

# Università degli Studi di Bologna

FACOLTÁ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

Dipartimento di Chimica « G. Ciamician »

**Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche e Chimica Industriale: Progetto n. 2**

**“Chimica Industriale” (XIX Ciclo) Chim 05**

Coordinatore: Chiar.mo Prof. L. Angiolini

## **PROGETTAZIONE DI NUOVI BIOMATERIALI A BASE POLIESTEREA**

Tesi presentata da:

Dott.ssa ISMAELA FOLTRAN

Relatore:

Chiar.mo Prof. M. SCANDOLA

Bologna, 2006

Parole chiave:

- *Poliestere*
- *Miscibilità*
- *Cristallizzazione non-isoterma*
- *Elettrofilatura*
- *Degradazione idrolitica*

# INDICE

1.INTRODUZIONE	pag. 1
1.1 Biomateriali polimerici	pag. 6
1.2 Polimeri dell'acido lattico e glicolico	pag. 9
1.3 Poli 3-idrossibutirrato	pag. 15
1.4 Fase cristallina	pag. 18
1.4.1 Cinetica di cristallizzazione	pag. 21
1.4.2 Cristallizzazione non-isoterma	pag. 23
1.5 Degradazione idrolitica	pag. 24
2.SCOPO	pag. 29
3.PARTE SPERIMENTALE	pag. 31
3.1 Materiali utilizzati	pag. 31
3.2 Preparazione delle leghe	pag. 32
3.3 Tecniche sperimentali	pag. 33
3.3.1 Termogravimetria (TGA)	pag. 33
3.3.2 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	pag. 33
3.3.3 Microscopia ottica in luce polarizzata	pag. 35
3.3.4 Misure di sforzo-deformazione (stress-strain)	pag. 37
3.3.5 Analisi dinamico meccanica (DMTA)	pag. 39
3.3.6 Microscopia a scansione (SEM)	pag. 39

3.3.7 Elettrofilatura	pag. 40
<b>4.RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>pag. 45</b>
4.1 Miscibilità di leghe PHB/P(D,L)LA	pag. 45
4.2 Cinetica di cristallizzazione di leghe PHB/P(D,L)LA	pag. 55
4.3 Proprietà termiche e meccaniche dei terpolimeri (GLT)	pag. 59
4.4 Elettrofilatura dei copolimeri PL11GA e PL36GA	pag. 65
4.5 Prove di degradazione idrolitica	pag. 76
4.5.1 Degradazione idrolitica del copolimero PL11GA	pag. 77
4.5.2 Degradazione idrolitica del copolimero PL36GA	pag. 89
4.6 Studio della stabilità termica del poli 3-idrossibutirrato in funzione delle condizioni di sintesi	pag. 92
<b>5.CONCLUSIONI</b>	<b>pag. 97</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>pag. 103</b>

# 1. INTRODUZIONE

I *biomateriali* hanno risposto al bisogno dell'uomo di sostituire od integrare tessuti ed organi, non più attivi dal punto di vista funzionale o metabolico, danneggiati da eventi patologici o traumatici, ed hanno coronato di successo una lunga serie di tentativi che risalgono agli albori della medicina. Il numero delle loro applicazioni è cresciuto notevolmente in questi anni e la portata delle innovazioni terapeutiche ha consentito ad un numero elevatissimo di pazienti la sopravvivenza o la restituzione di funzionalità a parti compromesse dell'organismo.

Tenuto conto del fatto che, in termini del tutto generali, si definisce *materiale* una sostanza fisica, generalmente solida, manipolata e/o usata dall'uomo per la realizzazione di specifici manufatti, non soggetti a significative trasformazioni durante l'uso, in prima istanza è possibile definire come *biomateriale* una sostanza utilizzata per costruire oggetti in grado di sostituire una parte vivente originaria del corpo umano. È ovvio, tuttavia, come questa definizione, del tutto generica, abbia richiesto negli anni molte precisazioni.

Una prima definizione ufficiale di biomateriale è stata proposta nel 1974: "*Biomateriale è una sostanza inerte, sia nei confronti dell'organismo che dal punto di vista farmacologico, progettata per essere impiantata o incorporata in un sistema vivente*" (6th annual International Symposium) fino ad arrivare a quella attualmente in uso di "*materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici per valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo*" (II International Consensus Conference on Biomaterials, 1991)<sup>1</sup>.

Un importante aspetto che caratterizza lo studio dei biomateriali è quello di garantire che i prodotti commerciali siano compatibili con le funzioni e le prestazioni attese dal punto di vista biologico, meccanico e chimico. Debbono pertanto essere definiti precisi standard di minimo che tengano conto della resistenza alla fatica del materiale, della tossicità propria e degli eventuali prodotti di degradazione in ambiente biologico.

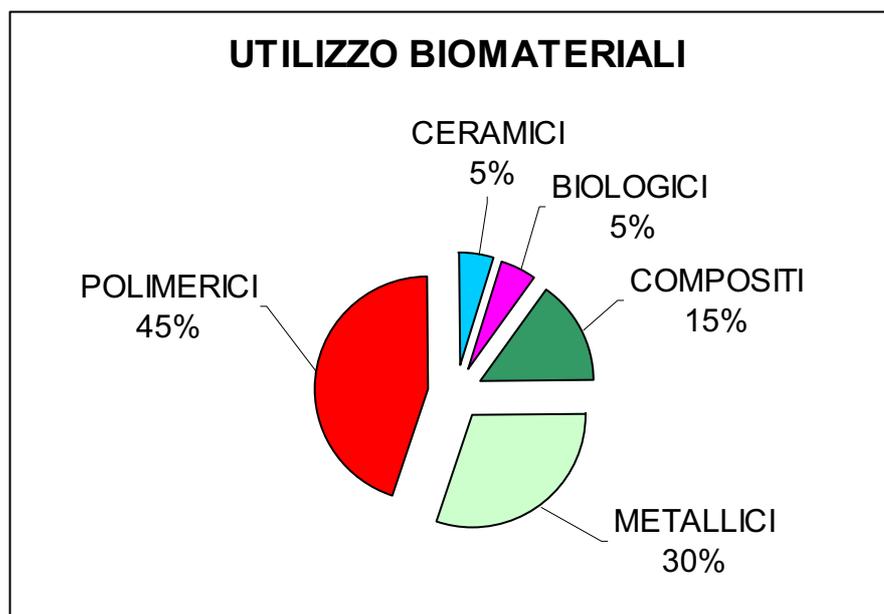
Dalla definizione appena riportata si evince come l'interazione con sistemi biologici sia l'aspetto qualificante del comportamento dei biomateriali. Affinché tale interazione non comporti effetti negativi, il materiale deve avere una buona biocompatibilità il che significa che non si devono stabilire interazioni sfavorevoli con i sistemi viventi con i quali esso viene in contatto. La biocompatibilità, inoltre, non è funzione solo delle caratteristiche e delle proprietà dei materiali (proprietà chimiche, stabilità chimica, proprietà dei prodotti di degradazione, rugosità, ecc.) e dei dispositivi impiantati (dimensioni, forma, rigidità, ecc.), ma anche delle condizioni dell'organismo ospite e della tecnica chirurgica. Due sono le caratteristiche principali che vanno considerate nella valutazione della biocompatibilità di un materiale: la resistenza del materiale ai processi di degradazione e gli effetti che i prodotti di tali processi hanno sui tessuti. La biocompatibilità di un materiale non va intesa comunque solo in riferimento alla sicurezza biologica, ma è relativa anche alle caratteristiche chimico-fisiche ed alle proprietà meccaniche del materiale e deve pertanto essere controllata durante l'intero ciclo produttivo, dalla fase di progettazione a quella di sterilizzazione, dall'approvvigionamento delle materie prime al confezionamento finale del prodotto.

Sin dai tempi più remoti, la necessità ha indotto il medico ad utilizzare i materiali più disparati, in circostanze spesso drammatiche per le condizioni fisiche del paziente e per l'ambiente operatorio. Medici Egiziani, Greci, e poi Romani, usavano spesso fibre vegetali e materiali di derivazione animale per cucire le ferite; le prime protesi artificiali erano modellate in legno, con risultati sorprendenti.

I biomateriali possono essere suddivisi secondo la loro natura chimica in:

- Materiali metallici, ulteriormente suddivisi in *ferrosi* e *non ferrosi*
- Materiali non metallici, ulteriormente suddivisi in *organici* ed *inorganici*: tra i primi rivestono grande interesse i polimeri, tra i secondi le *ceramiche* e i *vetri*.

Analogamente è possibile suddividere i biomateriali in polimerici, metallici, ceramici, compositi e di derivazione biologica; una indicazione di massima delle relative percentuali di utilizzo è riportata nella Figura 1.1.



**Figura 1.1:** Materiali impiegati in medicina<sup>2</sup>.

L'uso dei metalli è molto più recente: risale alla guerra civile americana il caso, divenuto classico, di un chiodo da carpentiere in ferro usato, sul campo, per fissare la frattura del femore di un soldato.

Dagli inizi del secolo scorso, i metalli hanno cominciato ad essere usati comunemente in odontoiatria. In seguito, la disponibilità degli acciai inossidabili e delle leghe, teoricamente resistenti alla corrosione, ha reso possibile la fabbricazione di protesi di tutti i tipi. L'utilizzo di metalli spesso pone problemi di biocompatibilità legati a fenomeni di corrosione e di cessione di ioni. Sotto questo aspetto, un caso particolare è rappresentato dalle leghe di titanio la cui ossidazione superficiale, spontanea o indotta da trattamenti specifici, provoca la formazione di uno strato di ossido che riduce, o addirittura impedisce, il rilascio di ioni potenzialmente tossici; tale rilascio può tuttavia avere luogo per effetto dell'abrasione degli strati superficiali di ossido.

I materiali ceramici coprono circa il 5% delle applicazioni nel settore biomedico (Figura 1.1). A questa categoria appartengono materiali come vetro, ossido di alluminio, ossido di zirconio, fosfato di calcio. I materiali ceramici sono largamente impiegati nella fabbricazione di impianti otorino-laringoiatrici ed ortopedici, come

riempitivi delle ossa e per usi odontoiatrici. Alla categoria dei materiali ceramici appartengono diversi composti sia naturali che sintetici, come ossidi di metalli, carburi, idruri, solfuri, seleniuri, tali materiali possono avere struttura cristallina, parzialmente cristallina, o amorfa. Essi sono caratterizzati da elevata durezza, notevole resistenza alle temperature e all'usura, ma anche fragilità che li rende sensibile agli urti.

I materiali compositi sono costituiti dalla combinazione di due o più materiali, tra loro non solubili. Pertanto, in un materiale composito deve essere possibile individuare una interfaccia tra i diversi componenti.

Tipicamente questi materiali sono composti da una matrice che contiene altri composti, ad essa compatibili, con funzione di rinforzo e di aumento della resistenza meccanica. Esistono molte combinazioni possibili tra materiali di rinforzo e matrici: in particolare, si possono avere composti di tipo *fibroso*, nei quali delle fibre sono immerse in una matrice, o di tipo *particolato*, nei quali particelle di varia forma sono inglobate nella matrice. Dato che i tessuti naturali sono generalmente di natura composita, queste particolari miscele ottenute combinando opportuni biomateriali (polimeri, ceramici e metalli) vengono utilizzate per ottenere proprietà meccaniche e di biocompatibilità soddisfacenti, o quanto meno paragonabili a quelle delle controparti naturali. I materiali compositi sono quindi particolarmente utili nei casi in cui questi requisiti non possono essere soddisfatti da un singolo biomateriale.

Come esempi di applicazione di materiali compositi in medicina si possono citare i cementi compositi per ossa e i tendini artificiali.

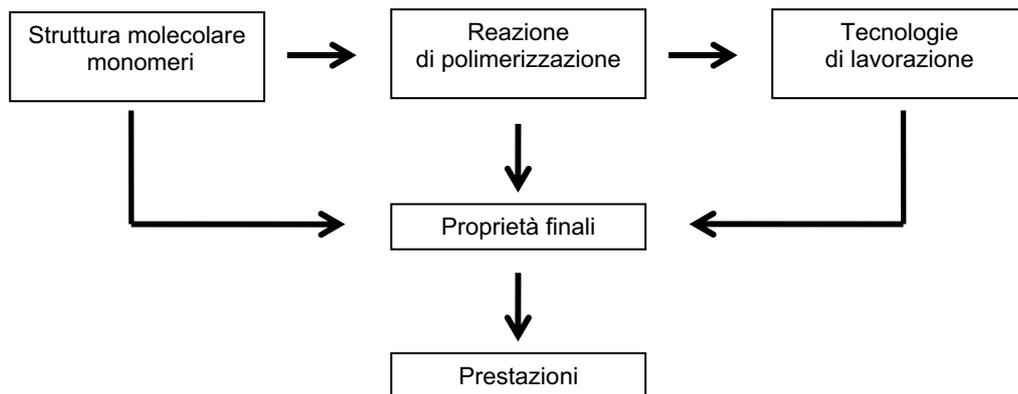
I diversi materiali di derivazione biologica rappresentano il 5% (Figura 1.1) dei biomateriali; essi comprendono proteine naturali e polisaccaridi (collagene, gelatina, elastina, enzimi, acido ialuronico, chitosani). I materiali di origine naturale vengono frequentemente usati in combinazione con materiali sintetici, specialmente in dermatologia. Un aspetto particolarmente importante ed attuale, connesso a questa categoria di biomateriali, riguarda la produzione di tessuti artificiali attraverso le tecnologie dell'ingegneria tessutale che ha permesso di ottenere interessanti risultati nella ricostruzione artificiale di pelle, cartilagine, osso, vasi sanguigni e tessuto nervoso<sup>3,4</sup> (Figura 1.2).

L'avvento di materiali di sintesi ha di fatto determinato una svolta, fornendo sul piano teorico la possibilità tecnica di adattare le caratteristiche strutturali dei materiali alle necessità funzionali dell'organismo.



**Figura 1.2:** Pelle e vasi sanguigni artificiali.

I principali vantaggi che i polimeri presentano rispetto alle altre classi di materiali sono una maggiore biocompatibilità, la possibilità di modificarne ampiamente composizione e proprietà fisico-meccaniche, bassi coefficienti di attrito, facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture complesse, possibilità di modificarne chimicamente e/o fisicamente la superficie, possibilità di immobilizzare cellule o biomolecole al loro intorno o sulla superficie. Gli svantaggi principali sono la presenza di sostanze che possono essere rilasciate nell'organismo (monomeri, catalizzatori, additivi, ecc.), la facilità di assorbimento di acqua e biomolecole dall'ambiente circostante (anche nelle applicazioni in cui non è richiesto), le basse proprietà meccaniche e, in alcuni casi, la difficoltà di sterilizzazione. Le proprietà finali del dispositivo dipendono sia dalla struttura molecolare intrinseca del polimero che dai processi chimici e fisici a cui è sottoposto e possono essere ampiamente manipolare intervenendo sulle condizioni operative di tali processi e sulla reazione di polimerizzazione<sup>5</sup> (Figura 1.3).



**Figura 1.3:** Fattori che determinano le proprietà finali e le prestazioni di un dispositivo medico.

## 1.1. Biomateriali polimerici

Negli ultimi anni, la produzione industriale di materiali polimerici ha subito una enorme crescita ed in molti settori tecnologici i materiali polimerici di sintesi hanno vantaggiosamente sostituito materiali naturali tradizionali.

I polimeri costituiscono circa il 45% dei biomateriali (Figura 1.1) e risultano quindi i più impiegati nei dispositivi medici<sup>5</sup> (Tabella 1.1). Le maggiori applicazioni di questi polimeri sono basate sulla caratteristica degli idrogel di rigonfiarsi quando entrano in contatto con intorni idrofilici.

I campi in cui i biopolimeri trovano maggiore applicazione sono:

- Ortopedia: le protesi articolari (ginocchio, anca, etc.), il cemento osseo, la sostituzione di legamenti, la fissazione interna ed esterna.
- Odontostomatologia: i cementi, le amalgame, i materiali da impronta, i materiali ortodontici, gli impianti ossei.
- Chirurgia cardiovascolare: le valvole cardiache, le protesi vascolari di grande e medio calibro, stimolatore cardiaci (pacemakers), stents.
- Chirurgia plastica: gli espansori cutanei.
- Oculistica: le lenti a contatto, i cristallini artificiali, il silicone nel trattamento dei distacchi di retina, gli impianti corneali e le cornee artificiali, le lenti intraoculari.

- Chirurgia generale (suture e cateteri), neurochirurgia, controllo del concepimento, dispensazione di farmaci, adesivi e sigillanti (tessutali), impianti cocleari, pelle artificiale.

**Tabella 1.1:** Materiali polimerici maggiormente impiegati in campo medico e loro principali applicazioni.

POLIMERO	SIGLA	APPLICAZIONE
Acido poliglicolico	PGA	Suture biodegradabili, placche e chiodi intramidollari
Acido polilattico	PLA	Placche e chiodi intramidollari, legamenti artificiali, rilascio controllato di farmaci
Polietilene tereftalato	PET	Protesi vascolari, anelli di sutura, suture
Polietilene	PE, LDPE,	Cateteri, tubi connettori, rilascio controllato di farmaci
Polietilene	UHM WPE	Protesi ortopediche
Polimetilmetacrilato	PMM A	Cemento osseo, lenti a contatto, materiali dentari
Polipropilene	PP	Imballaggi sterili, siringhe, connettori, fili di sutura
Politetrafluoroetilene	PTFE	Protesi vascolari, legamenti artificiali, rivestimenti
Poliuretani	PU	Cateteri, cannule, protesi valvolari e vascolari
...	...	...

Si evince come i materiali polimerici possano essere classificati in base alla interazione materiale/organismo in dispositivi passivi e in dispositivi attivi.

**PASSIVI:** Tra gli innumerevoli diversi prodotti che soddisfano tale definizione generale troviamo ad esempio quelli raffigurati in Figura 1.4: un ossigenatore, un dializzatore, cateteri, una sacca per stomia.



**Figura 1.4:** Dispositivi passivi.

**ATTIVI:** I biomateriali attivi favoriscono le interazioni dirette con il tessuto biologico, che può crescere sulla superficie del materiale stesso. Tutto ciò permette l'instaurarsi di un solido legame dal punto di vista meccanico tra il tessuto naturale e l'impianto protesico. All'interno di questa categoria, i materiali polimerici possono essere classificati anche per la durata del loro impiego; si può parlare di biomateriali permanenti o bioinerti/biostabili; sono definiti tali i materiali che una volta impiantati non subiscono sostanziali trasformazioni chimiche e/o fisiche nel tempo e presentano interazioni minime con i tessuti circostanti. Questi materiali consentono una buona coesistenza tra organismo e impianto e ad esempio a questa classe appartiene il polietilene ad altissimo peso molecolare (UHMWPE).

Un'altra categoria molto importante in cui si possono suddividere i biomateriali in base alla durata sono tutti quei dispositivi utilizzati temporaneamente in altre parole destinati ad avere un'applicazione limitata nel tempo. Questi materiali possono essere anche classificati come *biorisorbibili e/o biodegradabili* in quanto subiscono una progressiva degradazione all'interno del sistema biologico, senza che questo provochi reazioni di rigetto o effetti tossici.

Il corpo umano è un ambiente acquoso altamente aggressivo, la cui temperatura è stabilizzata a 37°C ed il cui pH è mantenuto ad un valore medio pari a 7.4. La soluzione salina presente nel corpo umano è un eccellente elettrolita che facilita i meccanismi di corrosione elettrochimica e di idrolisi. Nei tessuti, inoltre, sono presenti

numerose molecole e cellule che hanno la capacità di catalizzare determinate reazioni chimiche o di isolare, attaccare e distruggere rapidamente i corpi estranei. La maggior parte dei polimeri utilizzati in dispositivi medici consente la diffusione dell'acqua all'interno della struttura molecolare e può quindi dar luogo a processi di idrolisi. La scelta di un polimero idrolizzabile-non-idrolizzabile, oppure resistente-non resistente all'assorbimento di acqua è strettamente legata al tipo di applicazione considerata; è necessario, ad esempio, utilizzare un materiale facilmente degradabile per suture o dispositivi a rilascio controllato di farmaci. I processi degradativi dei materiali polimerici in *vivo* (biodegradazione) non sono semplicemente la conseguenza dell'assorbimento dell'acqua, ma vanno considerati molti altri fattori che ne aumentano notevolmente la velocità in vivo. Numerose cellule, infatti, incluse quelle coinvolte nei processi infiammatori, producono enzimi che catalizzano alcune reazioni degradative con conseguente alterazione della struttura molecolare dei materiali impiantati. Alcune cellule specifiche (i fagociti), inoltre, migrano verso le zone coinvolte in fenomeni di irritazione ed infiammazione per la presenza di corpi impiantati, e si adsorbono sulla loro superficie riconosciuta come estranea da proteine (ad esempio anticorpi). Questo meccanismo ha come conseguenza un rapido aumento dell'attività metabolica di difesa dell'organismo ed è responsabile dell'attivazione di processi di degradazione dei materiali polimerici.

I processi degradativi dei biomateriali variano in funzione della posizione dell'impianto all'interno dell'organismo, del tipo di tessuto con cui sono a contatto e da cui dipende la risposta del sistema immunitario, dalle caratteristiche fisiche e chimiche del materiale e dalle condizioni generali dell'organismo ospite (età, stato di salute, farmaci assunti, ecc.).

## 1.2. Polimeri dell'acido lattico e glicolico

I polimeri biodegradabili sintetici hanno attratto molta attenzione nell'ultima decade, poiché possono essere eliminati dal corpo umano dopo aver svolto la loro funzione e quindi senza ricorrere ad un ulteriore intervento chirurgico. Inoltre, l'avvento dell'ingegneria tissutale ha richiesto l'uso di supporti biodegradabili per la rigenerazione di tessuti e organi.

**Tabella 1.2:** Poliesteri alifatici sintetici biodegradabili

POLIMERI	STRUTTURA
Acido poliglicolico (PGA)	$\left[ \text{O}-\text{CH}_2-\text{CO} \right]_n$
Acido polilattico (PLA)	$\left[ \text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{CO} \right]_n$
Poli(ε-caprolattone) (PCL)	$\left[ \text{O}-\left(\text{CH}_2\right)_5-\text{CO} \right]_n$
Poli(para-diossanone) (PDS)	$\left[ \text{O}-\left(\text{CH}_2\right)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO} \right]_n$
Poli(3-idrossibutirrato) (PHB)	$\left[ \text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CO} \right]_n$
Poli(valerolattone) (PVL)	$\left[ \text{O}-\left(\text{CH}_2\right)_4-\text{CO} \right]_n$
Poli(idrossivalerato) (PHV)	$\left[ \text{O}-\underset{\text{CH}_2-\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CO} \right]_n$

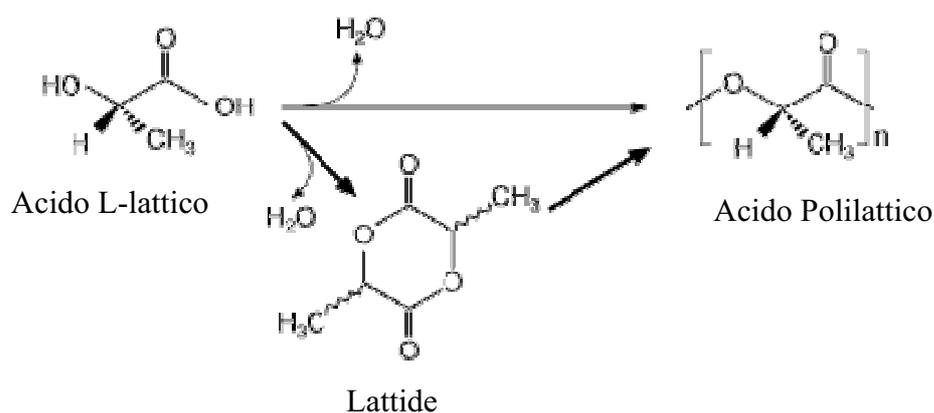
Tra i polimeri sintetici la classe più interessante dal punto di vista della biodegradabilità è quella dei poliesteri. Questi polimeri biodegradabili contengono

tutti nella loro struttura legami esterei idrolizzabili ciò significa che il processo degradativo prevede la rottura del legame ad opera dell'acqua. Per questi polimeri si parla perciò di degradazione idrolitica. In Tabella 1.2 sono riassunti i più comuni poliesteri alifatici biodegradabili<sup>6</sup>.

L'acido polilattico (PLA) è stato realizzato per la prima volta da Carothers nel 1932, con un processo di condensazione e polimerizzazione diretta in solvente e sotto vuoto spinto dell'acido lattico. Il polimero che si ottiene da questa reazione di policondensazione, però ha un peso molecolare basso. In seguito la Cargill ha introdotto un nuovo processo di polimerizzazione a due stadi che ha permesso la produzione del PLA a prezzi più abbordabili e di conseguenza un allargamento del suo campo di applicazione.

Il processo prevede l'estrazione di zuccheri (destrosio essenzialmente, ma anche glucosio e saccarosio) da farina di granturco, barbabietole da zucchero o amido di frumento e la successiva fermentazione ad acido lattico. Si preferisce partire da zuccheri raffinati piuttosto che dai meno costosi melassa o siero poiché la purificazione dopo fermentazione è più costosa.

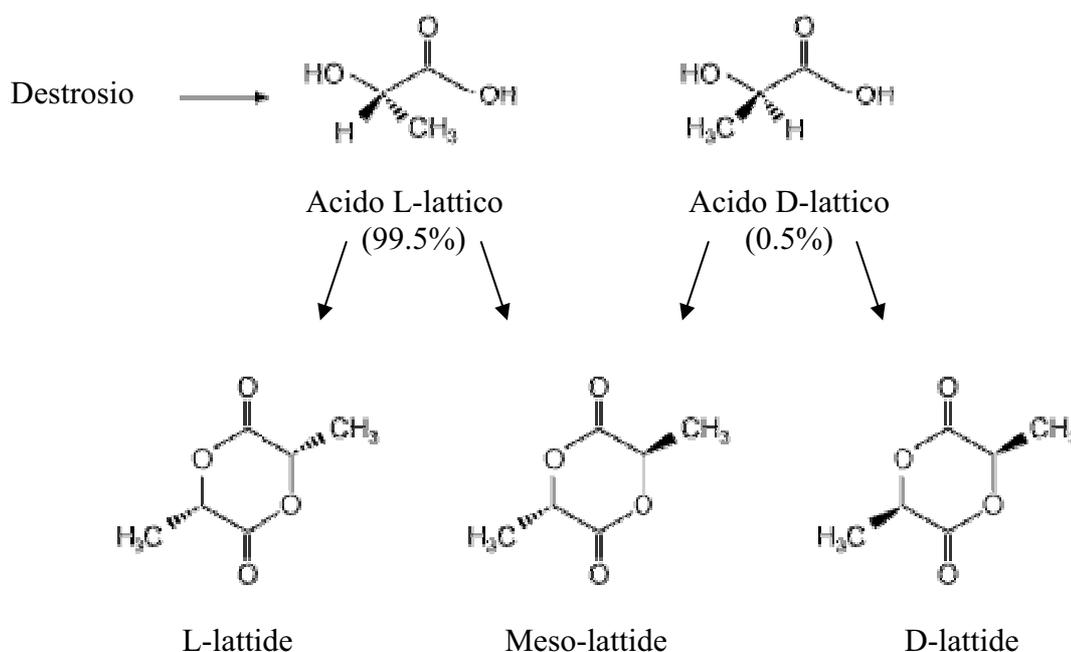
L'acido lattico è convertito nel dimero (lattide) che è purificato e polimerizzato (metodo dell'apertura dell'anello) ad acido polilattico senza bisogno di solventi (Figura 1.5).



**Figura 1.5:** Vie diretta e tramite dimero per il PLA.

Fermentato, l'acido lattico è per il 99,5% in forma L-isomero e per lo 0,5% in forma D-isomero.

La conversione a dimero può essere controllata per avere tre forme differenti: L, D, e mesolattidi. (Figura 1.6).



**Figura 1.6:** Sono possibili tre diversi lattidi

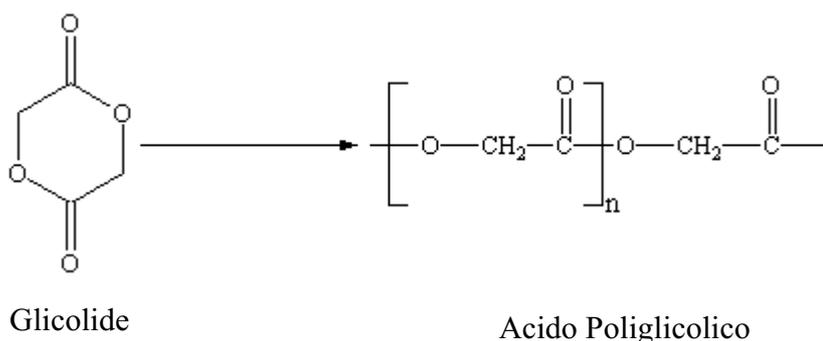
La polimerizzazione del lattide verso polimeri ricchi di L-isomero dà prodotti cristallini, mentre quelli che contengono più del 15% di D-isomero sono più amorfi. Il miglior controllo della stereochimica che si realizza con la via del dimero e l'ottenimento di polimeri a pesi molecolari più alti, spiega la superiorità dei prodotti attuali rispetto a quelli di Carothers del 1932.

Le proprietà dell'acido poli-L-lattico (PLLA) e dell'acido poli-(D,L)-lattico (P(D,L)LA) sono molto diverse; nello specifico, l'omopolimero PLLA è un polimero semicristallino con un punto di fusione ( $T_m$ ) compreso tra i 173-178°C e una temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) compresa tra 60-65°C<sup>7</sup>; tale poliestere possiede un elevato carico a rottura, ma un modesto allungamento a rottura che ne determinano un precipuo impiego nelle applicazioni biomediche che richiedono un'elevata resistenza al carico come, ad esempio, nei dispositivi ortopedici<sup>8,9</sup>. Mentre il

P(D,L)LA 50:50 (il più diffuso) è un polimero dove i due isomeri dell'acido lattico sono distribuiti casualmente lungo la catena, ed è perciò incapace di arrangiarsi in una struttura cristallina organizzata; è quindi un polimero amorfo, caratterizzato da un minor carico a rottura, una più elevata deformazione sotto stiro e un tempo di degradazione idrolitica minore del PLLA cristallino che impiega, invece, circa 3 anni per essere completamente riassorbito<sup>10</sup>. Data l'assenza di fase cristallina lo stereocopolimero P(D,L)LA 50:50 è un ottimo materiale utilizzabile nei sistemi a rilascio controllato dei farmaci<sup>8,9</sup>.

