel caso in cui i monomeri siano bifunzionali, ovvero presentano due soli gruppi funzionali, la policondensazione porta esclusivamente alla formazione di polimeri lineari; diversamente, si possono ottenere dei polimeri reticolati quando almeno uno dei monomeri presenta più di due gruppi funzionali, ed in questo caso la reazione prende il nome di policondensazione polifunzionale. L'ottenimento di policondensati lineari ha spesso luogo allo stato fuso, in assenza di solvente: all'inizio della reazione si opera generalmente a pressione atmosferica, per evitare perdite dei componenti a basso peso molecolare alle elevate temperature necessarie. Nello stadio successivo si aumentano le temperature e si opera in condizioni di vuoto spinto, per influenzare opportunamente l'equilibrio, spostandolo verso i prodotti [4]. Un esempio di policondensazione è

l'esterificazione, nella quale un acido carbossilico e un alcool reagiscono con perdita d'acqua, secondo la reazione:



Questo processo di sintesi, attraverso cui si producono ad esempio poliesteri, poliammidi, poliuretani e polisilossani, presenta degli aspetti negativi in quanto risulta essere abbastanza lento, ed i materiali ottenuti raggiungono pesi molecolari non particolarmente elevati (10.000-20.000g/mol); inoltre, durante la reazione è necessario eliminare continuamente le sostanze secondarie che si generano.

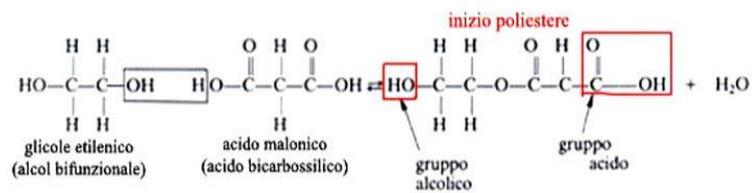


Figura 1.13. Esempio di reazione di policondensazione per la produzione di polietilentereftalato.

- **Poliaddizione:** è una reazione a catena che prevede l'unione diretta di monomeri senza il rilascio di sostanze secondarie, e avviene in genere in presenza di monomeri con bifunzionalità interdipendente (ad esempio quelli contenenti un doppio legame C=C). In questo caso la formula chimica del monomero e quella del polimero coincidono, ed i pesi medi molecolari possono raggiungere valori anche molto elevati. Affinché la reazione avvenga, è necessario dapprima attivare il monomero tramite la rottura del legame  $\pi$  che unisce gli atomi di carbonio, in maniera tale che ciascuno di questi atomi presenti un elettrone libero. Questa attivazione può essere di tipo termico, fotoelettrico o chimico; in quest'ultimo caso si parla di polimerizzazione radicalica. A questo punto il monomero attivato, definito iniziatore, entra in contatto con un altro monomero facendo avanzare la reazione. Il processo di poliaddizione può essere dunque suddiviso in quattro fasi:

1. fase iniziale o induzione: consiste nell'attivazione delle molecole tramite l'iniziatore;
2. fase di propagazione: prevede la crescita del monomero e la creazione della catena polimerica;
3. fase di chiusura: consiste nella chiusura della catena polimerica e può avvenire in diversi modi: tramite l'accoppiamento diretto di due molecole in crescita,

tramite l'attaccamento di un radicale, oppure tramite lo scambio di un atomo di idrogeno;

4. trasferimento di catena: una molecola in crescita può arrestare il suo accrescimento attivando una molecola di monomero o una catena precedentemente chiusa.

Polimeri che si ottengono per poliaddizione sono, per esempio, polietilene, polimetilmetacrilato, polistirene e politetrafluoretilene.

- Polimerizzazione per apertura di anello (*Ring Opening Polymerization* o ROP): la polimerizzazione per apertura di anello è un processo in cui, attraverso una propagazione di tipo ionico, il gruppo terminale di una catena polimerica funge da centro attivo su cui altri monomeri ciclici si congiungono formando catene polimeriche di maggiore lunghezza. La ROP può essere condotta in condizioni piuttosto blande, che limitano le reazioni secondarie e non necessita di un attento controllo della stechiometria; inoltre, i tempi di reazione sono brevi ed è possibile raggiungere pesi molecolari anche molto elevati (superiori a 100.000 g/mol). Uno tra i principali svantaggi rispetto alla policondensazione, oltre ai costi elevati, deriva dalla minore disponibilità di monomeri, che ne limita le possibili applicazioni. Il meccanismo di polimerizzazione coinvolto nella ROP può essere indotto da diverse classi d'iniziatori e di meccanismi di reazione [5]:
  - polimerizzazione cationica;
  - polimerizzazione anionica;
  - meccanismo d'inserzione-coordinazione;
  - polimerizzazione enzimatica;
  - polimerizzazione allo stato solido.

Il meccanismo cationico, mostrato in Figura 1.14, consiste nella protonazione o nell'alchilazione dell'ossigeno carbossilico ottenendo di conseguenza un'attivazione elettrofila del legame.

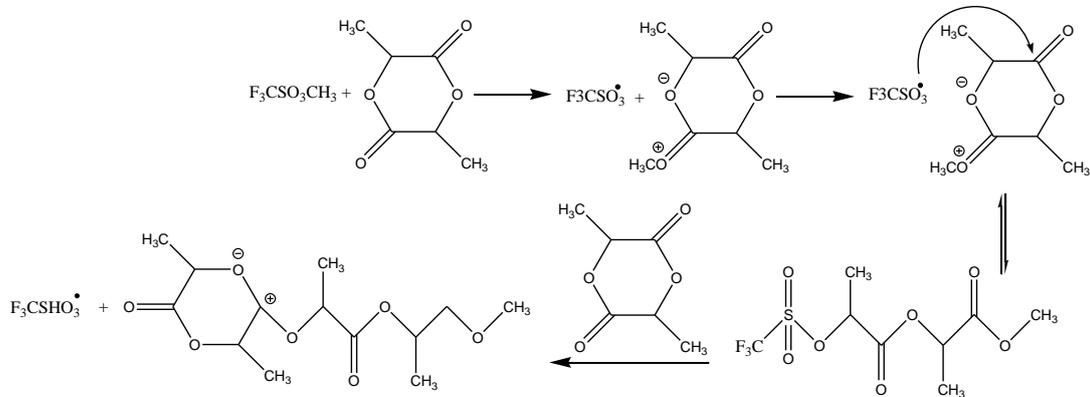


Figura 1.14. Meccanismo cationico per l'apertura dell'anello.

Questo legame viene poi rotto dall'attacco nucleofilo di un altro monomero, un processo che si ripete finché non si ha la terminazione a causa di un nucleofilo, ad esempio acqua [6]. Nel caso del PLLA, ad esempio, questo meccanismo, che solitamente non trova applicazione a livello industriale [7], può essere sfruttato solo se le temperature sono inferiori ai 50 °C: a temperature maggiori, infatti, si ha un processo di racemizzazione che influenza negativamente le proprietà meccaniche e fisiche del polimero finale.

Il meccanismo anionico, mostrato in Figura 1.15, si basa su alcossidi alcalino-metallici. Ad alte temperature possono essere utilizzati anche fenossidi e carbossilati. Sia lo stadio d'attivazione sia quello di propagazione si basano su un attacco nucleofilo di un anione nel gruppo CO del lattide, seguito dalla rottura del legame CO-O. L'attacco può anche deprotonare il carbonio in posizione iniziale causando delle reazioni di deprotonazione/reprotonazione che portano a racemizzazione. Questa è una reazione secondaria impossibile da evitare, che limita fortemente l'utilizzo di questo metodo a livello industriale.

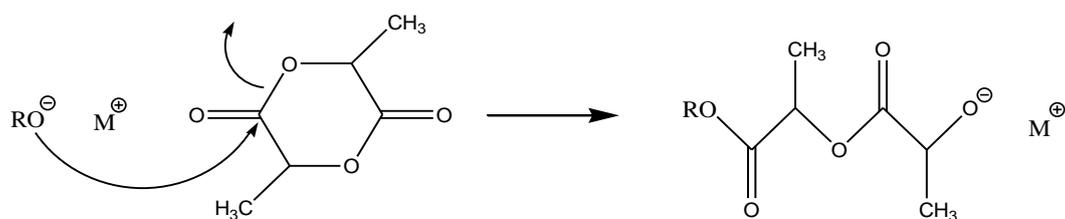


Figura 1.15. Meccanismo anionico per l'apertura dell'anello.

Il meccanismo di coordinazione-inserzione, mostrato in Figura 1.16, si basa invece su alcossidi metallici che hanno un legame covalente tra ossigeno e metallo, con un comportamento da acido debole di Lewis. Il lattide si comporta come un ligando che coordina l'atomo metallico con l'ossigeno legato al carbonile [8]. Questa coordinazione migliora l'elettrofilità del gruppo CO e la nucleofilicità del gruppo O-R, cosicché può avvenire l'inserzione del lattone nel legame ossigeno-metallo. Tipici iniziatori di questo meccanismo sono gli alcossidi di magnesio, alluminio, stagno, zirconio e zinco. In particolare, lo zinco e lo stagno (II) portano i polimeri ad un più elevato livello di purezza. Attualmente il composto più utilizzato è lo stagno (II) ottanoato ( $\text{SnOct}_2$ ) grazie alle sue proprietà di solubilità, elevata attività catalitica e capacità di favorire la formazione di polimeri ad elevato peso molecolare con basso livello di racemizzazione (<1 %). Inoltre, questo catalizzatore presenta bassi livelli di tossicità ed è stato riconosciuto dalla FDA come adatto per gli utilizzi in campo biomedico ed alimentare [9-11].

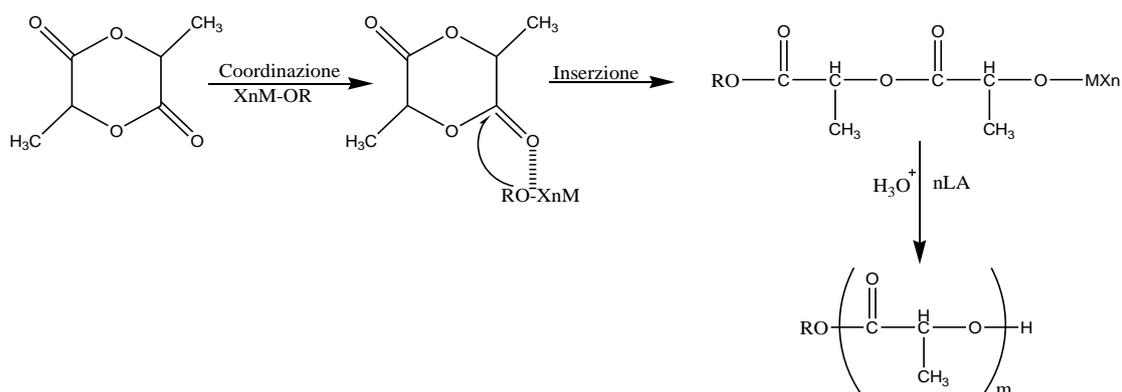


Figura 1.16. Meccanismo di coordinazione-inserzione per l'apertura dell'anello.

- Estensione di catena (*chain extension*): è una strategia sintetica utilizzata per ottenere polimeri multi blocco di peso molecolare particolarmente elevato [12]; si tratta di una reazione di polimerizzazione, che avviene a partire da omopolimeri o copolimeri ottenuti per policondensazione, che presentano un'alta percentuale di gruppi terminali ossidrilici, e che costituiscono i singoli "blocchi". Questi ultimi vengono poi fatti reagire allo stato fuso con un estensore di catena, generalmente un isocianato a doppia funzionalità, che tramite la formazione di un legame uretanico permette una veloce unione dei blocchi comonomerici, con conseguente aumento del peso molecolare. È necessario, in fase di sintesi, inserire una sufficiente quantità di estensore di catena per ottenere un aumento significativo del peso molecolare. Tuttavia, un sovradosaggio porta alla gelificazione del polimero, che rende impossibile ogni sua successiva lavorazione.

### 1.3 COPOLIMERI

I copolimeri sono formati dall'unione di due o più monomeri diversi. A seconda di come si ripetono le molecole di monomero all'interno della catena dei copolimeri, questi ultimi possono essere classificati in:

- Copolimeri statistici (o random): i monomeri costituenti si dispongono casualmente lungo la catena;
- Copolimeri alternati: le unità monometriche si dispongono in modo alternato;
- Copolimeri aggraffati (o a innesto): un tipo di unità ripetuta costituisce la catena principale mentre l'altra unità costituisce le ramificazioni;
- Copolimeri a blocchi: le unità ripetitive sono costituite da blocchi dello stesso monomero uniti ad altri blocchi dell'altro monomero.

#### 1.3.1 COPOLIMERI STATISTICI

Nei copolimeri statistici le diverse unità comonomeriche sono disposte in maniera casuale e indipendente dalla natura delle unità adiacenti.

I copolimeri statistici vengono ottenuti per lo più mediante processi di poliaddizione radicalica, ionica o di coordinazione. Una problematica centrale della teoria della copolimerizzazione

consiste nel prevedere la composizione di un certo copolimero, nota quella iniziale dei monomeri. Poiché la reattività di questi ultimi varia durante la reazione, ne consegue che la composizione del copolimero evolve continuamente nel tempo rispetto a quella del mezzo di reazione. Si può dunque affermare che la composizione di un copolimero, in relazione ad una certa miscela di alimentazione, è istantanea e definibile come l'esito di conversioni infinitesime di monomeri [13].

Come per gli omopolimeri, anche per i copolimeri la fusione della fase cristallina e la transizione vetrosa della componente amorfa, che si manifestano rispettivamente alle temperature  $T_m$  e  $T_g$ , sono transizioni termiche cruciali. Questi possono inoltre mostrare più di una fase cristallina, indice di vari processi di fusione. Di norma, la transizione vetrosa dei copolimeri statistici varia in maniera monotona con la composizione; inoltre, se una o entrambe le unità monomeriche sono in grado di cristallizzare, la transizione vetrosa caratteristica della fase amorfa si manifesta ad una temperatura  $T_g$  intermedia rispetto a quelle proprie dei due omopolimeri.

Al fine di descrivere l'andamento di  $T_g$  al variare della composizione polimerica, sono state formulate diverse equazioni, tra le quali figura quella di Fox:

$$1/T_g = w_A / T_{gA} + w_B / T_{gB}$$

in cui, se si definiscono A e B come le due diverse unità comonomeriche,  $w_A$  e  $w_B$  rappresentano le loro rispettive frazioni in peso, mentre  $T_{gA}$  e  $T_{gB}$  le temperature di transizione vetrosa.

Si può anche fare riferimento alla più recente equazione di Couchman, adottata anche nel caso di andamenti regolari di  $T_g$ :

$$\ln T_g = \frac{\ln T_{gA} + (k \cdot w_B / w_A) \cdot \ln T_{gB}}{1 + (k \cdot w_B / w_A)}$$

in cui  $k$  rappresenta il rapporto tra gli incrementi di calore specifico alla transizione vetrosa degli omopolimeri.

Per quanto riguarda invece la capacità di cristallizzare di un copolimero statistico, composto da due unità comonomeriche distinte, A e B, si possono avere due situazioni differenti: si può formare un sistema a due fasi, in cui la fase cristallina è composta interamente da unità A ed è in equilibrio con una fase amorfa mista di unità A e unità B non cristallizzabili (esclusione di comonomero). In alternativa, le unità del comonomero B possono entrare a far parte del reticolo

cristallino, sia in forma di difetti, sia in condizioni di equilibrio; in questo ultimo caso entrambe le fasi si considerano pure (inclusione del comonomero).

### 1.3.2 COPOLIMERI A BLOCCHI

Come già accennato, in un copolimero a blocchi le unità ripetitive sono costituite da blocchi dello stesso monomero uniti ad altri blocchi dell'altro monomero. In altre parole, un copolimero a blocchi può essere visto come l'unione di due omopolimeri (A e B) per le estremità terminali:



Secondo la distribuzione ed il numero dei singoli blocchi si possono identificare diverse strutture:

- Di-blocchi:  $A_m-B_n$ . I blocchi possono contenere gruppi terminali, ad esempio  $-OH$ , gruppi di giunzione ( $-CO-$ ); in alternativa, il secondo blocco può includere un terzo monomero C ( $A_m-BC$ ), distribuito in modo casuale, alternato, in sequenze decrescenti, etc.;
- Tri-blocchi:  $A_m-B_n-A_m$ ,  $A_m-B_n-A_q$ ,  $A_m-B_n-C_q$  sono rappresentazioni semplificate di copolimeri contenenti tre blocchi così distribuiti;
- Multi-blocchi, copolimeri segmentati:  $A_m-B_n-A_m-B_q-A_m-B_q$ ;
- Copolimeri a di-blocchi ripetuti:  $(A_m-B_n)_x$ ;
- Copolimeri a blocchi sovrapposti, *overlapped* o *tapered*,  $A_m-(A_x, B_y)-B_n$ ;
- Copolimeri a stella, multi-braccia, collegati da un'unità di giunzione: possono essere considerati un caso particolare di copolimeri ad innesto.

Si possono distinguere due tipologie di copolimeri a blocchi: quelli a blocchi non cristallizzabili e quelli a blocchi cristallizzabili.

#### 1) 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.

## 2) 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 d'organizzazione come nel caso di polimeri multi-blocco. 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.

## 1.4 POLIESTERI ALIFATICI

I poliesteri sono polimeri che presentano in catena gruppi esterei, e sono ottenuti principalmente per policondensazione di un poliacido con un polialcool, oppure mediante ROP di diesteri ciclici, lattoni e acetali chetonici ciclici; costituiscono la classe polimeri sintetici idrolizzabili più conosciuta. I poliesteri vengono inoltre classificati in aromatici e alifatici, in relazione alla presenza o meno, all'interno della catena macromolecolare, di anelli benzenici aromatici (Figura 1.17).

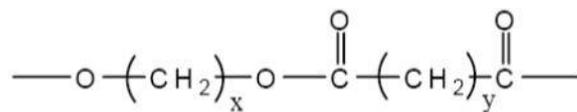


Figura 1.17. Struttura chimica di un poliestere alifatico.

Alcuni poliesteri risultano, inoltre, facilmente biodegradabili, caratteristica che li rende molto interessanti per applicazioni biomedicali; essi, infatti, possono essere gradualmente degradati ed eliminati dall'organismo, senza necessità di successivi interventi chirurgici, fornendo prestazioni ottimali per periodi di tempo programmabili in relazione alle specifiche applicazioni previste, quali ad esempio impianti ortopedici, *stent* intravascolari, dispositivi dentali, suture biorisorbibili, sistemi per il rilascio controllato di farmaci e supporti temporanei per la crescita tissutale.

Tra i principali poliesteri utilizzati a livello biomedicale figurano, oltre all'acido polilattico e al poli(butilene succinato), che verranno trattati più nel dettaglio nei prossimi paragrafi, il poli(etilene tereftalato) o PET, spesso utilizzato sotto forma di fibre in chirurgia cardiovascolare per suture e per la fabbricazione di anelli valvolari ed in ingegneria tissutale, come rinforzo per tessuti danneggiati, o per la sostituzione di tendini e legamenti. Altri materiali sono le poliolefine, impiegate per la fabbricazione di componenti di impianti ortopedici, specialmente per le superfici sottoposte a forti carichi, come le protesi dell'anca e del ginocchio, l'acido poliglicolico ed il poli( $\epsilon$ -caprolattone), impiegati come materiali per realizzare dispositivi per il rilascio controllato o per l'ingegneria tissutale.