I polimeri della famiglia dell'acido lattico possiedono buone proprietà meccaniche, tuttavia presentano degli inconvenienti importanti come una certa sensibilità all'acqua, che causa idrolisi della catena polimerica e al calore che, durante lavorazione ad alta temperatura, provoca scissione della catena polimerica con conseguente abbassamento del peso molecolare<sup>11</sup>. In passato alcuni studiosi hanno cercato di minimizzare l'effetto di peggioramento delle proprietà dovuto ai fenomeni descritti, utilizzando polimeri ad altissimo peso molecolare; purtroppo, l'elevato aumento della viscosità del fuso durante la lavorazione provoca un surriscaldamento che innesca fenomeni di degradazione termica di rottura di catena.

L'acido poliglicolico (PGA) è il poliesteri lineare alifatico più semplice. Il PGA può essere sintetizzato tramite condensazione o polimerizzazione ad apertura dell'anello del glicolide, il di estere ciclico dell'acido glicolico (Figura 1.7). L'acido poliglicolico è noto sin dal 1954 come polimero capace di formare fibre molto resistenti, tuttavia a causa della sua instabilità idrolitica il suo uso è stato limitato<sup>12</sup>.



**Figura 1.7**

Il PGA è un polimero altamente cristallino con una temperatura di fusione di 225-230°C e una transizione vetrosa compresa tra 35-40°C; questo polimero è anche caratterizzato da un alto grado di cristallinità (45-55%)<sup>13</sup> che lo rende scarsamente solubile in solventi organici ad eccezione di solventi fluorurati quali ad esempio l'esafluoroisopropanolo. Tale poliestere fu usato per la prima volta negli anni settanta per la produzione di fili da sutura totalmente riassorbibili commercializzati poi con il nome DEXON<sup>12,14,15</sup>. Le fibre per suture sono piuttosto rigide e presentano un elevato carico a rottura e buona resistenza meccanica. Tuttavia, utilizzate in vivo, tali fibre perdono circa il 50% della propria tenacia in due settimane e il 100% in quattro. Aspetto interessante è la buona riassorbibilità delle fibre di PGA; nel giro di quattro-sei mesi<sup>15</sup>, esse sono completamente riassorbite dal metabolismo umano. Il PGA viene degradato dall'enzima esterasi che idrolizza i legami esterei a formare unità monometriche di acido glicolico, il quale viene in parte eliminato tramite l'urina e in parte trasformato mediante specifiche reazioni biosintetiche, in acido piruvico per entrare infine nel ciclo di Krebs<sup>9</sup>. Il ruolo giocato dal PGA nel campo delle suture biodegradabili ha poi aperto la via all'utilizzo di questo materiale anche in altri campi biomedicali, ad esempio nel settore dell'ingegneria dei tessuti e del rilascio controllato dei farmaci. Supporti per l'ingegneria dei tessuti sono stati preparati con il PGA secondo diversi approcci, ma il più utilizzato prevede l'impiego di tecniche di tipo tessile per costruire strutture in forma di "non-tessuti" (non-wovens) altamente porose entro cui crescere cellule.

I copolimeri di PLA e PGA (PLGA) hanno suscitato, fin dalla fine degli anni sessanta e primi settanta, un enorme interesse in campo biomedico per la loro eccellente biocompatibilità e biodegradabilità. I copolimeri PLGA sono stati commercializzati per la produzione di suture sintetiche con il nome di Vicryl. In letteratura numerose sono le pubblicazioni che sottolineano l'utilità di questi biopolimeri<sup>16,17</sup>. Ad esempio, impiegati nelle fibre per suture mostrano ottime proprietà meccaniche, bassa immunogenicità e tossicità, una straordinaria biocompatibilità ed una nota cinetica di degradazione. Tutte queste caratteristiche rendono molto questi materiali molto utili perché possono essere usati in molti dispositivi biomedicali quali le ricostruzioni dei legamenti, sostituzioni tracheali,

innesti vascolari, dentali, nervosi<sup>16-18</sup>, nonché per la produzione di film e microsfele, microcapsule per il rilascio controllato di farmaci.

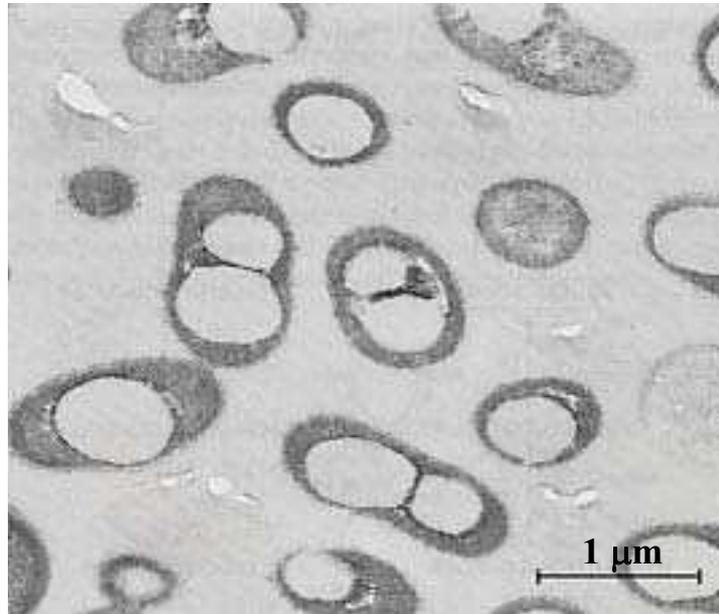
Le proprietà fisiche, come il peso molecolare e l'indice di polidispersità influenzano le proprietà meccaniche dei copolimeri e la loro abilità ad essere impiegati per il rilascio di farmaci<sup>16,17</sup>. Inoltre come già notato nel caso del PLLA e P(D,L)LA la copolimerizzazione in genere porta ad una diminuzione della cristallinità e di conseguenza a variazioni delle proprietà fisico-meccaniche. La velocità di degradazione idrolitica è anch'essa influenzata direttamente dalla cristallinità e nei copolimeri PLGA essa dipende dal tipo e dal rapporto molare dei monomeri<sup>19</sup>. Infatti, essendo l'acido lattico più idrofobo dell'acido glicolico, i copolimeri PLGA ricchi di acido lattico assorbono meno l'acqua e di conseguenza degradano più lentamente di quelli ricchi nell'altro comonomero. Una caratteristica della degradazione "in vivo" dei polimeri dell'acido e glicolico è l'accelerazione del processo dovuto ai gruppi acidi ottenuti durante l'idrolisi della catena polimerica; questo comporta un aumento dei gruppi carbossilici terminali che fungono da catalizzatore del processo di idrolisi che ne è quindi accelerato<sup>16,17</sup>. I prodotti di degradazione sono acido lattico e glicolico; il primo entra nel ciclo di Krebs ed è metabolizzato e di seguito eliminato sotto forma di CO<sub>2</sub> e acqua, il secondo, come già detto in precedenza, può seguire lo stesso percorso del lattico dopo essere stato trasformato in acido piruvico.

### 1.3. Poli-3-idrossibutirrato

Gli acidi poli (3-idrossialcanoici) (PHA) batterici sono polimeri termoplastici biodegradabili e biocompatibili, prodotti da una grande varietà di microrganismi a partire da sorgenti di carbonio diverse. I PHA vengono immagazzinati, sotto forma di granuli<sup>20</sup> (Figura 1.8) di diametro pari a 0.5 µm, nella cellula dei batteri come riserva di energia e di carbonio.

Fino ad oggi sono stati individuati o sviluppati almeno un centinaio di PHA a composizione diversa, alcuni dei quali ottenuti da ceppi batterici geneticamente modificati. Questi polimeri biodegradabili hanno suscitato grande interesse negli ultimi vent'anni, in quanto sono materiali ecologici ("environmentally friendly"), che

possono essere degradati da numerosi microrganismi con produzione di acqua, anidride carbonica e biomassa.



**Figura 1.8:** Sezione di *Alcaligenes eutrophus* contenete granuli di PHB (parte bianca).

Il successo commerciale dei PHA è in parte dovuto all'alta resa del processo produttivo: in condizione di coltura appropriate (terreni contenenti un eccesso di glucosio), ed in particolare in carenza di qualche nutriente essenziale (ad esempio N, P, S), i poliidrossialcanoati si accumulano nel batterio fino ad una concentrazione che può raggiungere il 80% del peso secco della massa batterica. Inoltre la vasta gamma di PHA conosciuti, offre la possibilità di ottenere materiali dalle più svariate proprietà meccaniche, termiche, di barriera, ecc.; PHA costituiti da unità con catene laterali corte sono altamente cristallini, mentre quelli costituiti da unità con catene laterali più lunghe tendono ad essere elastomerici.

Il poli(3-idrossibutirrato) (PHB) è il membro più famoso della famiglia dei PHA. Questo omopolimero è un poliestere lineare provvisto di un carbonio centro stereogenico che nella produzione per via biosintetica, assume sempre conformazione  $R^{20}$ , conferendo carattere isotattico alla catena.

L'assoluta regolarità della catena macromolecolare è determinante per lo sviluppo dell'elevata cristallinità tipica in questo poliestere. Il PHB viene prodotto da un'ampia

varietà di batteri che, come detto sopra, lo accumulano sotto forma di granuli intracellulari e lo utilizzano come materiale di riserva, fonte di energia e di carbonio<sup>21</sup>. Anche se viene accumulato come polimero, viene utilizzato dal microrganismo come monomero; il batterio quindi, oltre a contenere l'enzima che rende possibile il processo di polimerizzazione, è provvisto anche dell'enzima che catalizza la reazione di depolimerizzazione<sup>22</sup>.

Il PHB fu scoperto nel 1926 da Lemoigne dell'Istituto Pasteur come costituente del microrganismo *Bacillus Megaterium* e per vari decenni rimase una curiosità microbiologica non finalizzata ad alcuna applicazione pratica. Un forte interesse di tipo tecnologico verso il poliidrossialcanoati e in particolare verso il PHB, nacque negli anni settanta in funzione della possibilità di disporre di materiali polimerici sostitutivi alle olefine, sia in relazione alla crisi petrolifera, che faceva ritenere prossima la fine delle scorte, sia in relazione ai problemi connessi con lo smaltimento dei rifiuti e quindi all'aumento dell'inquinamento ambientale. Il PHB potrebbe perciò diventare un candidato a sostituire dei polimeri termoplastici ad uso quotidiano, associando le sue proprietà fisiche, simili a quelle del polipropilene<sup>21</sup>, con la sua biodegradabilità. Tra le proprietà del PHB di notevole interesse è la biocompatibilità che lo rende potenzialmente utilizzabile per applicazioni in campo medico e chirurgico. Tuttavia un'applicazione su larga scala di questo poliestere non è stata ancora sviluppata, principalmente per i seguenti motivi: un costo molto elevato, nonostante gli enormi progressi biotecnologici compiuti per potenziarne la produzione, ed inoltre, una bassa resistenza meccanica e infine una certa instabilità termica in fase di lavorazione, che si manifesta leggermente al di sopra della sua temperatura di fusione. All'inconveniente del costo di produzione elevato e alle proprietà meccaniche non ottimali si può ovviare, almeno in parte, miscelando il PHB con un secondo componente polimerico (polymer blending), che migliori possibilmente le proprietà del poliestere batterico senza però eliminarne le proprietà già soddisfacenti come la biodegradabilità e la biocompatibilità; la ricerca di un polimero compatibile con il poliestere batterico è finalizzata ad ottenere nuovi materiali con caratteristiche e proprietà mirate. Il problema della degradazione termica lo si può risolvere ricorrendo all'uso di plastificanti che abbassano la temperatura di

lavorazione, oppure favorendo la produzione di copolimeri , in particolari condizioni di alimentazione dei batteri.

A fianco degli studi sui PHA batterici si è sviluppato un lavoro di ricerca per ottenere PHA equivalenti per via sintetica, allo scopo di eliminare i problemi legati alla produzione per via fermentativa: gli alti costi legati alla ricerca biotecnologia, la difficoltà della realizzazione e conduzione di impianti di fermentazione di grandi dimensioni ed infine i problemi legati ai processi di recupero e purificazione del polimero. Nella produzione dei PHA per via sintetica, è tuttavia difficile ottenere purezza ottica elevata. Mentre nella biosintesi del PHB la configurazione del carbonio chirale nell'unità monometrica è rigorosamente (R) e il polimero è isotattico, per ottenere la tatticità opportuna nei PHA di sintesi si devono usare adatti catalizzatori. Sono stati sperimentati vari sistemi di catalisi e si sono ottenuti PHB con diversa stereoregolarità<sup>23-28</sup> a partire dal polimero con elevato grado di isotatticità (cristallino), fino al polimero totalmente atattico<sup>23,26-28</sup> (amorfo). E' stato anche ottenuto il PHB sindiotattico, semicristallino<sup>29,30</sup>. L'utilizzo di PHB di sintesi in sostituzione di quello batterico presenta vantaggio di una regolarità strutturale modificabile praticamente "a piacere", con l'ottenimento di materiali le cui proprietà chimico-fisiche possono essere modulate di conseguenza.

Nel corso della presente Tesi si è utilizzato un poli[(R,S)-3-idrossibutirrato] atattico (a-PHB), contenete 50% in moli di unità in configurazione S distribuite casualmente lungo la catena polimerica. Il polimero risulta quindi atattico e privo di fase cristallina utile come componente a bassa  $T_g$  in leghe miscibili con poliesteri rigidi per abbassarne la cristallinità. Il a-PHB risulta essere un elastomero a temperatura ambiente e risulta interessante come biomateriale per la sua comprovata biocompatibilità<sup>31,32</sup>.

## 1.4. Fase cristallina

Un materiale si trova allo stato solido in fase cristallina quando le sue unità costituenti sono disposte in maniera ordinata secondo un motivo che si ripete nello spazio. Si può così identificare una porzione di struttura, la cella elementare, che

contiene tutte le operazioni di simmetria del cristallo e che, traslata nelle tre direzioni dello spazio, riproduce il reticolo cristallino.

Nel caso dei materiali polimerici la catena deve presentare particolari caratteristiche affinché si possa avere la formazione di fase cristallina:

- i legami tra le unità costitutive devono essere dello stesso tipo, per esempio sempre testa-coda (regolarità costituzionale)

- deve presentare una certa flessibilità di catena (rotazione libera attorno ai legami e sostituenti poco ingombranti) per assumere una conformazione ad elica o a zig-zag (regolarità conformazionale)

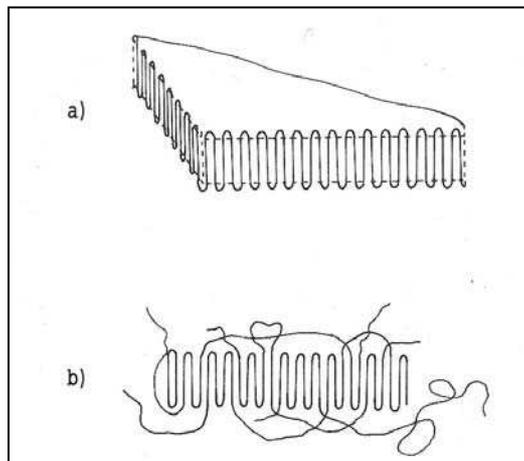
- se sono presenti dei centri stereogenici, deve possedere regolarità configurazionale

- deve contenere al suo interno dei gruppi funzionali che promuovano interazioni intra e inter catena per favorire il processo di formazione del cristallo ( $\Delta H$  molto negativo)

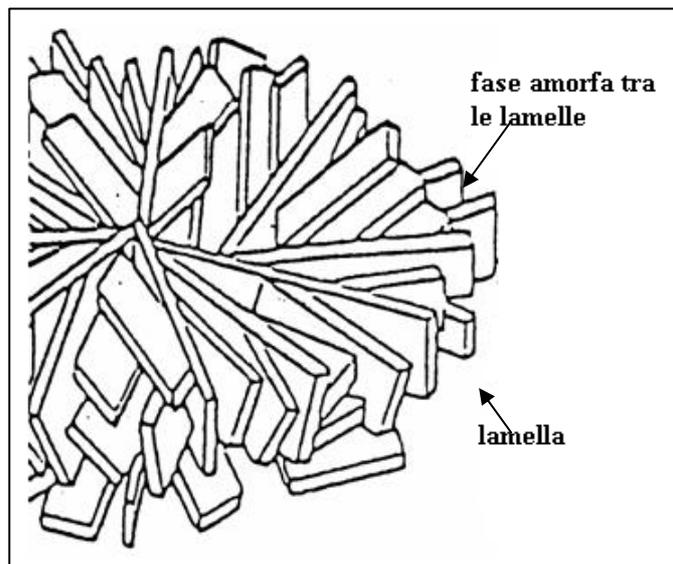
- deve essere il più possibile lineare (doppi legami in trans e anelli sostituiti in para) affinché le catene si aggregino tra loro per dare il massimo impaccamento.

Si deve precisare che, nel caso di materiali polimerici, si parla sempre di parziale cristallinità perché il grado di cristallinità raggiungibile non è mai il 100%.

La cristallizzazione in massa dei fusi polimerici, tra cui il PHB, porta comunemente alla formazione di sferuliti (Figura 1.9), oggetti policristallini di dimensioni tra 0.1  $\mu\text{m}$  e qualche centimetro. La caratteristica principale della morfologia sferulitica è la presenza di unità cristalline molto allungate in una delle tre direzioni dello spazio, dette lamelle (Figura 1.10), aventi spessore dell'ordine di 10-100  $\text{nm}^{33}$  che si irradiano in tutte le direzioni da un nucleo centrale di cristallizzazione, riuscendo a riempire omogeneamente tutto il volume sferico grazie ad un meccanismo di ramificazioni successive.



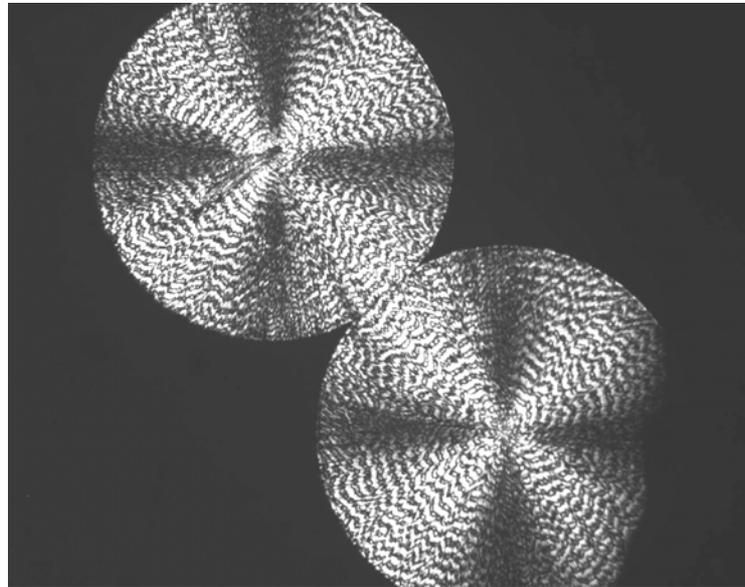
**Figura 1.9:** Ripiegamento delle macromolecole in una lamella: a) ripiegamento ideale, b) altri tipi di ripiegamenti.



**Figura 1.10:** Le lamelle si dipartono da un nucleo centrale per formare una struttura sferica.

Una sferulite osservata al microscopio ottico a nicols incrociati appare con una geometria circolare contenente delle zone illuminate e delle zone buie: è visibile una porzione di spazio scura a forma di croce maltese le cui braccia sono l'una parallela e

l'altra perpendicolare alla direzione di polarizzazione della luce incidente. Nel caso del PHB le sferuliti presentano inoltre dei cerchi concentrici di estinzione della luce alternati a cerchi illuminati (Figura 1.11).



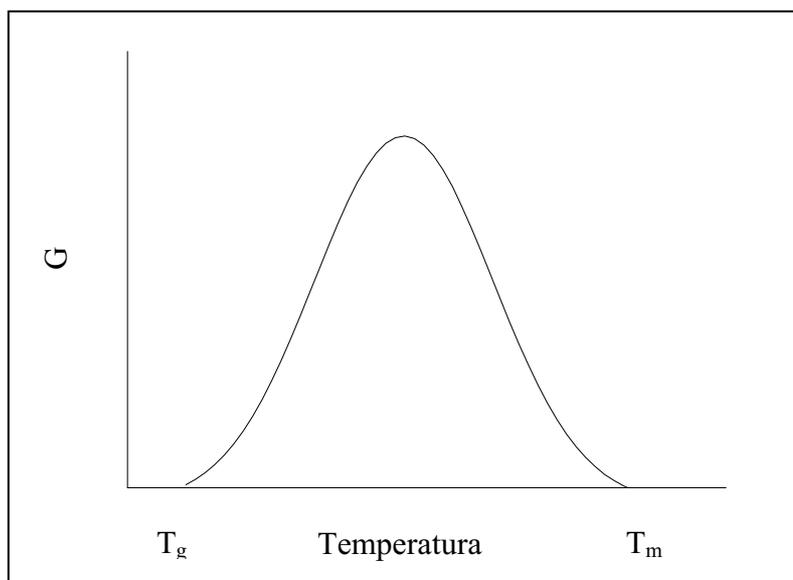
**Figura 1.11:** Due sferuliti in crescita (ingrandimento  $\times 50$ ).

#### 1.4.1. Cinetica di cristallizzazione

Il processo di cristallizzazione di un fuso polimerico avviene sostanzialmente in due stadi successivi. La prima fase è detta nucleazione e nella massa del polimero si formano microdomini ordinati (aggregati cristallini) di dimensioni opportune tali da raggiungere una situazione stabile. La seconda fase detta di accrescimento, implica a sua volta la formazione di nuclei stabili sulle superfici del cristallo in crescita ed il loro ulteriore sviluppo.

Sia la nucleazione che l'accrescimento sono fenomeni fisici la cui cinetica dipende dal superamento di barriere di energia di attivazione da parte degli elementi che devono cristallizzare. La temperatura alla quale viene condotta la cristallizzazione ha grande importanza in quanto determina l'energia termica delle macromolecole: tanto più la temperatura è alta, vicino alla temperatura di fusione, tanto più il processo di nucleazione è lento a causa della maggior mobilità delle catene polimeriche. D'altro canto, tanto più la temperatura è bassa, vicino alla temperatura di transizione vetrosa,

tanto più lento è l'accrescimento in quanto viene ostacolato il processo di diffusione attraverso il quale la catena polimerica raggiunge la superficie del cristallo. Il parametro temperatura ha pertanto effetti opposti sulle velocità di diffusione e deposizione e di conseguenza sulla velocità di cristallizzazione globale, che mostrerà un massimo a temperature intermedie. (Figura 1.12).



**Figura 1.12:** Diagramma semplificato della caratteristica campana di cristallizzazione di un polimero.

Nel caso della cristallizzazione sferulitica, la dipendenza della velocità di crescita radiale  $G$  dalla temperatura di cristallizzazione può essere espressa come segue<sup>34</sup>:

$$G = G_0 \exp(-\Delta E_a / KT_c) \exp(\Delta G^* / KT_c) \quad \text{Equazione 1}$$

dove,  $G_0$  è il fattore pre-esponenziale;  $T_c$  è la temperatura di cristallizzazione;  $\Delta E_a$  è l'energia libera di attivazione relativa alla diffusione a breve distanza, attraverso l'interfaccia amorfo-cristallo, degli elementi che devono cristallizzare;  $\Delta G^*$  è l'energia associata alla formazione del nucleo di dimensioni critiche e  $K$  è la costante di Boltzman. Diagrammando la velocità di crescita radiale  $G$  in funzione di  $T_c$  si ottiene un andamento a campana (Figura 1.12), delimitato a bassa temperatura dalla temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ), al di sotto della quale le macromolecole sono

“congelate” in una conformazione disordinata, e ad alta temperatura dalla temperatura di fusione ( $T_m$ ), sopra la quale le catene non presentano alcuna regolarità posizionale. La zona di temperature compresa tra  $T_g$  e  $T_m$  è detta finestra di cristallizzazione.

### Cristallizzazione non-isoterma

Lo studio della cristallizzazione da fuso in condizioni isoterme consiste, dopo aver scelto un’opportuna temperatura di cristallizzazione, nel misurare l’aumento del raggio dello sferulite in funzione del tempo<sup>35</sup>, tenuto conto che la velocità di crescita delle unità lamellari che lo compongono è mediamente uguale in tutte le direzioni. Ne consegue che  $G$  può essere espressa nel modo seguente:

$$G = \frac{dr}{dt} \quad \text{Equazione 2}$$

In questa Tesi di Dottorato è stato utilizzato un metodo alternativo proposto da Chen e Chung<sup>36,37</sup> e recentemente applicato da Di Lorenzo<sup>38,39</sup> per la cristallizzazione sia di omopolimero che di leghe polimeriche. La cristallizzazione viene seguita in condizioni non-isoterme applicando al fuso polimerico un raffreddamento a velocità costante. L’equazione per ottenere la velocità di crescita radiale  $G$  risulta essere:

$$G = \left( \frac{dr}{dT} \right) \left( \frac{dT}{dt} \right) = \frac{dr}{dt} \quad \text{Equazione 3}$$

dove  $\frac{dT}{dt}$  è la variazione di temperatura ( $T$ ) nel tempo ( $t$ ) impostata e  $\frac{dr}{dT}$  è la derivata della curva raggio ( $r$ ) in funzione di  $T$ . Si è scelto di interpolare i dati sperimentali ottenuti con una funzione geometrica sigmoidale del tipo:

$$y = \frac{(A_1 - A_2)}{\left( 1 + e^{\frac{(x-x_0)}{dx}} \right)} + A_2 \quad \text{Equazione 4}$$

dove  $A_1$  e  $A_2$  sono rispettivamente l’asintoto inferiore e superiore,  $x_0$  è il valore di  $x$  nel punto di flesso e  $dx$  definisce la pendenza della retta tangente al punto di flesso.

La scelta di tale funzione (Equazione 4) è dettata dal fatto che la sua derivata è una curva che presenta un massimo in corrispondenza del punto di flesso della sigmoide

come previsto per l'andamento di  $G$  in funzione di  $T_c$  che è noto essere di tipo campana (Figura 1.12). La derivata ad una data temperatura viene calcolata conoscendo la funzione di interpolazione.

Questo metodo permette di acquisire i valori di  $G$  in un ampio intervallo di temperature effettuando un singolo esperimento di cristallizzazione a differenza del metodo isoterma in cui si ottiene un singolo valore di  $G$  per ogni misura. L'intervallo di temperature in cui effettuare le misure di cristallizzazione non-isoterma può essere ampliato facilmente utilizzando varie velocità di raffreddamento: tanto più è lenta la velocità di raffreddamento tanto più lento è il cambiamento di temperature e tanto prima si verifica la formazione di nuclei stabili in quanto le macromolecole hanno più tempo per organizzarsi ed attivare la nucleazione.

Occorre però precisare che l'opportunità di acquisire dati relativi a cristalli in crescita dipende anche dalla possibilità di individuare nel campione i primi nuclei che si formano e posizionarli nel campo visivo. Tale procedura richiede tempo e spesso comporta la perdita delle informazioni relative a zone a temperature elevate. Per questo motivo sono state utilizzate procedure di "self-nucleation"<sup>38,40</sup>: i campioni sono sottoposti ad una breve isoterma a temperature più basse per favorire la formazione dei nuclei e quindi la crescita sferulitica viene seguita a temperature più elevate. La nucleazione si è dimostrata necessaria per rilevare dati del ramo alto della campana di cristallizzazione. La breve isoterma dà, infatti, il tempo per poter cercare il punto dove si è formato il nucleo e posizionarlo all'interno del campo visivo senza che la temperatura si abbassi.

## 1.5. Degradazione idrolitica

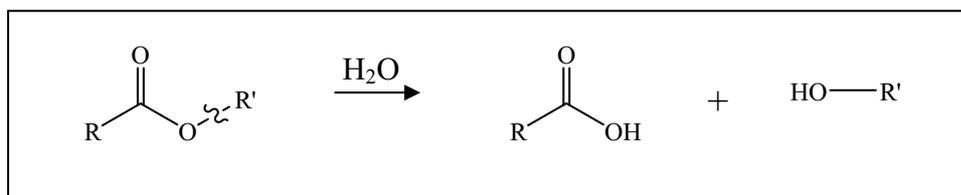
La degradazione del polimero è la reazione nella quale si ha la scissione di legami della catena polimerica con la conseguente formazione di oligomeri, monomeri e di altri prodotti a basso peso molecolare. Un polimero è considerato degradabile se la reazione di degradazione viene indotta dall'ambiente esterno e si parla di:

- **Degradazione termica:** processo causato dalla variazione della temperatura
- **Degradazione idrolitica:** processo causato dal contatto con un mezzo acquoso

- **Fotodegradazione:** processo causato da reazioni fotochimiche per esposizione a raggi UV
- **Biodegradazione:** a seguito di processi biocatalitici (per effetto di batteri, funghi, enzimi).

Molti fattori influenzano la velocità di degradazione di un polimero: struttura chimica, architettura macromolecolare, peso molecolare, geometria della particella, porosità, condizioni dell'ambiente esterno (pH, temperatura,...). Durante il processo di degradazione si ha la variazione di molte proprietà del polimero: riduzione del peso molecolare, della resistenza meccanica, aumento della cristallinità, formazione di monomeri e variazioni di pH.

Come si è già detto in precedenza, i materiali biodegradabili con applicazioni in medicina, una volta impiantati devono mantenere le loro proprietà meccaniche finché hanno terminato la loro funzione dopodiché subiscono una progressiva degradazione all'interno del sistema biologico, senza che questo provochi reazioni di rigetto o effetti tossici. Nel caso di materiali con legami come quello di tipo estereo la degradazione avviene per via idrolitica (Schema 1). In questo caso la velocità di degradazione è legata alla capacità del polimero di assorbire l'acqua, cioè dipende dalla idrofilicità della sostanza.



**Schema 1.1**

Questo processo avviene in due fasi. Nella *prima fase* l'acqua penetra nel materiale attaccando i legami della fase amorfa e convertendo la catena polimerica in frammenti più corti solubili in acqua. Poiché questo fenomeno coinvolge inizialmente la fase amorfa, si avrà un calo del peso molecolare senza, però produrre vistosi cambiamenti delle proprietà fisiche che vengono garantite dalla fase cristallina. Nella *seconda fase* la riduzione del peso molecolare delle catene polimeriche è seguita dalla perdita delle proprietà fisiche e meccaniche, mentre l'acqua continua a frammentare il materiale e

quando i prodotti di degradazione diventano solubili nel mezzo acquoso, si avrà una perdita del peso del materiale.

I poliesteri (PLA, PGA, PLGA) descritti nei paragrafi precedenti generano prodotti di degradazione che vengono naturalmente metabolizzati dall'organismo umano. Sia l'acido poli lattico che l'acido poli glicolico possono essere lavorati facilmente, inoltre la loro velocità di degradazione e le loro proprietà fisiche e meccaniche, possono essere modulate in funzione dell'uso finale, variando il peso molecolare e la composizione dei copolimeri.

Diversi sono i fattori che influenzano la cinetica di degradazione dei poliesteri: la composizione chimica e la struttura configurazionale, il peso molecolare, le condizioni dell'ambiente in cui avviene l'idrolisi, la cristallinità, le dimensioni del manufatto e in particolare il rapporto tra area superficiale e volume, la morfologia (ad esempio la porosità) e l'orientazione delle catene, presenza di eventuali additivi, tecnica di fabbricazione del dispositivo, natura idrofoba o idrofilica del polimero.

In genere il PGA degrada più velocemente del PLA poiché quest'ultimo è più idrofobo per la presenza dei gruppi metili. In merito a tale dipendenza, i dati riportati in letteratura<sup>41</sup> (Tabella 1.3) sono decisamente concordanti: si è dimostrato infatti che l'acido polilattico degrada più lentamente rispetto ai copolimeri, in cui sono presenti unità di acido glicolico più idrofile: all'aumentare del contenuto di acido glicolico la velocità di degradazione cresce.

**Tabella 1.3:** Tempi di degradazione e proprietà fisiche di poliesteri alifatici biodegradabili.

Polimero	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	Tempo di degradazione (mesi)
PGA <sup>42-44</sup>	35-40	225-230	6-12
PLLA <sup>42,43</sup>	60-65	173-178	> 24
P(D,L)LA <sup>9, 42,43</sup>	55-60	amorfo	12-16
PLGA <sup>45</sup>	45-55	amorfo	Modulabile: 1-12

È importante sottolineare come la cristallinità sia uno dei fattori responsabili del differente comportamento diffusivo dell'acqua in questi materiali. Catene polimeriche altamente regolari danno origine ad una matrice particolarmente compatta e regolare,

fortemente cristallina mentre una matrice amorfa presenta “maglie” più larghe e irregolari che permettono all’acqua di penetrare e diffondere meglio nel materiale. Questo dato si riflette numericamente nei coefficienti diffusivi dell’acqua, che risultano essere più elevati nel P(D,L)LA rispetto al PLLA e comporta che il poli lattico amorfo subisca idrolisi in tempi più brevi rispetto al poli lattico semicristallino. Studi precedenti hanno rivelato che la degradazione induce la cristallizzazione di copolimeri che, per la loro composizione, non dovrebbero cristallizzare. Questo fenomeno è stato spiegato assumendo che l’idrolisi avvenga preferenzialmente sui legami esterei delle unità di acido glicolico. Il processo di degradazione perciò cambia nel tempo la composizione delle catene generando catene residue costituite principalmente da unità di acido lattico<sup>46,47</sup>: quando il contenuto di acido lattico è sufficientemente alto si può formare la fase cristallina dell’acido polilattico<sup>48-50</sup>.

Gli studi di degradazione idrolitica in vitro a pH e temperatura fisiologica hanno dimostrato come la velocità di degradazione dipenda anche dalle dimensioni del dispositivo<sup>51,52</sup>. Infatti nei materiali polimerici di dimensioni medio-grandi, sia in vivo che in vitro, si è verificata una degradazione eterogenea molto più veloce nelle parti interne che non all’esterno. Nel caso del P(D,L)LA<sup>51</sup> si è mostrata la massima accentuazione del fenomeno, con la formazione di una struttura prima gelatinosa all’interno poi, man mano che gli oligomeri interni riuscivano ad uscire attraverso gli strati esterni in più lenta degradazione, di vere cavità all’interno del materiale. Conseguenze sono state un’iniziale stabilità del peso del campione, ma un calo nel peso molecolare medio con derivato calo delle caratteristiche meccaniche. In un secondo tempo si è iniziato a manifestare un calo anche del peso del campione, con una riduzione sempre più significativa del peso molecolare medio e delle caratteristiche meccaniche.

Da tali studi si evince come il primissimo fenomeno che avviene è l’assorbimento dell’acqua che si è dimostrato perdurare in tutte le fasi della degradazione. La penetrazione di acqua all’interno del materiale crea rapidamente un gradiente negativo di concentrazione dell’acqua dalla superficie verso l’interno; tuttavia questo gradiente scompare nel giro di pochi giorni, essendo la velocità di diffusione di molecole piccole come quelle dell’acqua assai superiore rispetto alle velocità di degradazione. Considerando i primissimi giorni di esperimento, si può affermare che la degradazione avvenga in modo omogeneo<sup>51</sup>. Altrettanto però non può dirsi per le restanti fasi della

degradazione: due fattori sono infatti fondamentali per comprendere i meccanismi degradativi che si instaurano dopo i primi giorni. Per prima cosa la degradazione idrolitica provoca la formazione di gruppi carbossilici alle estremità delle catene frammentate e la presenza di tali gruppi innesca un fenomeno di autocatalisi nell'idrolisi dei legami esterei<sup>53</sup>. Secondariamente solo gli oligomeri che risultano solubili nel mezzo acquoso circostante al materiale possono lasciare la matrice. Con l'avanzare del tempo, gli oligomeri che si trovano più vicini alla superficie del materiale sono più facilitati a lasciare la matrice rispetto a quelli che si trovano più internamente. Questi ultimi trovandosi intrappolati contribuiscono con i loro gruppi carbossilici ad aumentare l'effetto autocatalitico all'interno della matrice. Questo fenomeno si manifesta attraverso la presenza di uno strato superficiale di polimeri meno degradato. Va sottolineato che la solubilità degli oligomeri con terminazioni carbossiliche dipende da vari fattori dei mezzi acquosi che circondano il materiale: principalmente pH, forza ionica e temperatura.

## 2. SCOPO

La medicina e la chirurgia fanno ricorso, in maniera crescente, a materiali estranei all'organismo al fine di porre rimedio, in via promissoria o definitiva, al deficit di un funzione fisiologica. Tali materiali, denominati *biomateriali* proprio per la loro capacità di sostituire parzialmente o completamente funzioni di un organismo vivente, devono possedere il requisito fondamentale della biocompatibilità, vale a dire devono interagire in maniera non dannosa con l'organismo. Tra i vari materiali impiegati in campo biomedicale il 50% risulta essere di natura polimerica. I principali vantaggi che i polimeri di sintesi presentano rispetto alle altre classi di materiali (metalli, ceramiche, compositi, etc.) sono una maggiore biocompatibilità, la possibilità di modificarne ampiamente composizione e proprietà fisico-meccaniche, bassi coefficienti di attrito, facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture complesse, possibilità di modificarne chimicamente e/o fisicamente la superficie, possibilità di immobilizzare cellule o biomolecole al loro intorno o sulla superficie. L'obiettivo di questo lavoro è quello di progettare nuovi biomateriali a base poliesterea. I materiali che si utilizzano sono poliesteri di comprovata biocompatibilità e biodegradabilità, appartenenti alla famiglia dei poli- $\alpha$ -idrossiacidi, e dei poli idrossialcanoati. A tale scopo si andranno a preparare per mescolamento, leghe a composizione variabile che verranno caratterizzate termicamente e morfologicamente. Inoltre, alle soglie del terzo millennio uno degli obiettivi primari della ricerca medica, risulta essere quello di progettare dispositivi che presentano dimensioni nanometriche. A tale scopo si utilizzerà la tecnica dell'elettrofilatura e si

indagheranno i principali parametri (sperimentali e strumentali) che risultano essere responsabili della diversa morfologia dei “mats” ottenuti, cioè della distribuzione dei diametri delle fibre e della presenza di eventuali difetti (beads). Una volta ottimizzata la procedura di elettrofilatura saranno condotte prove preliminari di degradazione idrolitica in vitro in condizioni fisiologiche, fondamentali per poter poi pensare ad un utilizzo specifico del materiale polimerico così ottenuto. La copolimerizzazione di polimeri la cui biocompatibilità e biodegradabilità è comprovata, è un altro dei metodi utilizzati allo scopo di ottenere un nuovo biomateriale con caratteristiche specifiche e modulabili in funzione della composizione dei monomeri di partenza. In questa Tesi di Dottorato verranno studiate le proprietà termiche e meccaniche di terpolimeri costituiti da unità di acido L-lattico, acido glicolico e trimetilencarbonato distribuite in modo casuale nella catena polimerica. Tali terpolimeri sono stati sintetizzati presso il “Centre of Polymer Chemistry, Polish Academy of Sciences” di Zabrze (Polonia) usando come iniziatore il zirconio (IV) acetilacetato invece dei comuni iniziatori a base di stagno ottanoato poiché lo zirconio presenta una minor tossicità rispetto ai complessi contenuti lo stagno.

## 3. PARTE SPERIMENTALE

### 3.1 Materiali utilizzati

#### 1.1

I polimeri utilizzati in questa Tesi sono i seguenti:

- Poli [(R)-3-idrossibutirrato] isotattico (PHB), di origine batterica fornito dalla ICI con  $M_n = 131000$ ,  $M_w/M_n = 4.11$ .
- Poli [(R,S)-3-idrossibutirrato] atattico (a-PHB) contenente il 50% in moli di unità in ciascuna delle due configurazioni distribuite in modo casuale lungo la catena. Sono stati utilizzati campioni di a-PHB con diversi pesi molecolari ottenuti per polimerizzazione anionica del  $\beta$ -butirrolattone (BL) con diversi catalizzatori<sup>23,26,54-56</sup>.
- Copolimeri degli acidi (L)-lattico e glicolico (PLxGA) con diverso contenuto percentuale di unità glicoliche (x): PL11GA ( $M_n = 62000$ ,  $M_w/M_n = 3.57$ ) e PL36GA ( $M_n = 20000$ ,  $M_w/M_n = 2.08$ ), sintetizzati in massa usando come iniziatore zirconio (IV) acetilacetato  $[Zr(Acac)_4]$ <sup>55,56</sup>.
- Acido poli-(L)-lattico (PLLA) (Lacea H100-E) prodotto commerciale fornito da Mitsui Fine Chemicals con  $M_n = 49400$ ,  $M_w/M_n = 1.70$ .
- Acido poli-(D,L)-lattico [P(D,L)LA], contenente 50% di unità D e 50% di unità L dell'acido lattico distribuite in modo statistico lungo la catena, sintetizzato in massa a 120-130°C usando come iniziatore zirconio (IV) acetilacetato<sup>56</sup>  $[Zr(Acac)_4]$  con  $M_n = 43000$ ,  $M_w/M_n = 1.95$ .
- Terpolimeri (Tabella 3.1) dell'acido (L)-lattico e dell'acido glicolico, e trimetilencarbonato. La terpolimerizzazione è stata condotta in massa a 100°C per 3 giorni usando come iniziatore zirconio (IV) acetilacetato  $[Zr(Acac)_4]$ <sup>57</sup> (rapporto iniziatore/monomero: 1/1000) e in atmosfera di argon. Tutti i campioni sono stati purificati tramite precipitazione in metanolo e successivamente essiccati a 80°C sottovuoto al fine di eliminare eventuali tracce di solvente.

**Tabella 3.1:** Composizione e peso molecolare di terpolimeri utilizzati, dove  
G = a. glicolico, L = a. lattico, T = trimetilencarbonato.

<b>Polimero</b>	<b>Composizione</b>	<b>Mn</b>	<b>Mw/Mn</b>
GLT1	G25:L53:T22	36000	3.0
GLT2	G24:L33:T42	21000	3.3
GLT3	G37:L36:T27	28000	2.5
GLT4	G35:L52:T13	30000	2.2

Tutti i polimeri, tranne il PHB batterico e il PLLA, sono stati sintetizzati dal gruppo del prof. M. Kowalczyk, presso il “Centre of Polymer Chemistry, Polish Academy of Sciences” di Zabrze (Polonia).

## 3.2 Preparazione delle leghe

### 1.2

Le leghe di PHB con P(D,L)LA sono state ottenute con due metodologie:

1. per solubilizzazione di quantità pesate dei due componenti in diclorometano (5% w/v). La soluzione viene versata in una capsula Petri per permettere l'evaporazione del solvente a temperatura ambiente. Con tale procedimento sono stati ottenuti dei film sottili di leghe a diversa composizione, con spessore 0.1-0.3 mm. Tutte le leghe sono state ulteriormente essiccate in stufa per 1 notte a 80°C e sottovuoto, al fine di eliminare il solvente residuo.
2. per mescolamento ed estrusione di quantità pesate dei due componenti ad alta temperatura. Il miscelatore-estrusore è costituito da un pozzetto, lo statore, in cui si introducono circa 0.7-0.8 g di materiale; al di sopra dello statore, in linea con la sua parte centrale, c'è un rotore munito di pistoncino retrattile; il tutto è termostato alla temperatura necessaria per rendere fluido il campione. Il materiale viene rammollito e sottoposto ad un movimento contemporaneo di rotazioni e spostamenti verticali, per circa un minuto, che ne favoriscono l'omogeneizzazione.

## 3.3 Tecniche sperimentali

### 3.3.1 Termogravimetria (TGA)

L'analisi termogravimetrica permette di seguire le variazioni di peso in funzione della 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. Questa tecnica dà quindi informazioni in merito alla stabilità del materiale polimerico ed è necessaria per conoscere l'intervallo di temperatura alla quale il polimero può essere mantenuto senza subire degradazione termica.

Lo strumento utilizzato è la termobilancia TA-TGA 2950: un braccio della bilancia porta un piattello su cui viene posto una quantità di campione compresa tra 5-10 mg che viene poi inserita all'interno di una fornace, l'altro braccio della bilancia contiene un altro piattello che funge da riferimento. Lo strumento è collegato ad un calcolatore sul quale viene impostato l'intervallo di temperature a cui si vuole lavorare e la velocità di scansione. Il termogramma in uscita riporta la variazione percentuale di peso in funzione della temperatura e la corrispondente funzione derivata in ogni punto.

La procedura utilizzata per l'analisi dei vari polimeri e leghe prevede una scansione da temperatura ambiente a  $600^\circ\text{C}$  ad una velocità di  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  in flusso di azoto.

### 3.3.2 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

#### 1.4

Le misure calorimetriche sono state eseguite con un calorimetro a flusso di calore TA-DSC Q100 interfacciato ad un personal computer che permette l'impostazione dell'analisi (temperatura iniziale, finale, velocità di scansione, ecc.), la registrazione e l'elaborazione dei dati. I campioni polimerici sono stati inseriti in capsule di alluminio e le analisi sono state condotte in atmosfera inerte per mezzo di un flusso costante di elio. Quando la sostanza subisce una transizione di fase si crea una differenza di temperatura tra il campione e il riferimento, che lo strumento converte in flusso di calore. Il diagramma in uscita riporta il flusso di calore,  $\Delta Q$ , in funzione della temperatura. Le transizioni del primo ordine, come la fusione e la cristallizzazione, si

manifestano con dei picchi, rispettivamente endotermici ed esotermici, mentre la transizione vetrosa provoca una variazione endoterma “a scalino” della linea di base.

La procedura utilizzata per l'analisi delle leghe polimeriche e per i rispettivi omopolimeri, è la seguente:

- prima scansione: riscaldamento alla velocità di 20°C/min da -80°C a 220°C
- isoterma per 4 minuti a 220°C
- raffreddamento veloce (tempra) fino a -80°C
- seconda scansione: riscaldamento alla velocità di 20°C/min da -80°C a 220°C.

La procedura utilizzata per l'analisi dei copolimeri, è la seguente:

- prima scansione: riscaldamento alla velocità di 20°C/min da -80°C a 180°C
- raffreddamento veloce (tempra) fino a -80°C
- seconda scansione: riscaldamento alla velocità di 20°C/min da -80°C a 180°C.

La procedura utilizzata per l'analisi dei terpolimeri, è la seguente:

- prima scansione: riscaldamento alla velocità di 20°C/min da -80°C a 220°C
- raffreddamento veloce (tempra) fino a -80°C
- seconda scansione: riscaldamento alla velocità di 20°C/min da -80°C a 180°C.

La procedura utilizzata per l'analisi del poli [(R,S)-3-idrossibutirrato] atattico (a-PHB) a diversi pesi molecolari è la seguente:

- prima scansione: riscaldamento alla velocità di 20°C/min da -80°C a 220°C
- raffreddamento veloce (tempra) fino a -80°C
- seconda scansione: riscaldamento alla velocità di 20°C/min da -80°C a 200°C.

Nella prima scansione le transizioni termiche subite dal campione sono determinate dalla storia termo-meccanica pregressa. Nella seconda scansione, invece, le transizioni termiche dipendono esclusivamente dalla natura della sostanza e dalla storia termica relativa alla fase di raffreddamento tra le due scansioni. Ciò si verifica perchè, al termine della prima scansione, il campione si trova ad una temperatura maggiore di  $T_g$  (o di  $T_m$ , nel caso in cui la sostanza possieda una fase cristallina). In queste condizioni il polimero è allo stato fuso, in una condizione di equilibrio, nel quale la sua “storia termica” pregressa viene cancellata. La temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) è stata valutata in corrispondenza della metà della variazione del calore specifico; la temperatura di fusione ( $T_m$ ) e di cristallizzazione ( $T_c$ ) si riferiscono al valore del massimo del picco corrispondente.

### 3.3.3 Microscopia ottica in luce polarizzata

I processi di cristallizzazione delle leghe di PHB con P(D,L)LA e di fusione delle sferuliti sono stati esaminati con il microscopio ottico in luce polarizzata Axioskop Zeiss (ingrandimento dell'oculare  $\times 10$ , ingrandimento dell'obbiettivo  $\times 5$ ,  $\times 20$ ,  $\times 32$ ). L'effetto della polarizzazione si realizza inserendo due filtri aventi direzione di polarizzazione perpendicolari: il primo, detto polarizzatore, è posto tra la sorgente di luce e il campione, il secondo, detto analizzatore, si trova tra l'oculare e l'obbiettivo. Per queste caratteristiche si dice che il microscopio è a "nicols" incrociati. Il sistema è provvisto di una fotocamera (AxioCam MRc Zeiss) in comunicazione con un computer. Tale apparato permette l'acquisizione digitale delle immagini che sono poi elaborate mediante il software Axio Vision 3.0. Il sistema è fornito inoltre di un tavolino riscaldante (Linkham TH600) controllato dal programma Linksys con cui si regolano le rampe di riscaldamento, raffreddamento e isoterme a cui il polimero è sottoposto. Una piccola quantità di campione è posizionato tra due sottili vetri copri-oggetto a temperatura ambiente nel tavolino riscaldante. Viene riscaldato ad una velocità di  $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  fino a  $220^{\circ}\text{C}$ , temperatura superiore alla temperatura di fusione e mantenuto a quella temperatura per 4 minuti per distruggere la sua storia termica e per permettere ai due componenti della leghe di mescolarsi più intimamente. Durante il riscaldamento nel momento in cui il campione fonde viene sottoposto ad una lieve compressione al fine di diminuirne lo spessore ed ottenere immagini dei cristalli meglio osservabili. La sostanza viene poi raffreddata secondo la rampa di temperatura impostata.

#### Procedura per la cristallizzazione isoterma

Una volta ottenuto il fuso secondo la procedura sopra descritta, lo si sottopone a un veloce raffreddamento ( $130\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) con un flusso di aria compressa fino alla temperatura di cristallizzazione,  $T_c$ , impostata. Il polimero viene mantenuto a questa temperatura fino al termine della cristallizzazione (da qualche decina di minuti per i campioni che mostrano velocità di cristallizzazione elevata a qualche ora per quei

campioni che cristallizzano più lentamente). Le micrografie acquisite durante il processo, vengono successivamente analizzate singolarmente per misurare la crescita del raggio della sferulite nel tempo.

#### Procedura per la cristallizzazione non isoterma

Il fuso ( $T = 220^{\circ}\text{C}$ ) viene raffreddato a una velocità controllata di  $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e si attende la comparsa di un nucleo cristallino stabile la cui crescita viene seguita misurando il raggio della sferulite al crescere del tempo, cioè al calare della temperatura. Tuttavia la ricerca del nucleo e il suo posizionamento all'interno del campo visivo può rivelarsi problematico. Per la zona di temperatura più prossima a  $T_m$ , dove la nucleazione è molto lenta, è stato utile portare il fuso ad una temperatura inferiore di quella di cristallizzazione impostata per favorire la nascita di nuclei stabili su cui possa successivamente crescere la sferulite. Questa procedura di enucleazione è stata condotta come segue: il fuso, dopo 4 minuti di isoterma a  $220^{\circ}\text{C}$ , viene velocemente raffreddato fino a  $100^{\circ}\text{C}$  e mantenuto a questa temperatura fino alla comparsa di almeno 2-3 nuclei nel campo visivo del microscopio.

La scelta della temperatura di nucleazione a  $100^{\circ}\text{C}$  è determinata dal fatto che la velocità di crescita della sferulite a questa temperatura è bassa: in questo modo, durante il periodo di tempo perso per posizionare il nucleo, il cristallo non aumenta di molto le sue dimensioni. Inoltre, la densità di nuclei per unità di volume è bassa perciò la sferulite appena nata ha inizialmente a disposizione molto spazio per crescere.

Una volta individuato il nucleo il campione viene velocemente riscaldato con una velocità di  $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$  fino alla temperatura di  $140^{\circ}\text{C}$  ( $T_c$ ). Inizia a questo punto il raffreddamento del campione a  $\frac{dT}{dt}$  costante ( $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) e l'acquisizione delle immagini mediante il programma Axio Vision 3.0 fino a quando le sferuliti si scontrano e non hanno più volume libero per crescere. Le micrografie sono state acquisite ad intervalli di 10 sec e i dati sono stati elaborati in accordo con l'Equazione 4 nel Paragrafo 1.4.2.

#### 3.3.4 Misure di sforzo-deformazione (stress-strain)

Le misure di resistenza meccanica vengono utilizzate per studiare il comportamento dei materiali polimerici in presenza di sollecitazioni di diverso tipo<sup>59</sup>. Esse rivestono notevole importanza nella progettazione di un manufatto, in quanto permettono di prevedere il comportamento meccanico nelle condizioni d'uso.

In questa Tesi di Dottorato sono state condotte prove in trazione sui terpolimeri a temperatura ambiente, ad una velocità di 5 mm/min, su provini rettangolari. I terpolimeri sono stati pressati ad alta temperatura nella pressa Carver fino ad ottenere film di spessore compreso tra 0.15 e 0.25 mm. Da ogni film sono stati ritagliati dei provini con una fustella avente un tratto utile di 20 mm e larghezza 5 mm (distanza tra i morsetti). È stata utilizzata una cella di carico da 0.1kN (precisione 0.01 del fondo scala). I risultati riportati sono la media di 5-6 prove per ciascun campione.

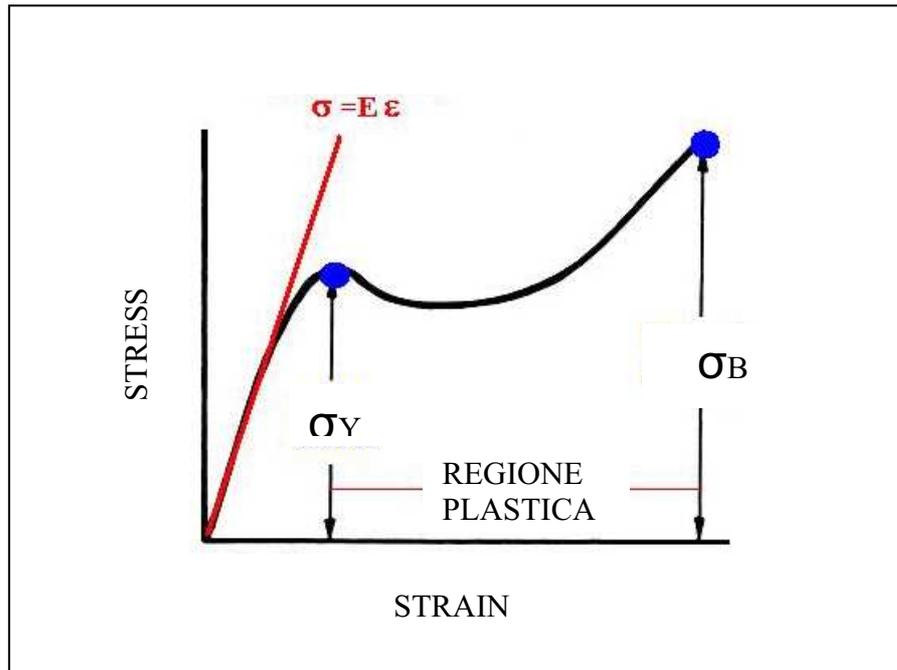
Nelle prove tensili lo sforzo  $\sigma$  (*stress*) viene definito dal rapporto tra il carico applicato F e l'area A della sezione del provino prima del test (Equazione 5):

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad \text{Equazione 5}$$

e la deformazione  $\varepsilon$  (*strain*) corrisponde all'allungamento ( $\Delta l$ ) relativo alla lunghezza iniziale  $l_0$  del provino (Equazione 6):

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad \text{Equazione 6}$$

Durante la prova si misura il valore del carico e al variare della lunghezza del provino e in tal modo si ottengono dei diagrammi sforzo-deformazione (Figura 3.1) .i



**Figura 3.1:** Curva sforzo-deformazione.

Inizialmente, il materiale si allunga elasticamente, ovvero può riprendere la lunghezza originaria quando il carico ritorna a zero. Il materiale segue la legge di Hooke ( $\sigma = E \epsilon$ ) in cui la costante di proporzionalità  $E$  è il modulo elastico di Young, che corrisponde alla pendenza del tratto iniziale rettilineo della curva sforzo-deformazione .

All'aumentare della deformazione si arriva ad un punto, detto di snervamento, in cui la deformazione permane anche in piccola parte quando il carico è stato tolto, il materiale ha, quindi, subito una deformazione permanente e si è entrati nel campo plastico.

Dall'area sottesa alla curva è possibile inoltre valutare la tenacità, che è una misura dell'energia necessaria per rompere il materiale. È necessario sottolineare che i dati ottenuti da prove meccaniche non dipendono solamente dal tipo di polimero (struttura chimica, cristallinità, peso molecolare), ma risentono, oltre che della temperatura, anche delle condizioni di prova quali la velocità di allungamento, la forma e le dimensioni del provino. È quindi necessario operare in condizioni

sperimentali strettamente controllate per poter confrontare il comportamento meccanico dei diversi materiali e porlo in relazione con le caratteristiche strutturali.

Le misure sforzo-deformazione sui terpolimeri (GLT) sono state condotte utilizzando un dinamometro per prove meccaniche in trazione (Instron 4465).

Lo strumento è costituito principalmente da una struttura rigida di base e una traversa mobile posta nella parte superiore. Al provino, fissato attraverso opportuni morsetti alla base inferiore (fissa) ed alla traversa mobile, viene applicato il carico mediante lo spostamento, a velocità costante, della traversa verso l'alto grazie all'azione di un motore. Il carico applicato è misurato dalla cella di carico (alloggiata nella traversa mobile), la quale trasmette all'elaboratore dati un segnale elettrico proporzionale alla forza rilevata. Lo strumento, in base alle dimensioni di un provino, converte tali dati in sforzo, cioè forza per unità di superficie. L'allungamento del campione viene determinato automaticamente dal movimento della traversa mobile con una precisione di  $\pm 0.05\%$  del fondo scala.

### 3.3.5 Analisi dinamico meccanica (DMTA)

Le prove dinamico meccaniche sui terpolimeri, sono state effettuate in flessione (*bending*) con un DMTA MkII della Polymer Laboratories. Il campione sotto forma di sbarretta rettangolare, di larghezza 7 mm e spessore compreso tra 0.15 e 0.25 mm, è stato ritagliato da un film di materiale stampato nella pressa Carter. Le misure sono state condotte ponendo i campioni fra due lastrine di alluminio, a 3Hz di frequenza e con una velocità di riscaldamento costante a 3°C/min. Tutte le prove sono state effettuate in un intervallo di temperatura compreso tra da -150° C e 80°C.

### 3.3.6 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

La microscopia elettronica a scansione è una tecnica analitica che permette di studiare la morfologia superficiale di un campione.

Lo strumento utilizzato è un Philips 515 costituito da:

- una sorgente di elettroni

- una colonna dove viaggiano gli elettroni emessi, che contiene lenti per la focalizzazione del fascio
- una camera sottovuoto che contiene il campione. Il vuoto è necessario per rendere minime le interazioni tra gli elettroni e le molecole d'aria.
- un rivelatore del segnale che consente l'acquisizione delle immagini.

L'interazione del fascio di elettroni con la superficie del campione dà luogo a numerosi fenomeni tra i quali l'emissione di elettroni secondari, di elettroni retrodiffusi, di raggi X e di radiazione UV-visibile. Tali fenomeni forniscono informazioni in merito alla topologia superficiale, alla composizione e alle proprietà elettroniche del materiale. L'immagine della superficie si ottiene attraverso l'elaborazione del segnale fornito dagli elettroni secondari in uscita dal campione.

Per eseguire l'analisi al SEM il campione viene montato su un supporto di materiale conduttore (alluminio) mediante nastro adesivo ricoperto di grafite. La superficie del campione viene infine ricoperta di un sottile strato di oro (metallizzazione).

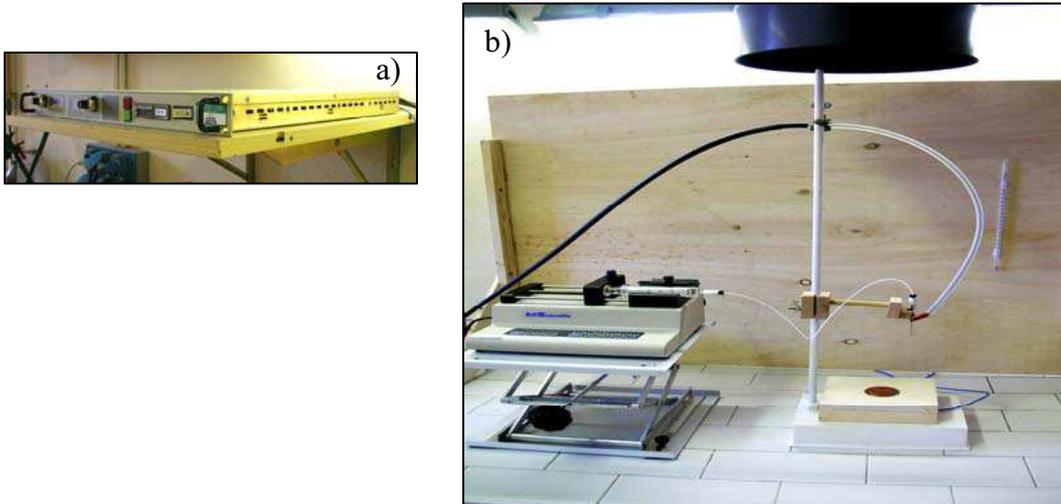
### 3.3.7 Elettrofilatura

La tecnica di elettrofilatura permette di produrre, a partire da una soluzione polimerica, fibre di dimensioni nanometriche o micrometriche, in funzione delle condizioni sperimentali.