#### 1.4.1 POLIBUTILENE SUCCINATO (PBS)

Il poli(butilene succinato) (PBS), la cui struttura chimica è riportata in Figura 1.18, è un poliestere alifatico recentemente approvato dalla *Food and Drug Administration*, sul quale negli ultimi anni si sono notevolmente focalizzate le ricerche come materiale per utilizzi biomedici di diverso tipo, quali ad esempio la realizzazione di impianti in chirurgia vascolare o ortopedica, la sintesi di membrane, micro- e nanoparticelle e matrici impiantabili per il rilascio controllato di farmaci; inoltre, in materia di *tissue engineering*, il PBS è risultato un buon materiale per la realizzazione di supporti tridimensionali per la crescita e la rigenerazione di tessuti ossei e cartilaginei.

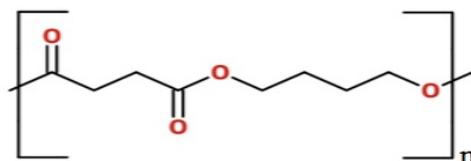


Figura 1.18. Struttura chimica del poli(butilene succinato).

I monomeri impiegati nella sintesi di PBS sono acido succinico (SA) (o dimetil succinato DMS) e 1,4-butandiolo (BD) (Figura 1.19), che sono comunemente ottenuti da risorse fossili, ma che possono essere ottenuti anche da fonti rinnovabili, ad esempio attraverso la fermentazione di zuccheri [14], rendendo il PBS, un polimero potenzialmente 100% *bio-based*.

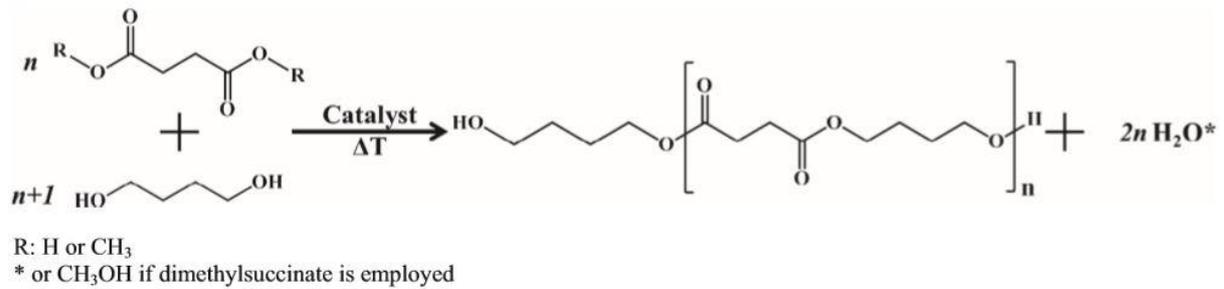


Figura 1.19. Schema di reazione di polimerizzazione del PBS.

Negli ultimi anni, inoltre, sono stati messi a punto processi biotecnologici, caratterizzati da buone rese, che utilizzano microrganismi di vario tipo per la produzione di acido succinico. L'acido succinico così ottenuto può quindi essere convertito in 1,4-butandiolo attraverso meccanismi di idrogenazione.

Comunemente il PBS viene sintetizzato per policondensazione in massa a due fasi: nella prima si verifica una reazione di esterificazione (o transesterificazione qualora il monomero di partenza sia il DMS) con rimozione di acqua (o metanolo), mentre nella seconda, condotta a temperatura più elevata e a pressione ridotta, viene rimosso il glicole in eccesso (generalmente si usa un eccesso di glicole del 10-20% circa), promuovendo contemporaneamente le reazioni di transesterificazione che permettono di ottenere alti pesi molecolari. La reazione viene condotta in presenza di un catalizzatore, solitamente a base di titanio, come ad esempio il titanio (IV) butossido (TBT).

Per quanto riguarda le proprietà, il PBS è un polimero semicristallino ad alta capacità di cristallizzazione ( $X_c = 35-45\%$ ) con temperatura di fusione di circa 110-115°C. La temperatura di transizione vetrosa è ben al di sotto di temperatura ambiente, pertanto il PBS possiede un ampio intervallo di lavorabilità che consente la sua lavorazione mediante estrusione, stampaggio a iniezione e termoformatura. Dal punto di vista meccanico, questo materiale mostra un comportamento fragile, con allungamenti a rottura estremamente ridotti (circa 5-20%), ma buona resistenza agli urti. Infine, il poli(butilene succinato) è caratterizzato da una comprovata biodegradabilità (con tempi di degradazione piuttosto lunghi in condizioni fisiologiche, ma facilmente controllabili) e biocompatibilità, caratteristica di fondamentale importanza per applicazioni in ambito biomedicale. A tutti questi vantaggi, occorre aggiungere anche il moderato costo di produzione ed un processo di sintesi semplice, già consolidato a livello industriale.

Come già detto, la copolimerizzazione ha come scopo quello di migliorare le proprietà dell'omopolimero di riferimento in funzione della specifica applicazione, possibilmente senza

alterarne le caratteristiche già buone; per quanto riguarda il caso del PBS, la copolimerizzazione è risultata un approccio vincente per diminuirne la cristallinità, migliorarne le proprietà meccaniche in termini di flessibilità e aumentarne il tasso di biodegradabilità, mantenendo ad esempio la buona stabilità termica e la biocompatibilità. Attraverso le principali strategie sintetiche di copolimerizzazione, quali la copolicondensazione, la miscelazione reattiva e la *chain extension*, il gruppo di ricerca della Prof. ssa Lotti, relatrice della presente Tesi, che da anni lavora a questo interessante poliesteri, ha realizzato con successo copolimeri statistici a diversa composizione, copolimeri multiblocco con blocchi a diversa lunghezza (semplicemente variando il tempo di miscelazione), e copoliesteri-uretani multiblocco ad alto peso molecolare [14-20].

#### 1.4.2 ACIDO POLILATTICO (PLA)

L'acido polilattico (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. Viene ottenuto principalmente dall'apertura dell'anello dell'acido lattico (lattide) tramite la *Ring Opening Polymerization (ROP)*; l'acido lattico, a sua volta, è ottenibile dalla fermentazione degli zuccheri (destrosio essenzialmente, ma anche glucosio e saccarosio) da farina di granturco, barbabietole da zucchero o amido di frumento. A seconda dei microrganismi coinvolti nel processo, la fermentazione può essere omolattica o eterolattica. La prima conduce solo ad acido lattico ed è propria di molti batteri e bacilli, lattobacilli (*Lactobacillus delbrueckii*, *L. casei*, *L. leichmannii*) e streptococchi, mentre nell'altra avviene anche produzione di alcol etilico, acido acetico, anidride carbonica, ecc... L'acido lattico è convertito nel dimero (lattide), che viene purificato e poi polimerizzato ad acido polilattico senza bisogno di solventi (Figura 1.20).

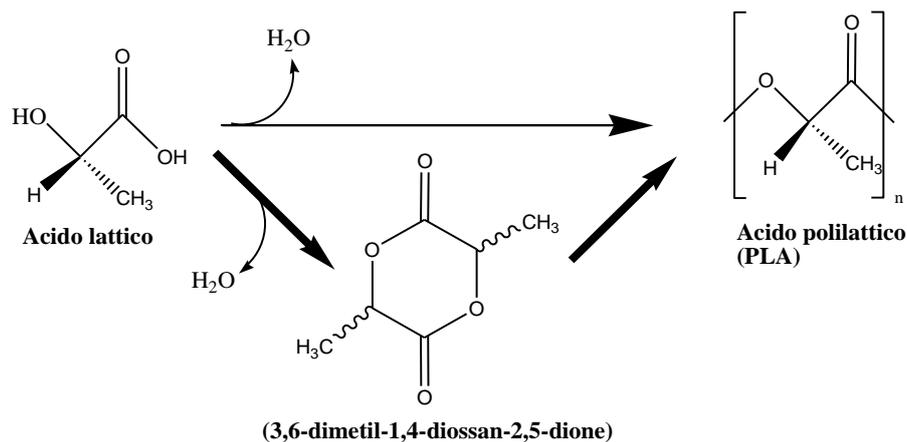


Figura 1.20: Sintesi per ottenere il PLA.

L'acido lattico è una molecola enantiomerica poiché esiste nelle due forme L (levogira) e D (destrogiro). Non considerando la stereochimica del lattide, il meccanismo d'apertura d'anello è mostrato in Figura 1.21.

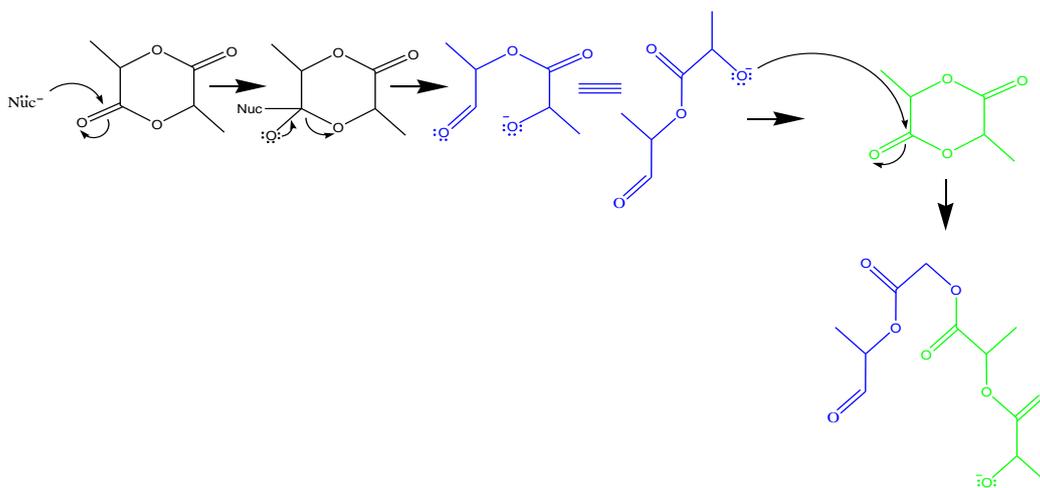


Figura 1.21. Meccanismo di apertura dell'anello.

Le quantità di enantiomeri che si ottengono sono differenti poiché la forma D è prodotta rapidamente, ma l'isomero-L è la forma biologicamente attiva e sintetizzata in maggioranza dai microrganismi. In particolare, le quantità di enantiomeri che si ottengono sono il 99,5% in forma L-isomero e per lo 0,5% in forma D-isomero.

Gli esteri ciclici che si ottengono (lattidi), sono 3 (Figura 1.22):

- 1) L-lattide (otticamente attivo);
- 2) D-lattide (otticamente attivo);
- 3) Meso-lattide (otticamente inattivo)

La polimerizzazione del lattide verso polimeri ricchi di L-isomero dà prodotti cristallini, mentre quelli che contengono più del 15% di D-isomero sono più amorfi.

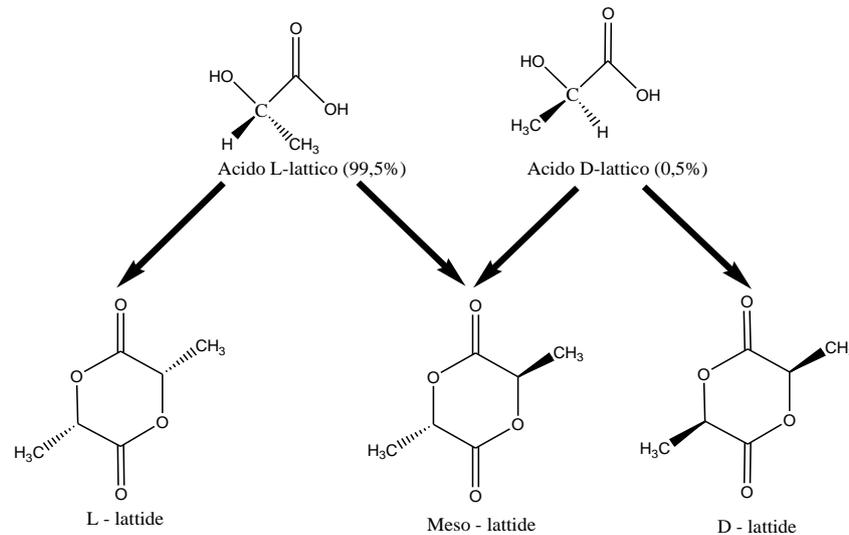


Figura 1.22. Enantiomeri dell'acido lattico e forme cicliche corrispondenti.

Per quanto riguarda la formazione dei polimeri, l'acido poli(DL-lattico) o PDLA indica la miscela racemica dei due (50%-50%). È amorfo, ha una temperatura di fusione tra i 150 e 160 °C, presenta una sola temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) a circa 60°C ed è insolubile in acqua. L'acido poli(L-lattico) o PLLA indica il polimero costituito esclusivamente dall'enantiomero L ed è un materiale semicristallino, rigido, con un'elevata temperatura di fusione (170-180°C), ha una  $T_g$  di 53°C, è insolubile in acqua e presenta un valore di cristallinità pari al 37%. Questo materiale è duro, trasparente con un allungamento a rottura tra l'85% e il 105% e una resistenza a trazione pari a 45-70 MPa. Infine, l'acido poli(D-lattico) o PDLA indica il polimero costituito esclusivamente dall'enantiomero D; esso è semicristallino, con una temperatura di fusione pari a 180°C e una  $T_g$  di 60°C [21,22]. Il PLA può essere processato termicamente con semplici modifiche alle apparecchiature tradizionali e può essere filato mediante convenzionali processi di filatura. Il suo smaltimento, inoltre, può avvenire mediante semplice compostaggio [23-24]. Attualmente, oltre che nel *drug delivery*, viene impiegato in vari settori della medicina, in particolare per suture riassorbibili, fissaggio ortopedico, e recentemente in ingegneria tissutale come supporto poroso temporaneo allo scopo di favorire la rigenerazione di tessuti quali ossa, cartilagini, tendini e nervi [25].

Il principale limite del PLA è dato dal suo comportamento fragile, dalla scarsa stabilità termica e dagli elevati costi. Notevoli sforzi della ricerca sono volti a diminuire la rigidità del PLLA:

ad oggi la strategia più plausibile risulta la sintesi di copolimeri mediante l'introduzione, nella sua catena, di componenti flessibili.

## 1.5 INGEGNERIA TISSUTALE

Con il termine "ingegneria tessutale" si intende "l'applicazione di principi e metodi dell'ingegneria e delle scienze della vita verso la comprensione fondamentale delle relazioni struttura-funzione nei tessuti mammiferi normali e patologici e lo sviluppo di sostituti biologici per ripristinare, mantenere o migliorare la funzione del tessuto " [26]. E' un settore terapeutico interdisciplinare che si pone l'obiettivo di soddisfare le esigenze mediche legate a tessuti e organi ricreandoli, ingegnerizzandoli o favorendone la riparazione, ristabilendo, ricreando o migliorando, quindi, le loro originarie funzioni biologiche. L'ingegneria tissutale, inoltre, studia la progettazione e la realizzazione di bioreattori dove vengono prodotti organi e tessuti, partendo dall'inseminazione di cellule in opportune impalcature tridimensionali, di varia natura, che sostengono l'architettura cellulare, dette *scaffold*.

Questi scaffold, che insieme alle fonti cellulari e ad opportuni fattori di crescita costituiscono la cosiddetta "triade" dell'ingegneria tissutale (Figura 1.23), possono essere impiantati direttamente nel sito danneggiato *in vivo*, oppure essere inseminati di cellule *in vitro*, per favorire la realizzazione di un tessuto che solo in un secondo momento verrà impiantato.

La premessa di base dell'ingegneria tissutale consiste, dunque, nel combinare la giusta tipologia cellulare con il giusto biomateriale: la natura e le proprietà fisico-chimiche del materiale, di fondamentale importanza per ricreare le condizioni ottimali per la rigenerazione tissutale, vanno scelte attentamente di volta in volta in base alla tipologia di tessuto da rigenerare. In ogni caso, comunque, gli scaffold utilizzati in campo biomedico devono necessariamente soddisfare alcuni criteri fondamentali; essi infatti devono risultare caratterizzati da:

- Biocompatibilità: le cellule devono poter aderire, proliferare e migrare sia sulla superficie sia attraverso l'impalcatura e iniziare così a costruire la loro matrice extracellulare. Dopo l'impianto, inoltre, lo *scaffold* non deve suscitare una reazione immunitaria al fine di prevenire una risposta infiammatoria grave che potrebbe ridurre la guarigione o causare il rigetto da parte dell'organismo;
- Biodegradabilità: le impalcature, devono degradarsi con una velocità compatibile con quella della crescita delle cellule, che via via andranno a sostituire lo *scaffold*. Inoltre, i sottoprodotti della degradazione devono essere non tossici per l'organismo ospite [27];

- Proprietà meccaniche coerenti con il sito anatomico in cui deve essere impiantato, unitamente ad una buona resistenza tale da consentirne la manipolazione chirurgica in fase di impianto;
- Elevata porosità, con pori interconnessi (di diametro tipicamente compreso tra i 200 e i 500  $\mu\text{m}$ ) che permettano la diffusione e la crescita cellulare, il trasporto di sostanze nutritive e la rimozione dei cataboliti;
- Opportune proprietà superficiali che favoriscano l'adesione, la proliferazione e/o il corretto differenziamento cellulare;
- Riproducibilità ed economicità del processo di produzione: gli *scaffold*, per poter essere utilizzati su larga scala, dovrebbero essere prodotti con materiali piuttosto economici e attraverso procedure facilmente attuabili a livello industriale.

Gli *scaffold* non sono, dunque, supporti meccanici passivi, ma partecipano attivamente al processo di ricostruzione del tessuto, provvedendo alla stabilità meccanica della struttura, necessaria per la corretta organizzazione tridimensionale delle cellule in proliferazione.

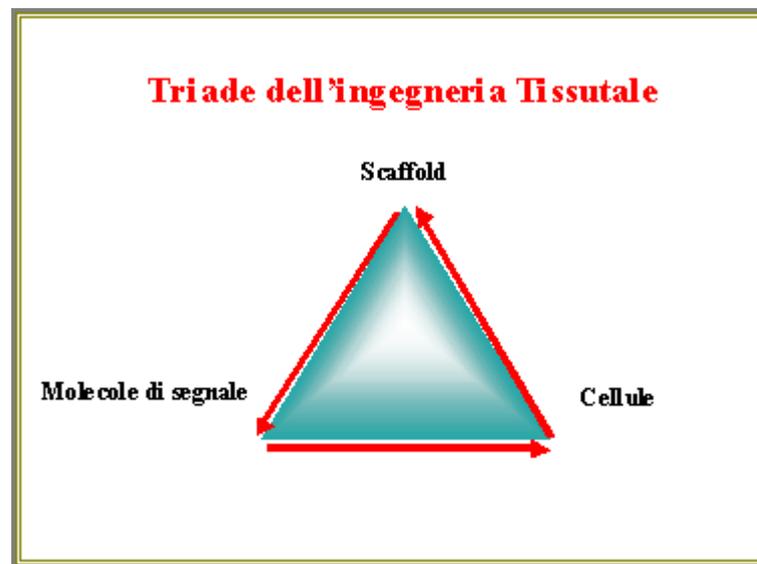


Figura 1.23. "Triade" dell'ingegneria tissutale.

Comunemente gli *scaffold* vengono fabbricati con materiali polimerici, eccetto quelli destinati alla rigenerazione del tessuto osseo, il quale richiede la presenza, in aggiunta, di una matrice inorganica rinforzante. All'interno della varietà di polimeri, sia naturali che di sintesi, già sperimentati per la costruzione dei supporti, quelli di origine naturale includono polisaccaridi

(come acido ialuronico) e proteine (ad esempio il collagene), mentre quelli sintetici comprendono: la famiglia di poliesteri alifatici derivanti dall'acido lattico e glicolico, i poliidrossialcanoati (poliesteri, caratterizzati dalla ripetizione del monomero [-O-CHR-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO-], prodotti in natura da fermentazione batterica di zuccheri o lipidi), il policaprolattone, le polianidridi, i poliortoesteri e i policarbonati.

Il principale svantaggio derivante dall'impiego di polimeri sintetici per la realizzazione di *scaffold* risulta, in generale, la ridotta bioattività; al contrario i polimeri di origine naturale, benché molto biocompatibili e biologicamente attivi, come limitazione presentano delle scarse proprietà meccaniche, che ne restringono il campo di applicabilità; inoltre, molto spesso, l'utilizzo di polimeri naturali non garantisce l'uniformità e la riproducibilità del prodotto. Vista l'impossibilità sia da parte dei polimeri naturali che dei sintetici di coniugare le diversificate proprietà richieste dalle applicazioni in ingegneria tissutale, la ricerca di biomateriali per *scaffold* si è recentemente spostata sui copolimeri che, come già evidenziato, sono caratterizzati da un'elevata modulabilità delle proprietà, mediante la combinazione di più unità comonomeriche. Tra i copolimeri più utilizzati nell'ambito dell'ingegneria tissutale troviamo alcuni copoliesteri alifatici, come l'acido polilattico-co-glicolico, PLGA.

I supporti tridimensionali più all'avanguardia contengono molecole bioattive, come fattori di crescita, che vengono rilasciati dalla matrice polimerica per degradazione e/o diffusione allo scopo di promuovere la proliferazione cellulare all'interno dello *scaffold*. In alcuni casi la superficie del supporto esposta all'interazione con le cellule può essere fisicamente o chimicamente modificata per inserire sequenze polipeptidiche segnale.

## CAPITOLO 2:

### SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni, i nuovi approcci della medicina rigenerativa hanno portato allo sviluppo dell'ingegneria tissutale, un campo multidisciplinare che ha tra gli obiettivi lo sviluppo di dispositivi per la rigenerazione tissutale, in alternativa agli approcci tradizionali quali il trapianto di organo. In questo contesto, i biomateriali, ed in particolare i polimeri, sono i biomateriali più utilizzati in ingegneria tissutale, grazie alla loro versatilità in termini di proprietà meccaniche, biodegradabilità e biocompatibilità con il tessuto ospite. I poliesteri alifatici di maggior successo sono l'acido poliglicolico (PGA), il policaprolattone (PCL), l'acido polilattico (PLA), tutti approvati dalla *Food and Drug Administration*, ed i loro copolimeri e blend. Il PLA, in particolare, si è rivelato un candidato vincente per applicazioni in ingegneria tissutale, in quanto completamente ottenibile da fonti rinnovabili, biocompatibile, biodegradabile, piuttosto economico e già ampiamente utilizzato a livello industriale. Dal punto di vista delle proprietà termiche, inoltre, è uno dei poliesteri alifatici più altofondente, caratteristica che ne permette l'utilizzo in diversi settori e per diverse applicazioni. Ad esempio, in campo biomedicale, trova ampio uso come materiale per dispositivi a rilascio controllato, per dispositivi impiantabili e per il fissaggio di fratture ossee. Il principale limite è dato dalla sua elevata cristallinità e rigidità, che non lo rendono idoneo per applicazioni a contatto con i tessuti molli. Tale limite può essere superato con successo attraverso la copolimerizzazione, che permette di modificare e modulare *ad hoc* le proprietà di un materiale in relazione alla specifica applicazione richiesta, semplicemente agendo sulla struttura chimica e la tipologia di unità comonomerica. In particolare, copolimeri con struttura a blocchi permettono di abbassare considerevolmente il grado di cristallinità dell'omopolimero di riferimento, mantenendone, allo stesso tempo, la stessa temperatura di fusione, quindi la stessa finestra di lavorabilità.

Considerando questo scenario, il presente lavoro di Tesi si è focalizzato sulla sintesi di nuovi copoliesteri 100% *bio-based* a base di acido poli-L-lattico (PLLA) ad architettura triblocco A-B-A e a diversa composizione. I blocchi laterali A, detti anche blocchi *hard*, sono costituiti da acido polilattico, mentre come blocco centrale B, o blocco *soft*, è stato utilizzato un copolimero statistico poli(butilene succinato/azelato) P(BSxBAzy), anch'esso *bio-based*, con la funzione di incrementare significativamente la flessibilità dell'omopolimero di riferimento. L'introduzione del polibutilene azelato (PBaz) all'interno delle catene macromolecolari di polibutilene succinato (PBS) ha lo scopo di abbassare il grado di cristallinità di quest'ultimo,

aumentandone la velocità di biodegradazione. Al fine di ottenere una struttura triblocco, è stata effettuata prima una polimerizzazione ad apertura d'anello del L-lattide, per opera del copolimero P(BSxBAzy), poi, mediante una reazione di estensione di catena, utilizzando esametilene diisocianato come estensore, è stato possibile ottenere copolimeri dal peso molecolare elevato, parametro indispensabile per ottenere materiale performanti dal punto di vista delle proprietà meccaniche. Diverse percentuali in peso tra blocco soft e blocco hard sono state studiate ed i materiali così ottenuti sono stati analizzati dal punto di vista molecolare, termico e meccanico. Inoltre, al fine di valutare la loro potenzialità come materiali per l'ingegneria tissutale sono state condotte prove di biodegradabilità e biocompatibilità, queste ultime in collaborazione con il gruppo di ricerca del ICTP-CSIC di Madrid.

## **CAPITOLO 3:**

### **MATERIALI E METODI**

#### 3.1 SINTESI

La procedura di sintesi utilizzata per il presente lavoro di Tesi si compone di diversi step. In primo luogo, è stato preparato un copolimero idrossil-terminato. Questo materiale è stato in seguito utilizzato, in diverse percentuali, per l'apertura dell'anello del L-lattide. I copolimeri triblocco così ottenuti sono stati infine chain estesi per aumentarne il peso molecolare. È stato sintetizzato anche l'omopolimero PLLA chain esteso come confronto.

##### 3.1.1 STRUMENTAZIONE PER LA SINTESI

La strumentazione per la sintesi si compone di un reattore in vetro a tre colli, immerso in un bagno di sali inorganici (nitrati e nitriti di potassio e sodio) che garantiscono il mantenimento di una temperatura uniforme e costante. Il sistema che permette l'agitazione dei reagenti è di tipo meccanico, formato da un albero motore a cui è collegata una pala, e su cui sono posti degli estensimetri per la misura del momento torcente (*torque*), il cui valore è direttamente proporzionale alla viscosità del fluido, indice a sua volta dell'incremento del peso molecolare. Temperatura e *torque* vengono costantemente monitorati durante la reazione. Nella prima parte di reazione il reattore viene collegato ad un'unica trappola che ha la funzione di raccogliere i prodotti della reazione di esterificazione, quali acqua e metanolo. Durante la seconda fase, in cui viene gradualmente aumentata la temperatura, diminuendo contemporaneamente la pressione mediante una pompa da vuoto, si inserisce anche una seconda trappola immersa in un *dewar* contenente azoto liquido, per impedire che le sostanze volatili prodotte entrino nella pompa (Figura 3.1).

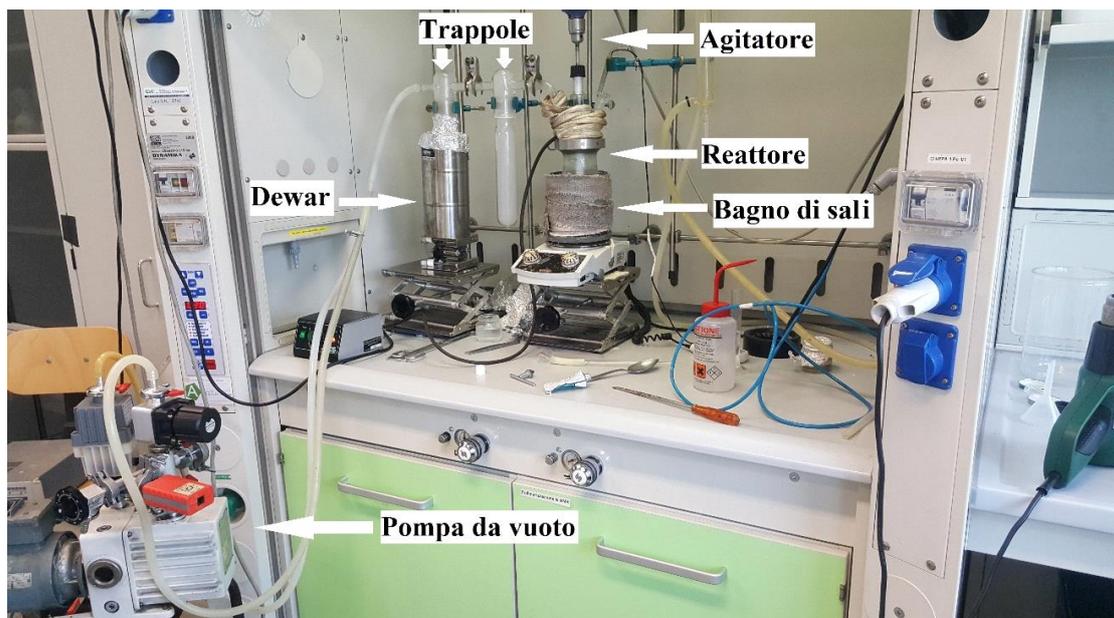


Figura 3.1. Schema dell'apparecchiatura per la polimerizzazione.

### 3.1.2 SINTESI DEL COPOLIMERO IDROSSI-TERMINATO

Il copolimero random idrossil-terminato poli(butilene succinato/azelato) P(BS80BAz20) è stato sintetizzato mediante policondensazione in massa a due stadi a partire da dimetil succinato (DMS) e dimetil azelato (DMAz), in percentuale molare rispettivamente dell'80% e del 20%, utilizzando come glicole 1,4-butandiolo (BD). Al fine di garantire la presenza di terminali idrossilici al termine della reazione, si è lavorato in largo eccesso di glicole, pari al 100% molare rispetto alla quantità complessiva di estere. È stato inoltre impiegato titanio tetrabutossido  $Ti(OBu)_4$  come catalizzatore (circa 150 ppm di  $Ti/g$  di polimero teorico). Nella prima fase della policondensazione, condotta sotto flusso di azoto, la temperatura è stata fissata a 170 °C e mantenuta costante finché il 90% della quantità teorica di metanolo non è stata distillata e raccolta nella trappola (circa 2 ore). Nella seconda fase, la pressione è stata progressivamente ridotta a 0,1 mbar, al fine di facilitare la rimozione dell'eccesso di glicole, e la temperatura è stata portata gradualmente a 225 °C. La sintesi si è conclusa dopo circa due ore, al raggiungimento di un *torque* pari a 3 N · cm (il valore misurato all'inizio del secondo stadio era di 0 N · cm). Il prepolimero ottenuto è stato accuratamente purificato secondo la procedura riportata in seguito, e tenuto sottovuoto a temperatura ambiente per una settimana per rimuovere il solvente residuo, prima di procedere con le successive sintesi.

### 3.1.3 SINTESI DEI COPOLIMERI TRIBLOCCO MEDIANTE *CHAIN EXTENSION*

La sintesi dei copolimeri triblocco A-B-A a diversa composizione, dove A indica il blocco *hard* costituito da PLLA e B il blocco *soft* dato dal copolimero statistico idrossil-terminato P(BS80BAz20) è avvenuta in due fasi: nella prima, condotta a 170 °C sotto flusso controllato di azoto, al copolimero idrossil-terminato è stato aggiunto L-lattide insieme al catalizzatore, in questo caso Sn (II)-2-etilesanoato (100 ppm Sn/g polimero ottenibile). Durante questa fase, della durata di circa tre ore, avvengono le reazioni di apertura dell'anello del lattide (ROP) ad opera dei terminali idrossilici del copolimero P(BS80BAz20), e la formazione dei blocchi *hard* di PLLA. Nella seconda fase, al fine di aumentare il peso molecolare, è stato utilizzato esametilene diisocianato (HDI) in quantità equimolare ai terminali idrossilici del copolimero P(BS80BAz20), come estensore di catena. I gruppi isocianati dell'HDI reagiscono con i terminali -OH del PLLA, formando legami uretanici. La quantità di HDI necessaria è stata calcolata mediante analisi NMR effettuata su P(BS80BAz20). Durante la fase di estensione di catena è stato rilevato un improvviso aumento del valore di *torque*, a riprova della formazione dei legami uretanici tra i blocchi, con conseguente aumento del peso molecolare. La reazione è continuata fino a quando è stato misurato un valore di *torque* costante (circa 45 minuti). Mediante questa stessa procedura sono stati ottenuti 4 diversi copolimeri triblocco, indicati con la formula  $PLLA_mP(BS80BAz20)_n$ , dove m e n rappresentano, rispettivamente, la percentuale in peso di blocco *hard* e *soft*.

Analogamente, a fini di confronto, si è proceduto alla sintesi dell'omopolimero *chain* esteso PLLA, operando in analoghe condizioni a quelle sopra descritte, utilizzando però come iniziatore una piccola quantità di butandiolo.

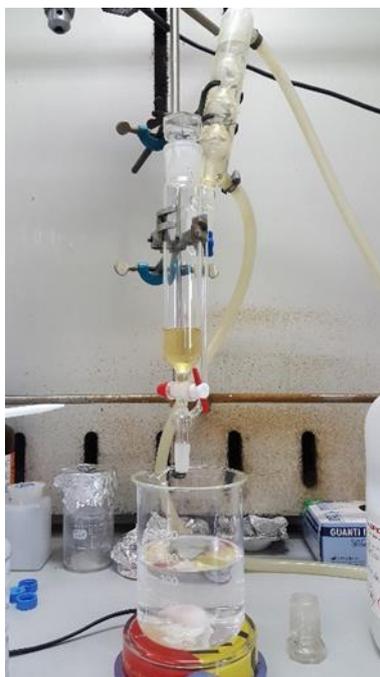
### 3.1.4 PURIFICAZIONE DEI POLIMERI

Tutti i polimeri oggetto della presente Tesi hanno subito un processo di purificazione finalizzato all'eliminazione di eventuali residui monomerici, catalizzatori e sottoprodotti indesiderati.

I polimeri allo stato solido sono stati dapprima sciolti nella minima quantità di cloroformio necessaria per avere la completa solubilizzazione: per velocizzare tale processo, la soluzione è stata mantenuta in agitazione tramite un'ancoretta magnetica.

Ciascuna soluzione è stata poi fatta sgocciolare in un becher contenente un largo eccesso di metanolo, un non solvente (Figura 3.2): il polimero, a contatto con il metanolo, precipita sul

fondo del becher, mentre in soluzione restano le impurezze, che rendono via via sempre più opaco il metanolo. Una volta terminato lo sgocciolamento, il precipitato viene filtrato sottovuoto, al fine di separarlo dalla miscela di solventi, e lasciato a riposo per qualche giorno, in modo tale da permettere la completa evaporazione di eventuali metanolo e cloroformio residui.



*Figura 3.2. Processo di purificazione dei polimeri.*

## 3.2 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

### 3.2.1 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)

La spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) è una tecnica analitica strumentale che permette di ottenere dettagliate informazioni sulla struttura molecolare dei composti in esame. Misura l'assorbimento di radiazione elettromagnetica di frequenza radio in molecole immerse in un forte campo magnetico. Queste radiazioni provocano transizioni di spin nucleare in particolari atomi (tipicamente  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$ ). Le informazioni sulla struttura molecolare vengono dedotte osservando il comportamento dei nuclei atomici in presenza di un campo magnetico applicato.

Il momento di spin  $\mu$  è dato dalla relazione:

$$\mu = \gamma I \frac{h}{2\pi}$$

dove  $\gamma$  è il rapporto giromagnetico,  $I$  è il numero quantico di spin nucleare,  $h$  è la costante di Plank. Lo spin viene prodotto dalle particelle che costituiscono il nucleo, protoni e neutroni. Queste si comportano come se fossero in rotazione (spin) attorno al proprio asse: in molti atomi (come nel  $^{12}\text{C}$ ) gli spin sono tutti appaiati, uno in opposizione all'altro, annullandosi reciprocamente, per cui il nucleo atomico ha uno spin risultante  $I$  uguale a zero, il quale non risulta visibile. In alcuni atomi, però (come in  $^1\text{H}$  e in  $^{13}\text{C}$ ), il nucleo possiede  $I$  diverso da zero. Quando nuclei come questi sono immersi in un campo magnetico esterno  $B_0$ , vengono sottoposti ad una coppia di forze che li fanno ruotare e allineare col campo magnetico stesso, come l'ago di una bussola. Le possibili orientazioni che il nucleo può assumere in un campo magnetico sono governate dal numero quantico  $m$ , il quale può assumere i valori da  $-I$  a  $+I$  (con incrementi di una unità) e quindi può assumere  $2I + 1$  valori diversi. Nel caso di un nucleo con spin  $1/2$  (come  $^1\text{H}$ ) sono solo 2 le possibili orientazioni: una con  $m = -1/2$  e una con  $m = +1/2$ . Il momento magnetico nucleare  $m$  non rimane fermo, ma continua ad oscillare attorno alla direzione del campo magnetico applicato  $B_0$  compiendo un moto di precessione simile a quello di una trottola (Figura 3.3). I due stati possibili del nucleo non hanno la stessa energia, ma lo stato con  $m = +1/2$  (allineato con il campo) si trova ad energia leggermente più bassa di quello con  $m = -1/2$  (opposto al campo) (Figura 3.4).

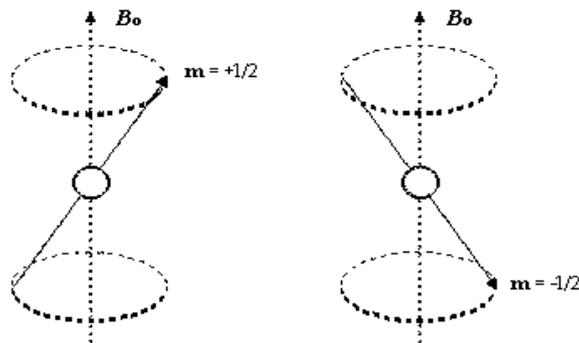


Figura 3.3. Possibili orientamenti dei nuclei in presenza di campo magnetico esterno.