L'apparato strumentale (Figura 3.2) è costituito da:

- un generatore di potenziale ad alta tensione Spellman SL50\*10 con le seguenti specifiche tecniche: voltaggio massimo consentito di 50 kV, polarità positiva e potenza massima di 10 Watt (Figura 3.2a).
- Una pompa dosatrice KDScientific serie 200 che alloggia la siringa contenente la soluzione polimerica. La pompa consente di regolare la velocità di uscita della soluzione dalla siringa in un intervallo compreso tra 0.001  $\mu\text{l/h}$  e 70.57 ml/min. La soluzione fuoriesce dalla siringa ed attraversa un tubicino in teflon collegato ad un ago metallico con diametro interno di 0.5 mm (Figura 3.2b).

- Un collettore, costituito da una piastra di rame con forma circolare (diametro 5 cm), posizionato ad una distanza regolabile dall'ago metallico (Figura 3.2b).



**Figura 3.2:** Apparato per elettrofilatura: a) generatore; b) pompa dosatrice e collettore.

La tecnica di elettrofilatura<sup>59</sup> sfrutta la differenza di potenziale applicata tra una soluzione di polimero (contenuta in una siringa) ed una piastra di raccolta (collettore), per forzare un getto di soluzione fuoriuscente dalla siringa a dirigersi verso la piastra di raccolta. Nel tempo che il getto impiega per raggiungere il collettore, il solvente evapora lasciando un filamento di polimero che sotto l'azione del campo elettrico si allunga e si assottiglia fino alla sua deposizione sulla piastra di raccolta sotto forma di fibra solida molto sottile. Se il campo elettrico è poco intenso la goccia di soluzione ha forma sferica e cade sulla piastra in forma liquida. Aumentano la differenza di potenziale si osserva una progressiva distorsione della goccia fino alla formazione del cosiddetto “cono di Taylor” (Figura 3.3) da cui fuoriesce un sottile getto, in genere poco visibile a occhio nudo. Ciò si verifica quando il potenziale applicato è sufficientemente alto e le forze elettrostatiche repulsive sulla goccia superano la tensione superficiale.



**Figura 3.3:** Immagine del cono di Taylor ottenuta mediante macchina fotografica ad alta velocità.

La presenza di legami fisici, chiamati concatenamenti, caratteristici delle macromolecole ad alto peso molecolare, permette la trasmissione dell'effetto di "stiro" da una macromolecola all'altra e provoca la formazione di una fibra che si deposita sulla piastra metallica.

La deposizione continua e caotica di queste fibre genera un "tappetino" (mat) di tessuto-non-tessuto costituito da fibre orientate in modo casuale nelle due dimensioni definite dal piano della piastra metallica (Figura 3.4).



**Figura 3.4:** Esempio di tappetino elettrofilato.

Gli studi condotti nel campo dell'elettrofilatura<sup>59</sup> hanno evidenziato che i parametri che influenzano e controllano il processo e la morfologia delle fibre prodotte sono molteplici. I parametri, per semplicità, possono essere suddivisi in due gruppi:

1. *Proprietà della soluzione:*

peso molecolare medio del polimero  
distribuzione dei pesi molecolari  
viscosità della soluzione  
concentrazione della soluzione  
conducibilità del solvente  
tensione di vapore del solvente  
costante dielettrica del solvente.

2. *Parametri strumentali:*

potenziale elettrico  
velocità di flusso della soluzione  
distanza tra il capillare ed il collettore  
diametro interno dell'ago  
condizioni ambientali (temperatura, umidità, etc.).

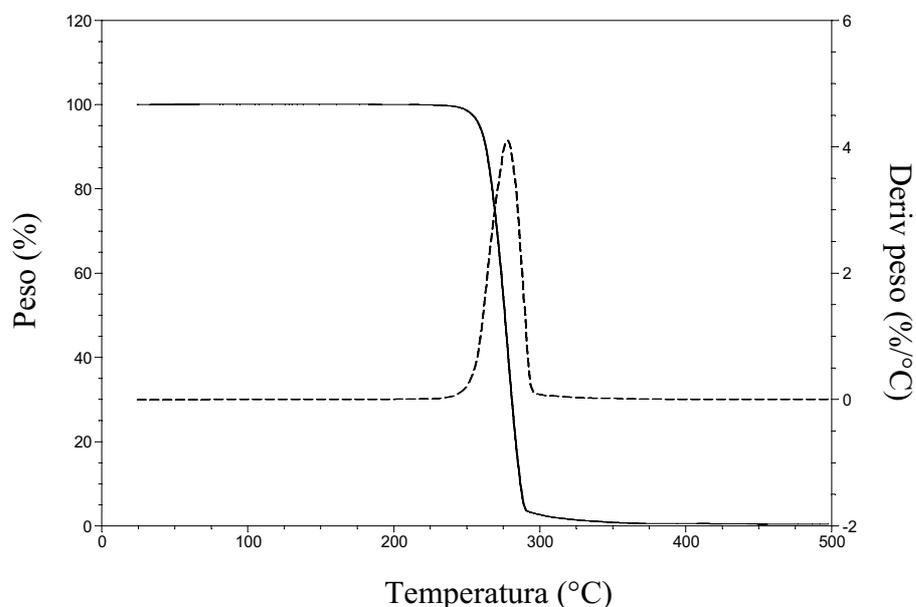
I diversi parametri non sono indipendenti l'uno dall'altro e le loro interazioni sono spesso complesse e difficili da prevedere. Alcune delle variabili sopra elencate sono state analizzate in dettaglio in un precedente lavoro di tesi condotto nel laboratorio di Macromolecole<sup>60</sup>.



## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

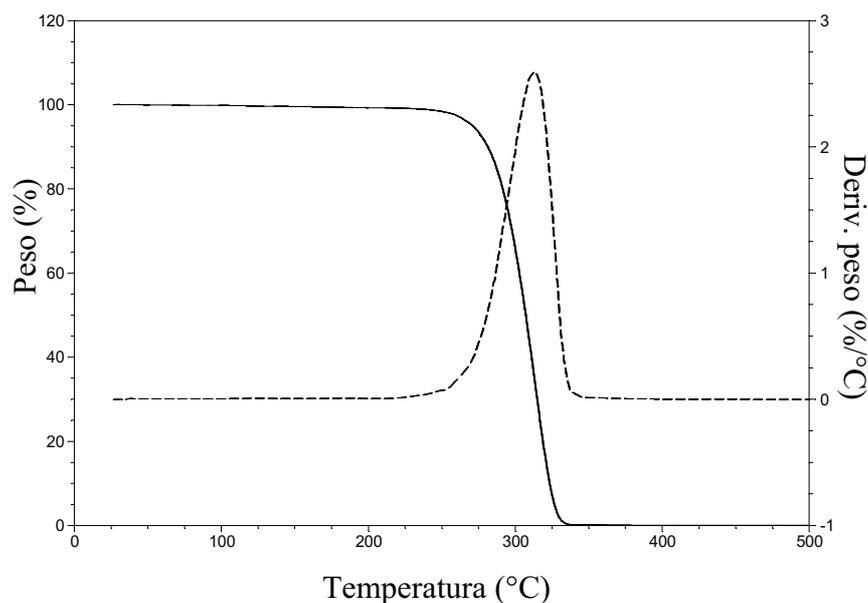
### 4.1 Miscibilità di leghe PHB/P(D,L)LA

L'analisi termogravimetrica è stata utilizzata per caratterizzare la stabilità termica delle leghe e dei componenti puri. In Figura 4.1 vengono riportati i risultati relativi alla prova di stabilità termica del campione di PHB: il grafico mostra che il polimero comincia a subire una perdita di peso significativa a partire da una temperatura di circa 250°C. La curva derivata presenta un picco a circa 278°C, temperatura alla quale la velocità di degradazione del campione è massima. A 300°C circa il campione è del tutto degradato.



**Figura 4.1:** Analisi termogravimetrica del PHB dove la curva continua rappresenta la variazione percentuale di peso in funzione della temperatura e la curva tratteggiata è la corrispondente derivata (% perdita di peso/°C) in ogni punto.

L'analisi termogravimetrica del P(D,L)LA è riportata in Figura 4.2 e mostra che il polimero comincia a perdere peso ad una temperatura di 240°C e ad 306°C la velocità di degradazione risulta massima. a 350°C il campione è del tutto degradato. Risulta evidente che entrambi i polimeri impiegati nella preparazione delle leghe, degradano attraverso un singolo processo e praticamente senza residuo.



**Figura 4.2:** Analisi termogravimetrica del P(D,L)LA dove la curva continua rappresenta la variazione percentuale di peso in funzione della temperatura e la curva tratteggiata è la corrispondente derivata (% perdita di peso/°C) in ogni punto.

I valori di temperatura relativi alla velocità massima di perdita di peso ( $T_{max}$ ) del PHB e del P(D,L)LA sono riportati in Tabella 4.1, oltre alla perdita di peso percentuale ( $\Delta m$  %) nell'intervallo di temperatura tra RT e 200°C.

**Tabella 4.1**

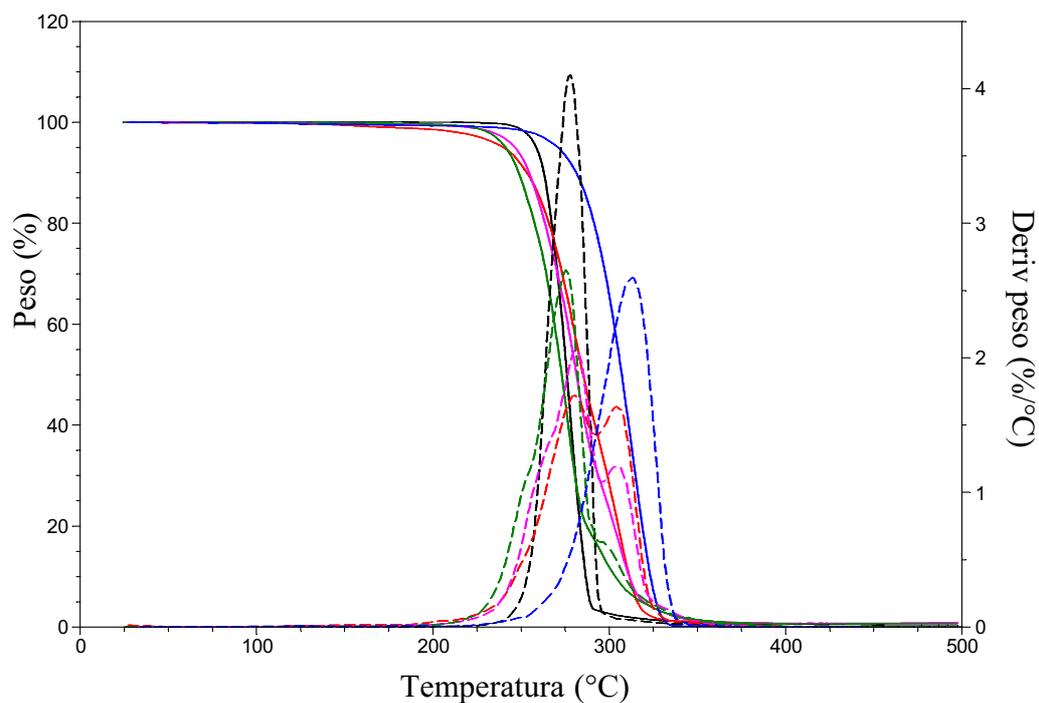
Campione	$\Delta m$ (%) RT - 200°C	$T_{max}$ °C
PHB	< 0.1	278
P(D,L)LA	1.75	306

I polimeri PHB e P(D,L)LA sono stati caratterizzati anche con analisi calorimetrica (DSC) e le curve relative sono riportate in Figura 4.4 assieme a quelle delle leghe, mentre in Tabella 4.2 sono riportate le temperature di transizione vetrose ( $T_g$ ) e le temperature di fusione ( $T_m$ ) ricavate dall'ultimo riscaldamento dopo raffreddamento veloce (vedi Capitolo 3.3.2) dei due componenti puri.

**Tabella 4.2**

<b>Campione</b>	<b><math>T_g</math> (°C)</b>	<b><math>T_m</math>(°C)</b>
PHB	-1	172
P(D,L)LA	49	/

Come riportato nella parte sperimentale (Capitolo 3.2) le leghe sono state ottenute in forma di film mediante solubilizzazione dei due componenti in un solvente comune, evaporazione di quest'ultimo e successivo trattamento termico in stufa sotto vuoto. Anche le leghe sono state caratterizzate tramite TGA (Figura 4.3 e Tabella 4.3) ed è interessante notare che il comportamento termogravimetrico delle leghe mostra in tutti i casi due stadi di degradazione ben individuabili. A titolo d'esempio in Figura 4.3 sono riportate le curve relative alle leghe PHB/P(D,L)LA con le seguenti composizioni :25/75, 50/50, 75/25 confrontate con i componenti puri. Il primo processo si manifesta nel campo di temperatura tipica della degradazione del PHB isotattico, mentre il secondo avviene a temperature più vicine a quelle in cui si ha degradazione del P(D,L)LA. L'entità relativa alle perdite di peso stimate dalle curve termogravimetriche, rispecchia piuttosto bene la composizione di ciascuna lega. Il comportamento osservato indica che la degradazione dei due poliesteri avviene indipendentemente dalla presenza del secondo componente nella lega. Una degradazione in due stadi era stata osservata precedentemente in altri sistemi polimerici binari contenenti il poli3-idrossibutirrato ed in particolare in leghe costituite da PHB atattico con altri acidi poli lattici o copolimeri dell'acido lattico e dell'acido glicolico<sup>55</sup> ed in leghe di PHB naturale con PMMA<sup>61</sup> o con copolimeri poli(metilmetacrilato-g-idrossibutirrato)<sup>62</sup>.



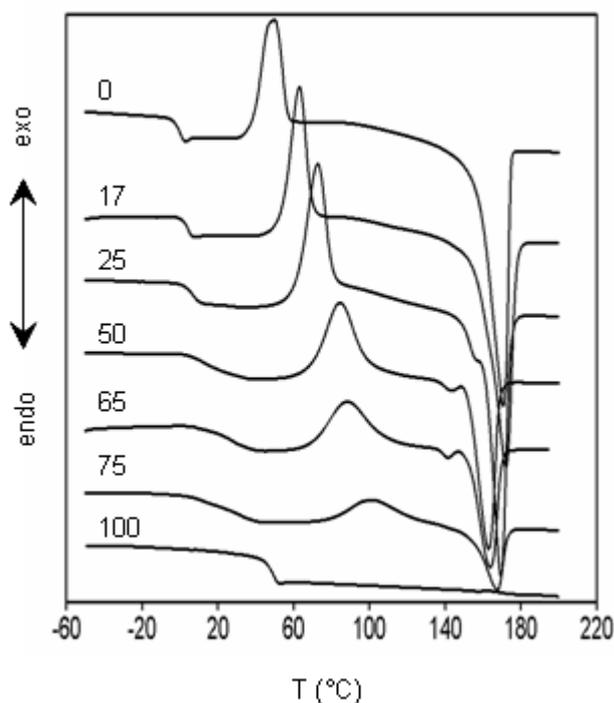
**Figura 4.3:** Confronto analisi termogravimetrica delle leghe PHB/P(D,L)LA con composizione variabile: 25/75 (rosso), 50/50 (fucsia) e 75/25 (verde), con i componenti puri: PHB (nero), P(D,L)LA (blu).

In Tabella 4.3 sono riportati riassunti i dati relativi all'analisi termogravimetrica di tutte le leghe preparate.

**Tabella 4.3**

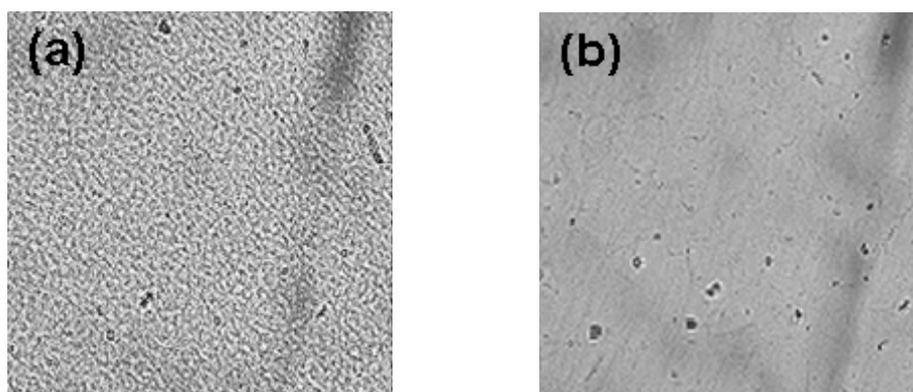
<b>Leghe PHB/P(D,L)LA</b>	<b><math>\Delta m</math> % RT-200°C</b>	<b><math>T_{max1}</math> °C</b>	<b><math>T_{max2}</math> °C</b>
10/90	0.72	293	301
22/78	0.64	291	303
25/75	1.44	280	304
35/65	0.21	287	305
50/50	0.53	281	304
60/40	0.76	284	306
75/25	0.37	275	297
83/17	0.59	280	304
90/10	0.45	281	302

Le leghe PHB/P(D,L)LA sono state caratterizzate tramite calorimetria a scansione ed in Figura 4.4 sono riportate le curve DSC delle leghe, in tutto il campo di composizione studiato, a confronto con i polimeri puri.



**Figura 4.4:** Analisi calorimetriche di leghe PHB/P(D,L)LA con differenti contenuti di P(D,L)LA (valori indicati sulle rispettive curve).

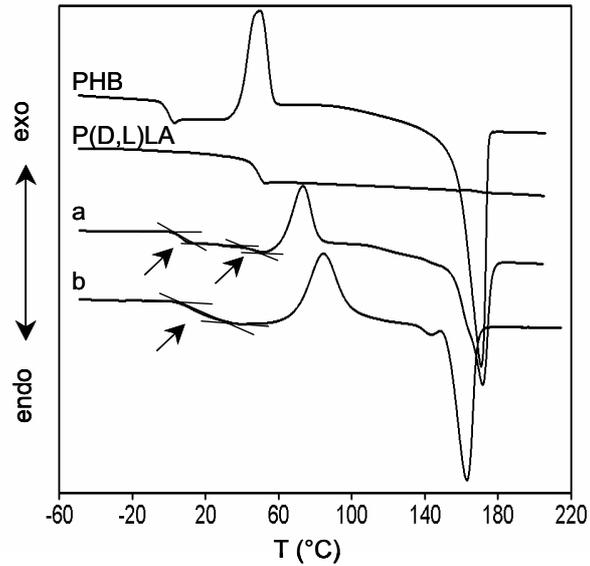
In accordo con quanto detto nella parte sperimentale, le scansioni riportate in Figura 4.4 sono quelle ottenute dopo trattamento isothermico a  $220^{\circ}\text{C}$  per 4 minuti seguito da un raffreddamento veloce fino a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Si può ipotizzare che il trattamento termico sia necessario al fine di distruggere totalmente la fase cristallina del PHB che si è sviluppata durante la fase di preparazione delle leghe, oppure, tale trattamento, permette ai due poliesteri di mescolarsi in modo migliore essendo allo stato fuso e quindi più mobili. La prova ottica dell'omogeneizzazione delle leghe nel fuso è fornita dalle micrografie riportate in Figura 4.5, che mostrano la lega 50/50 fusa a  $220^{\circ}\text{C}$  (a) e dopo 4 minuti di isoterma a tale temperatura (b). È evidente come durante il trattamento isoterma il fuso diventi dà bi-fasico (Figura 4.5a) a completamente omogeneo (Figura 4.5b).



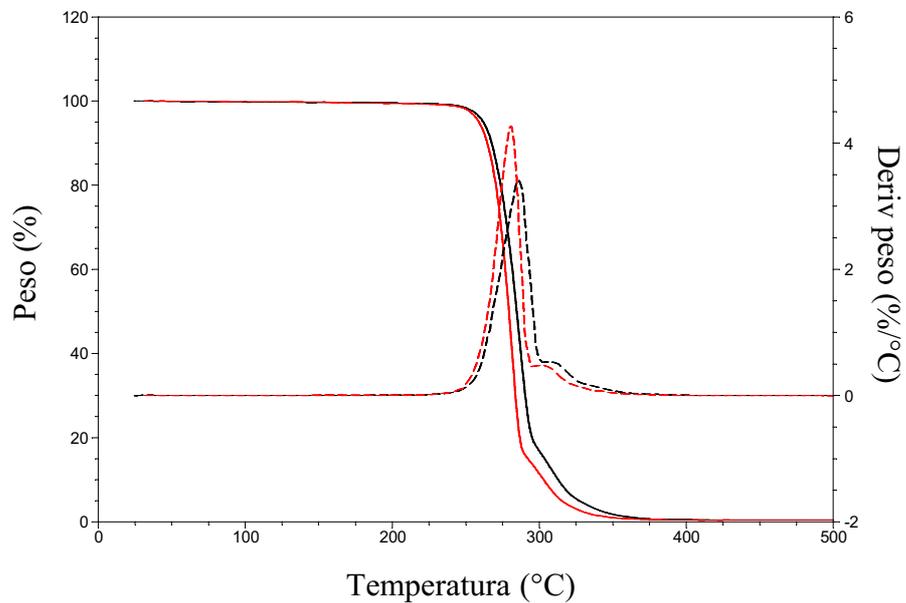
**Figura 4.5:** Micrografie ottiche della lega PHB/P(D,L)LA (50/50) a  $T = 220^{\circ}\text{C}$ : (a); (b) dopo 4 minuti a  $220^{\circ}\text{C}$ .

Questo stesso trattamento effettuato al microscopio ottico è stato eseguito anche nelle prove calorimetriche secondo la procedura riportata nel Capitolo 3.3.2 ed in Figura 4.6 sono confrontate le scansioni di riscaldamento DSC della lega 50/50 senza trattamento termico e con trattamento termico e si osserva come nel primo caso (a) la lega presenti due distinte temperature di transizione vetrosa imputabili ai singoli componenti, mentre dopo i 4 minuti di isoterma a  $220^{\circ}\text{C}$  (b) si ottiene una lega con una singola  $T_g$ .

Va tuttavia precisato che il trattamento termico applicato alle leghe può aver causato una diminuzione del peso molecolare dei polimeri PHB e P(D,L)LA e quindi la cinetica di miscelazione risulta più veloce a causa dell'aumento di terminali di catena che aumentano la mobilità generale. Il confronto tra prove termogravimetriche effettuate su leghe trattate termicamente ha dimostrato come la stabilità termica sia risultata leggermente modificata ed in particolare diminuita rispetto a leghe non trattate. In Figura 4.7 sono riportate le curve TGA della lega PHB/ P(D,L)LA 83/17 prima del trattamento (in nero) e dopo trattamento isoterma a  $220^{\circ}\text{C}$  (rosso). Un abbassamento della stabilità termica è sintomo di una diminuzione del peso molecolare ed è noto, infatti, che la stabilità termica dei poliesteri dipende fortemente dalla lunghezza delle catene: se il peso molecolare è minore saranno necessari un numero di eventi di rottura di legame minore per generare oligomeri volatili, la cui evaporazione provoca la perdita di peso.



**Figura 4.6:** Analisi calorimetrica della lega PHB/P(D,L)LA (50/50) (curve a e b) confrontate con i rispettivi componenti puri. Lega 50/50: (a) senza trattamento termico, (b) dopo 4 minuti a 220°C.



**Figura 4.7:** Analisi termogravimetriche della lega PHB/P(D,L)LA (83/17). Lega 83/17: (nero) senza trattamento termico, (rosso) dopo 4 minuti a 220°C.

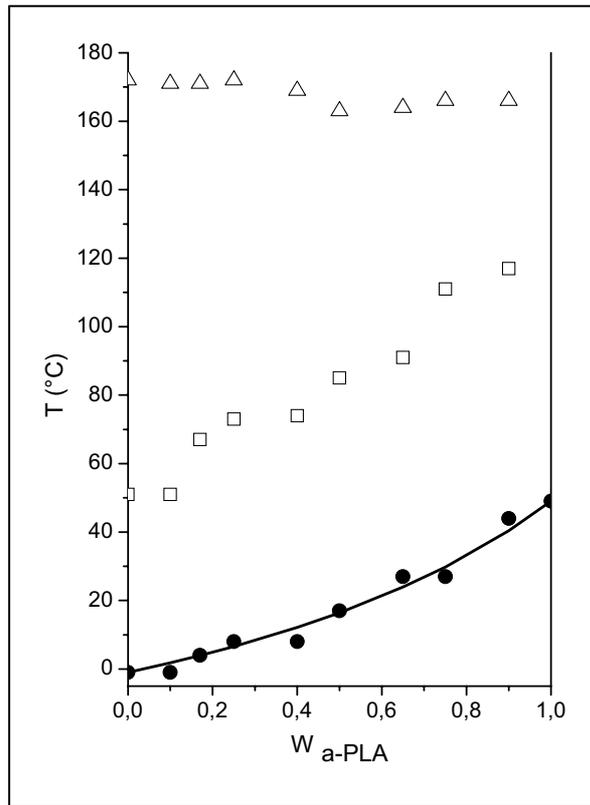
Ritornando alla Figura 4.4 si può notare come la temperatura di transizione vetrosa aumenta all'aumentare del componente amorfo (P(D,L)LA) nelle leghe. Inoltre, l'innalzamento della  $T_g$  per opera dell'acido poli lattico porta ad un restringimento della finestra di cristallizzazione (intervallo tra  $T_g$  e  $T_m$ ) e quindi il picco isoterma relativo alla cristallizzazione del PHB viene spostato a temperature più alte. La Figura 4.8 riporta le temperature delle transizioni termiche ottenute dall'analisi calorimetrica di tutte le leghe PHB/P(D,L)LA analizzate. La temperatura di transizione vetrosa cambia con andamento monotono da quella del PHB ( $-1^\circ\text{C}$ ) a quella del P(D,L)LA ( $49^\circ\text{C}$ ); tale andamento è ben rappresentato dalla Equazione empirica 7 proposta da Wood<sup>63</sup>:

$$T_g = (w_2 T_{g_2} + k w_1 T_{g_1}) / (w_2 + k w_1) \quad \text{Equazione 7}$$

dove 1 e 2 si riferiscono al P(D,L)LA e al PHB,  $w$  è la frazione in peso,  $T_g$  è la temperatura di transizione vetrosa e  $k$  è un parametro aggiustabile che in questo caso vale 1.87.

In Figura 4.8 si osserva come la temperatura di cristallizzazione ( $T_c$ ,  $\square$ ) aumenta sensibilmente all'aumentare del componente amorfo P(D,L)LA mentre la temperatura di fusione ( $T_m$ ,  $\Delta$ ) varia solo leggermente con la composizione.

La transizione vetrosa ( $\bullet$ ) si sposta gradualmente da quella del PHB a quella del P(D,L)LA al variare della composizione e la presenza di un'unica  $T_g$  suggerisce che i due componenti sono miscibili in tutto il campo di composizione.



**Figura 4.8:** Temperature di transizione vetrosa ( $T_g$ , ●), temperature di cristallizzazione ( $T_c$ , □) e temperature di fusione ( $T_m$ , Δ) delle leghe PHB/P(D,L)LA in funzione della composizione. La curva tracciata corrisponde all'Equazione 5

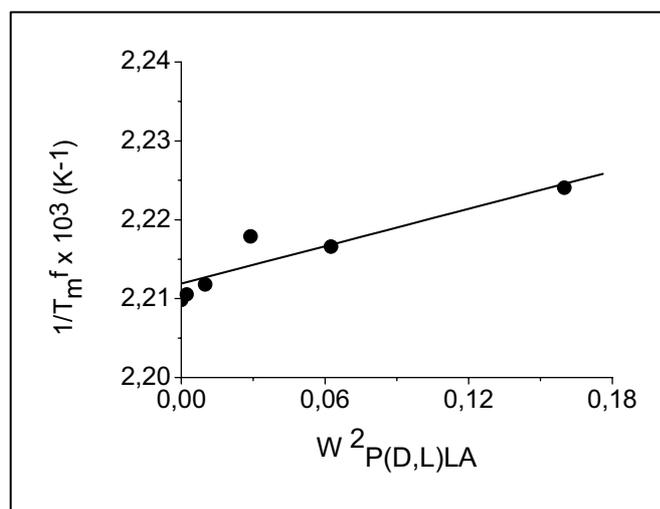
con  $k = 1.87$ .

In leghe polimeriche miscibili la depressione del punto di fusione può essere descritta dall'Equazione 8 di Nishi-Wang<sup>64</sup>:

$$\frac{1}{T_m} = \frac{1}{T_m^\circ} - \left( \frac{R}{\Delta H_u} \right) \left( \frac{V_2}{V_1} \right) \chi_{12} (\phi_1)^2 \quad \text{Equazione 8}$$

dove 1 e 2 si riferiscono rispettivamente ai componenti amorfo e cristallino,  $T_m$  e  $T_m^\circ$  sono le temperature di fusione delle leghe e del polimero cristallizzabile puro,  $V$  è il volume dell'unità molare ripetitiva,  $\Delta H_u$  è l'entalpia di fusione,  $\phi$  è la frazione di

volume e  $\chi_{12}$  è il parametro di Flory-Huggins<sup>65</sup> di interazione polimero-polimero. L'Equazione 8 si applica solitamente ai dati sperimentali usando la frazione in peso ( $w$ ) al posto della frazione in volume ( $\phi$ ), in quanto si assume che i componenti delle leghe abbiano una densità simile. In Figura 4.9 è graficato  $1/T_m$  vs  $(w_1)^2$  usando come  $T_m$  la temperatura di fusione finale ottenuta come intercetta tra la tangente della parte finale del picco di fusione e la linea di base, poiché questa è la temperatura dove il fuso è in equilibrio con i cristalli e ha la stessa composizione della composizione nominale della lega<sup>66</sup>. La linea tracciata rappresenta l'interpolazione migliore dei dati sperimentali. In accordo con l'Equazione 8, il parametro di interazione polimero-polimero  $\chi_{12}$  si ottiene dalla pendenza di tale retta e usando i dati di letteratura per i valori di entalpia e volume molare ( $\Delta H_u = 11 \text{ kJmol}^{-1(66)}$ ,  $V_1=57.69 \text{ cm}^3\text{mol}^{-1}$  per P(D,L)LA<sup>67</sup> e  $V_2=73.07 \text{ cm}^3\text{mol}^{-1}$  per PHB<sup>68</sup>, ed equivale a  $-0.009$ . Un valore di  $\chi_{12}$  piccolo e negativo suggerisce che il PHB e il P(D,L)LA sono termodinamicamente miscibili nel fuso e questo risultato è in accordo con la variazione monotona della  $T_g$  in funzione della composizione descritta dall'Equazione 7 e tipica di leghe miscibili.