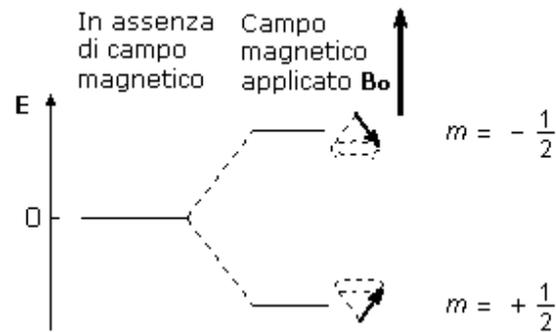


Figura 3.4. Energia e orientamento dei nuclei con o senza campo magnetico esterno.

Il moto di precessione dei momenti magnetici nucleari avviene con una frequenza proporzionale alla differenza di energia tra i due livelli, detta frequenza di Larmor data dalla formula:

$$\nu = \gamma \frac{B_0}{2\pi}$$

dove  $\gamma$  è il rapporto giromagnetico che dipende dal nucleo in esame. All'aumentare del campo applicato  $B_0$ , aumenta la frequenza di Larmor e quindi aumenta la differenza di energia tra i due livelli. Se il campione viene irradiato con una radiazione elettromagnetica di frequenza uguale alla frequenza di Larmor, si ha un'interazione della componente magnetica della radiazione con i momenti magnetici nucleari (anche questi oscillanti alla frequenza di Larmor). L'energia della radiazione può così essere trasferita ai nuclei. Ogni assorbimento di radiazione comporta un cambiamento di orientazione dello spin nucleare, che ruota da allineato con il campo ad opposto al campo. Quando si verifica questa transizione di spin, si dice che i nuclei sono in risonanza con la radiazione applicata, da qui il nome di Risonanza Magnetica Nucleare, NMR.

Anche nello stato di massima eccitazione, la popolazione dei nuclei nei due livelli permessi è circa uguale, data la piccolissima differenza di energia tra i livelli. Nei moderni strumenti FT-NMR il segnale NMR viene generato con il metodo ad impulso e acquisito sfruttando la trasformata di Fourier. Con questa tecnica tutti i nuclei di una specie vengono eccitati contemporaneamente da un impulso a radiofrequenza che contiene tutto l'intervallo di frequenze necessario; i dati vengono poi elaborati da un software con la tecnica della trasformata di Fourier. Quando si interrompe l'impulso della radiazione elettromagnetica i nuclei eccitati continuano ad emettere per qualche istante un debole segnale di radiofrequenza che si spegne nel tempo, come una sorta di eco del segnale assorbito. Per registrare questo

segnale entra in funzione un circuito ricevente. Il segnale raccolto è un segnale oscillante con frequenza  $\nu$ , la frequenza di Larmor del nucleo in esame, che si smorza nel tempo e che viene detto FID (Free Induction Decay), ovvero libero decadimento dell'induzione. Nel grafico FID la frequenza d'oscillazione è facilmente individuabile misurando la lunghezza d'onda (cioè la distanza tra due creste successive, che rappresenta il periodo dell'onda) e applicando la formula:

$$\nu = \frac{1}{\lambda}$$

dove  $\lambda$  è la lunghezza d'onda. A partire da questo grafico in funzione del tempo, il FID (Figura 3.5 sopra), si ottiene così un nuovo grafico in funzione delle frequenze, chiamato spettro NMR, che mostra la frequenza assorbita dagli atomi in esame, ad esempio quelli di idrogeno (Figura 3.5 sotto).

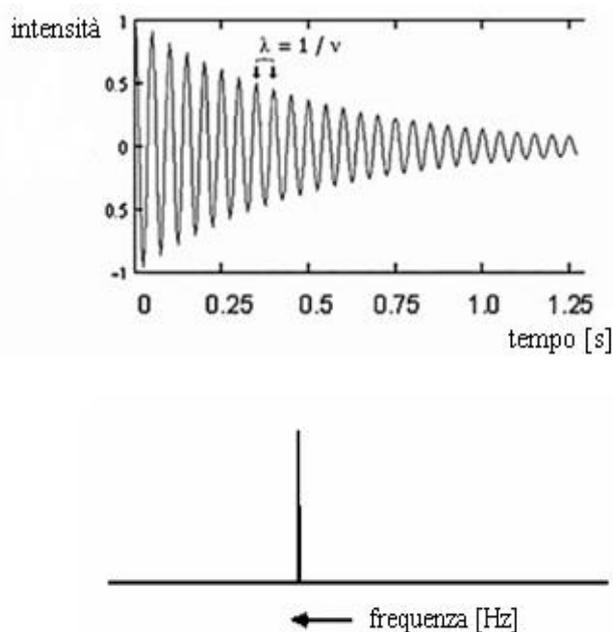


Figura 3.5. Sopra: esempio di grafico FID e sotto: corrispondente spettro NMR.

Il segnale NMR di un certo nucleo risulta spostato nello spettro a frequenze più alte o più basse, a seconda del suo intorno chimico. Ciò accade perché gli elettroni sono particelle cariche e, in quanto tali, se immerse in un campo magnetico, si muovono generando un campo magnetico secondario, opposto ad esso. Questo campo magnetico secondario scherma il nucleo dalla piena forza del campo applicato e tanto più grande è la densità elettronica, tanto maggiore sarà l'effetto di schermatura; di conseguenza, i nuclei che si trovano in un intorno ricco di elettroni

percepiranno un campo magnetico meno intenso e cioè subiranno la transizione ad una frequenza applicata più bassa rispetto ai nuclei situati in intorni poveri di elettroni. In particolare, questo effetto dipende dal fatto che gli elettroni di legame possono trovarsi più vicini o più lontani dall'atomo in esame a seconda dell'elettronegatività dell'altro atomo legato; in generale, protoni o carboni adiacenti ad atomi più elettronegativi risultano deschermati e di conseguenza avvertono un campo magnetico applicato più intenso, subiscono pertanto la transizione a frequenze maggiori e, nello spettro NMR, si trovano ad uno spostamento chimico più alto.

Lo spostamento chimico viene definito come la differenza tra la frequenza  $\nu$  (in Hz) del segnale NMR del nucleo in esame e quella del TMS (tetrametilsilano), che viene preso come riferimento. Nel caso di  $^1\text{H}$ -NMR:

$$\text{Spostamento chimico (assoluto)} = \nu_{(H_{\text{misurato}})} - \nu_{(H_{\text{TMS}})}$$

Per convenzione, sia per  $^1\text{H}$ -NMR che per  $^{13}\text{C}$ -NMR, lo zero della scala degli spostamenti chimici è attribuito all'assorbimento all'NMR del tetrametilsilano o TMS, nel quale gli idrogeni e i carboni sono più fortemente schermati di quanto si osserva nella maggior parte delle altre molecole organiche, che quindi rispetto al TMS presenteranno tutte spostamenti chimici positivi. Lo spostamento chimico assoluto, però, è proporzionale al campo applicato, quindi strumenti che usano campi magnetici più intensi producono spostamenti chimici assoluti maggiori. Per questo si utilizza lo spostamento chimico relativo  $\delta$  definito dalla seguente equazione:

$$\delta = \frac{\nu_{(H_{\text{misurato}})} - \nu_{(H_{\text{TMS}})}}{\nu_{(H_{\text{TMS}})}} \times 10^6 \quad \text{ppm}$$

In questo modo lo spostamento chimico  $\delta$ , misurato in ppm (Hz/MHz), è indipendente dal campo applicato, quindi è uguale su tutti gli strumenti indipendentemente dall'intensità del loro campo magnetico.

Per  $^1\text{H}$ -NMR, la scala  $\delta$  generalmente si estende da 0 a 12 ppm; mentre per  $^{13}\text{C}$ -NMR è molto più grande e copre l'intervallo 0-220 ppm. Per quanto riguarda i campioni oggetto della presente Tesi, essi sono stati disciolti in cloroformio deuterato contenente lo 0,03% (v/v) di

tetrametilsilano (TMS), aggiunto come standard interno, in maniera tale da avere una concentrazione del polimero disciolto pari allo 0,5% in peso. Gli spettri  $^1\text{H-NMR}$ , utili per valutare sia la struttura chimica che la composizione dei materiali, oltre che per definire la quantità di HDI da aggiungere in fase di *chain extension*, sono stati acquisiti a temperatura ambiente impiegando uno strumento Varian INOVA 400 MHz, schematizzato in Figura 3.6 (con tempo di rilassamento di 0 s, tempo di acquisizione di 1 s e fino a 100 ripetizioni).

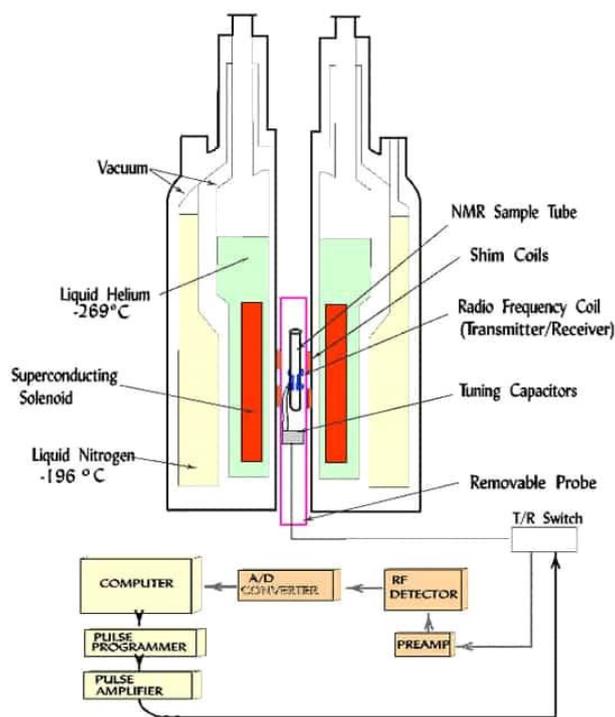


Figura 3.6. Strumentazione NMR.

### 3.2.2 Cromatografia a permeazione su gel (GPC)

La cromatografia a permeazione su gel (GPC) è una tecnica di separazione fisica che consente di determinare la distribuzione del peso molecolare in un polimero. Il metodo di analisi dei campioni si basa sull'acquisizione dei segnali del campione e successivo confronto con curve di taratura realizzate attraverso standard di polimeri a peso molecolare noto. Lo strumento è costituito da una pompa volumetrica, una colonna riempita di particelle porose ed un rivelatore, come illustrato in Figura 3.7.

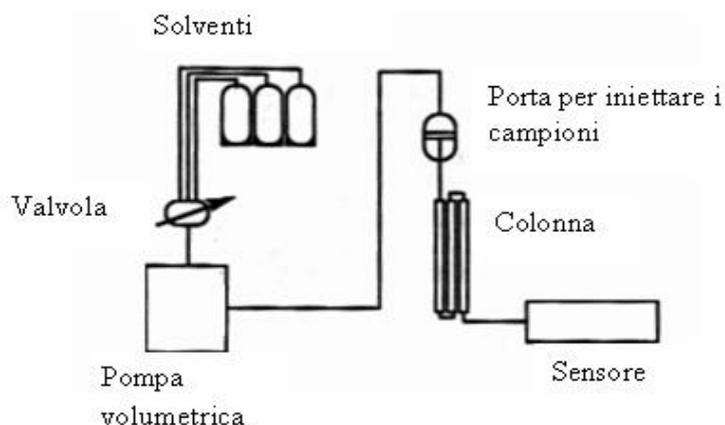


Figura 3.7. Schematizzazione del cromatografo.

Il sistema di funzionamento della GPC prevede di solubilizzare il campione nello stesso solvente che scorre all'interno della colonna, che nel caso di poliesteri alifatici è generalmente cloroformio, ed iniettarlo, dopo filtrazione, all'interno dello strumento. La colonna cromatografica per analisi in GPC è generalmente costituita di particelle di polistirene a granulometria differente impaccate in modo tale da generare una porosità controllata. Gli analiti, una volta iniettati, permeano le porosità della colonna a seconda del loro volume idrodinamico (correlato al peso molecolare). In funzione della frazione di porosità permeata varierà il tempo di ritenzione. Molecole di piccolo peso molecolare permeano tutta la porosità con un tempo di ritenzione lungo. Viceversa, molecole di grandi dimensioni sono escluse dalla porosità e vengono eluite a bassi tempi di ritenzione (limite di esclusione). Molecole intermedie possono permeare parte della porosità con tempi di ritenzione intermedi (Figura 3.8). Il segnale in uscita è misurato da un detector, che è in grado di rilevare istante per istante l'intensità del segnale, proporzionale alla concentrazione del soluto, in funzione del tempo di eluizione. Il detector è generalmente a indice di rifrazione, mentre per campioni che presentano assorbimento nel visibile si può utilizzare un detector UV-Vis. A Partire dal cromatogramma, attraverso un software, è possibile poi risalire alla distribuzione dei pesi molecolari. L'utilizzo di polimeri a peso molecolare noto come standard permette infine la stima del peso molecolare del campione.

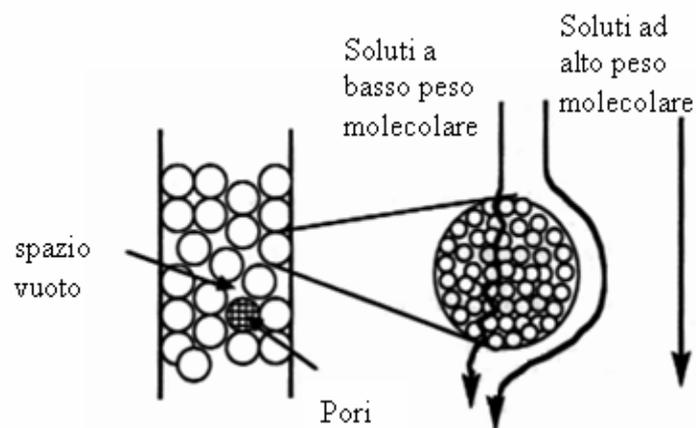


Figura 3.8. Schematizzazione della separazione molecolare.

Le misure di GPC sono state ottenute a 30 °C con un cromatografo HP Series 1100 HPLC per mezzo di una colonna PL gel 5 Mini MIX-C (rapporto lunghezza/diametro in mm interno 250/4.6) (Figura 3.9). I cromatogrammi sono stati registrati con HP Chemstation versione A.05.04 ed elaborati con GPC Calculator 7.6 software sviluppato dalla General Electric Company. Come eluente è stato usato cloroformio (flusso in colonna 0.3 mL/min). Le soluzioni utilizzate erano tutte caratterizzate da una concentrazione di polimero pari a 2 mg/ml. Per costruire la curva di taratura sono stati impiegati vari standard di polistirene con peso molecolare variabile tra 2000 e 100000, usando una curva del terzo ordine.



Figura 3.9. Strumentazione GPC utilizzata.

### 3.3 PREPARAZIONE DI FILM

La preparazione dei film per pressofusione è stata realizzata tramite l'utilizzo di una pressa idraulica da laboratorio (*Carver Laboratory Press*, modello C, USA), dotata di piastre d'alluminio riscaldate e di un sistema di raffreddamento ad acqua (Figura 3.10).



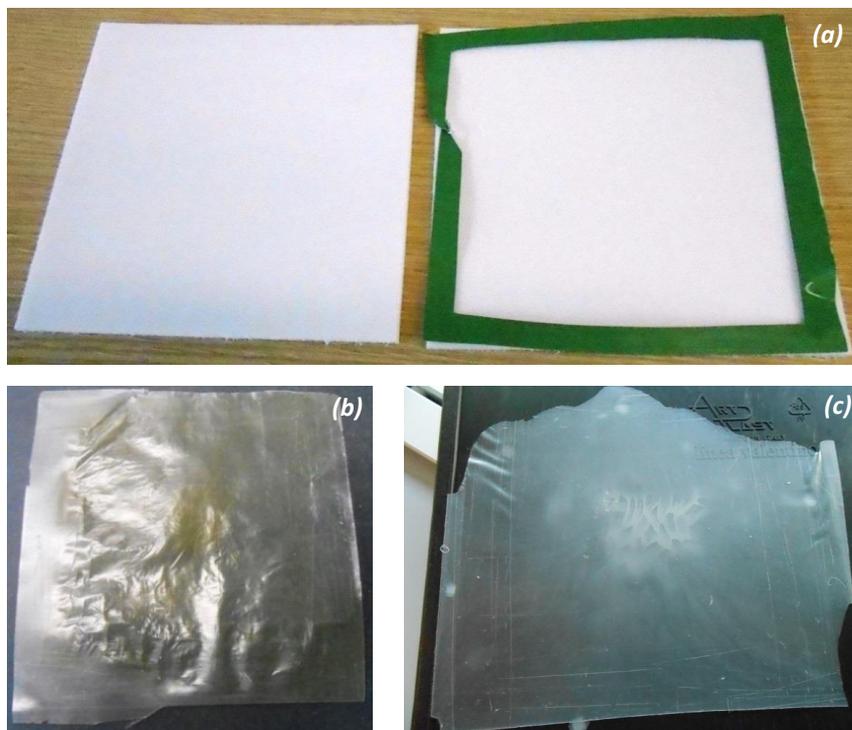
*Figura 3.10. Pressa idraulica usata per lo stampaggio dei film.*

La procedura per lo stampaggio dei film è la seguente (Figura 3.11):

- 1) Tra le due piastre di teflon dove andrà collocato il polimero da sottoporre a filmatura si inserisce una maschera d'alluminio teflonato necessaria per assicurare uno spessore uniforme del film;
- 2) Si dispongono al centro della piastra inferiore circa 2,2 g di polimero cercando di compattare il più possibile il materiale per evitare la formazione di spazi vuoti e di conseguenza la formazione di bolle nel film polimerico;
- 3) S'impone sul sistema di riscaldamento delle piastre una temperatura di circa 40°C superiore alla temperatura di fusione ( $T_m$ );
- 4) Quando la temperatura è stata raggiunta, si inseriscono le due piastre di teflon con all'interno il polimero. Si deve mantenere compatto il materiale e non muovere il bordo della maschera in alluminio teflonato per evitare irregolarità nel film.

- 5) Azionando una leva collegata ad un pistone idraulico si esercita una pressione fino a che le due piastre riscaldanti non stringono leggermente le piastre in teflon. Questa operazione è necessaria per fondere inizialmente il polimero e l'indice del manometro della pressione di carico deve essere ancora sullo 0. Questa operazione dura circa 2 minuti;
- 6) Si esercita, per mezzo della leva idraulica, una pressione di  $2 \text{ ton/m}^2$  per 4 minuti;
- 7) Successivamente si spegne il sistema di riscaldamento e si apre il rubinetto dell'acqua per il raffreddamento delle piastre.

Per garantire una maggiore cristallinità e quindi stabilità dei film, questi ultimi non vengono subito staccati dalle lastre di teflon.



*Figura 3.11. (a) maschera in alluminio teflonato (verde) e piastre in teflon (bianche); (b) film copolimerico ottenuto dopo lo stampaggio; (c) film di solo PLLA.*

Dopo aver realizzato tutti i film, i campioni sono posti in un essiccatore a temperatura ambiente per due settimane per permettere ai polimeri di raggiungere la cristallinità di equilibrio.

### 3.4 CARATTERIZZAZIONE TERMICA

#### 3.4.1 Analisi Termogravimetrica (TGA)

Attraverso l'analisi termogravimetrica si ottengono informazioni sia sulla cinetica del processo di decomposizione che sulla stabilità termica del materiale. Tali informazioni sono di fondamentale importanza per definire il valore di temperatura che non deve essere oltrepassato nel trattamento del polimero, per non incorrere nella sua degradazione. La tecnica si avvale nella determinazione delle variazioni di peso del campione quando è sottoposto ad un graduale aumento di temperatura, in atmosfera controllata ( $N_2$ ,  $O_2$ , aria). I cambiamenti di peso sono dovuti a perdite di sostanze volatili in seguito a processi fisici o chimici che modificano la natura del composto. Nel caso dei polimeri, i prodotti di decomposizione sono  $CO_2$  e acqua, ed il termogramma ha il tipico andamento riportato in Figura 3.12.

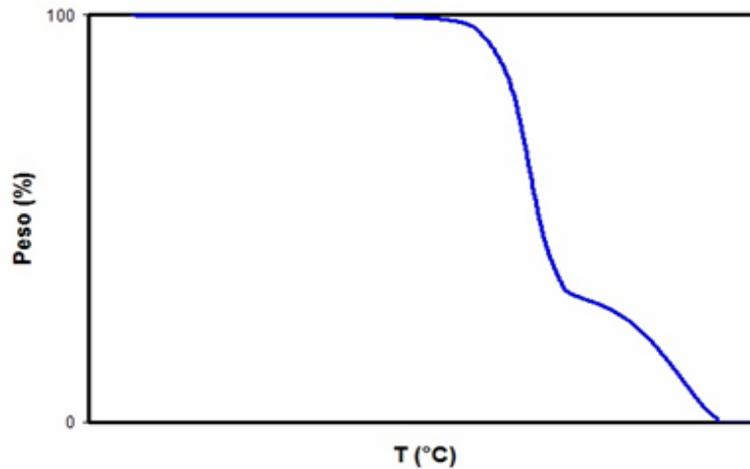


Figura 3.12. Esempio di termogramma.

La strumentazione utilizzata per la termogravimetria è composta da quattro parti: una bilancia termica, un forno, un sistema di gas di spurgo che assicura un ambiente inerte o reattivo a seconda del caso, ed un computer per il controllo dello strumento (Figura 3.13).

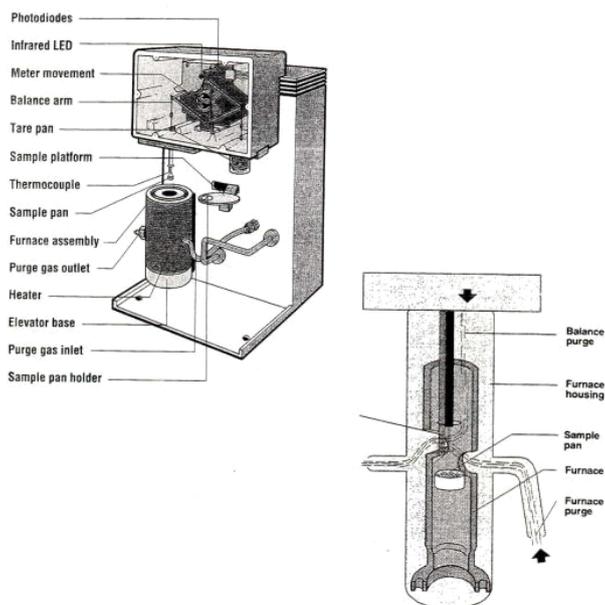


Figura 3.13. Schematizzazione della strumentazione TGA.

Tra le informazioni di maggiore importanza che possono essere dedotte vi sono:

- $T_{id}$ : temperatura in corrispondenza della quale inizia il processo di decomposizione;
- $T_{max}$ : temperatura alla quale si ha la massima velocità di perdita di peso.

Le curve TGA sono state ottenute usando la bilancia termogravimetrica PerkinElmer TGA 4000, in atmosfera di azoto partendo da circa 5 mg di campione. La velocità di riscaldamento impostata è di 10 °C/min e la temperatura varia nell'intervallo [40-800 °C].

### 3.4.2. Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC)

La calorimetria a scansione differenziale è una tecnica utilizzata per studiare le transizioni termiche dei materiali e determinarne le proprietà termodinamiche, in particolare temperatura di transizione vetrosa, calore associato alla transizione vetrosa, punto di fusione e calore di fusione. Il principio di base consiste nel ricavare informazioni sul materiale attraverso un riscaldamento (o raffreddamento) controllato, ed il confronto con un riferimento sottoposto al medesimo programma termico.

La macchina (Figura 3.14) viene predisposta mettendo sugli alloggiamenti due crogioli identici scelti in modo da resistere alle temperature di prova senza interagire con il campione in esame. Uno dei due crogioli rimarrà vuoto, in quanto servirà come riferimento per la misura

differenziale. Le due celle costituiscono dei microcalorimetri che, durante l'analisi, vengono mantenuti in atmosfera di azoto inerte. Durante tutto l'arco dell'esperimento, un sistema di termocoppie raccoglie i dati di temperatura e li invia ad un elaboratore, che mediante un apposito software li elabora per generare l'output.

Durante la scansione, quando non si verificano fenomeni di transizione di fase, campione e riferimento rimangono alla stessa temperatura; in caso contrario, si verificano degli squilibri termici, che vengono misurati dalle termoresistenze. Queste sono responsabili della regolazione della potenza elettrica fornita ai microcalorimetri: il flusso di energia che viene fornito o sottratto è finalizzato a riportare il campione ed il riferimento alla medesima temperatura.

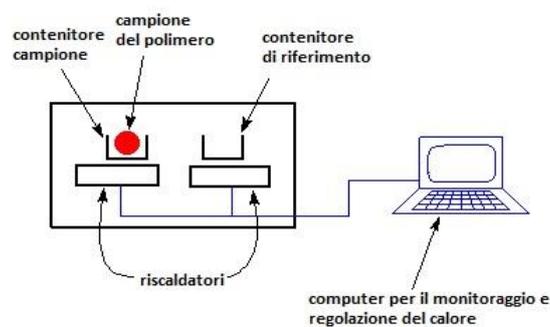


Figura 3.14. Schematizzazione degli alloggiamenti del DSC.

Per quanto riguarda l'analisi della curva calorimetrica, di cui un esempio è riportato in Figura 3.15, è possibile operare in modalità *endo-up* o *endo-down*; nel caso si operi in *endo-up*, per la fusione (fenomeno endotermico), lungo la curva si osserverà un picco rivolto verso l'alto che corrisponde all'aumento del flusso di calore in quanto, oltre una certa temperatura, l'agitazione molecolare è tale da vincere le forze di coesione nei cristalli, i quali fondono assorbendo calore. Per la cristallizzazione (fenomeno esotermico), si osserverà invece un picco rivolto verso il basso che corrisponde alla diminuzione del flusso di calore in quanto il materiale, ricristallizzando, cede energia. L'area sottesa al picco di fusione corrisponde al calore di fusione  $\Delta H_m$  [J/g], un parametro direttamente proporzionale al grado di cristallinità del polimero. Il rapporto tra quest'ultima grandezza ed il calore di fusione del polimero completamente cristallino costituisce il grado di cristallinità del materiale.

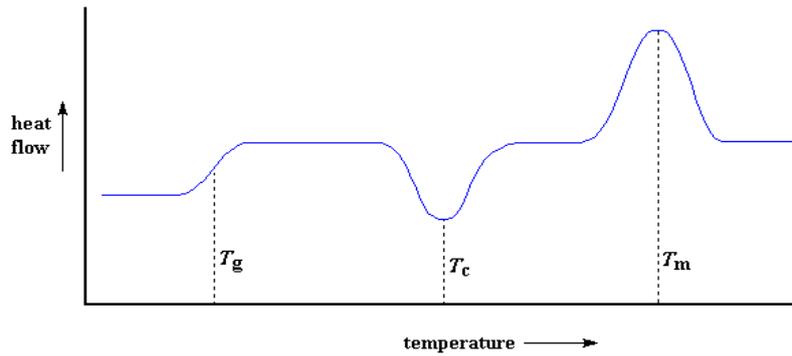


Figura 3.15. Esempio di curva calorimetrica.

È inoltre possibile osservare la temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ), un parametro caratteristico dei solidi polimerici, rappresentante la soglia termica oltre la quale si verifica il passaggio dallo stato vetroso a quello gommoso, in cui sono permessi i movimenti di torsione e rotazione all'interno della catena polimerica. Si manifesta come una variazione endotermica 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). 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 da cui si estrapola la  $T_g$ :

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

dove  $(dT/dt)^{-1}$  è la velocità di scansione.

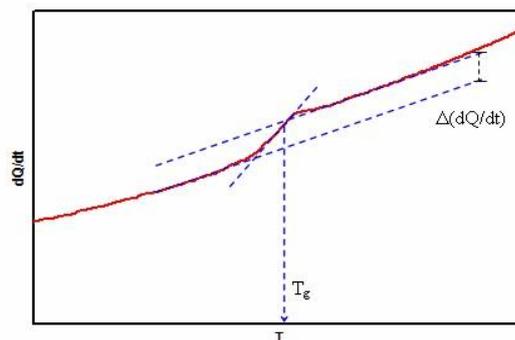


Figura 3.16. Calcolo della  $T_g$ .

La temperatura di fusione ( $T_m$ ) è una transizione termodinamica di primo ordine, che si presenta come un picco endotermico e costituisce la soglia termica alla quale si verifica il passaggio da polimero solido a polimero fuso (Figura 3.17). Il valore di  $T_m$  si riferisce all'ascissa del picco, mentre l'area sottesa ad esso, proporzionale alla cristallinità del polimero, corrisponde al calore di fusione  $\Delta H_m$  (J/g). Il rapporto tra quest'ultima grandezza ed il calore di fusione del polimero completamente cristallino costituisce il grado di cristallinità del materiale.

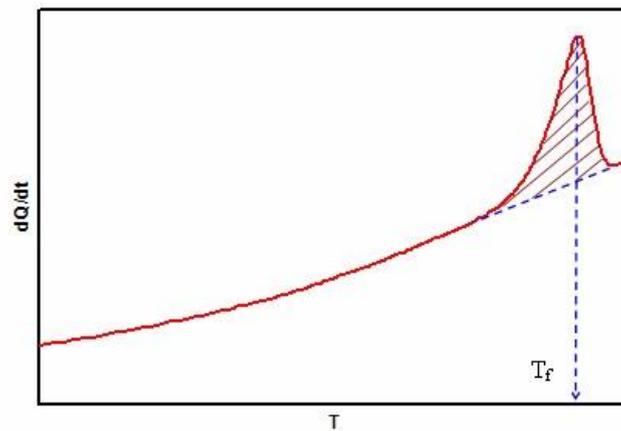


Figura 3.17. Calcolo della  $T_m$ .

Se il polimero tende a formare delle strutture ordinate (cristalliti) si ha una cessione di calore da parte del materiale ( $\lambda$  cristallizzazione) che si evidenzia con una variazione esotermica della linea di base, come mostrato in Figura 3.18, alla cui ascissa di picco viene fatta corrispondere la temperatura di cristallizzazione  $T_c$ .

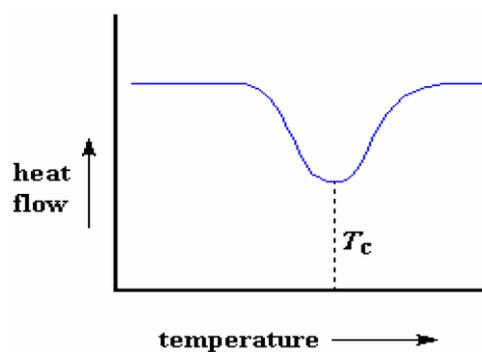


Figura 3.18. Calcolo della  $T_c$ .

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 (Figura 3.19).

La capsula contenente il campione è stata riempita con circa 10 mg di materiale e, insieme alla capsula di riferimento 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 (una temperatura superiore di circa 40 °C a quella di fusione del materiale in esame) con velocità di 20 °C/min, raffreddamento rapido con velocità di 100 °C/min fino a -70 °C;
- seconda scansione: riscaldamento in analoghe condizioni di temperatura e velocità.



*Figura 3.19. Strumentazione DSC utilizzata.*

### 3.5 ANALISI DIFFRATTOMETRICA A RAGGI X (WAXS)

La diffrazione a Raggi X (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.

Il diffrattometro è costituito da un tubo generatore di raggi X, alcuni filtri monocromatori (che isolano una specifica lunghezza d'onda utile  $\lambda$ ) e collimatori, per convogliare le onde elettromagnetiche prodotte in una direzione preferenziale, un piatto porta-campione che viene investito dal fascio di onde, uno specchio monocromatore secondario e, infine, un rivelatore.

Il principio di funzionamento della diffrattometria si basa sulla legge di Bragg:

$$n\lambda = 2d\sin(\theta),$$

dove  $n$  è un numero intero,  $\lambda$  è la lunghezza d'onda del raggio,  $d$  è la distanza tra i piani reticolari e  $\theta$  è l'angolo di incidenza (Figura 3.20). Questa formula descrive l'interazione tra il piano cristallino e la radiazione incidente, nelle ipotesi che i raggi incidenti siano tutti paralleli ed in fase tra loro, in modo da creare un'interferenza costruttiva, e permette di determinare la distanza di legame  $d$ , conoscendo la lunghezza d'onda selezionata e misurando l'angolo di incidenza.

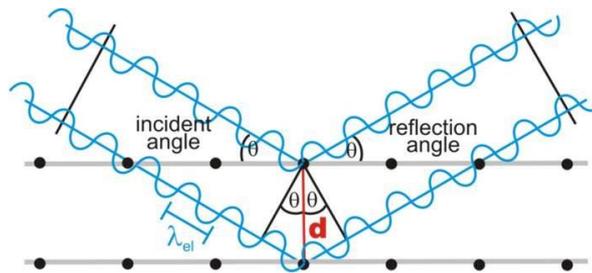


Figura 3.20. Legge di Bragg.

I pattern di diffrazione a raggi X sono stati ottenuti utilizzando un diffrattometro PANalytical X'PertPro equipaggiato con un rivelatore allo stato solido X'Celerator, che utilizza la  $\lambda$  del rame ( $\lambda = 0,15418$  nm), schematizzato in Figura 3.21. La frequenza in ascissa dei dati è descritta dal passo di  $0,10^\circ$  sul range  $[5-60^\circ]$  nell'intervallo  $2\theta$ .

Gli indici di cristallinità  $\chi_c$  si ricavano applicando la formula:

$$\chi_c = A_c/A_t,$$

dove  $A_c$  rappresenta l'area di diffrazione cristallina e  $A_t$  l'area totale del profilo di diffrazione.  $A_c$  è stata calcolata sottraendo all' $A_t$  la componente amorfa, modellata e approssimata come picco a campana sulla linea di base. È stato inoltre considerato lo scattering non coerente.

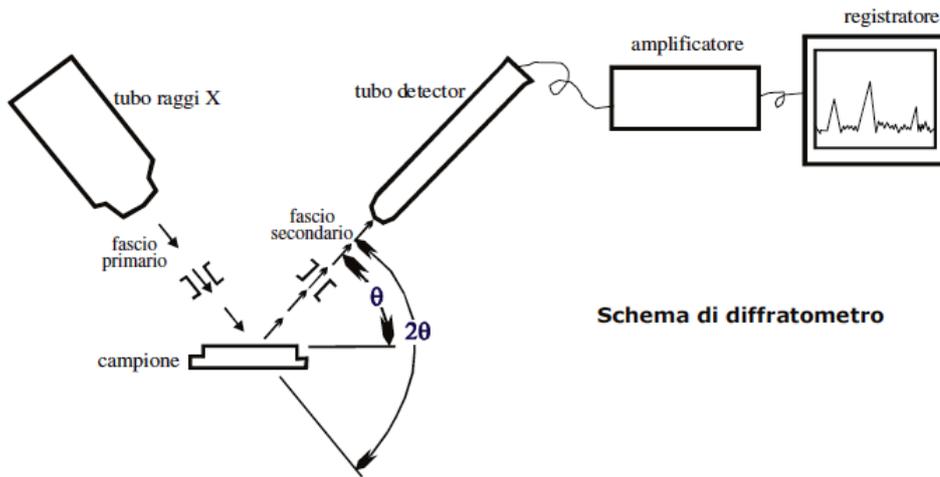


Figura 3.21. Schematizzazione di un diffrattometro.

### 3.6 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA

Le misure di resistenza meccanica permettono di studiare il comportamento dei materiali polimerici in presenza di sollecitazioni meccaniche di diverso tipo. Per quanto riguarda le prove tensili, nelle quali il provino viene sottoposto a trazione, si possono definire due diversi valori:

- *stress* (o tensione,  $\sigma$ ): rapporto tra il carico applicato in direzione normale  $N$  e l'area della sezione del provino resistente a riposo,  $A$ :

$$\sigma = N/A$$

- *strain* (deformazione,  $\varepsilon$ ): indica l'allungamento del provino, indicato con  $\Delta l$ , rapportato alla lunghezza iniziale  $l$ :

$$\varepsilon = \Delta l/l$$

La strumentazione con cui si effettuano queste prove è costituita da un dinamometro schematizzabile in alcuni sottocomponenti (Figura 3.22):

- una base rigida con aggancio rigido;
- due aste laterali di sostegno;
- una traversa orizzontale con aggancio superiore che può spostarsi verticalmente lungo le barre laterali;

- un attuatore meccanico che controlla il moto della struttura superiore;
- un pannello di controllo;
- un visualizzatore a video.

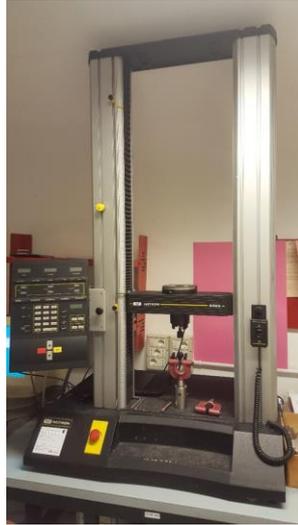


Figura 3.22. Strumentazione per prove meccaniche.

Il carico viene applicato dall'attuatore e concretizzato nel movimento verso l'alto della traversa; durante la prova viene misurato il valore dell'allungamento in funzione del carico applicato e i risultati vengono poi importati su un diagramma che presenta in ascissa  $\epsilon$  ed in ordinata  $\sigma$ , al fine di tracciare la curva sforzo-deformazione, caratteristica del materiale. Un tipico andamento, nel caso di materiali polimerici, è riportato in Figura 3.23.

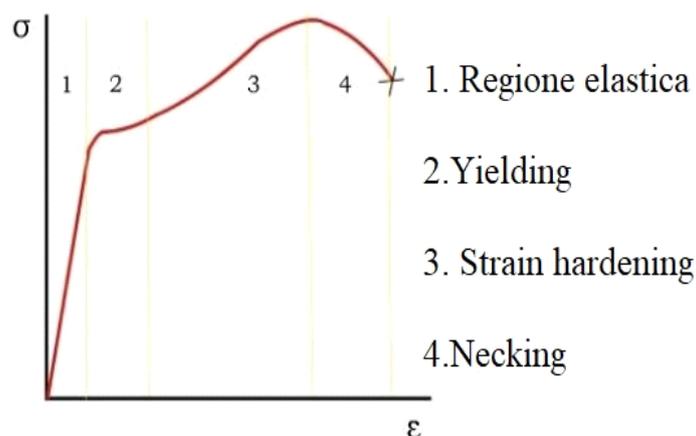


Figura 3.23. Esempio di curva sforzo-deformazione per materiali duttili.