**Figura 4.9:** Temperatura di fusione ( $T_m$ ) delle leghe PHB/P(D,L)LA in funzione del quadrato della frazione in peso di P(D,L)LA.

È interessante confrontare le conclusioni ottenute con i dati riportati in letteratura<sup>70</sup> che al contrario, evidenziano un'immiscibilità in tutto il campo di composizioni per un

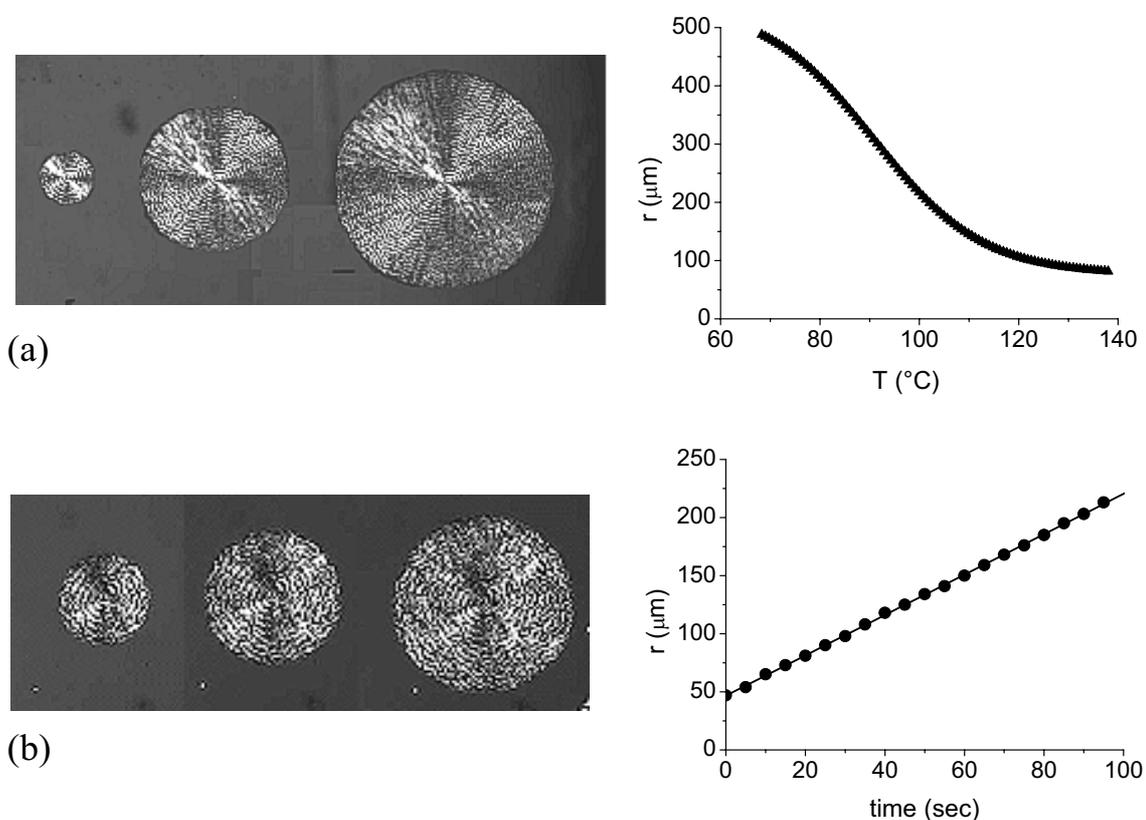
sistema di leghe costituito dagli stessi poliesteri trattati in questo lavoro. In particolare nel lavoro di *Zhang et al.*<sup>69</sup> le leghe sono realizzate con PHB e P(D,L)LA aventi massa molare confrontabile con i polimeri utilizzati per la preparazione delle leghe analizzate precedentemente. Il fatto che i risultati di *Zhang* differiscano da quelli trovati potrebbe essere imputabile al possibile abbassamento del peso molecolare nelle leghe studiate in questa Tesi, discusso precedentemente, ad opera del trattamento termico che invece *Zhang* non ha applicato al sistema binario da lui studiato. In accordo con quanto detto, in letteratura<sup>70</sup> sono riportati dati calorimetrici di completa miscibilità per sistemi binari PHB/P(D,L)LA dove la massa molare del P(D,L)LA ( $M_n = 9000$ ) è inferiore rispetto a quella del poliestere analogo utilizzato in questa Tesi di Dottorato ( $M_n = 43000$ ). Si può concludere dicendo che ci si riserva in futuro di verificare tale ipotesi utilizzando la cromatografia ad esclusione sterica (GPC).

## 4.2 Cinetica di cristallizzazione di leghe PHB/P(D,L)LA

I processi di cristallizzazione delle leghe di PHB con P(D,L)LA sono stati esaminati con il microscopio ottico in luce polarizzata utilizzando una procedura di cristallizzazione non isoterma. Come è stato descritto nella parte sperimentale (Capitolo 3.3.3), il fuso polimerico viene raffreddato a una velocità controllata di  $-10^\circ\text{C}/\text{min}$  e si attende la comparsa di un nucleo cristallino stabile la cui crescita viene seguita misurando il raggio della sferulite al crescere del tempo, cioè al calare della temperatura. L'acquisizione delle immagini a intervalli di 10 sec mediante il programma Axio Vision 3.0 permette di osservare la crescita delle sferuliti finché si scontrano e non hanno più volume libero per crescere. I dati sono stati quindi elaborati in accordo con l'Equazione 4 (Capitolo 1.4.2). In questa Tesi di Dottorato sono stati eseguiti inoltre, studi di cristallizzazione isoterma sempre sul sistema PHB/P(D,L)LA al fine di confrontare le due tecniche.

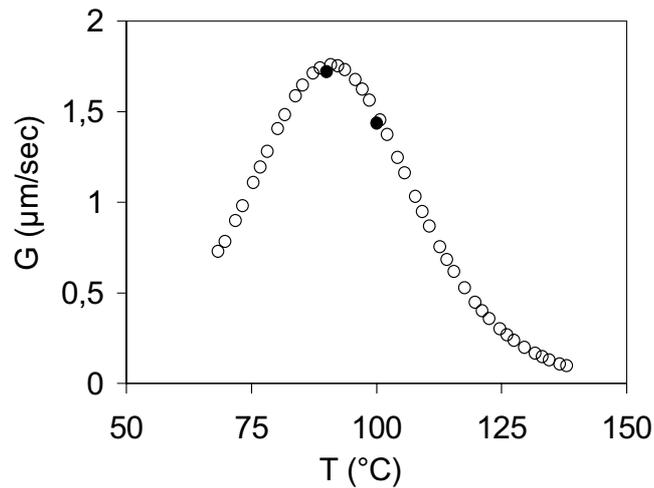
La Figura 4.10 mostra tre micrografie successive di crescita sferulitica di una lega 50/50 PHB/P(D,L)LA, raccolte durante i due differenti esperimenti di cristallizzazione: (a) cristallizzazione non-isoterma, e (b) cristallizzazione isoterma a  $90^\circ\text{C}$ . In entrambi i casi le sferuliti che si osservano hanno una forma regolare e l'unica differenza apprezzabile risulta essere lo spessore delle bande di interferenza,

che è noto essere una funzione della temperatura di cristallizzazione (lo spazio tra le bande aumenta con la temperatura)<sup>68,71-74</sup>. In Figura 4.10 sono inoltre riportati gli andamenti del raggio in funzione della temperatura (nel caso della procedura non-isoterma) o del tempo (nel caso dell'esperimento condotto in condizioni isoterme). Come detto nell'introduzione (Capitolo 1.4.2), mentre dalla pendenza della retta nel grafico in Figura 4.10b si ricava un singolo valore di velocità di crescita sferulitica ( $G$ ), l'intera curva di  $G$  vs.  $T_c$  (vedi Figura 4.11) può essere ottenuta dal grafico sigmoideale di Figura 4.10a.



**Figura 4.10:** Crescita sferulitica non isoterma e isoterma della lega PHB/P(D,L)LA (50/50). (a) Procedura non-isoterma con sequenza di 3 micrografie (velocità costante di  $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) e grafico del raggio vs. temperatura, (b) procedura isoterma con sequenza di 3 micrografie ( $T = 90^{\circ}\text{C}$ ) grafico del raggio vs. tempo.

In Figura 4.11 sono graficati due valori di  $G$  calcolati con procedura isoterma a due differenti temperature di cristallizzazione ( $T_c = 90^\circ\text{C}$  e  $T_c = 100^\circ\text{C}$ ) con i valori di  $G$  calcolati utilizzando la procedura non-isoterma, al fine di dimostrare l'eccellente accordo tra i risultati ottenuti tramite i due differenti metodi di cristallizzazione.

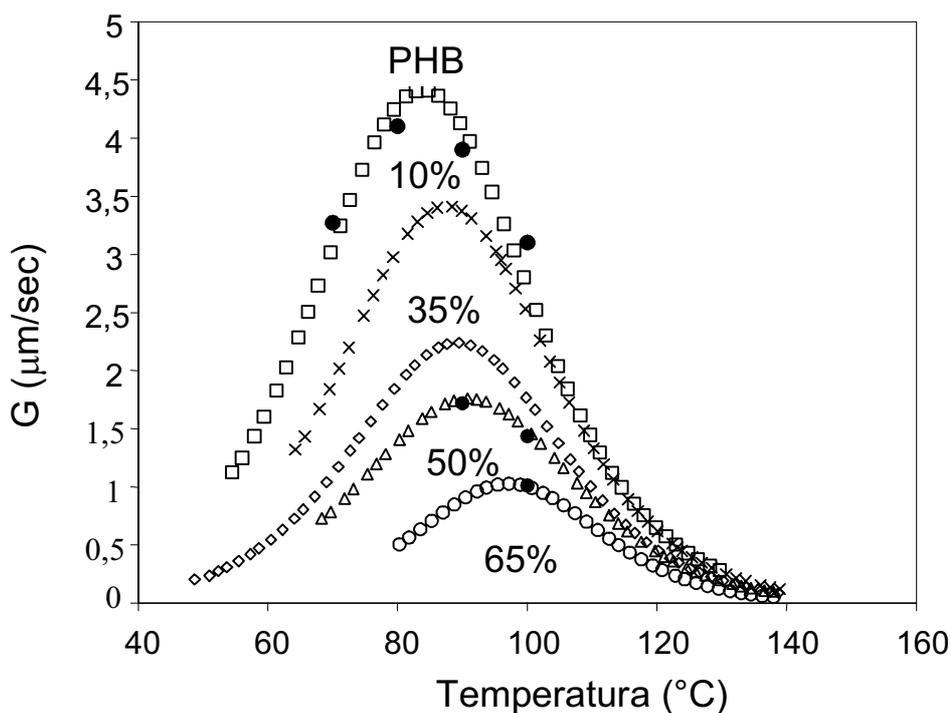


**Figura 4.11:** Velocità di crescita sferulitica ( $G$ ) della lega PHB/P(D,L)LA (50/50) in funzione della temperatura ottenuta con procedura non-isoterma (○) e isoterma (●).

In Figura 4.12 è riassunto l'andamento di cristallizzazione del sistema binario PHB/P(D,L)LA: gli andamenti della velocità di crescita sferulitica delle leghe contenenti da 10% al 65% del componente amorfo P(D,L)LA sono confrontate con la curva relativa al componente cristallino puro (PHB). È importante sottolineare come in tutte le leghe considerate, le sferuliti crescano in modo regolare in tutto il campo di temperature analizzate, anche quando vi è un'elevata quantità di P(D,L)LA (65%). In Figura 4.12 sono graficati inoltre, valori di  $G$  ottenuti con procedura isoterma al fine di sottolineare la corrispondenza con i dati ottenuti in esperimenti non-isotermi.

È ampiamente noto che la velocità di crescita sferulitica nelle leghe osservata ad una data temperatura, è governata dalla composizione del fuso. In condizioni isoterme, la dipendenza lineare delle dimensioni delle sferuliti dal tempo ( $r$  vs.  $t$ ) implica che la concentrazione del componente cristallizzabile al fronte di crescita della lamella sia costante. Questo accade quando il componente non-cristallizzabile possiede una

mobilità relativamente bassa tale da intrappolarlo nello spazio interlamellare. Di conseguenza le sferuliti si scontrano lungo fronti lineari senza accumulo di P(D,L)LA nello spazio intersferulitico. Tale comportamento è stato riscontrato in tutte le leghe di PHB/ P(D,L)LA analizzate in questa Tesi di Dottorato.



**Figure 4.12:** Curve di cristallizzazione non-isoterme del PHB ( $\square$ ) e delle leghe PHB/P(D,L)LA con differenti contenuti di P(D,L)LA: 10% (X), 35% ( $\diamond$ ), 50% ( $\Delta$ ) e 65% ( $\circ$ ). I dati rappresentati da ( $\bullet$ ) sono stati ottenuti in condizioni isoterme.

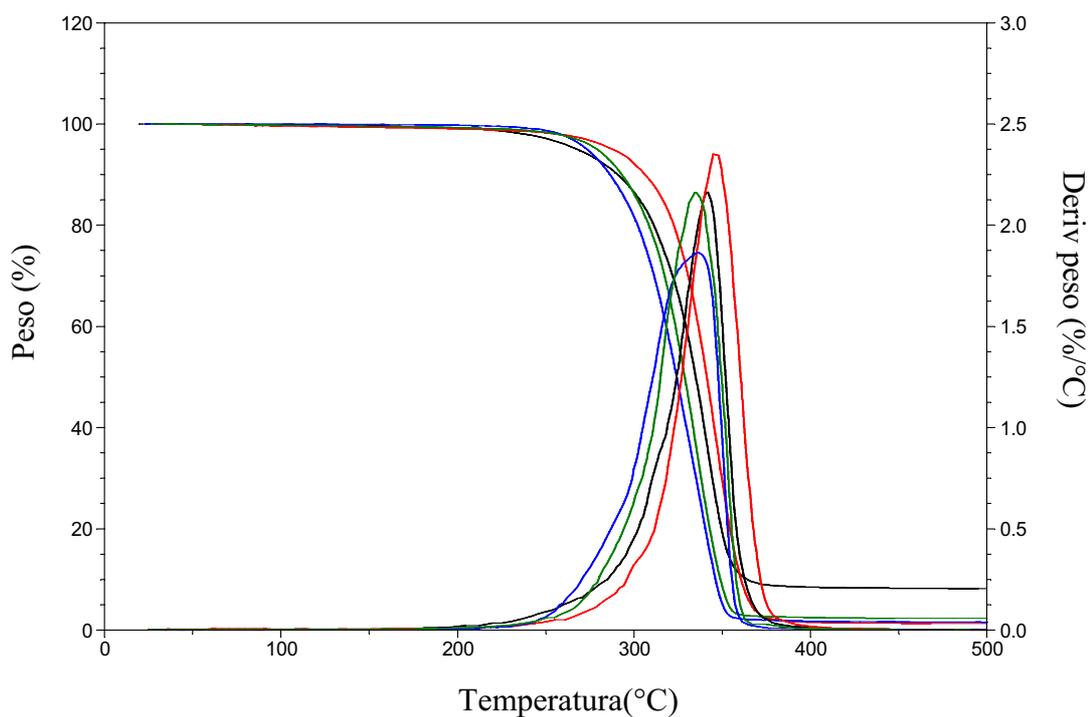
Dalla Figura 4.12 si può osservare inoltre, come la campana di cristallizzazione del PHB all'aumentare del P(D,L)LA si abbassi gradualmente, passando da un valore massimo di G pari a  $4.40 \mu\text{m}/\text{sec}$  a  $1.03 \mu\text{m}/\text{sec}$  nel caso della lega contenente il 65% di acido poli lattico amorfo. Questo risultato è tipico di un sistema binario miscibile ed è determinato dalla concomitanza di diversi parametri, i più importanti sono i seguenti: (i) la diluizione, che il polimero cristallizzabile subisce per la presenza del secondo componente amorfo, causa una diminuzione della velocità di crescita sferulitica G e (ii) l'aumento della temperatura di transizione vetrosa del sistema dovuto alla

presenza del secondo componente amorfo ( $T_g$  P(D,L)LA = 49°C), provoca un restringimento della finestra di cristallizzazione e quindi una diminuzione della mobilità dei segmenti di catena in grado di cristallizzare del PHB ( $T_g$  PHB = -1°C) (vedi Figura 4.8). In Figura 4.12 si può osservare che la velocità massima di cristallizzazione si sposta a temperature crescenti a seguito dell'aumento del contenuto dell'acido poli lattico che determina un aumento della temperatura di transizione vetrosa e conseguentemente un restringimento della finestra di cristallizzazione (vedi Figura 4.8). I dati ottenuti relativi alle cinetiche di cristallizzazione confermano le conclusioni basate sui risultati calorimetrici riportati nel paragrafo precedente e cioè che il sistema binario PHB/P(D,L)LA è miscibile e il fuso risulta omogeneo in tutto l'intervallo di composizioni analizzato.

### 4.3 Proprietà termiche e meccaniche dei terpolimeri (GLT)

Come detto in precedenza (vedi Capitolo 1.2), la copolimerizzazione di polimeri la cui biocompatibilità e biodegradabilità è comprovata, è uno dei metodi utilizzati allo scopo di ottenere un nuovo biomateriale con caratteristiche specifiche e modulabili in funzione della composizione dei monomeri di partenza. In questa Tesi di Dottorato sono state studiate le proprietà termiche e meccaniche di terpolimeri (GLT) costituiti da unità di acido L-lattico, acido glicolico e trimetilencarbonato distribuite in modo casuale nella catena polimerica. Tali terpolimeri sono stati sintetizzati usando come iniziatore il zirconio (IV)<sup>57</sup> acetilacetato invece dei comuni iniziatori a base di stagno ottanoato poiché lo zirconio presenta una minor tossicità rispetto ai complessi contenuti lo stagno<sup>75</sup>.

Le analisi termogravimetriche sono state eseguite sui terpolimeri a disposizione come si può vedere dalla Figura 4.13, tutti i campioni degradano attraverso un singolo processo e le curve derivate (% perdita di peso/°C) presentano un picco in un intervallo di 335-346°C, temperature alle quali la velocità di degradazione dei campioni è massima. Il grafico mostra, inoltre, che i terpolimeri comincino a subire una perdita di peso significativa a partire da una temperatura di circa 200°C.



**Figura 4.13:** Analisi termogravimetrica dei terpolimeri GLT1 (rosso), GLT2 (blu), GLT3 (verde) e GLT4 (nero).

In Tabella 4.4 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi termica e meccanica dei GLT analizzati.

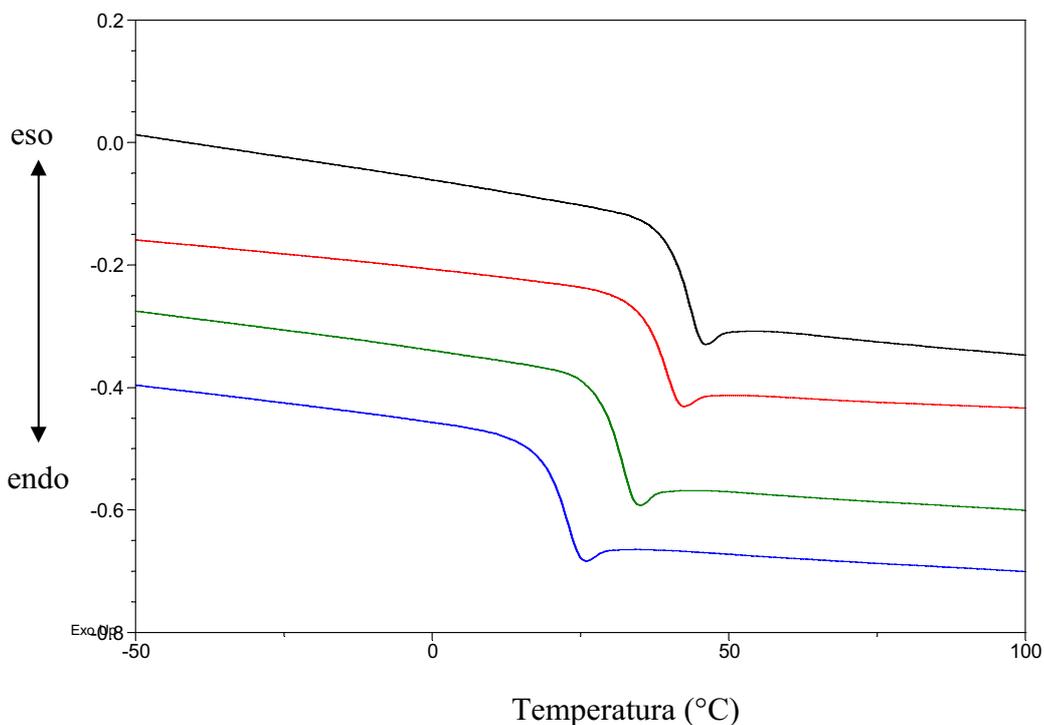
**Tabella 4.4:** Proprietà termiche dei terpolimeri.

Polimero	Composizione	$\Delta m$ % RT-200°C	$T_{max}$ (°C)	$T_g$ (°C)	$T_a$ (°C)	$T_g^*$ (°C)
GLT1	G25:L53:T22	0.96	346	39	42	27
GLT2	G24:L33:T43	0.27	336	21	26	6
GLT3	G35:L34:T31	0.68	335	31	35	15
GLT4	G35:L52:T13	0.80	341	42	44	36

\* calcolata con l'Equazione 9

Le curve calorimetriche di tutti i campioni sono state determinate utilizzando un calorimetro a flusso di calore seguendo la procedura indicata precedentemente nel

Capitolo 3.3.2. e sono riportate in Figura 4.14. Tutti i terpolimeri studiati presentano un'unica transizione di fase relativa alla  $T_g$  e nessuna altra, il che significa che tutti i GLT sono allo stato amorfo. I valori delle temperature di transizione vetrosa sono riportati in Tabella 4.4.



**Figura 4.14:** Analisi calorimetrica dei terpolimeri GLT1 (rosso), GLT2 (blu), GLT3 (verde) e GLT4 (nero).

Allo scopo di spiegare la variazione delle temperature di transizione vetrosa al variare della composizione dei terpolimeri si può applicare l'equazione empirica di Fox<sup>76</sup>, proposta per copolimeri statistici, opportunamente modificata per tener conto dei tre monomeri utilizzati:

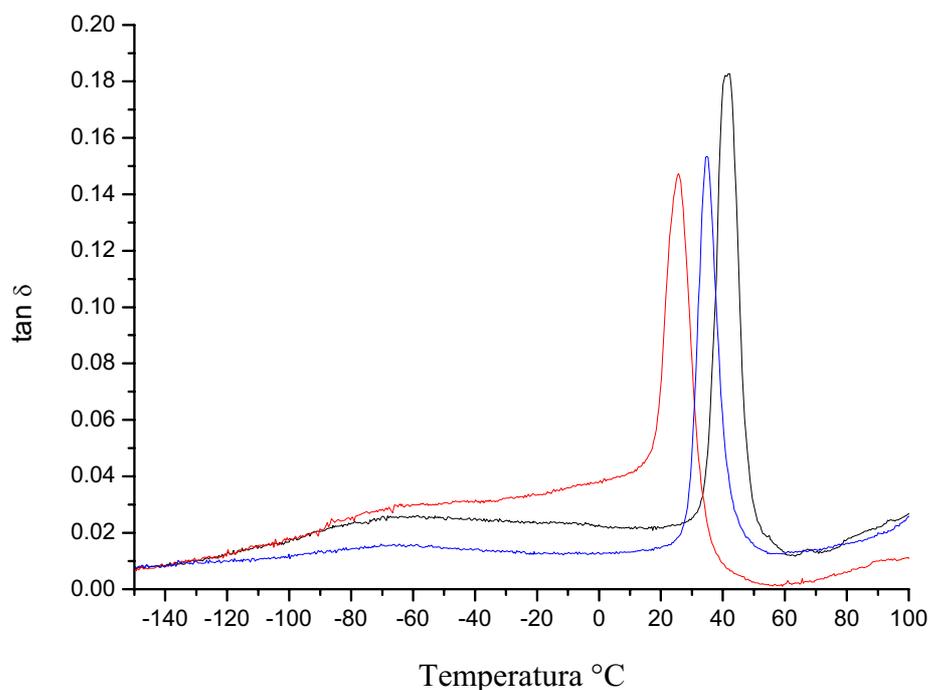
$$\frac{1}{T_g} = \frac{w_1}{T_{g1}} + \frac{w_2}{T_{g2}} + \frac{w_3}{T_{g3}} \quad \text{Equazione}$$

dove  $T_g$  è la temperatura di transizione vetrosa del terpolimero,  $w_1$ ,  $w_2$  e  $w_3$  sono le frazioni in peso rispettivamente dell'acido glicolico, dell'acido lattico e del trimetilencarbonato e  $T_{g1}$ ,  $T_{g2}$  e  $T_{g3}$  sono le temperature di transizione vetrosa degli omopolimeri ( $T_{g\text{PGA}} = 311\text{K}^{42-44}$ ,  $T_{g\text{PLA}} = 336\text{K}^{41,43}$  e  $T_{g\text{TMC}} = 248\text{K}^{77}$ ). Utilizzando l'Equazione 9 si ottengono valori calcolati di  $T_g^*$  più bassi di quelli sperimentali (vedi Tabella 4.4), ma con un andamento simile al variare della composizione. Tale risultato è importante in quanto mostra che è possibile stimare, a grandi linee, in fase di sintesi le proprietà termiche dei terpolimeri finali ed inoltre variando le composizioni dei monomeri iniziali si possono ottenere materiali con proprietà *ad hoc*.

Tendendo in considerazione i valori di  $T_g$  degli omopolimeri sopra riportati, e riconsiderando i valori di  $T_g$  sperimentali dei terpolimeri indicati in Tabella 4.4, si può osservare che: GLT1 e GLT4, che contengono entrambi circa il 50% di unità dell'acido lattico (PLA è il polimero con il valore di  $T_g$  più elevato dei tre componenti) hanno una temperatura di transizione vetrosa maggiore rispetto ai terpolimeri GLT2 e GLT3 che contengono entrambi circa il 30% di unità dell'acido lattico. Inoltre il GLT2 che contiene il maggior contenuto di trimetilencarbonato (43%) (TMC è il polimero con minore valore di  $T_g$ ), presenta il valore più basso di  $T_g$ . Mentre nonostante il GLT3 e il GLT4 contengano lo stesso contenuto di unità dell'acido lattico (35%) hanno valori di  $T_g$  che differiscono di circa  $10^\circ\text{C}$  ( $T_{g\text{GLT3}} < T_{g\text{GLT4}}$ ) in quanto nel GLT3 l'unità di acido lattico e di trimetilencarbonato sono circa le stesse, mentre nel GLT4 il contenuto di unità di acido lattico è del 50% circa rispetto al 10% di unità di trimetilencarbonato. In conclusione, la  $T_g$  dei terpolimeri cresce al crescere del contenuto di unità di acido L-lattico e cala al crescere di unità di trimetilencarbonato.

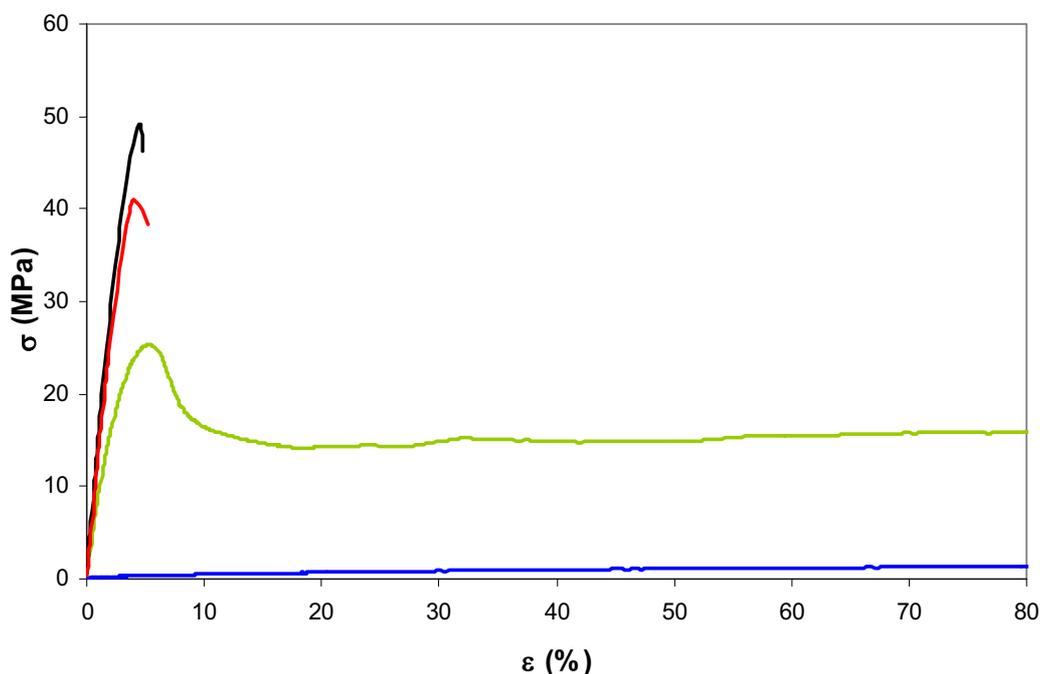
Le temperature di transizione vetrosa sono state ricavate anche da misure dinamico-meccaniche. In Figura 4.15 sono riportate le curva DMTA dei terpolimeri GLT1, GLT2 e GLT3; si può osservare come a basse temperature dove il polimero si trova in uno stato vetroso rigido, il valore di  $\tan \delta$  ha valori bassi. All'aumentare della temperatura, in corrispondenza della temperatura di transizione vetrosa (rilassamento  $\alpha$ , vedi  $T_\alpha$  in Tabella 4.4)  $\tan \delta$  passa attraverso un massimo molto pronunciato. I valori di  $T_\alpha$  ottenuti dall'analisi DMTA risultano essere più alti dei valori di  $T_g$  ottenuti tramite DSC ma hanno un andamento simile con la composizione;

tale differenze sono riscontrate essenzialmente perchè: la frequenza applicata nelle prove DMTA è di 3Hz, mentre nel caso del DSC si stima sia di 1Hz ed è noto che a seguito di un aumento della frequenza di misura ( $\nu_1 > \nu_2$ ) l'intero rilassamento viscoelastico si sposta a temperature più elevate ( $T_1 > T_2$ ).