Questo grafico è costituito da quattro diverse zone: regione elastica, punto di snervamento (*yielding*), zona di *strain hardening* e infine di strizione (*necking*). Nel primo tratto, detto campo

elastico, la curva risulta essere lineare in quanto il materiale segue, fino al raggiungimento di un punto detto limite elastico, la legge di Hooke:

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

La costante di proporzionalità  $E$  indica il modulo elastico, o modulo di Young, il cui valore corrisponde, per definizione, alla pendenza del tratto iniziale rettilineo della curva sforzo-deformazione. In corrispondenza di carichi contenuti all'interno di questo primo tratto, il materiale presenta allungamenti elastici, cioè reversibili una volta che il carico viene riportato a zero. All'aumentare della deformazione si entra nella regione plastica, in cui la deformazione subita dal materiale è permanente e irreversibile anche a seguito della rimozione del carico; il punto in corrispondenza del quale avviene il passaggio tra le due regioni è detto di snervamento (*yielding*), ed è causato dallo scorrimento dei piani reticolari all'interno del materiale. Successivamente si riscontra la zona di *strain hardening* in cui sia l'allungamento che la tensione crescono, fino a raggiungere un apice corrispondente alla tensione di rottura ( $\sigma_{rott}$ ). Il campo plastico viene infine completato dall'ultimo tratto, detto regione di strizione (o *necking*) in cui tipicamente la tensione diminuisce ma la deformazione continua e si rende più marcata in un punto particolare del provino (collo di strizione). L'ultimo punto della curva è detto punto di rottura.

Naturalmente questa descrizione è applicabile ai soli materiali duttili, poiché i materiali fragili sono caratterizzati da un unico tratto rettilineo, che termina nel punto di rottura.

Un'ulteriore informazione che si può ricavare misurando l'area sottesa all'intera curva è la tenacità, che è una misura dell'energia necessaria per portare a rottura il materiale. Occorre tenere presente che i dati ottenuti, oltre ad essere funzione del materiale utilizzato nel test, risentono anche delle condizioni ambientali, quali temperatura e umidità, e delle condizioni sperimentali, come velocità di scorrimento, forma e dimensioni dei provini.

Le prove a trazione oggetto della presente Tesi sono state effettuate utilizzando una macchina di prova Zwick Roell Texture dotata di una cella di carico 500N, su film rettangolari larghezza 5 mm, lunghezza 50 mm e spessore circa 0,2 mm. I campioni sono stati fissati mediante opportuni aggraffaggi in maniera tale che la lunghezza del tratto utile fosse di 23 mm, ed è stato applicato un precarico di 1 MPa alla velocità di 5,0 mm/min. Le prove sono state condotte alla velocità di 50 mm/min, fino a rottura. Il modulo elastico è stato determinato dalla pendenza del tratto lineare iniziale della curva sforzo-deformazione. Per ogni campione sono stati eseguiti sei replicati e i risultati sono stati forniti come valore medio  $\pm$  deviazione standard.

### 3.7 STUDI DI DEGRADAZIONE IDROLITICA

Le prove di degradazione idrolitica permettono di testare il comportamento dei polimeri, in particolare la loro velocità di degradazione, in condizioni che simulano l'ambiente corporeo. Gli esperimenti di degradazione idrolitica sono stati condotti, in condizioni di temperatura e pH fisiologici (37°C e pH 7.4), su film dalle dimensioni di 10x35 mm, realizzati a partire dall'omopolimero PLLA e dai diversi copolimeri. I campioni sono stati dapprima mantenuti in essiccatore per una settimana e pesati, al fine di ricavare il peso iniziale, ed in un secondo momento immersi in una soluzione acquosa tamponata a pH 7.4 con tampone fosfato. Essi sono stati dunque mantenuti in agitazione ad una temperatura costante di 37 °C per periodi di tempo variabili, all'interno di un bagno termostatico (Julabo SW22) con scuotitore azionato alla frequenza di 50 giri/minuto. La soluzione tampone, cambiata periodicamente per mantenere costante il pH, è stata preparata seguendo la procedura di seguito riportata: in 800ml di acqua distillata, sono stati disciolti 8g di NaCl, 0.2g di KCl, 1.44g di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0.24g di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; il pH della soluzione è stato aggiustato al valore di 7.4 per aggiunta di HCl e il volume finale portato ad 1 litro. Da ultimo la soluzione è stata sottoposta a sterilizzazione in autoclave, a 121°C per circa 20 minuti, al fine di evitare la crescita di microorganismi al suo interno.

Al fine di analizzare le conseguenze legate al processo degradativo, periodicamente sono stati effettuati prelievi, in duplicato, dei diversi campioni: essi sono stati rimossi dalla soluzione, lavati con acqua distillata per eliminare i sali della soluzione tampone, asciugati con carta assorbente ed essiccati sottovuoto a temperatura ambiente, fino alla completa eliminazione dell'acqua residua e al raggiungimento di un peso costante. Al termine di questa procedura, i campioni parzialmente degradati sono stati pesati e analizzati mediante cromatografia a permeazione su gel (GPC), per poter valutare, oltre alla perdita di peso gravimetrica, anche variazioni relative al peso molecolare.

## CAPITOLO 4:

### RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 4.1 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

Nella Parte Sperimentale sono riportate le condizioni di sintesi dell'omopolimero PLLA e dei copolimeri  $PLLA_mP(BS80BAz20)_n$ , dove  $m$  e  $n$  rappresentano rispettivamente la % in peso di unità comonomeriche di PLLA e  $P(BS80BAz20)$ . La struttura chimica dei copolimeri ad alto peso molecolare è riportata in Figura 4.1.

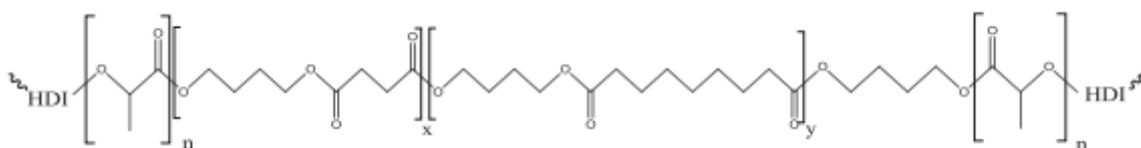


Figura 4.1. Struttura chimica dei copolimeri triblocco  $PLLA_mP(BS80BAz20)_n$ .

Per quanto riguarda il copolimero random idrossil-terminato  $P(BS80BAz20)$ , la sua struttura chimica, la composizione ed il peso molecolare sono stati determinati mediante spettroscopia  $^1H$ -NMR. In Figura 4.2 è mostrato lo spettro  $^1H$ -NMR del  $P(BS80BAz20)$ : come si può notare, lo spettro ottenuto è risultato coerente con la struttura. In particolare, è possibile riconoscere i picchi relativi ai protoni metilenici della subunità glicolica  $a$  (4H, tripletto) e  $b$  (4H, multipletto), collocati rispettivamente a  $\delta$  4.12 ppm e 1.72 ppm. Il singoletto  $c$  relativo alla subunità succinica si trova a  $\delta$  2.63 ppm. Per quanto riguarda la subunità azelaica, invece, i segnali  $d$  (4H, tripletto),  $e$ ,  $f$  e  $g$  (4H, multipletti) sono collocati rispettivamente a  $\delta$  2.28 ppm, 1.62 ppm e 1.33 ppm. Insieme ai segnali dei protoni alifatici relativi alle unità ripetitive interne, è possibile notare i picchi relativi ai protoni dei terminali glicolici  $a'$  (2H, tripletto). La composizione effettiva, calcolata dalle aree dei picchi relativi alla subunità succinica  $c$  e alla subunità azelaica  $d$ , è risultata molto simile a quella di alimentazione.

Il grado di polimerizzazione (DP) è stato calcolato dalle aree relative ai protoni *a* dei butandioli centrali (Ia) e ai protoni *a'* relativi ai butandioli terminali (Ia') come segue:

$$DP = [(Ia / 2 + Ia') \cdot 2] / Ia'$$

Il peso molecolare del copolimero ( $M_n$ ) è stato ottenuto secondo la seguente formula:

$$M_n = DP \cdot (M_{BS} \cdot BS + M_{BAz} \cdot BAz)$$

dove  $M_{BS}$  è il peso molecolare dell'unità ripetitiva butilene succinato,  $M_{BAz}$  è il peso molecolare dell'unità ripetitiva butilene azelato, BS e BAz sono rispettivamente le percentuali effettive di butilene succinato e butilene azelato presenti. Il peso molecolare calcolato attraverso tale procedura è risultato di 6400 g/mol. Da questo valore, assumendo che la maggior parte delle catene fosse idrossil-terminata, è stato possibile ricavare il numero di moli di terminali -OH per unità di massa e, di conseguenza, la quantità di estensore di catena HDI necessaria per le reazioni di estensione di catena.

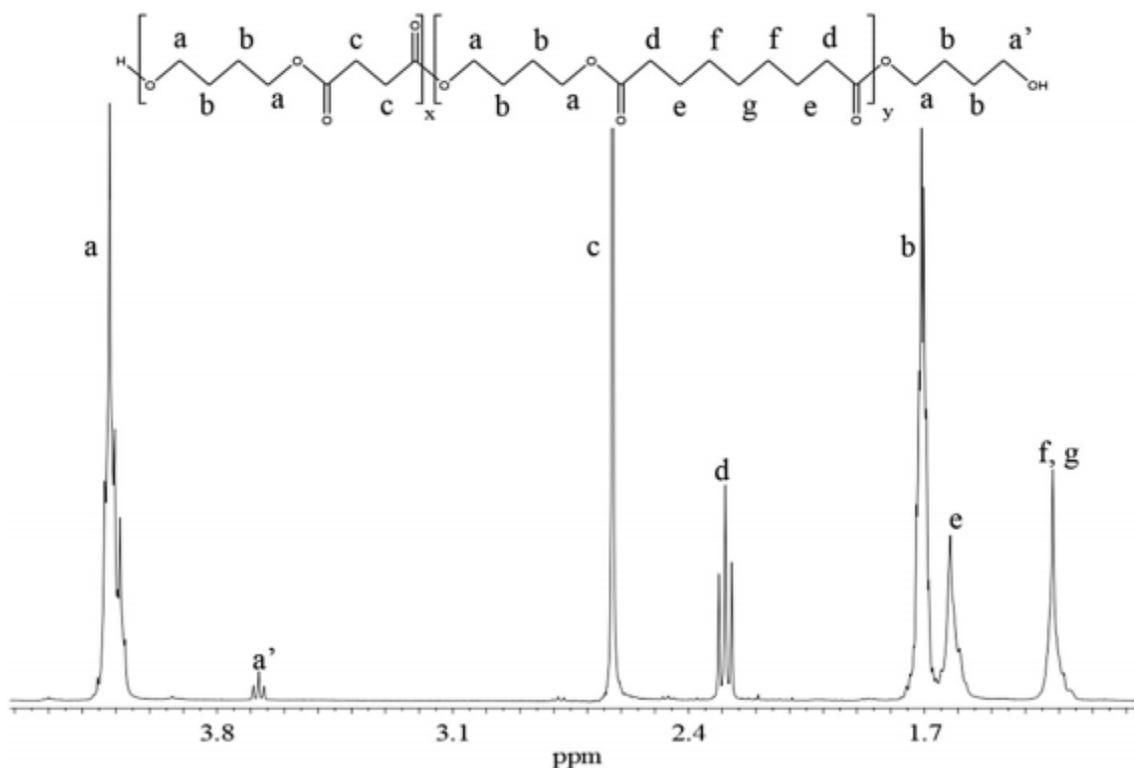


Figura 4.2. Spettro  $^1H$ -NMR del copolimero idrossil terminato P(BS80BAz20) con attribuzione dei picchi.

Per quanto riguarda i campioni ad alto peso molecolare sintetizzati, essi si presentano come solidi semicristallini di colore giallo chiaro e sono caratterizzati da una buona solubilità nei più comuni solventi organici, quali cloroformio, diclorometano e tetracloroetano.

I campioni in oggetto sono riportati in Tabella 4.1.

Tabella 4.1. Dati di composizione chimica e di peso molecolare dell'omopolimero PLLA e dei copolimeri PLLA<sub>m</sub>P(BS80BAz20)<sub>n</sub>, ottenuti mediante <sup>1</sup>H-NMR e GPC.

Polimeri	Mn <sup>a</sup> (g/mol)	D <sup>a</sup>	wt% PLA (feed)	wt% PLA <sup>b</sup>	mol% HDI <sup>b</sup>
PLLA <sub>18</sub> P(BS80BAz20) <sub>82</sub>	26800	2.5	15	18	3
PLLA <sub>32</sub> P(BS80BAz20) <sub>68</sub>	40500	2.4	30	32	4
PLLA <sub>61</sub> P(BS80BAz20) <sub>39</sub>	39800	2.1	60	61	3
PLLA <sub>73</sub> P(BS80BAz20) <sub>27</sub>	40300	3.1	75	73	5
PLLA	40500	1.9	100	100	4

Tabella 4.1 <sup>a</sup> analisi GPC, <sup>b</sup> analisi <sup>1</sup>H-NMR

Tutti gli spettri sono risultati coerenti con la struttura prevista, e non è stata rilevata la presenza di HDI non reagito. A titolo di esempio, lo spettro <sup>1</sup>H-NMR del copolimero triblocco PLLA<sub>32</sub>P(BS80BAz20)<sub>68</sub> è riportato in Figura 4.3. Insieme ai segnali relativi al copolimero idrossil terminato P(BS80BAz20) è possibile individuare anche i segnali della co-unità L-lattide *h* (1H, quadrupletto) e *i* (3H, doppietto), collocati rispettivamente a δ 5,15 ppm e 1,6 ppm, insieme ai segnali relativi ai protoni dell'estensore di catena HDI, collocati a δ 3,18 ppm, 1,34 ppm e 1,25 ppm.

La composizione effettiva, calcolata dalle aree relative ai protoni *c* della subunità succinica (δ 2,62 ppm) ed al quadrupletto *h* dell'unità L-lattico (δ 5,18 ppm), è risultata vicina a quella di alimentazione. In tutti i casi la quantità di HDI è risultata inferiore al 5%.

In Tabella 4.1 sono riportati anche i dati di peso molecolare ottenuti da GPC. Come atteso, i campioni sono caratterizzati da un peso molecolare M<sub>n</sub> più elevato rispetto al prepolimero P(BS80BAz20), e da una polidispersità D piuttosto ridotta, ad indicare un buon controllo sia sulla polimerizzazione per apertura d'anello sia sulla *chain extension*.

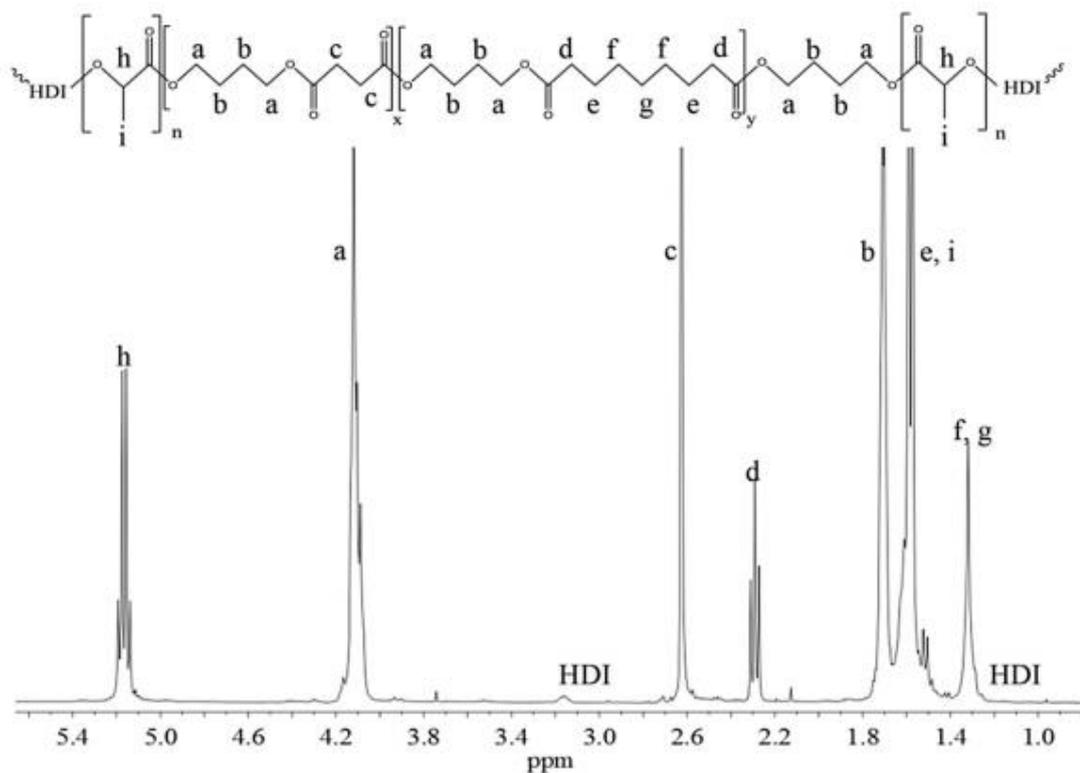


Figura 4.3. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del copolimero triblocco  $\text{PLLA}_{32}\text{P}(\text{BS80BAz20})_{68}$  con attribuzione dei picchi.

#### 4.2 CARATTERIZZAZIONE TERMICA E DIFFRATTOMETRICA

I copolimeri triblocco  $\text{PLLA}_m\text{P}(\text{BS80BAz20})_n$  sono stati sottoposti ad analisi termogravimetrica in atmosfera controllata di azoto; le temperature corrispondenti alla perdita di peso iniziale ( $T_{id}$ ) sono state determinate dalle curve termogravimetriche riportate in Figura 4.4 e raccolte nella Tabella 4.2. Come mostrato in Figura 4.4, l'omopolimero PLLA risulta essere meno stabile termicamente rispetto ai copolimeri triblocco. Questo effetto potrebbe essere dovuto alla maggiore densità di gruppi di esteri per unità ripetitiva nelle catene di PLLA rispetto a quelle di  $\text{P}(\text{BS80BAz20})$ . Per quanto riguarda i copolimeri triblocco, il processo di degradazione termica si è verificato in due stadi. L'altezza relativa dei due step dipende chiaramente dalla composizione: in particolare, più alto è il contenuto di PLLA, più intenso è il primo step di perdita di peso. Ad ogni modo, la temperatura corrispondente all'inizio della degradazione dei copolimeri è risultata paragonabile a quella dell'omopolimero PLLA.

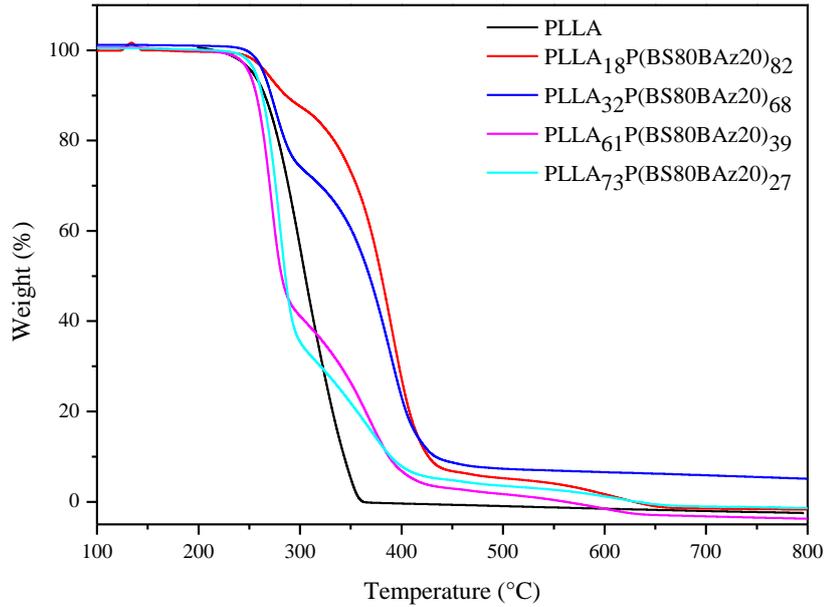


Figura 4.4. Curve termogravimetriche dell'omopolimero PLLA e dei copolimeri triblocco  $PLLA_mP(BS80BAz20)_n$  ( $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ).

Prima di ulteriori caratterizzazioni, i polimeri sottoposti a stampaggio a compressione sono stati conservati a temperatura ambiente per un mese al fine di raggiungere la cristallinità di equilibrio. Un periodo di 30 giorni si è dimostrato infatti appropriato per rendere uniforme la storia termica dei materiali in esame. I tracciati DSC di questi film sono riportati in Figura 4.5, mentre i dati calorimetrici ottenuti sono raccolti in Tabella 4.2.

Polimeri	<i>I scan</i>									
	$T_{id}$ °C	$T_g$ °C	$\Delta c_p$ J/°C g	$T_{m,BS}$ °C	$\Delta H_{m,BS}$ J/g	$T_c$ °C	$\Delta H_c$ J/g	$T_{m,PLA}$ °C	$\Delta H_{m,PLA}$ J/g	$X_c, DSC$ %
PLLA <sub>18</sub> P(BS80BAz20) <sub>82</sub>	252	-26 43	0.376 0.171	86	28	--	--	--	--	26
PLLA <sub>32</sub> P(BS80BAz20) <sub>68</sub>	258	-5 41	0.201 0.170	81	17	90	4	132	6	18
PLLA <sub>61</sub> P(BS80BAz20) <sub>39</sub>	256	44	0.189	--	--	88	12	141	11	20
PLLA <sub>73</sub> P(BS80BAz20) <sub>27</sub>	255	53	0.162	--	--	91	10	153	32	24
PLLA	265	61	0.460	--	--	--	--	170	40	43

Tabella 4.2. Dati di caratterizzazione termica ottenuti mediante analisi TGA e DSC (*I scan*).

Le curve calorimetriche del sistema in esame dimostrano che il comportamento termico dei campioni  $PLLA_mP(BS80BAz20)_n$  dipende profondamente dal rapporto ponderale tra i blocchi *hard* e quelli *soft*.

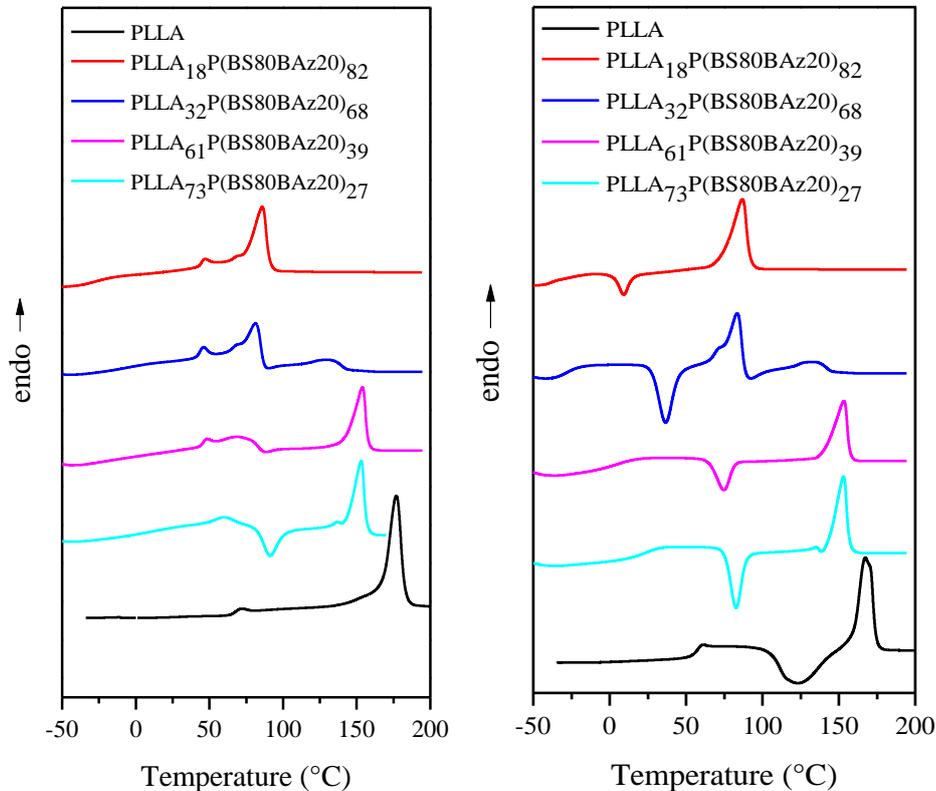


Figura 4.5. Curve calorimetriche dell'omopolimero PLLA e dei copolimeri triblocco  $PLLA_mP(BS80BAz20)_n$ . A sinistra: I scan; a destra: II scan dopo quenching da fuso ( $20\text{ }^\circ\text{C/min}$ ).

Per quanto riguarda la prima scansione, tutti i materiali in esame presentano il tipico comportamento dei materiali semicristallini, con almeno un picco endotermico di fusione ed una variazione endotermica della linea di base associata alla transizione vetrosa. Nel caso dei campioni contenenti la maggiore quantità di blocco *soft*, ovvero  $PLLA_{18}P(BS80BAz20)_{82}$  e  $PLLA_{32}P(BS80BAz20)_{68}$ , è possibile osservare due transizioni vetrose, ad indicare una separazione di fase nello stato amorfo che porta alla formazione di una fase ricca in  $P(BS80BAz20)$ , associabile al valore più basso di  $T_g$ , e un'altra ricca in PLLA, responsabile della transizione vetrosa a più alta temperatura (Tabella 4.2). Viceversa, per i copolimeri contenenti le più alte quantità di PLLA, è possibile osservare una sola transizione vetrosa, quindi una sola  $T_g$ , legata alla fase ricca in PLLA: probabilmente, la quantità di blocco  $P(BS80BAz20)$  è troppo bassa perché sia possibile vedere la  $T_g$  associata a questa fase (Tabella

4.2). Per quanto riguarda il fenomeno di fusione, nel caso dell'omopolimero PLLA il picco di fusione si trova ad elevata temperatura (170 °C), ed il calore associato a tale transizione è consistente, mentre tutti i copolimeri mostrano temperature di fusione ed entalpie di fusione inferiori (Figura 4.5a): in particolare, all'aumentare della quantità di segmenti *soft*, il picco di fusione si sposta verso temperature più basse. Infatti, un maggiore contenuto di blocco P(BS80BAz20) porta alla formazione di cristalli con un grado di perfezione inferiore. Parallelamente, una diminuzione della quantità di fase *hard* implica una diminuzione dell'entalpia di fusione legata ad un minore grado di cristallinità (Tabella 4.2). Occorre infine osservare che, nel caso dei copolimeri PLLA<sub>18</sub>P(BS80BAz20)<sub>82</sub> e PLLA<sub>32</sub>P(BS80BAz20)<sub>68</sub> è possibile osservare un secondo fenomeno endotermico a più basse temperature (Figura 4.5 sinistra). Infine, tutti i copolimeri triblocco, ad eccezione del campione PLLA<sub>18</sub>P(BS80BAz20)<sub>82</sub>, sono in grado di cristallizzare in scansione. Ad ogni modo, le entalpie associate al fenomeno di cristallizzazione sono sempre minori rispetto a quelle associate alla fusione, ad ulteriore riprova del fatto che tutti i materiali sono semicristallini.

Per quanto concerne il grado di cristallinità  $X_{c,DSC}$ , è stato calcolato a partire dalle curve calorimetriche in accordo con la seguente equazione:

$$X_{c,DSC} = (\Delta H_m / \Delta H_m^0) \cdot 100$$

dove  $\Delta H_m$  è il valore di entalpia di fusione misurata in prima scansione, mentre  $\Delta H_m^0$  è il valore teorico di entalpia di fusione di campioni di PLLA e PBS 100% cristallini (rispettivamente 93 e 110,3 J/g).

Come è possibile notare dai valori riportati in Tabella 4.2, il PLLA è il materiale caratterizzato da un più elevato grado di cristallinità, mentre i copolimeri, ad eccezione di PLLA<sub>18</sub>P(BS80BAz20)<sub>82</sub>, presentano valori di cristallinità minore al diminuire della quantità di blocco PLLA. Nel campione PLLA<sub>18</sub>P(BS80BAz20)<sub>82</sub> la maggiore cristallinità può essere spiegata considerando che è possibile lo sviluppo di un'ulteriore fase cristallina, oltre a quella del PLLA (Tabella 4.2).

Per studiare la natura della fase cristallina presente nei polimeri oggetto della presente Tesi, i campioni sono stati sottoposti ad analisi diffrattometrica a Raggi X. In Figura 4.6 sono riportati i pattern di diffrazione del PLLA e dei suoi copolimeri PLLA<sub>n</sub>P(BS80BAz20)<sub>m</sub>, mentre in Tabella 4.3 sono raccolti i relativi gradi di cristallinità. I profili diffrattometrici sono tipici dei materiali semicristallini, con riflessi ben definiti, caratteristici della porzione ordinata del

materiale, sovrapposti ad una linea di base a campana legata alla componente amorfa. Per quanto riguarda il tipo di fase cristallina presente, i due copolimeri contenenti una maggiore quantità di PLLA, così come il PLLA stesso, presentano la tipica fase cristallina  $\alpha$  del PLLA, caratterizzata dalla presenza di un intenso riflesso a  $2\theta$  16,6°, e altri riflessi a  $2\theta$  19,0 e 22,2°. Il copolimero PLLA<sub>32</sub>P(BS80BAz20)<sub>68</sub> mostra riflessi attribuibili sia alla fase cristallina del PLLA che a quella del PBS, mentre nel copolimero PLLA<sub>18</sub>P(BS80BAz20)<sub>82</sub> è possibile individuare soltanto la fase cristallina del PBS, i cui riflessi si trovano a  $2\theta$  19,5 e 22,5° (Figura 4.6). Come riportato in Tabella 4.3, i valori di grado di cristallinità più alti corrispondono ai campioni più ricchi in uno dei due componenti (PLLA o PBS). La posizione dei picchi non sembra influenzata dalla copolimerizzazione, confermando l'esclusione totale delle unità comonomeriche dai cristalli di PLLA e PBS. Inoltre, la minore perfezione della fase cristallina è suggerita dalla diminuzione dell'intensità dei picchi e dalla scomparsa di alcuni riflessi.

In conclusione, è possibile affermare che i dati diffrattometrici sono risultati in accordo con quelli calorimetrici.

<b>Polimeri</b>	<b>Fase principale</b>	<b>X<sub>c</sub> (%)</b>
PLLA	PLLA	41
PLLA <sub>73</sub> P(BS80BAz20) <sub>27</sub>	PLLA	28
PLLA <sub>61</sub> P(BS80BAz20) <sub>39</sub>	PLLA	18
PLLA <sub>32</sub> P(BS80BAz20) <sub>68</sub>	PBS	22
PLLA <sub>18</sub> P(BS80BAz20) <sub>82</sub>	PBS	30

*Tabella 4.3. Dati di caratterizzazione diffrattometrica (fase cristallina principale e grado di cristallinità X<sub>c</sub> dell'omopolimero PLLA e dei copolimeri triblocco PLLA<sub>m</sub>P(BS80BAz20)<sub>n</sub>).*

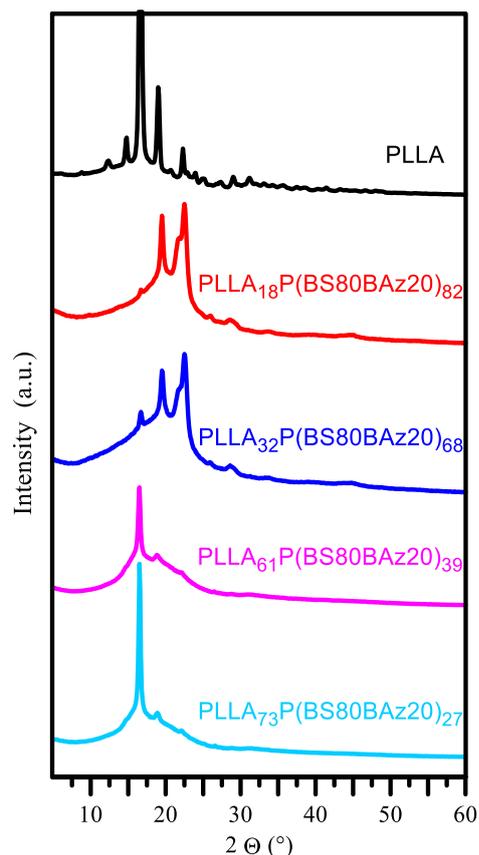


Figura 4.6. Pattern diffrattometrici dell'omopolimero PLLA e dei copolimeri triblocco  $PLLA_mP(BS80BAz20)_n$ .

La miscibilità delle due componenti nella fase amorfa è stata ulteriormente studiata analizzando il comportamento termico dei materiali in esame dopo rapido raffreddamento da fuso (*quenching*). Come noto, il fenomeno della transizione vetrosa di un materiale parzialmente cristallino risulta diverso rispetto a quello del materiale analogo completamente amorfo. Sebbene sull'argomento in letteratura siano riportati risultati contrastanti, è comunemente accettato che la cristallinità agisca come punto di reticolazione in una struttura polimerica, riducendo perciò la mobilità delle catene amorfè e alzando il valore di  $T_g$ . Per evitare la cristallizzazione e ottenere polimeri completamente amorfi, Pertanto, al fine di evidenziare meglio la temperatura di transizione vetrosa in assenza di cristallinità, si ricorre al rapido raffreddamento dallo stato fuso. In Figura 4.5 destra sono riportate le curve calorimetriche di seconda scansione per l'omopolimero PLLA e i copolimeri triblocco  $PLLA_mP(BS80BAz20)_n$  mentre in Tabella 4.4 sono raccolti i relativi dati di caratterizzazione termica.

II scan								
Polimeri	T <sub>g</sub> °C	Δc <sub>p</sub> J/°C g	T <sub>c</sub> °C	ΔH <sub>c</sub> J/g	T <sub>m,BS</sub> °C	ΔH <sub>m,BS</sub> J/g	T <sub>m,PLA</sub> °C	ΔH <sub>m,PLA</sub> J/g
PLLA <sub>18</sub> P(BS80BAz20) <sub>82</sub>	-38	0.147	9	8	87	34	--	--
PLLA <sub>32</sub> P(BS80BAz20) <sub>68</sub>	-27	0.489	37	26	84	31	130	13
PLLA <sub>61</sub> P(BS80BAz20) <sub>39</sub>	2	0.531	75	13	--	--	153	20
PLLA <sub>73</sub> P(BS80BAz20) <sub>27</sub>	21	0.462	83	21	--	--	153	26
PLLA	57	0.540	133	20	--	--	167	30

Tabella 4.4. Dati di caratterizzazione termica ottenuti mediante analisi DSC (II scan).

Tutti i campioni mostrano una transizione vetrosa e almeno un picco di fusione. In tutti i materiali, le catene macromolecolari, una volta superata la T<sub>g</sub>, acquisiscono energia e mobilità sufficienti per cristallizzare durante la scansione. Inoltre, essendo ΔH<sub>c</sub> < ΔH<sub>m</sub> per tutti i materiali in esame, è possibile affermare che nelle condizioni in cui si è operato non è stato possibile ottenere polimeri allo stato completamente amorfo (Tabella 4.4). Come si può vedere dalla Figura 4.5 destra, e dai risultati raccolti in Tabella 4.4, tutti i copolimeri presentano una sola T<sub>g</sub> in posizione intermedia rispetto a quelli dei due blocchi. La presenza di una sola T<sub>g</sub> in seconda scansione per tutti i copoliesteri indica come la permanenza allo stato fuso per alcuni minuti favorisca la miscibilità fra i due blocchi nella fase amorfa. La temperatura di transizione vetrosa dipende inoltre dalla quantità di segmenti *soft* nella catena: come previsto, i copolimeri caratterizzati da una più alta percentuale in peso di blocco *soft* presentano valori di T<sub>g</sub> più bassi.

#### 4.3 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA

Lo studio delle proprietà meccaniche di un materiale è di importanza cruciale per testarne la sua idoneità per una determinata applicazione. Per fornire informazioni sulla risposta meccanica dei polimeri sintetizzati, sono state effettuate prove tensili a trazione. I risultati ottenuti (modulo elastico E, resistenza e deformazione allo snervamento σ<sup>y</sup> e ε<sup>y</sup>, stress e deformazione a rottura σ<sup>B</sup> e ε<sup>B</sup>) sono raccolti in Tabella 4.5, mentre in Figura 4.7 sono riportate le curve sforzo-deformazione dell'omopolimero PLLA e dei copolimeri triblocco PLLA<sub>m</sub>P(BS80BAz20)<sub>n</sub>.

<b>Polimeri</b>	<b>E</b> <b>MPa</b>	<b><math>\sigma^y</math></b> <b>MPa</b>	<b><math>\epsilon^y</math></b> <b>%</b>	<b><math>\sigma^b</math></b> <b>MPa</b>	<b><math>\epsilon^b</math></b> <b>%</b>
PLLA	1812±122	-	-	37±4	2.7±0.2
PLLA <sub>73</sub> P(BS80BAz20) <sub>27</sub>	368±32	16±2	11±2	11±1	102±13
PLLA <sub>61</sub> P(BS80BAz20) <sub>39</sub>	264±32	12±1	11±2	11±2	233±76
PLLA <sub>32</sub> P(BS80BAz20) <sub>68</sub>	193±17	12±1	14±1	12±3	607±69
PLLA <sub>18</sub> P(BS80BAz20) <sub>82</sub>	213±8	12±1	11±1	17±3	547±88

Tabella 4.5. Dati di caratterizzazione meccanica dell'omopolimero PLLA e dei copolimeri triblocco PLLA<sub>m</sub>P(BS80BAz20)<sub>n</sub>.