**Figura 4.15:** Analisi dinamico-meccanica dei terpolimeri: GLT1 (nero), GLT2 (rosso), GLT3 (blu).

In Figura 4.16 sono riportate le curve sforzo-deformazione relative ai terpolimeri analizzati. Le misure sono state condotte come indicato nella parte sperimentale (Capitolo 3.3.4) e cioè in trazione, a temperatura ambiente, allungando un provino di forma rettangolare a velocità costante e misurando lo sforzo al variare della deformazione o del tempo. In Tabella 4.5 sono riportati i valori medi ottenuti del Modulo di Young (E) e dello sforzo a rottura ( $\sigma$ ).



**Figura 4.16:** Curve sforzo-deformazione dei terpolimeri GLT1 (rosso), GLT2 (blu), GLT3 (verde) e GLT4 (nero).

**Tabella 4.5:** Dati ottenuti dalle prove meccaniche.

Polimero	Composizione	$T_g^*$ (°C)	E (MPa)	$\sigma$ (MPa)
GLT1	G25:L53:T22	39	1353	41
GLT2	G24:L33:T43	21	148	-
GLT3	G35:L34:T31	31	841	26
GLT4	G35:L52:T13	42	1541	49

\* valore ricavato da analisi calorimetriche (DSC).

Come si può vedere i valori di modulo di Young dei terpolimeri risultano seguire un andamento simile a quello delle  $T_g$  dei campioni:  $E_{GLT4} > E_{GLT1} > E_{GLT3} > E_{GLT2}$ . A temperatura ambiente, la rigidità del materiale diminuisce al diminuire della temperatura di transizione vetrosa. I terpolimeri GLT1 e GLT4, hanno modulo elastico più elevato e comportamento fragile a rottura minore del 5%, mentre il

campione GLT3 dopo lo snervamento si rompe a deformazione superiore al 100%. Infine, il GLT2, che ha una  $T_g$  praticamente a temperatura ambiente, ha un comportamento tipicamente elastomerico: basso modulo di Young e non presenta snervamento ed inoltre ha un grado di deformazione molto alto (superiore al 100%) prima che si verifichi rottura.

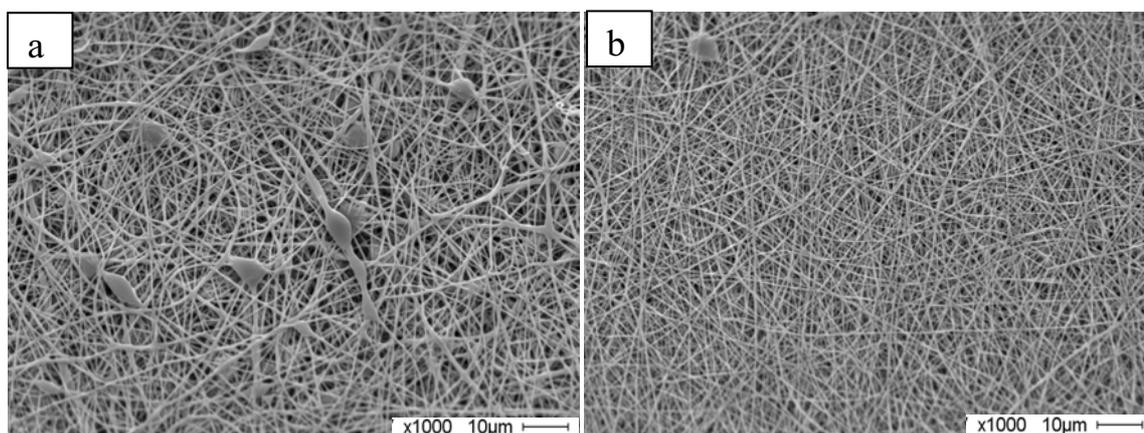
#### 4.4 Elettrofilatura dei copolimeri PL11GA e PL36GA

Come già detto in precedenza, la tecnica di elettrofilatura permette di produrre, a partire da una soluzione polimerica, fibre di dimensioni nanometriche o micrometriche, in funzione delle condizioni sperimentali. Il processo di elettrofilatura è controllato da molteplici parametri tra loro correlati ed in questa Tesi di Dottorato si è scelto di ottimizzare le condizioni sperimentali per l'elettrofilatura dei due copolimeri lattico glicolico (PLGA) eseguendo diverse prove che prevedevano la variazione dei seguenti parametri uno alla volta:

1. la concentrazione della soluzione
2. il potenziale
3. la distanza ago-collettore
4. la velocità di flusso della soluzione.

Nel processo di elettrofilatura la scelta del solvente è la fase critica, poiché essa determina sia la possibilità di ottenere delle fibre sia, quando queste sono presenti, la loro morfologia. Inoltre, non sempre un solvente in grado di solubilizzare completamente un determinato polimero, possiede anche le caratteristiche adatte per essere utilizzato in un processo di elettrofilatura. La costante dielettrica del solvente, che è una misura della polarità delle molecole del solvente, costituisce uno dei parametri principali da considerare nella scelta del sistema polimero/solvente. Come già detto, il requisito fondamentale affinché la soluzione possa essere elettrofilata è che la carica elettrica superi la tensione superficiale. L'utilizzo quindi di un solvente con un valore elevato di costante dielettrica favorisce la formazione di una notevole densità di carica nella soluzione e quindi facilita la formazione di fibre. In genere si è osservato che, se il solvente ha un'alta costante dielettrica le fibre polimeriche mostrano un diametro inferiore.

Per il copolimero PL11GA il sistema solvente utilizzato è una miscela costituita da cloroformio e dimetilformammide in rapporto 70:30 in volume. Trattandosi di un copolimero contenente l'11% di unità gli coliche, la scelta di tale sistema solvente si è basata su una precedente ottimizzazione condotta nel laboratorio per un omopolimero dell'acido lattico (PLLA). Il cloroformio (CF) solubilizza bene il PL11GA e avendo una elevata tensione di vapore evapora facilmente lungo il percorso ago-collettore; d'altro canto la dimetilformammide (DMF) possiede un'alta costante dielettrica e favorisce la formazione di una notevole densità di carica nella soluzione e quindi facilita la formazione di fibre. Nel caso del copolimero PL36GA è stato necessario utilizzare un sistema solvente ternario costituito da cloroformio, dimetilformammide e esafluoroisopropanolo (HFIP) in rapporto 60:30:10 in volume. In Figura 4.17 si confrontano le micrografie ottenute al SEM di un campione di PL36GA elettrofilato usando un sistema solvente privo di HFIP (Figura 4.17a). con fibre dello stesso materiale prodotte con un sistema solvente ternario contenente HFIP (Figura 4.17b). Come si può vedere le fibre elettrofilate utilizzando il sistema binario presentano numerosi difetti morfologici di forma sferica detti “beads” (perle), mentre quelle elettrofilate in presenza di esafluoroisopropanolo, che possiede una elevata costante dielettrica, i difetti sono scomparsi.



**Figura. 4.17:** Fibre di PL36GA elettrofilate in

a) CF:DMF 70:30 b) CF:DMF:HFIP 60:30:10

nelle seguenti condizioni: differenza di potenziale =19 kV, distanza ago-collettore=10 cm, velocità di flusso =  $20 \times 10^{-3}$  ml/min, soluzione al 25% (w/V).

Una volta identificato il sistema solvente ottimale per entrambi i copolimeri, sono state preparate soluzioni a diversa concentrazione.

La formazione di un getto continuo di soluzione, senza che si abbia la suddivisione del getto in gocce singole (elettrospray) è determinata dalla presenza in soluzione di macromolecole in grado di formare dei legami di tipo fisico tra le catene chiamati concatenamenti<sup>78</sup>. È stato dimostrato<sup>79-81</sup> che la concentrazione è un parametro che influisce sulla morfologia delle fibre. Esiste, infatti, per ogni polimero, con un dato peso molecolare, una concentrazione critica al di sotto della quale non si creano concatenamenti e quindi non avviene il processo di elettrofilatura. Lo stesso ragionamento va esteso al peso molecolare del polimero ed entrambi i parametri contribuiscono alla determinazione di una viscosità critica necessaria affinché il processo di elettrofilatura produca fibre polimeriche.

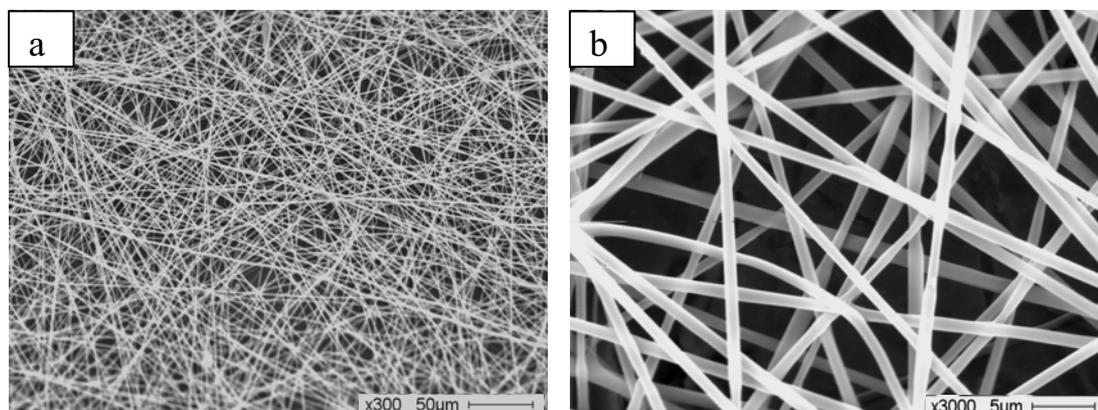
Per ottimizzare il processo di elettrofilatura dei due copolimeri lattico-glicolico, dato che il peso molecolare è definito, l'unico modo per far variare il numero di concatenamenti tra le catene polimeriche è quello di modificare la concentrazione.

#### Copolimero PL11GA

La prima soluzione preparata per il PL11GA ha una concentrazione del 10%. In Figura 4.18 sono riportate le micrografie delle fibre ottenute applicando una differenza di potenziale di 11kV, una velocità di flusso pari a  $10 \times 10^{-3}$  ml/min e con una distanza ago-collettore di 10cm: le fibre sono risultate prive di difetti morfologici con diametri da 0.7 a 1  $\mu$ m. In seguito sono state effettuate altre prove, sempre partendo da una soluzione al 10%, ma variando i parametri distanza ago-collettore, differenza di potenziale e velocità di flusso. Tali variazioni non hanno modificato in maniera sostanziale né il diametro delle fibre, che si mantiene dell'ordine di qualche  $\mu$ m, né la morfologia, che è caratterizzata dall'assenza di difetti. Si può affermare che in questo caso la concentrazione risulta essere il parametro principale che governa la morfologia delle fibre.

In seguito a tali risultati sono state preparate soluzioni meno concentrate sino ad ottenere una concentrazione di PL11GA del 7%: le fibre ottenute sono risultate più sottili rispetto a quelle ottenute con una soluzione al 10%. Tra tutte le varie prove

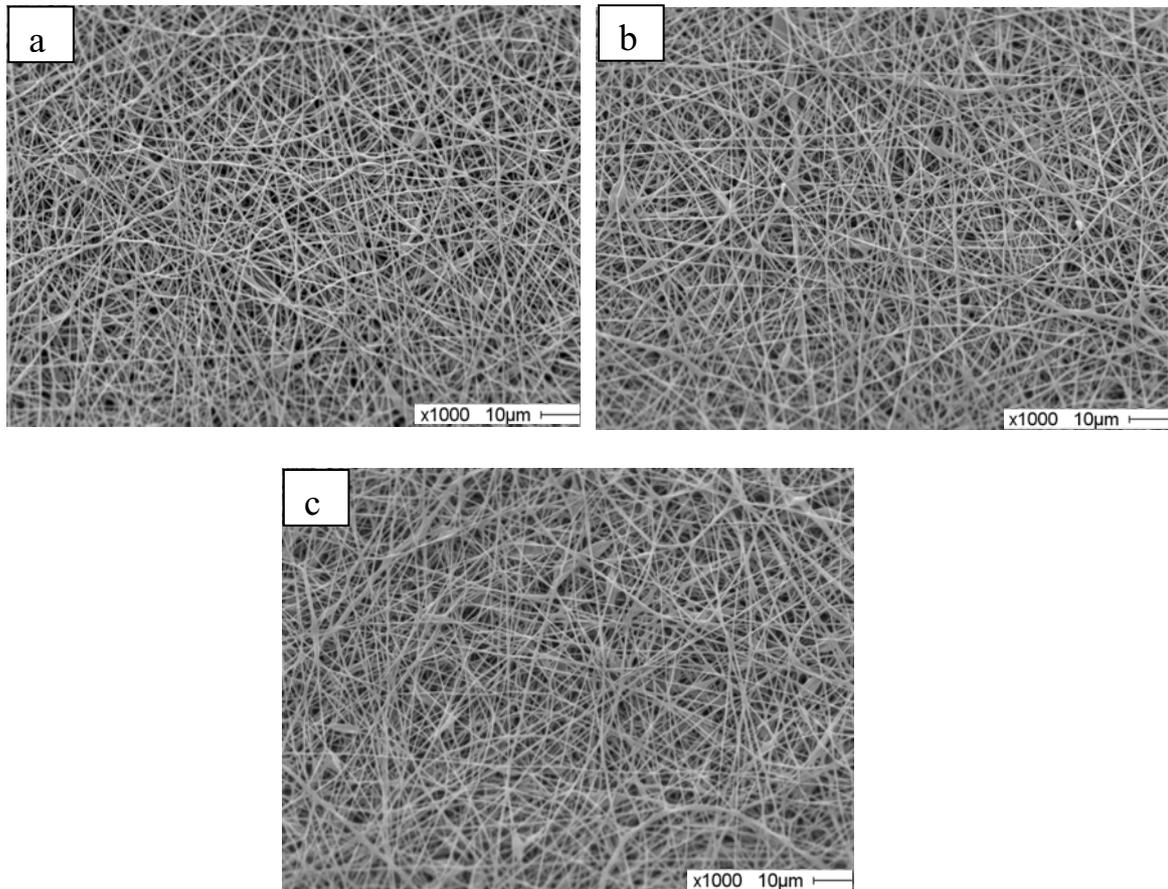
e eseguite a questa concentrazione (7%), si riportano di seguito le più significative per spiegare, a grandi linee, come i parametri strumentali influenzano la morfologia delle fibre.



**Figura. 4.18:** Fibre di PL11GA elettrofilate in

CF:DMF 70:30 nelle seguenti condizioni: differenza di potenziale =11 kV, distanza ago-collettore =10 cm, velocità di flusso =  $10 \times 10^{-3}$  ml/min, soluzione al 10% (w/V) a due diversi ingrandimenti: a) x300, b) x3000.

È importante sottolineare come tali parametri siano strettamente dipendenti tra loro ma, per semplificare il problema, le prove di seguito descritte prevedono la variazione di un parametro alla volta. In Figura 4.19 sono mostrate micrografie SEM di fibre (ingrandimenti uguali), ottenute variando il potenziale e mantenendo costanti gli altri parametri. La morfologia delle fibre risulta simile per tutte e tre le prove ed infatti, i diametri misurati sono risultati sempre essere compresi tra 0.3-0.5 µm. È stato illustrato, nella parte sperimentale Capitolo 3.3.7, come, a parità di velocità di flusso, se la differenza di potenziale elettrico applicato non è sufficientemente elevata non si ha la formazione del cono di Taylor e l'inizio del processo di stiro. Questo fenomeno si è verificato nelle prove eseguite, a parità di parametri, a potenziali sia di 9 kV che di 11 kV. D'altra parte se il potenziale è troppo elevato, non si ha ugualmente la formazione del cono di Taylor e la soluzione risulta tirata direttamente dall'interno dell'ago; in questo caso le fibre raccolte presentano numerosi difetti morfologici.



**Figura 4.19:** fibre di PL11GA elettrofilate nelle seguenti condizioni:

soluzione al 7% (w/V) in CF:DMF 70:30,

distanza ago-collettore =10 cm,

velocità di flusso =  $10 \times 10^{-3}$  ml/min

a) differenza di potenziale =13 kV

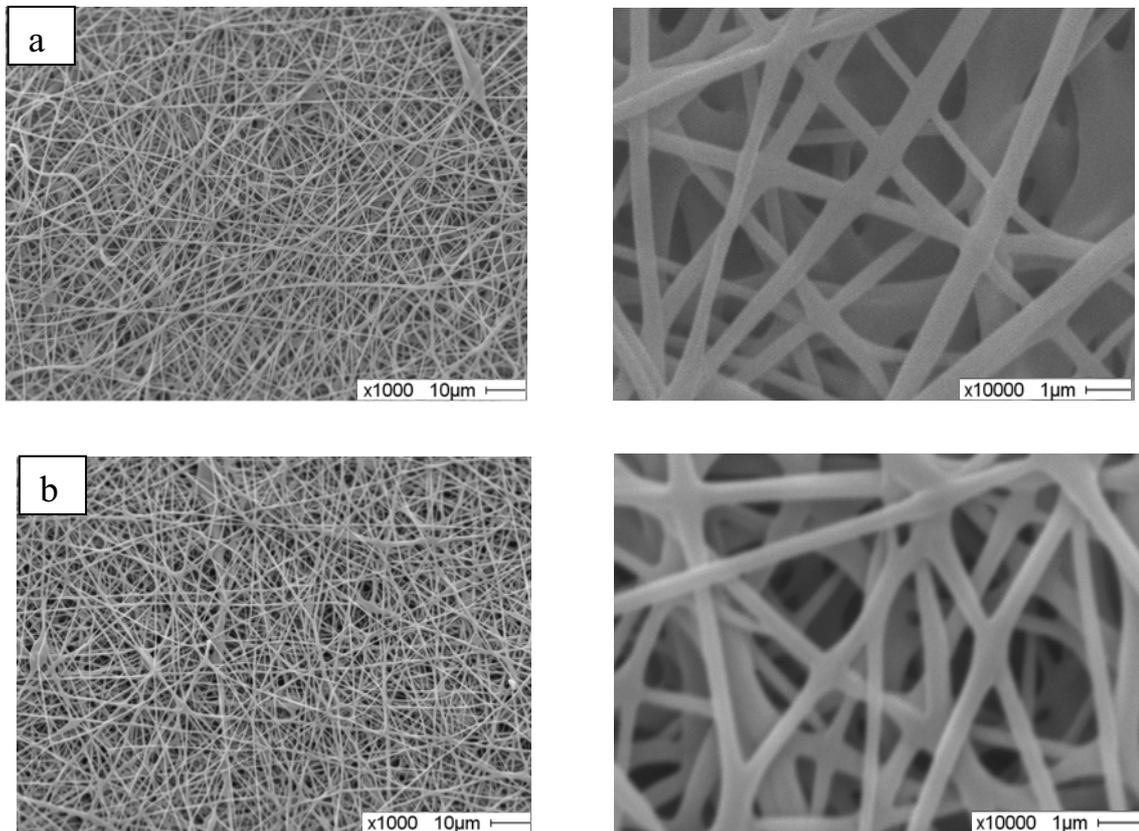
b) differenza di potenziale =15 kV

c) differenza di potenziale =17 kV.

A questo punto si è passati a prove di elettrofilatura in cui si varia la velocità di flusso e si mantengono costanti gli altri parametri.

A titolo di esempio in Figura 4.20 è mostrato un campione ottenuto a partire dalla soluzione al 7% (w/V) elettrofilato a due velocità diverse. Sia alla velocità di  $10 \times 10^{-3}$  ml/min che di  $20 \times 10^{-3}$  ml/min si forma il cono di Taylor e il getto risulta

estremamente stabile ed in entrambe le prove le fibre presentano diametri compresi tra 0.3-0.5  $\mu\text{m}$ . È chiaro che, in questo caso, una velocità di flusso maggiore ha come vantaggio la possibilità di ottenere elettrofilati in tempi minori.



**Figura 4.20:** Fibre di PL11GA elettrofilate nelle seguenti condizioni:

soluzione al 7% (w/V) in CF:DMF 70:30,

distanza ago-collettore =10 cm,

differenza di potenziale =15 kV

a) velocità di flusso  $20 \times 10^{-3}$  ml/min

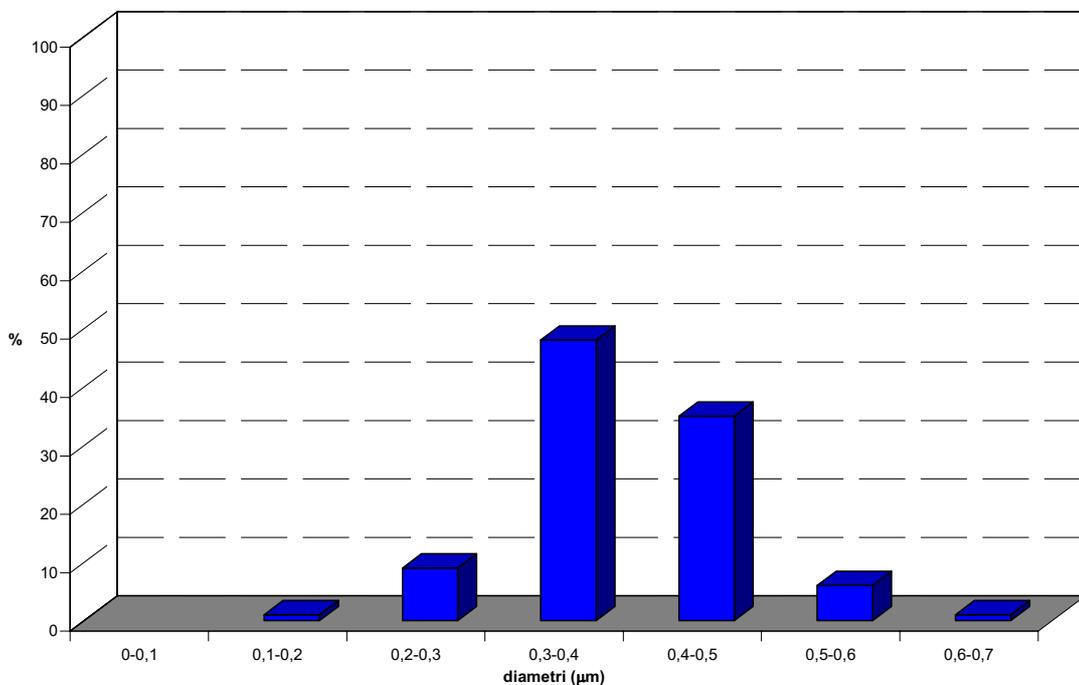
b) velocità di flusso  $10 \times 10^{-3}$  ml/min.

Alla luce di queste considerazioni e dei risultati ottenuti si è deciso di non effettuare prove in cui venga variata la distanza ago-collettore. Va tuttavia ricordato che quando la distanza viene diminuita il getto impiega meno tempo a raggiungere la piastra e quindi si potrà avere una non completa evaporazione del solvente; inoltre il campo elettrico applicato risulterà maggiore e ciò comporterà la produzione di fibre

più grosse in quanto l'effetto di stiro applicato al getto dura meno. Se invece si aumenta la distanza, il getto impiega più tempo a raggiungere la piastra ma il campo elettrico risulta minore.

Le condizioni di elettrofilatura ottimali per il copolimero PL11GA sono risultate essere: **7% (w/V) in CF:DMF 70:30 (rapporto in volume), differenza di potenziale = 15 kV, distanza ago-collettore = 10 cm e velocità di flusso =  $20 \times 10^{-3}$  ml/min.**

Inoltre, una volta ottimizzate le condizioni sperimentali di elettrofilatura sono state eseguite misure dirette delle dimensioni delle fibre su immagini acquisite al SEM che hanno permesso di ricavare una distribuzione dei diametri (Figura 4.21) sulla base del campionamento di circa 200 fibre.



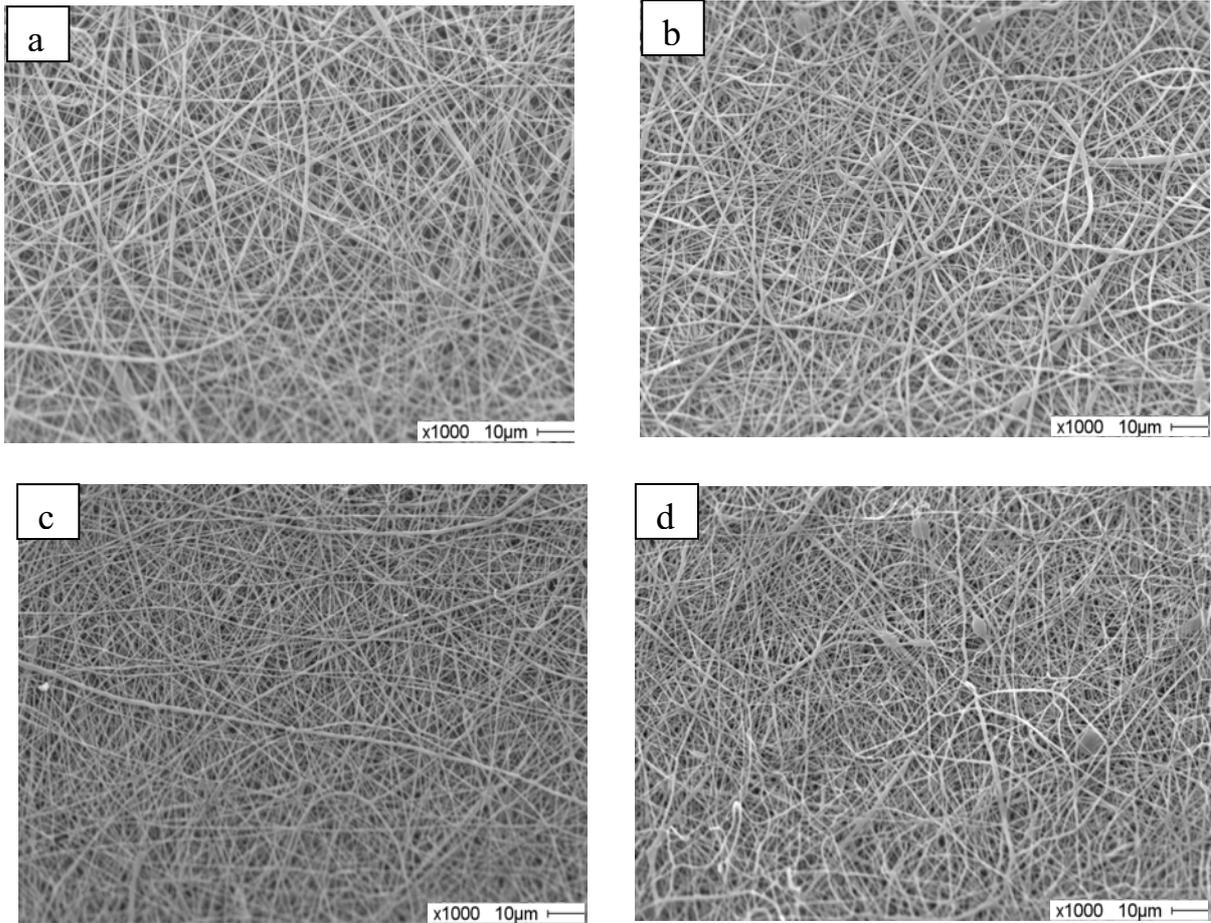
**Figura 4.21:** Distribuzione dei diametri delle fibre elettrofilate dei tappetini di PL11GA.

I dati dell'istogramma di Figura 4.21 dimostrano che le fibre ottenute sono risultate sub-micrometriche e mostra che la maggior parte delle fibre, circa il 50%, ha una distribuzione di diametri compresa tra 0.3-0.4 µm con un diametro massimo compreso tra 0.6-0.7 µm.

### Copolimero PL36GA

Come è stato detto all'inizio di questo Capitolo il sistema solvente ideale nel caso di questo copolimero è risultato essere un sistema ternario costituito da CF:DMF:HFIP 60:30:10. È stata preparata una soluzione al 25% (w/V) e sono state effettuate prove di elettrofilatura variando il potenziale (vedi Figura 4.22) e mantenendo invariati gli altri parametri.

Il confronto tra le immagini al SEM di Figura 4.22 mostra che la morfologia migliore si ottiene applicando un potenziale di 17 kV (Figura 4.22c): le fibre risultano prive di difetti e i diametri sono compresi tra 0.25-0.45  $\mu\text{m}$ . Quando si imposta un potenziale di 13 kV (fig. 4.22a) le fibre ottenute sono anche in questo caso esenti da difetti morfologici ma presentano una distribuzione di diametri piuttosto disomogenea, che varia da 0.20 a 0.6  $\mu\text{m}$  ed è lo stesso risultato che si ha con un potenziale di 15 kV. Se il potenziale è troppo elevato, nel caso specifico 19 kV (Figura 4.22d) le fibre appaiono disomogenee e con dei "beads".



**Figura 4.22:** Fibre di PL36GA elettrofilate nelle seguenti condizioni:

soluzione al 25% (w/V) in CF:DMF:HFIP 60:30:10,

distanza ago-collettore =13 cm,

velocità di flusso =  $20 \times 10^{-3}$  ml/min

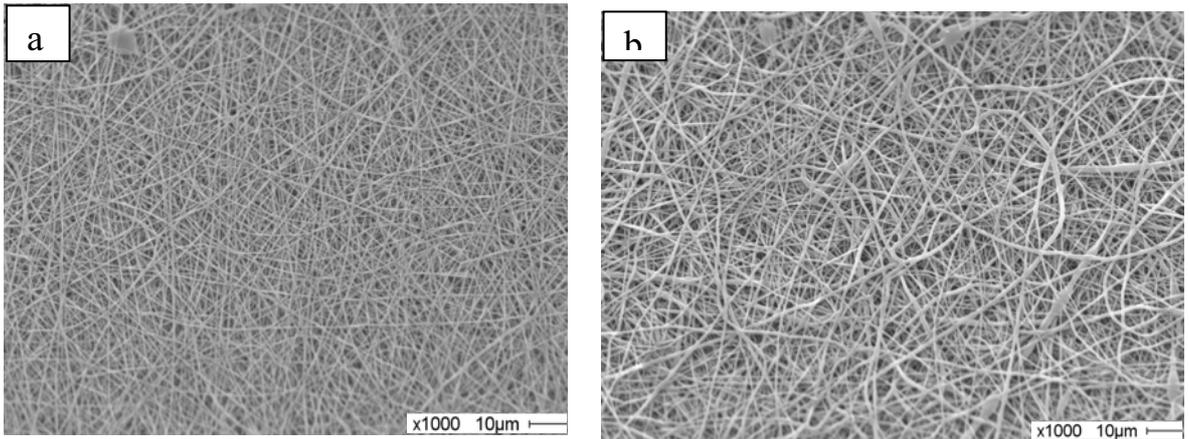
a) differenza di potenziale =13 kV

b) differenza di potenziale =15 kV

c) differenza di potenziale =17 kV

d) differenza di potenziale =19 kV.

A questo punto sono state effettuate prove in cui è stato fatto variare il parametro distanza ago-collettore (Figura 4.23 e Figura 4.24 ). Si può vedere che sia nel caso in cui il potenziale applicato è di 15 kV (Figura 4.23) che nel caso in cui sia di 19 kV (Figura 4.24) la morfologia delle fibre risulta migliorata nettamente al diminuire della distanza ago-collettore (10 cm invece di 12 cm).



**Figura 4.23:** Fibre di PL36GA elettrofilate nelle seguenti condizioni:

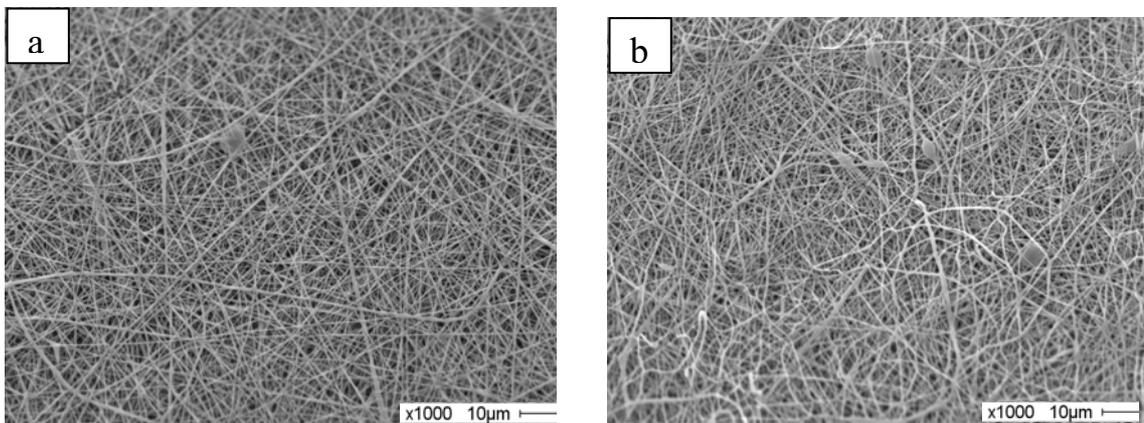
soluzione al 25% (w/V) in CF:DMF:HFIP 60:30:10,

differenza di potenziale =15 kV

velocità di flusso  $20 \times 10^{-3}$  ml/min

a) distanza ago-collettore =10 cm,

b) distanza ago-collettore =12 cm.



**Figura 4.24:** Fibre di PL36GA elettrofilate nelle seguenti condizioni:

soluzione al 25% (w/V) in CF:DMF:HFIP 60:30:10,

differenza di potenziale =19 kV

velocità di flusso  $20 \times 10^{-3}$  ml/min

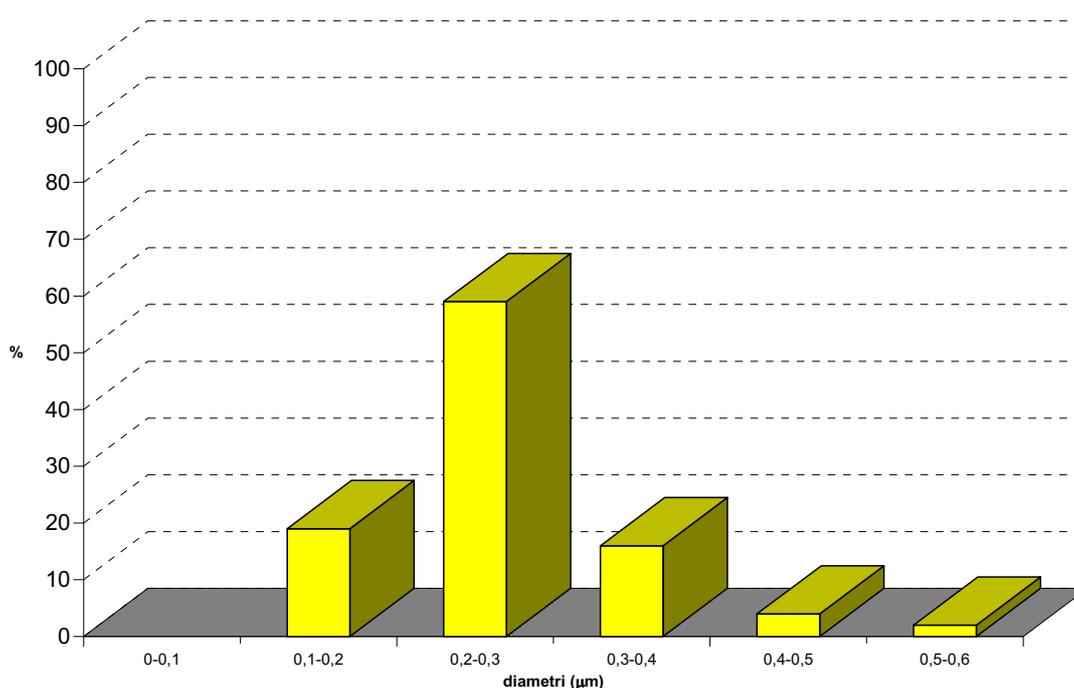
a) distanza ago-collettore =10 cm,

b) distanza ago-collettore =12 cm

La distribuzione dei diametri delle fibre risulta essere nel primo caso (Figura 4.23a) compresa tra 0.25-0.50  $\mu\text{m}$ , mentre nel secondo caso (Figura 4.24a) è compresa tra 0.15-0.40  $\mu\text{m}$ . Non sono state effettuate prove a concentrazioni diverse.

Le condizioni di elettrofilatura ottimali per il copolimero PL36GA sono risultate essere: **25% (w/V) in CF:DMF;HFIP 60:30:10 (rapporto in volume), differenza di potenziale = 19 kV, distanza ago-collettore = 10 cm e velocità di flusso =  $20 \times 10^{-3}$  ml/min.**

Inoltre, una volta ottimizzate le condizioni sperimentali di elettrofilatura sono state eseguite misure dirette delle dimensioni delle fibre su immagini acquisite al SEM che hanno permesso di ricavare una distribuzione dei diametri (Figura 4.25) sulla base del campionamento di circa 200 fibre.

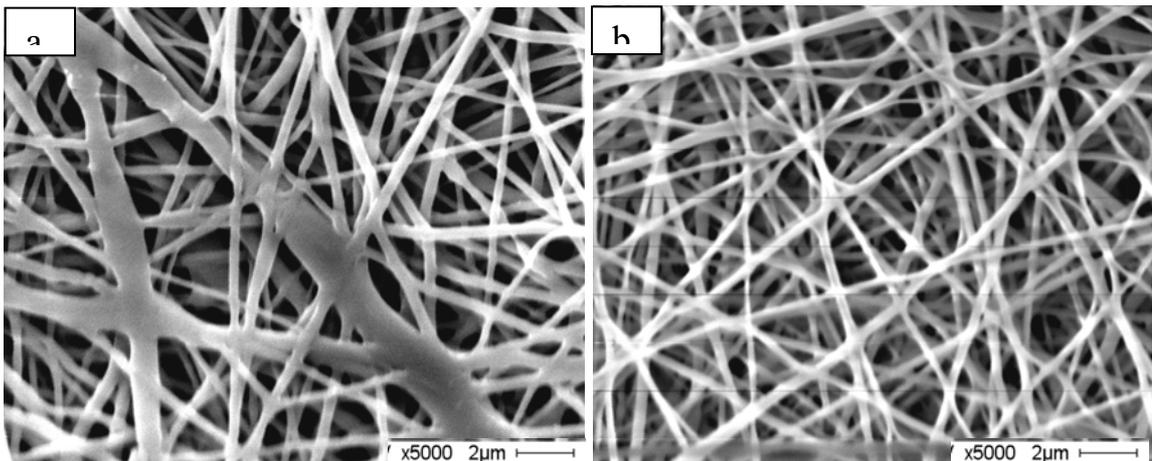


**Figura 4.25:** Distribuzione dei diametri delle fibre elettrofilate dei tappetini di PL36GA.

I dati dell'istogramma di Figura 4.25 dimostrano che le fibre ottenute sono risultate sub-micrometriche e mostra che la maggior parte delle fibre, circa il 60%, ha una

distribuzione di diametri compreso tra 0.2-0.3  $\mu\text{m}$  con un diametro massimo compreso tra 0.5 e 0.6  $\mu\text{m}$ .

Un esame accurato delle due superfici del “mat” elettrofilato ha inaspettatamente rivelato solamente per il PL36GA differenze morfologiche tra i due lati del tappetino. In Figura 4.26 sono messe a confronto la superficie inferiore (quella aderente alla piastra di raccolta) (Figura 4.26a) e la superficie superiore (Figura 4.26b) del tappetino.



**Figura 4.26:** Tappetino di PL36GA: a) lato inferiore, b) lato superiore.

Il lato inferiore presenta fibre più grosse e fuse tra loro in alcuni punti. L’immagine fa pensare che le fibre contengano del solvente residuo, imputabile al fatto che la distanza ago-collettore è stata diminuita, e quindi l’evaporazione del solvente non è stata completa. Probabilmente, le fibre risultano meno rigide e non sopportano il peso del materiale che si deposita sopra di esse durante l’elettrofilatura e quindi collassano.

## 4.5 Prove di degradazione idrolitica

Le prove di degradazione idrolitica sono state condotte sia su campioni ottenuti tramite elettrofilatura, che su campioni in forma di film ottenuti tramite pressatura ad alta temperatura. In entrambi i casi il peso dei campioni analizzati è di circa 20 mg e vengono mantenuti per diversi giorni ad una temperatura costante di 37°C in una soluzione acquosa a pH 7.40 (condizioni fisiologiche) con tampone fosfato.

Per analizzare i cambiamenti provocati dal processo di degradazione nel tempo si è stabilito un calendario dei prelievi. Nei giorni fissati si preleva un campione dal bagno che viene lavato con acqua distillata per eliminare i sali della soluzione tampone, asciugato ed infine essiccato sotto vuoto su  $P_2O_5$  per eliminare l'acqua residua.

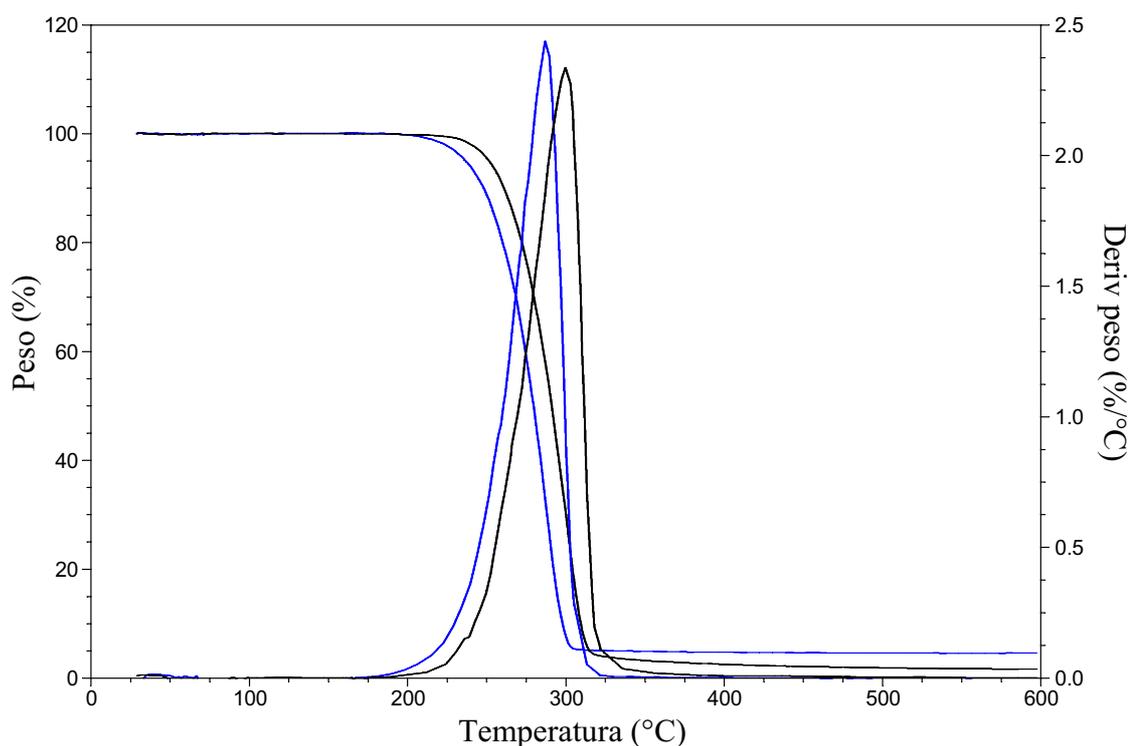
#### 4.5.1 Degradazione idrolitica del copolimero PL11GA

##### PL11GA elettrofilato

Sono stati preparati 12 campioni di PL11GA che sono stati sottoposti alle prove di idrolisi per tempi diversi e sono stati denominati PL11GA-x, dove x indica il numero dei giorni di permanenza in tampone fosfato. Il primo prelievo è stato effettuato dopo 7 giorni e l'ultimo dopo 44 giorni. È stato misurato il pH della soluzione tampone di ogni campione e si è registrata una variazione da 7.39 (primo prelievo) a 7.35 (ultimo prelievo): si può quindi affermare che il pH rimane pressoché invariato durante i 44 giorni di analisi.

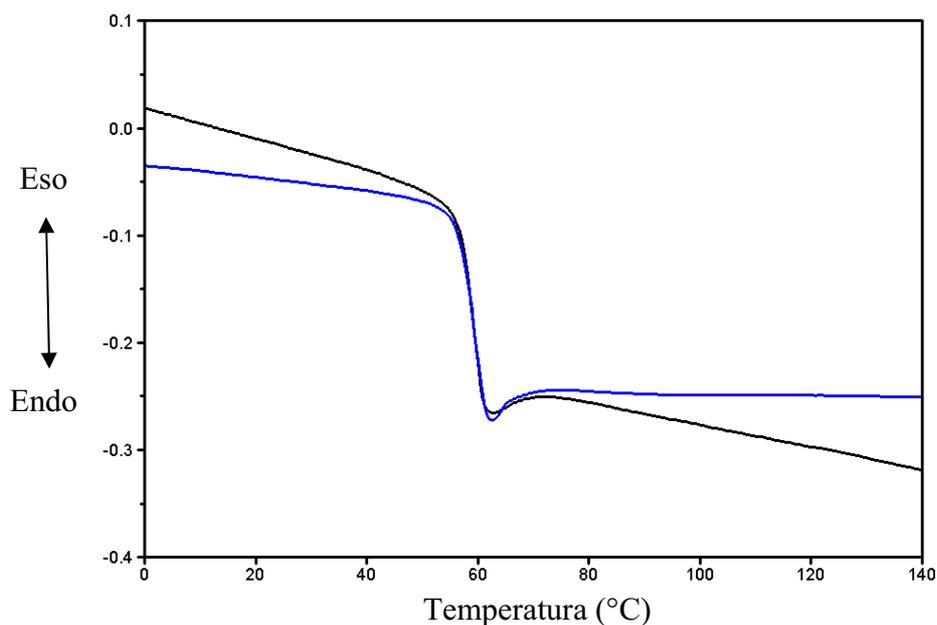
Dopo il prelievo dalla soluzione tampone, i campioni sono stati analizzati sia alla TGA che al DSC allo scopo di individuare eventuali differenze di comportamento termico attribuibili alla permanenza in tampone.

Il confronto delle TGA (Figura 4.27) del campione iniziale e dell'ultimo prelevato, mostra una diminuzione modesta della stabilità termica ( $T_{max}$  varia di circa  $13^{\circ}C$ ), dopo 44 giorni di permanenza in soluzione acquosa. Questo risultato può essere attribuito all'effetto dell'idrolisi che provoca un calo del peso molecolare del copolimero. Come già discusso nel Capitolo 4.1 la stabilità termica di un polimero dipende fortemente dalla lunghezza delle catene e una diminuzione del peso molecolare comporta, all'analisi termogravimetrica, un numero di eventi di rottura di legame minore per generare oligomeri volatili, la cui evaporazione provoca la perdita di peso del campione. Quindi laddove si verifici un abbassamento del peso molecolare, conseguentemente si avrà una diminuzione della stabilità termica.



**Figura 4.27:** Analisi termogravimetrica dei campioni PL11GA-0 (nero) e PL11GA-44 (blu)

In Figura 4.28 sono riportate le curve calorimetriche relative alla seconda scansione (per la procedura vedi Capitolo 3.3.2) del campione di PL11GA sottoposto ad idrolisi per 44 giorni è confrontata con quelle del copolimero non idrolizzato. Le temperature di transizione vetrosa dei campioni misurate nella seconda scansione sono risultate uguali (58°C) il che fa concludere che se i campioni hanno subito modifiche a livello molecolare durante la permanenza in tampone, come un calo del peso molecolare, devono essere di entità modesta, tali cioè da non alterare le proprietà calorimetriche delle fibre elettrofilate.



**Figura 4.28:** Analisi calorimetrica dei campioni PL11GA-0 (nero) e PL11GA-44 (blu).

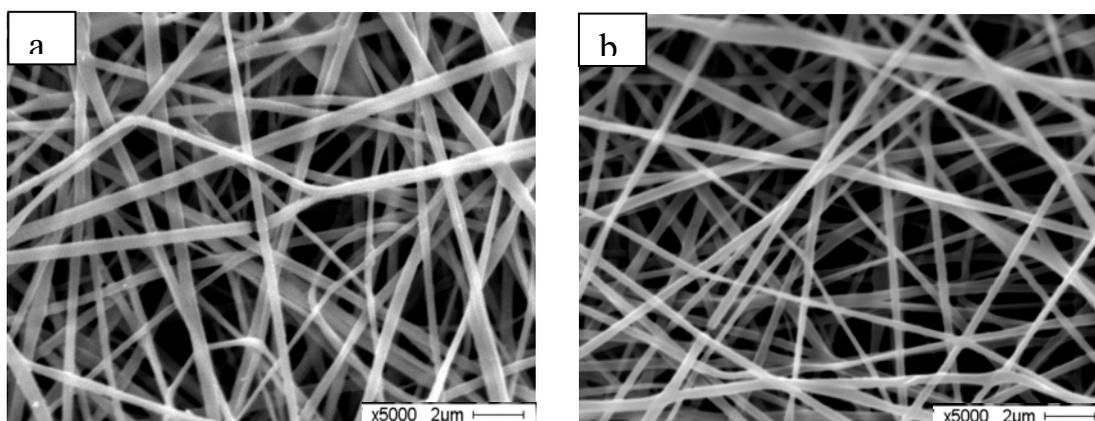
**Tabella 4.6:** Dati calorimetrici dei campioni PL11GA-0 e PL11GA-44.

PL11GA-0	$T_g$ (°C)	$\Delta c_p$	$T_c$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_c = \Delta H_m$ (J/g)
1 scansione	58	0.58	95	144	26
2 scansione	58	0.55			
PL11GA-44					
1 scansione	64	0.39	97	145	25
2 scansione	58	0.54			

In Tabella 4.6 sono riportati i dati ottenuti al DSC, in due scansioni successive, per i campioni di PL11GA-0 e PL11GA-44. Nel corso della prima scansione il PL11GA-0 mostra, oltre alla transizione vetrosa, un picco esotermo ( $T_c$ ) ed uno endotermo ( $T_m$ ) da cui è possibile calcolare i valori di  $\Delta H_c$  e  $\Delta H_m$  che risultano entrambi pari a 26J/g il che significa che il materiale di partenza è amorfo. La temperatura di transizione vetrosa misurata per il PLGA-0 nella prima scansione è identica a quella misurata nella seconda scansione mentre il picco endotermo scompare. Anche nel caso del

PL11GA-44 nella prima scansione è presente un picco esotermo a ed uno endotermo da cui si ricavano le temperature di cristallizzazione ( $97^{\circ}\text{C}$ ) e fusione ( $145^{\circ}\text{C}$ ) che risultano simili a quelle ottenute per il copolimero che non ha subito idrolisi ( $T_c=95^{\circ}\text{C}$ ,  $T_m=144^{\circ}\text{C}$ ). I valori di entalpia di cristallizzazione e fusione calcolati nella prima scansione sono entrambi pari a  $25\text{J/g}$  e anche dopo 44 giorni il copolimero rimane amorfo. Anche nella seconda scansione del PL11GA-44 non si registrano transizioni relative a cristallizzazione e fusione; la  $T_g$  risulta essere più alta nella prima scansione ( $64^{\circ}\text{C}$ ) rispetto a quella della seconda scansione ( $59^{\circ}\text{C}$ ): tale diversità va correlata alla presenza di un rilassamento entalpico registrato, in corrispondenza della transizione vetrosa nella prima scansione (non riportata), attribuibile al fenomeno dell'invecchiamento fisico. Tale fenomeno si verifica quando il polimero si trova ad una temperatura minore ma vicina alla sua  $T_g$  e trae origine dalla mancanza di equilibrio termodinamico nei polimeri allo stato vetroso: si avrà, quindi, una contrazione del volume libero (inteso come spazio non occupato dalle molecole) che si riflette in un aumento della temperatura di transizione vetrosa del polimero. I campioni sottoposti alle prove di degradazione idrolitica sono stati lasciati a  $37^{\circ}\text{C}$  per diversi giorni e presentano quindi, nella prima scansione, una  $T_g$  più alta. Alla seconda scansione, dopo aver portato il campione ad una  $T$  molto maggiore di  $T_g$ , l'effetto dell'invecchiamento fisico viene cancellato e la  $T_g$  si abbassa.

Considerando i dati termogravimetrici e calorimetrici si può concludere che durante i 44 giorni di permanenza in soluzione tampone del mat di PL11GA, potrebbe esserci stata una perdita di peso molecolare, ma di modesta entità.



**Figura 4.29:** Tappetino di PL11GA: a) 0 giorni, b) dopo 44 giorni.

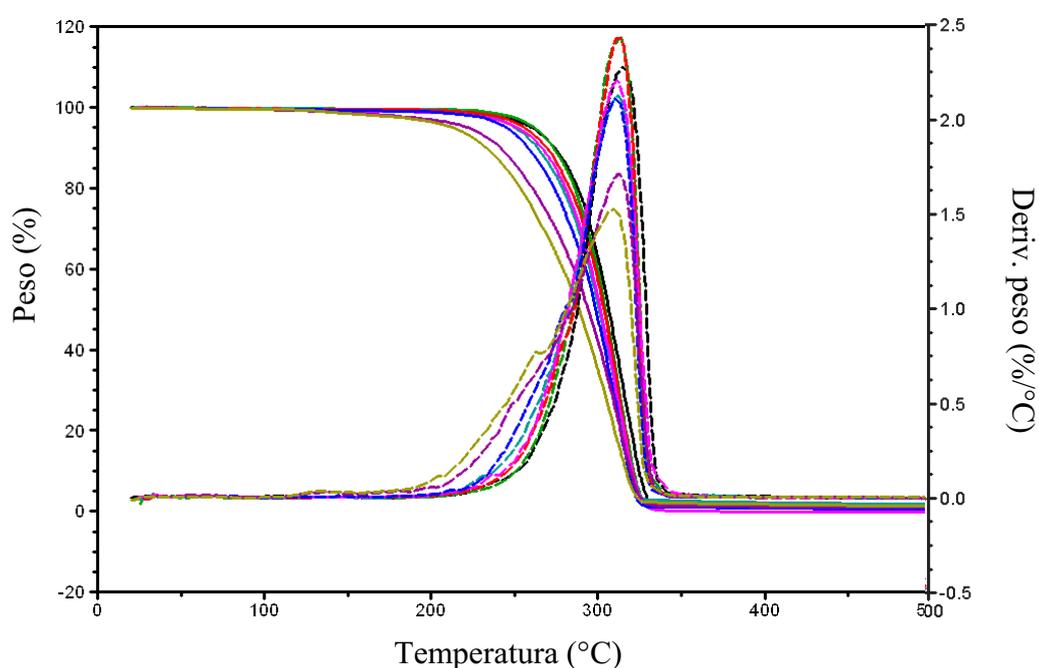
Tale osservazione è confermata dalle micrografie SEM in Figura 4.29, che evidenziano come le fibre non presentino cambiamenti morfologici evidenti per effetto dell'idrolisi anche dopo 44 giorni.

### PL11GA film

Le prove di degradazione idrolitica per questo copolimero sono state condotte anche, come detto all'inizio del Capitolo 4.5, su campioni in forma di film ottenuti tramite pressatura ad alta temperatura. Il poliestere è stato inizialmente solubilizzato in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5% w/v), la soluzione è stata quindi versata in una capsula Petri per permettere l'evaporazione del solvente a temperatura ambiente. Con tale procedimento sono stati ottenuti dei film sottili che sono stati successivamente pressati a  $185^\circ\text{C}$  (pressa Carver) al fine di ricavare film di spessore compreso tra 0.15 e 0.20 mm. Da ogni film sono stati ritagliati dei campioni aventi una lunghezza di 25 mm e larghezza 5 mm; una parte dei campioni è stata successivamente trattata in stufa a  $100^\circ\text{C}$  per 1h al fine di ottenere uno sviluppo di fase cristallina in quantità definita e stabile alla temperatura delle prove di degradazione idrolitica ( $37^\circ\text{C}$ ). I film non trattati in stufa sono risultati amorfi. I parametri di idrolisi sono gli stessi che nel caso dei campioni elettrofilati, ma data la differenza di morfologia (vedi Capitolo 1.5) imputabile al metodo di preparazione dei campioni, è stato necessario stabilire un calendario di prelievi della durata complessiva di: 305 giorni per il PL11GA amorfo (a-PL11GA) e di 300 giorni per il PL11GA cristallizzato (c-PL11GA).

In Figura 4.30 sono riportate le curve termogravimetriche di alcuni campioni di PL11GA amorfi sottoposti alle prove di idrolisi, in particolare di: a-PL11GA-47, a-PL11GA-83, a-PL11GA-116, a-PL11GA-154, a-PL11GA-196, a-PL11GA-277, a-PL11GA-305 confrontati con il campione a-PL11GA-0. Tutti i campioni sono stati sottoposti ad essiccamento prima di procedere all'analisi termogravimetrica. Si può osservare che la stabilità termica diminuisce al crescere del tempo di idrolisi suggeriscono variazione del peso molecolare. In questo caso si vede come in tutti i campioni la temperatura a cui la velocità di degradazione è massima ( $T_{\text{max}}$ ) sia piuttosto stabile e compresa tra  $310\text{-}320^\circ\text{C}$ , mentre l'inizio del processo di degradazione (vedi curva relativa alla perdita di peso percentuale) avviene a

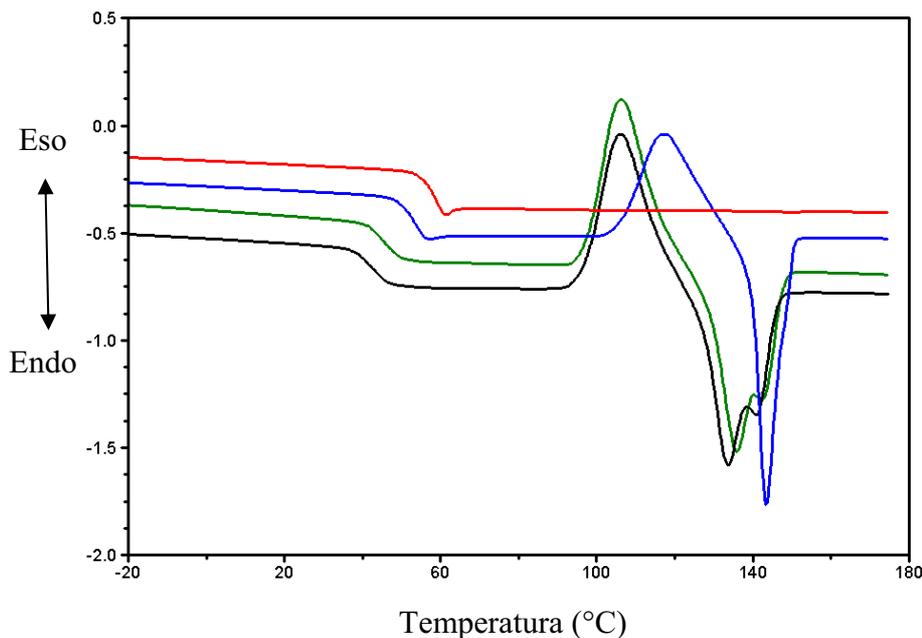
temperature minori man mano che il tempo di idrolisi aumenta. Si può ipotizzare, dai dati ottenuti dalla TGA, che nei campioni degradati cambi la distribuzione dei pesi molecolari elevati all'aumentare del tempo di idrolisi, con lo sviluppo di frazioni a pesi molecolari bassi con minore stabilità termica. Come detto precedentemente nel Capitolo 1.5, quando frammenti a basso peso molecolare rimangono nel campione, si parla di degradazione idrolitica eterogenea in cui le catene a basso peso molecolare permangono all'interno del campione e innescano un processo di autocatalisi. La degradazione all'interno sarà maggiore rispetto che all'esterno.



**Figura 4.30:** Analisi termogravimetrica dei campioni a-PL11GA-0 (nero), a-PL11GA-47 (verde), a-PL11GA-83 (rosso), a-PL11GA-116 (fucsia), a-PL11GA-154 (azzurro), a-PL11GA-196 (blu), a-P11LGA-277 (viola), a-P11LGA-305 (verde oliva). Le curve continue rappresentano le perdite di peso percentuali e le curve tratteggiate rappresentano le rispettive derivate in funzione della temperatura.