Come si può notare dalla Tabella 4.5, il PLLA mostra un valore di modulo elastico molto alto, a conferma della sua elevatissima rigidità. Viceversa, i copolimeri presentano una risposta meccanica significativamente diversa: E diminuisce progressivamente all'aumentare della quantità di blocco *soft*, ad eccezione del copolimero PLLA<sub>18</sub>P(BS80BAz20)<sub>82</sub>, ovvero quello con il più basso contenuto di PLLA. Tale risultato può essere attribuito al basso grado di cristallinità del copolimero rispetto all'omopolimero PLLA. Aumentando ulteriormente la percentuale di P(BS80BAz20), il grado di cristallinità aumenta (Tabella 4.3) a causa della formazione di cristalli di PBS, portando ad un aumento del modulo elastico. L'andamento di E è dovuto anche alla rigidità dell'unità ripetitiva: se si confrontano infatti i due campioni PLLA<sub>73</sub>P(BS80BAz20)<sub>27</sub> e PLLA<sub>18</sub>P(BS80BAz20)<sub>82</sub>, entrambi caratterizzati da un grado di cristallinità simile (28 vs. 30%), il copolimero contenente una maggiore quantità di blocco *soft* presenta un modulo elastico minore.

Per quanto riguarda la deformazione a rottura ( $\epsilon^B$ ), è risultata inversamente proporzionale al grado di cristallinità e direttamente correlata al contenuto di blocco *soft*, raggiungendo un valore di circa il 600% nel caso del copolimero PLLA<sub>32</sub>P(BS80BAz20)<sub>68</sub> (Tabella 4.5). L'effetto della copolimerizzazione sulla tensione a rottura ( $\sigma^B$ ), invece, è meno marcato: sebbene nei copolimeri sia minore che nell'omopolimero, non cambia però in modo significativo al variare della composizione. Inoltre, i copolimeri presentano un punto di snervamento molto simile, essendo sia la tensione di snervamento ( $\sigma^y$ ) che la deformazione di snervamento ( $\epsilon^y$ ) comparabili per tutti i materiali ottenuti (Tabella 4.5).

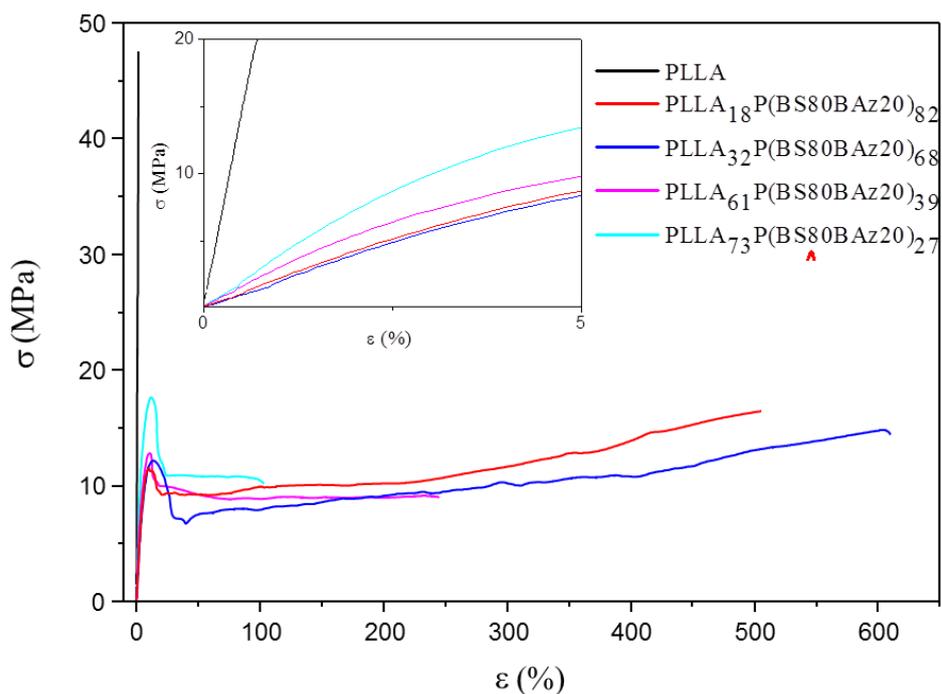


Figura 4.7. Curve tensione-deformazione dell'omopolimero PLLA e dei copolimeri triblocco  $PLLA_mP(BS80BAz20)_n$ .

#### 4.4 STUDI DI DEGRADAZIONE IDROLITICA

I test di degradazione idrolitica sono stati condotti in condizioni fisiologiche (37 °C, pH 7.4) in tampone fosfato, per studiare la cinetica di degradazione dei materiali oggetto della presente Tesi, in ambiente simile a quello corporeo.

In Figura 4.8 sono riportati i pesi residui (gravimetrico e molecolare) in funzione del tempo di incubazione dell'omopolimero PLLA e dei copolimeri triblocco  $PLLA_mP(BS80BAz20)_n$ . Nel periodo di tempo studiato, il PLLA non presenta alcuna perdita di peso, contrariamente a quanto avviene per i copolimeri, che risultano soggetti all'idrolisi, nonostante non sia stata evidenziata una variazione sostanziale della velocità di degradazione in funzione della composizione, ad eccezione del campione  $PLLA_{18}P(BS80BAz20)_{82}$ . Come noto, la velocità di degradazione idrolitica dipende da molteplici fattori tra cui il peso molecolare, il grado di cristallinità, la mobilità della fase amorfa, la densità di gruppi esterei e l'ingombro sterico. Nonostante la correlazione tra tutti questi fattori risulti piuttosto complessa, è possibile affermare che nel caso dei copolimeri triblocco studiati la più elevata velocità di degradazione, che raggiunge circa il

25% dopo 124 giorni di incubazione (Figura 4.8 alto) è attribuibile al minore grado di cristallinità e alla maggiore mobilità della fase amorfa.

È noto che durante le prime fasi del processo di degradazione idrolitica, è osservabile una sostanziale diminuzione del peso molecolare, nonostante il peso gravimetrico rimanga pressoché invariato. Per questo motivo, sull'omopolimero PLLA e sui copolimeri triblocco  $PLLA_mP(BS80BAz20)_n$  sono state effettuate anche analisi GPC, per analizzare l'andamento del peso molecolare in funzione del tempo di incubazione. Come è possibile notare dalla Figura 4.8 (basso), il PLLA perde circa il 60% del suo peso molecolare nella finestra temporale esplorata, a conferma del fatto che anche per l'omopolimero il processo di degradazione ha avuto luogo. Per quanto riguarda i copolimeri, è stato osservato un andamento del peso molecolare molto simile a quello già osservato per il peso gravimetrico: anche in questo caso, la composizione non sembra avere effetti considerevoli sulla velocità di perdita di peso molecolare.

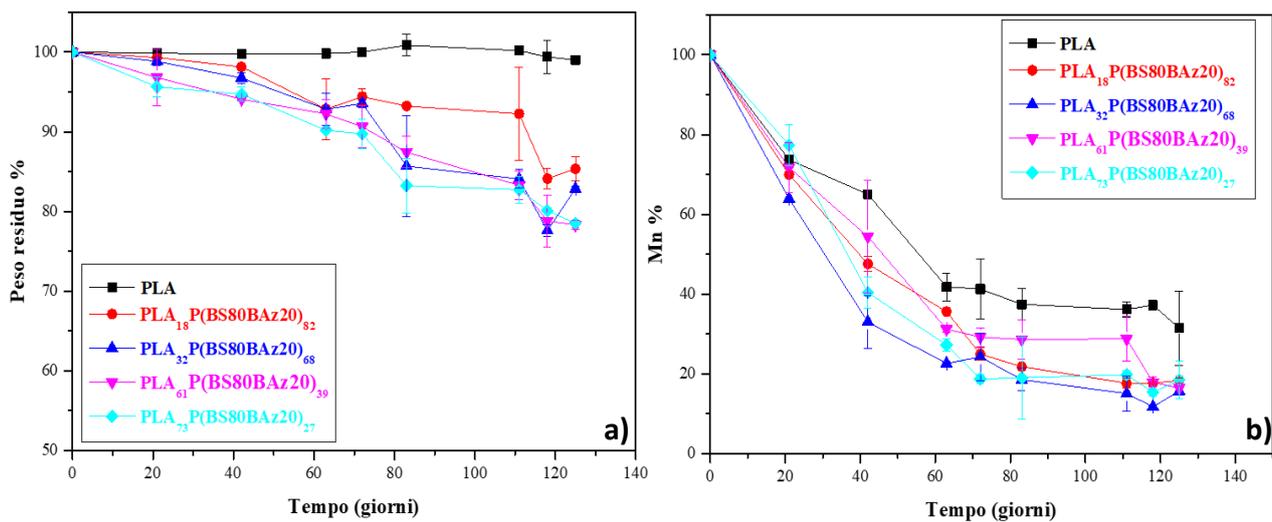


Figura 4.8. a) peso gravimetrico e b) peso molecolare residuo dell'omopolimero PLLA e dei copolimeri triblocco  $PLLA_mP(BS80BAz20)_n$  in funzione del tempo di incubazione (37 °C, pH 7.4).

## CAPITOLO 5: CONCLUSIONI

Alla luce dei continui sviluppi nel campo delle applicazioni biomedicali all'avanguardia quali la medicina rigenerativa e, con essa, l'ingegneria tissutale, la ricerca di biomateriali con cui realizzare dispositivi per il supporto e la crescita tissutale rappresenta un tema sempre attuale e di cruciale importanza. Tali biomateriali, infatti, oltre a dover soddisfare requisiti quali biocompatibilità e biodegradabilità, devono poter fornire un'ampia pletora di proprietà chimico-fisiche, variabili e modulabili in funzione delle diverse applicazioni e dei diversi tessuti che la medicina rigenerativa tratta. I polimeri, ed in particolare i poliesteri alifatici, sono i biomateriali più utilizzati in ingegneria tissutale, grazie alla loro versatilità in termini di proprietà meccaniche, biodegradabilità e biocompatibilità con il tessuto ospite. Tra i principali si ricordano l'acido poliglicolico (PGA), il policaprolattone (PCL), l'acido polilattico (PLA), ed i loro copolimeri e blend. Quest'ultimo, già ampiamente utilizzato a livello industriale per applicazioni biomedicali e non solo, grazie alla sua comprovata biocompatibilità e la sua buona stabilità termica, presenta però un forte limite in termini di elevata cristallinità e rigidità, che non lo rendono particolarmente idoneo per applicazioni in ingegneria tissutale dei tessuti molli. La copolimerizzazione risulta una soluzione vincente in questo senso, in quanto consente di modificare e modulare *ad hoc* le proprietà di un materiale semplicemente agendo sulla struttura chimica e la tipologia di unità comonomerica. In particolare, è noto che la copolimerizzazione a blocchi permette di abbassare considerevolmente il grado di cristallinità dell'omopolimero di riferimento, mantenendone, allo stesso tempo, la stessa temperatura di fusione, quindi la stessa finestra di lavorabilità.

In questo contesto, il presente lavoro di Tesi ha avuto come obiettivo la sintesi di nuovi copolimeri triblocco A-B-A a diversa composizione, dove il blocco B, o blocco *soft* flessibile, è il copolimero statistico poli(butilene succinato/azelato) P(BS80BA20), mentre il blocco A, o blocco *hard*, più rigido, è costituito da acido polilattico PLLA. La struttura triblocco, è stata garantita mediante polimerizzazione ad apertura d'anello del L-lattide, per opera del copolimero P(BSxBazy), e successiva *chain extension*. È stato dimostrato che la copolimerizzazione ha permesso di modulare le proprietà fisico-chimiche, diminuendo la cristallinità del PLLA, mantenendo allo stesso tempo una simile stabilità termica. In particolare, l'applicazione della strategia di estensione della catena consente di ottenere polimeri ad alto peso molecolare con maggiore flessibilità ed elasticità, in funzione del rapporto tra co-unità *soft/hard*. Inoltre, la

copolimerizzazione si è rivelata efficace per aumentare la velocità di degradazione del PLLA in condizioni fisiologiche.

Alla luce di questi promettenti risultati, sono state svolte, in collaborazione con l'“Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros” di Madrid, prove di biocompatibilità in vitro su scaffold ottenuti per elettrofilatura, utilizzando diverse fonti cellulari, che hanno mostrato come i materiali oggetto della presente Tesi risultino biocompatibili e supportino la crescita e l'adesione cellulare, e possano essere considerati degli ottimi candidati per applicazioni nel campo della *soft tissue engineering*.

## CAPITOLO 6: BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Pietrabissa, *Biomateriali per protesi e organi artificiali*, Pàtron Editore (1996), 19-32.
- [2] C. Piconi, *Biomateriali e dispositivi medici*, Energia Ambiente Innovazione, Enea (2014), 48-65.
- [3] N.R. Patel, P. Gohil, *A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance*, International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering 2 (2012), 91-101.
- [4] G.H. Olivè, S. Olivè, *Polimerizzazione: catalisi, cinetica, meccanismi di reazione*, Boringhieri (1972), 218-231.
- [5] G.E. Luckachan, C.K.S. Pillai, *Biodegradable polymers – A review on recent trends and emerging perspectives*, Journal of Polymer Environmental (2011), 19, 637.
- [6] D. Bourissou, B. Martin-Vaca, A. Dumitrescu, M. Graullier, F. Lacombe, *Controlled Cationic Polymerization of Lactide*, Macromolecules (2005), 38, 9993–9998.
- [7] D. Garlotta, *A literature review of polylactic acid*, Journal of Polymer Environmental (2002), 9, 63– 84.
- [8] O.T. du Boullay, E. Marchal, B. Martin-Vaca, F.P. Cossio, D. Bourissou, *An activated equivalent of lactide toward organocatalytic ring-opening polymerization*, Journal of the American Chemical Society (2006), 128, 16442–16443.
- [9] H.R. Kricheldorf, *Syntheses of Biodegradable and Biocompatible Polymers by Means of Bismuth Catalysts*, Chemical Reviews (2009), 109, 5579–5594.
- [10] Y.J. Du, P.J. Lemstra, A.J. Nijenhuis, H.A.M. Van Aert, C. Bastiaansen, *ABA type copolymers of lactide with polyethylene glycol. Kinetic, mechanistic and model studies*, Macromolecules (1995), 28, 2124-2132.
- [11] J. Kadokawa, S. Kobayashi, *Polymer synthesis by enzymatic catalysis*, Current Opinion in Chemical Biology (2010), 14, 145–153.

- [12] L.C. Arruda, M.M. Rosário, E.S. Bretas, M.M. Ueki, *Influence of chain extender on mechanical, thermal and morphological properties of blown films of PLA/PBAT blends*, Polymer Testing (2015), 43, 27-37.
- [13] L. Li, K. Raghupathi, C. Song, P. Prasad, S. Thayumanavan, *Self-assembly of Random Copolymers*, *Chemical Communications* 77A (2014), 13417–13432.
- [14] M. Gigli, M. Fabbri, N. Lotti, R. Gamberini, B. Rimini, A. Munari, *Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review*, *European Polymer Journal* (2016), 75, 431-460.
- [15] M. Gigli, N. Lotti, M. Gazzano, L. Finelli, A. Munari, *Novel eco-friendly random copolyesters of poly(butylene succinate) containing ether-linkages*, *Reactive and Functional Polymers* (2012), 72, 303–310.
- [16] M. Soccio, N. Lotti, L. Finelli, M. Gazzano, A. Munari, *Influence of transesterification reactions on the miscibility and thermal properties of poly (butylene/diethylene succinate) copolymers*, *European Polymer Journal* (2008), 44, 1722–1732.
- [17] M. Gigli, N. Lotti, M. Gazzano, L. Finelli, A. Munari, *Macromolecular design of novel sulfur-containing copolyesters with promising mechanical properties*, *Journal of Applied Polymer Science* (2012), 126, 686–696.
- [18] C. Gualandi, M. Soccio, E. Saino, M.L. Focarete, N. Lotti, A. Munari, L. Moroni, L. Visai, *Easily synthesized novel biodegradable copolyesters with adjustable properties for biomedical applications*, *Soft Matter* (2012), 8, 5466–5476.
- [19] M. Gigli, N. Lotti, M. Gazzano, L. Finelli, A. Munari, *Synthesis and characterization of novel poly(butylene succinate)-based copolyesters designed as potential candidates for soft tissue engineering*, *Polymer Engineering & Science* (2013), 53, 491–501.
- [20] C. Gualandi, M. Soccio, M. Govoni, S. Valente, N. Lotti, A. Munari, E. Giordano, G. Pasquinelli, M.L. Focarete, *Poly(butylene/diethylene glycol succinate) multiblock copolyester as a candidate biomaterial for soft tissue engineering: solid-state properties, degradability, and biocompatibility*, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* (2012), 27, 244–264.

- [21] C. Woodings, *Nuovi sviluppi nei nontessuti biodegradabili*, Calvin Woodings Consulting, UK, 2001.
- [22] L. Fambri, C. Migliaresi, *Poly (Lactic Acid) Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*, John Wiley & Sons, Inc. (2010), 113-124.
- [23] C. Woodings, *NF New Fibres*, Regenerated Cellulose Fibres, 1st Edition Woodhead Publishing (2001). [www.technica.net/NF](http://www.technica.net/NF)
- [24] P.Y. Bruice, *Organic Chemistry*, Glenview, IL: Prentice Hall (2011).
- [25] R.P. Pawara, S.U. Tekalea, S.U. Shisodiaa, J.T. Totrea, A.J. Dombb, *Biomedical Applications of Poly(Lactic Acid)*, *Recent Patents on Regenerative Medicine* (2014), 4, 40-51.
- [26] C. Zhao, A. Tan, G. Pastorin, H.K. Ho, *Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering*, *Biotechnology Advances* (2013), 31, 654–668.
- [27] J. Zhaoa, M. Griffina, J. Caib, S. Li, P.E.M. Bultera, D.M. Kalaskara, *Bioreactors for tissue engineering: An update*, *Biochemical Engineering Journal* (2016), 109, 268–281.

## **CAPITOLO 7:**

### **RINGRAZIAMENTI**

La realizzazione di questa tesi, a conclusione del mio percorso di studi e di tirocinio, è stata frutto del lavoro di numerose persone che hanno seguito il progetto e mi hanno aiutata nella stesura fino al raggiungimento di questo obiettivo a lungo desiderato. Voglio quindi ringraziare tutte le persone che mi hanno aiutato durante questi anni.

In primis desidero ringraziare la mia relatrice la professoressa Nadia Lotti per avermi dato la possibilità di partecipare a questo progetto, di avermi fatta appassionare al mondo della Chimica, di avermi accolta nei laboratori DICAM di Bologna e anche dato importanti lezioni di vita.

Ringrazio tutte le meravigliose persone che mi hanno guidata in laboratorio e nella preparazione della tesi: Michelina Soccio, sempre presente con importanti consigli, Martina Fabbri, che mi ha inclusa nel suo progetto di ricerca, Michela Costa che mi ha pazientemente insegnato ad usare gli strumenti di laboratorio, Giulia Guidotti che si è dovuta fare in quattro per farmi concludere questo percorso con la stesura di questa tesi. Inoltre ringrazio tutti i ragazzi che lavorano al dipartimento sempre pronti a dare una mano, a spiegarti in modo semplice anche ciò che sembra incomprensibile, e sempre gentili.

Ringrazio i miei genitori che hanno fatto sì che arrivassi alla fine di questo percorso, spronandomi anche nei momenti più duri.

Ringrazio tutti i miei amici, da quelli d'infanzia a quelli che lo sono diventati negli anni, per il sostegno morale.

In fine ringrazio Marco, che mi supporta e sopporta sempre, in ogni cosa, da sei anni.