Confrontando le curve DSC (Figura 4.31) dei campioni prelevati dalla soluzione tampone dopo diversi periodi di permanenza, con quelle del campione iniziale, si osserva come cali la  $T_g$  al crescere del tempo di idrolisi. Questa osservazione è imputabile all'effetto delle catene a basso peso molecolare che fungono da

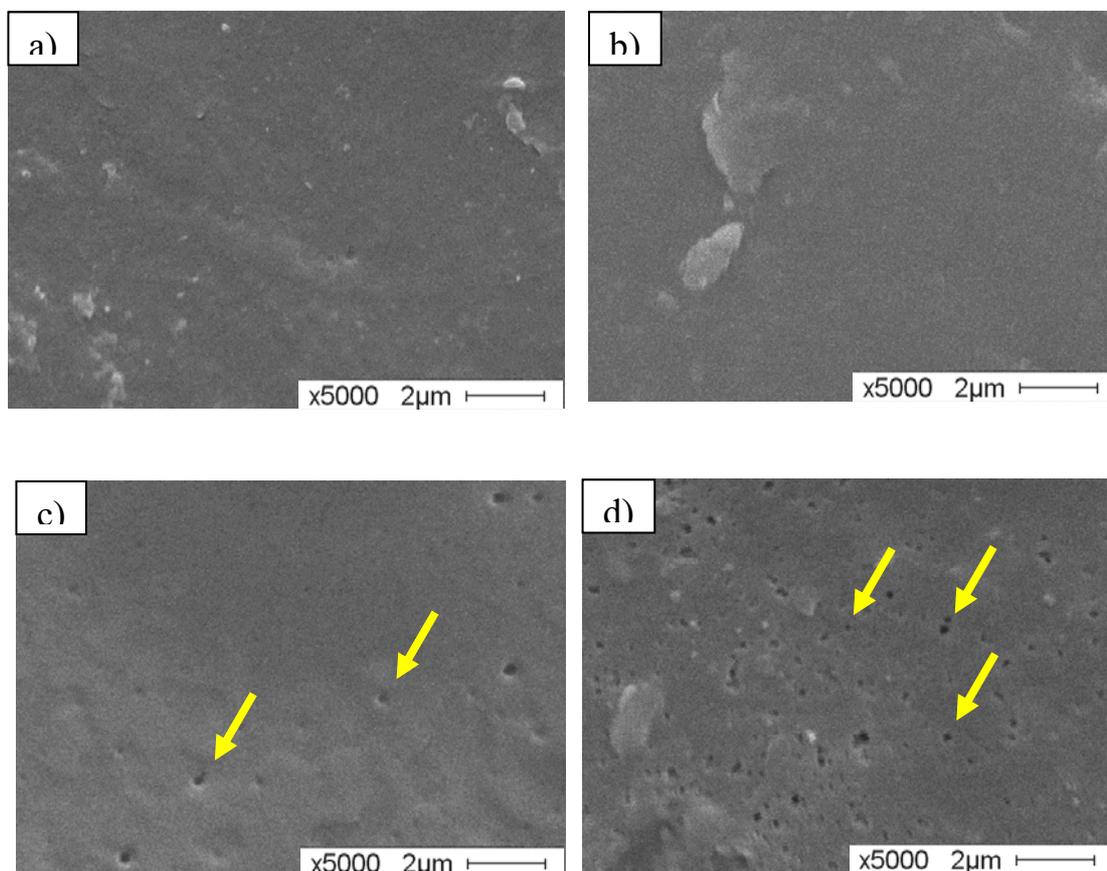
plastificante. Inoltre l'abbassamento della  $T_g$  permette al polimero di cristallizzare per effetto della maggior mobilità delle catene ed è per questo che, nelle curve relative alla seconda scansione dopo raffreddamento veloce, compaiono i picchi esotermi ed endotermi nei campioni idrolizzati.



**Figura 4.31:** Analisi calorimetrica dei campioni: a-PL11GA-0 (rosso), a-PL11GA-196 (blu), a-PL11GA-277 (verde), a-PL11GA-305 (nero). Curve calorimetriche relative alla seconda scansione.

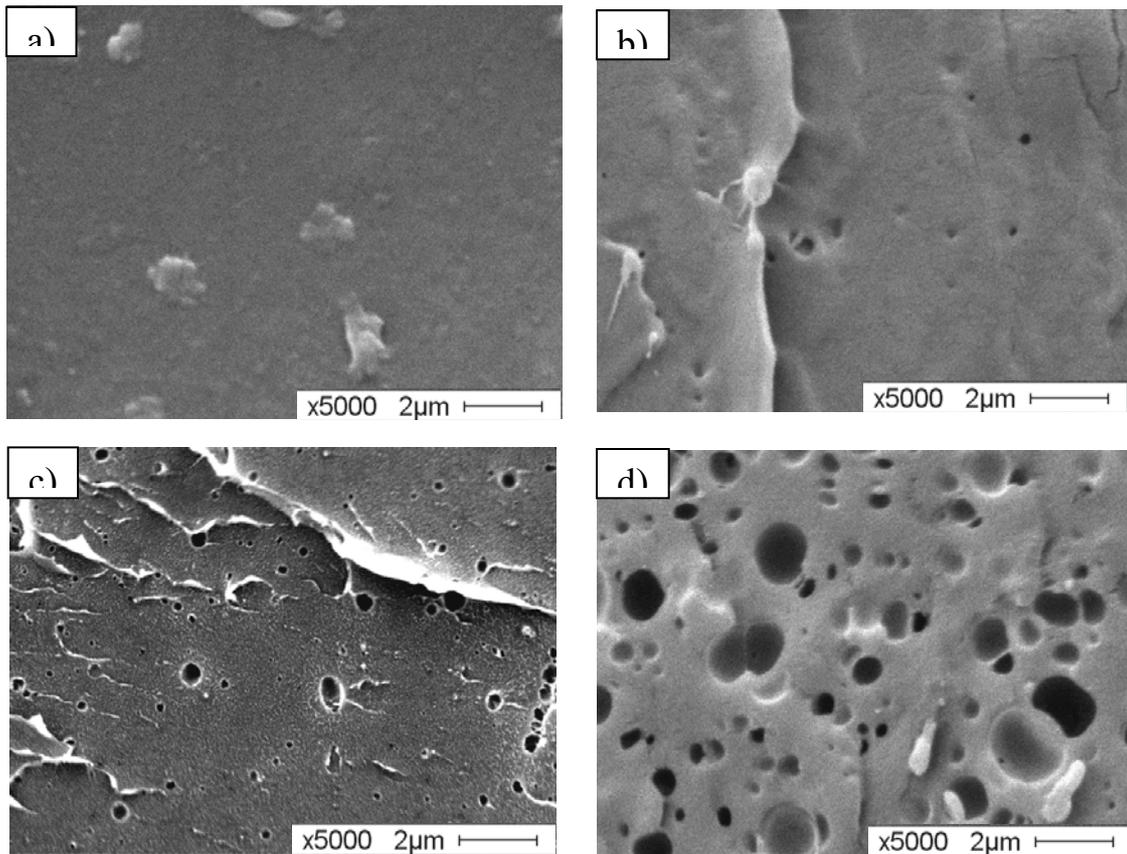
Le micrografie SEM (Figura 4.32) della superficie e della sezione (Figura 4.33) di campioni di a-PL11GA idrolizzati per diversi periodi, confermano che la degradazione avviene in modo eterogeneo. Infatti si può osservare che in superficie compaiono pochissimi fori (indicati dalle frecce) solamente a partire da 154 giorni (Figura 4.32c) e a 305 giorni (Figura 4.32d) e la superficie appare ancora abbastanza integra soprattutto se confrontata con la sezione in cui i fori compaiono già nel campione prelevato dopo 47 giorni (Figura 4.33b).

I fori sono dovuti alle catene di oligomeri liquidi che si sono formati per degradazione e che sono rimasti all'interno del campione generando il processo di autocatalisi acida.



**Figura 4.32:** Micrografie SEM delle superfici dei campioni:

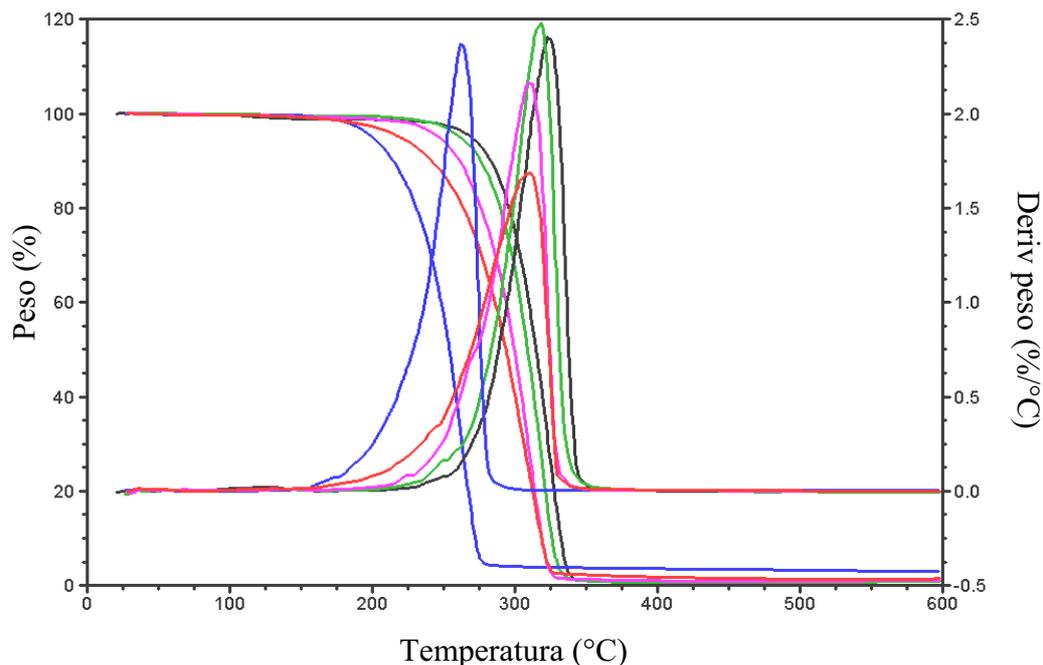
a) a-PL11GA-0, b) a-PL11GA-47, c) a-PL11GA-154, d) a-PL11GA-305.



**Figura 4.33:** Micrografie SEM delle sezioni dei campioni:

a) a-PL11GA-0, b) a-PL11GA-47, c) a-PL11GA-154, d) a-PL11GA-305.

Consideriamo ora i risultati di idrolisi ottenuti per i film di c-PL11GA. In Figura 4.34 sono riportate le curve termogravimetriche dei seguenti campioni: c-PL11GA-50, c-PL11GA-116, c-PL11GA-196, c-PL11GA-300 confrontati con il campione c-PL11GA-0. Tutti i campioni sono stati sottoposti ad essiccamento prima di procedere all'analisi termogravimetrica.

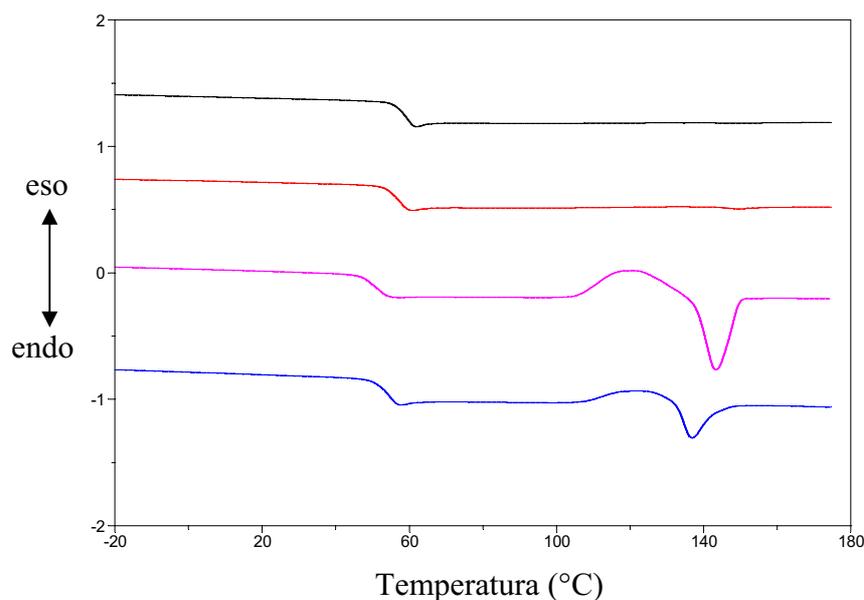


**Figura 4.34:** Analisi termogravimetrica dei campioni:  
c-PL11GA-0 (nero), c-PL11GA-50 (verde), c-PL11GA-116 (fucsia),  
c-PL11GA-196 (rosso), c-PL11GA-300 (blu).

Dalle curve TGA in Figura 4.34, si può vedere come per i campioni c-PL11GA-50, c-PL11GA-116, c-PL11GA-196, la temperatura a cui la velocità di degradazione è massima ( $T_{max}$ ), risulta molto simile, mentre il processo di degradazione (vedi curva relativa alla perdita di peso percentuale) inizia a temperature minori man mano che il tempo di idrolisi aumenta. Come detto sopra; questo fa pensare che nei campioni citati, le catene a basso peso molecolare che si sviluppano durante l'idrolisi non diffondano nell'ambiente acquoso ma permangano all'interno del campione dando vita a un processo di degradazione eterogeneo. Andamento decisamente diverso è mostrato dal campione c-PL11GA-300, nel quale tutta la curva di degradazione si

sposta a temperature inferiori con  $T_{\max}$  abbassata di circa  $50^{\circ}\text{C}$  rispetto ai campioni sopra discussi. Questa osservazione fa ipotizzare che si sia avuto un cambiamento consistente nel peso molecolare.

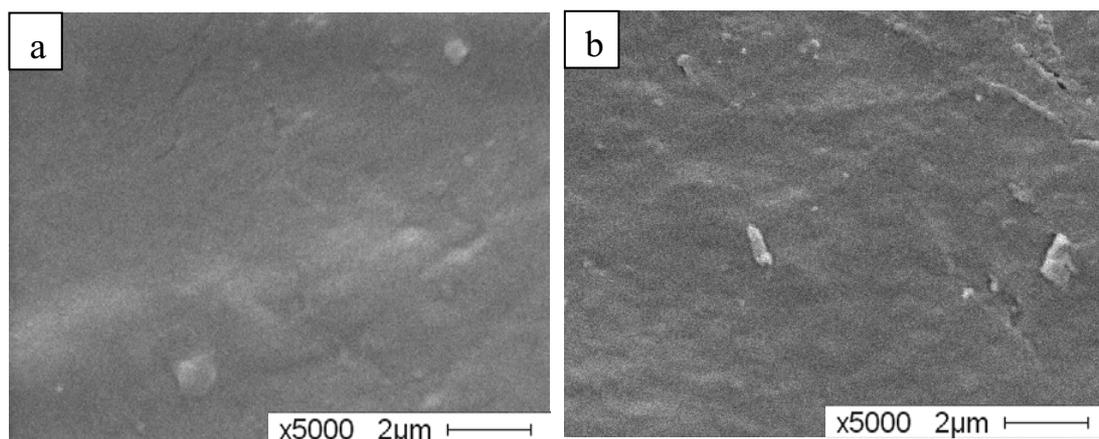
Confrontando le curve calorimetriche relative alla seconda scansione dopo raffreddamento veloce (Figura 4.35) dei campioni idrolizzati per diversi periodi, con quelle del campione iniziale, si osserva come per i campioni c-PL11GA-0 e c-PL11GA-50 l'unica transizione termica che si verifica è la  $T_g$  con valori molto simili:  $T_{g \text{ c-PL11GA-0}} = 58^{\circ}\text{C}$  e  $T_{g \text{ c-PL11GA-50}} = 56^{\circ}\text{C}$ . Al crescere del tempo di idrolisi si verifica un abbassamento della temperatura di transizione vetrosa ( $T_{g \text{ c-PL11GA-116}} = 50^{\circ}\text{C}$  e  $T_{g \text{ c-PL11GA-300}} = 53^{\circ}\text{C}$ ), che permette al polimero di cristallizzare per effetto della maggior mobilità delle catene ed è per questo che compaiono i picchi esotermi ed endotermi man mano che l'idrolisi prosegue.



**Figura 4.35** Analisi calorimetrica dei campioni: c-PL11GA-0 (nero), c-PL11GA-50 (rosso), c-PL11GA-116 (fucsia), c-PL11GA-300 (blu). Curve calorimetriche relative alla seconda scansione.

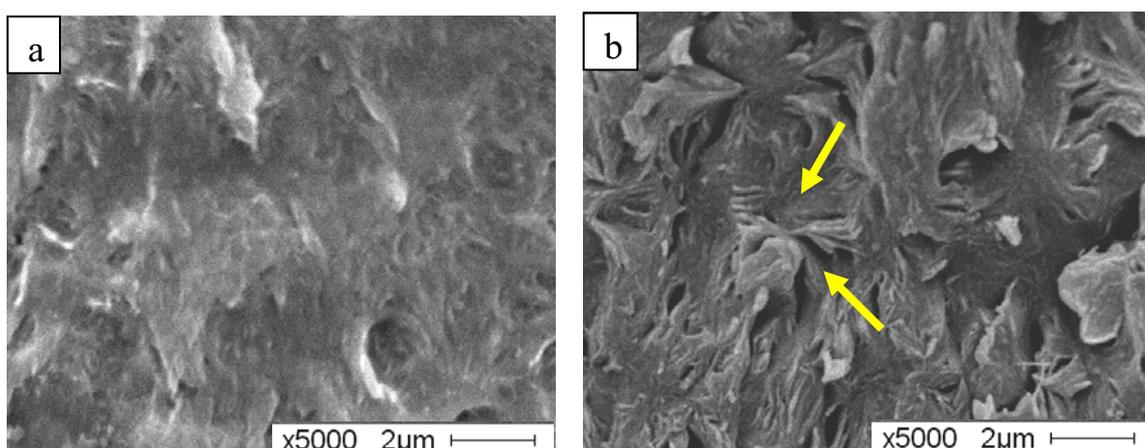
Ricordando che i film di partenza sono stati trattati in stufa a  $100^{\circ}\text{C}$  per 1h al fine di ottenere uno sviluppo di fase cristallina, dalle analisi morfologiche eseguite al SEM, si può osservare che, al crescere del tempo di idrolisi, mentre la superficie resta

invariata (Figura 4.36), in sezione (Figura 4.37) compaiono le lamelle che costituiscono la sferulite (indicate dalle frecce in Figura 4.37b). Tale fenomeno va spiegato considerando, come già detto nel Capitolo 1.5, che la fase amorfa subisce idrolisi in tempi più brevi rispetto alla fase cristallina in virtù del differente comportamento diffusivo dell'acqua in queste matrici.



**Figura 4.36:** Micrografie SEM delle superfici dei campioni semicristallini:

a) c-PL11GA-0, b) c-PL11GA-300.

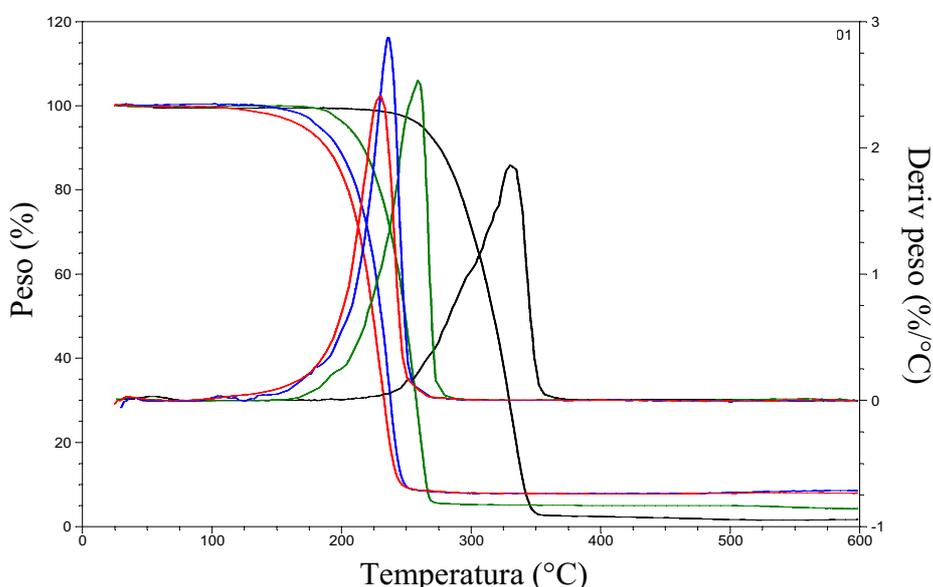


**Figura 4.37:** Micrografie SEM delle sezioni dei campioni semicristallini:

a) c-PL11GA-0, b) c-PL11GA-300.

#### 4.5.2 Degradazione idrolitica del copolimero PL36GA

Le prove di degradazione idrolitica sono state condotte su 12 campioni di PL36GA ottenuti tramite elettrofilatura. Il primo prelievo è stato effettuato dopo 7 giorni e l'ultimo dopo 40 giorni. È stato misurato il pH della soluzione tampone di ogni campione e si è registrata una variazione da 7.40 (primo prelievo) a 7.27 già dopo la prima settimana di test. Dopo il prelievo dalla soluzione tampone, i campioni sono stati analizzati sia alla TGA che al DSC allo scopo di individuare eventuali differenze di comportamento termico attribuibili alla permanenza in soluzione.



**Figura 4.38:** Analisi termogravimetrica dei campioni PL36GA-0 (nero), PL36GA-16 (verde), PL36GA-30 (blu), PL36GA-40 (rosso)

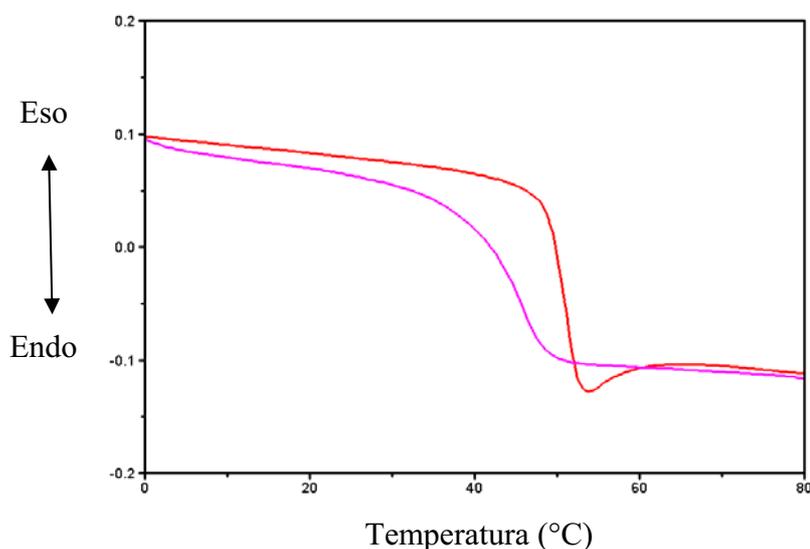
Il confronto delle TGA (Figura 4.38) dei campione iniziale e dei campioni a diversi giorni di idrolisi mostra una diminuzione notevole della stabilità termica con l'aumento dei giorni di permanenza in soluzione acquosa dei “mats”.

Questa diminuzione della T di degradazione può essere attribuita, come detto anche per il PL11GA elettrofilato (Figura 4.27), all'effetto dell'idrolisi sul peso molecolare delle catene polimeriche. Un abbassamento del peso molecolare provoca una diminuzione della stabilità termica. Il fatto che la diminuzione della stabilità termica

del copolimero PL36GA al crescere del tempo di idrolisi sia più consistente rispetto al calo riscontrato per il PL11GA, va spiegato, come detto nel Capitolo 1.5, con il fatto che la velocità di degradazione idrolitica dipende dalla composizione dei copolimeri. Il PL36GA (36%) contiene un maggior numero di unità dell'acido glicolico rispetto al PL11GA (11%) che conferiscono al PL36GA un maggior idrofilicità rispetto al PL11GA.

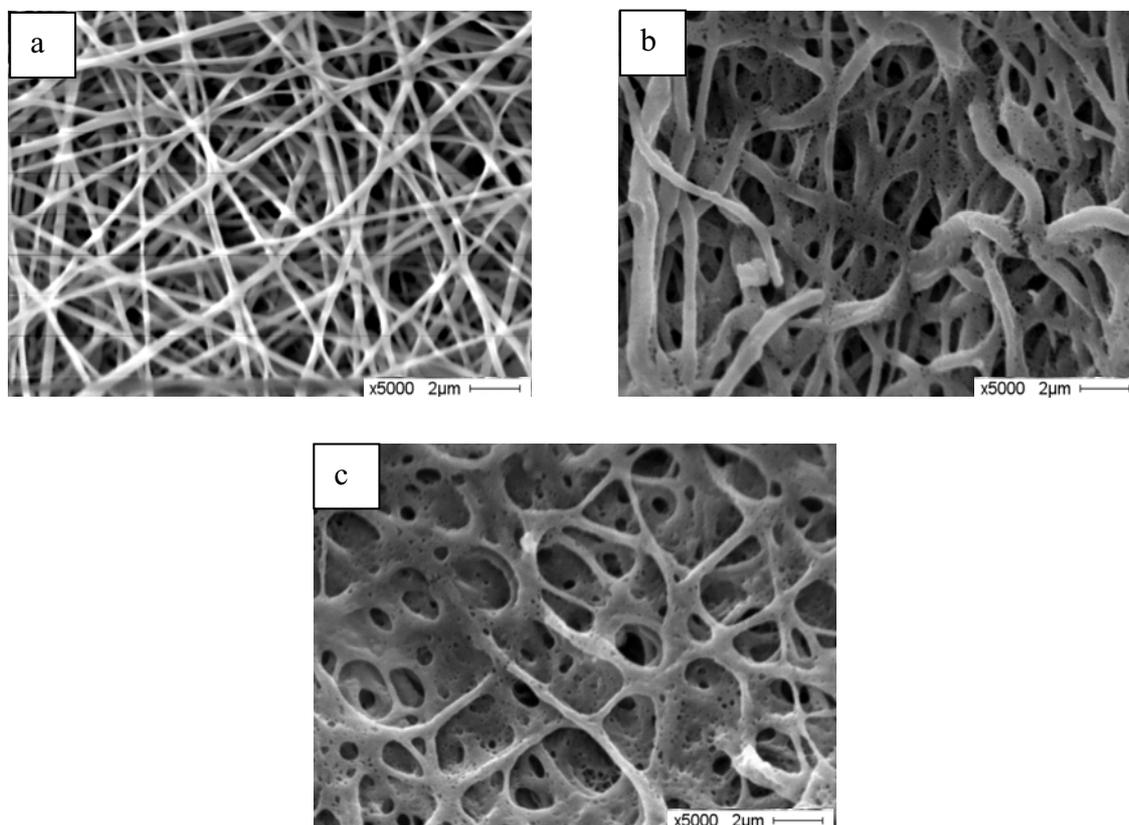
Dopo il prelievo dalla soluzione tampone, i campioni sono stati analizzati al DSC allo scopo di individuare eventuali differenze di comportamento termico attribuibili al processo di idrolisi.

In Figura 4.39 sono confrontate le curve calorimetriche relative alla seconda scansione dei campioni PL36GA-0 e PL36GA-40. Si può osservare come la temperatura di transizione vetrosa del campione prelevato dopo 40 giorni, risulti inferiore ( $44^{\circ}\text{C}$ ) rispetto quella del campione iniziale ( $48^{\circ}\text{C}$ ). L'abbassamento della  $T_g$  è imputabile alla presenza di catene a basso peso molecolare, che si sviluppano al crescere del tempo di idrolisi, e che fungono da plastificante.



**Figura 4.39:** Analisi calorimetrica dei campioni:  
PL36GA-0 (rosso), PL36GA-40 (fucsia).

In Figura 4.40 sono riportate le immagini al SEM di fibre di PL36GA, allo stesso ingrandimento; in particolare sono mostrati i campioni PL36GA-0, PL36GA-19 e PL36GA-40.



**Figura 4.40:** Micrografie SEM di PL36GA: a) 0 giorni, b) dopo 19 giorni, c) dopo 40 giorni.

In Figura 4.40 risulta evidente il cambiamento morfologico subito dalle fibre di PL36GA per effetto dell'idrolisi. Già al diciannovesimo giorno (Figura 4.40b) le fibre presentano chiaramente dei pori distribuiti lungo la fibra e contemporaneamente un collasso della struttura che va aumentando fino al quarantesimo giorno (Figura 4.40c) in cui la struttura fibrosa di partenza scompare. Tale effetti sono accompagnati da un infragilimento del materiale. Va ricordato che questo copolimero rispetto al PL11GA contiene più unità dell'acido glicolico che lo rendono maggiormente idrofilico e quindi più facilmente idrolizzabile.

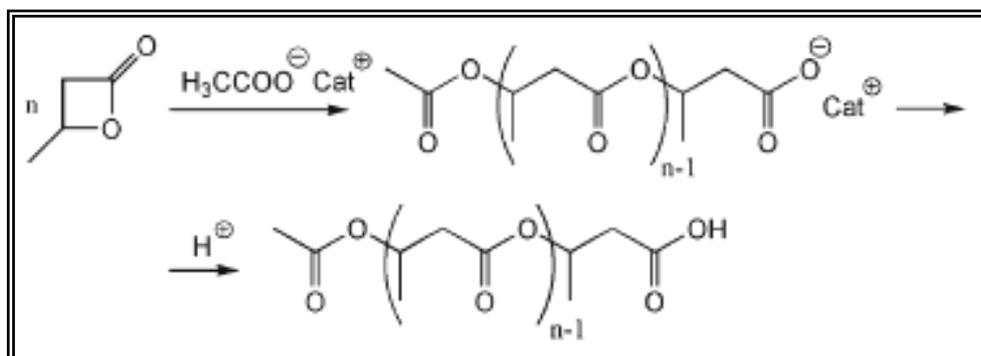
## 4.6 Studio della stabilità termica del poli 3-idrossibutirrato in funzione delle condizioni di sintesi

L'utilizzo di PHB di sintesi in sostituzione di quello batterico presenta, come è già stato detto nel Capitolo 1.3, il vantaggio di una regolarità strutturale modificabile praticamente "a piacere", con l'ottenimento di materiali le cui proprietà chimico-fisiche possono essere modulate di conseguenza. Sono stati sperimentati, in passato, vari sistemi di catalisi e si sono ottenuti PHB con diversa stereoregolarità<sup>23-28</sup> a partire dal polimero con elevato grado di isotatticità (cristallino), fino al polimero totalmente atattico<sup>23,26-28</sup> (amorfo). E' stato anche ottenuto il PHB sindiotattico, semicristallino<sup>29,30</sup>.

Il meccanismo termico di degradazione del PHB naturale è stato descritto in molti lavori<sup>82-86</sup>: il processo di reazione dominante è una scissione casuale della catena polimerica intramolecolare e stereoselettiva che procede attraverso una *cis*-eliminazione, portando alla formazione prevalentemente di acido *trans*-crotonico e oligomeri contenenti come gruppo terminale il *trans*-crotonato. È stato dimostrato inoltre, che nel caso del a-PHB ottenuto tramite polimerizzazione attraverso l'apertura dell'anello del BL, si libera acido crotonico durante la degradazione termica<sup>87</sup>.

In questo Capitolo verranno riportati i risultati ottenuti dallo studio della stabilità termica di campioni di a-PHB sintetizzati, come riportato nei lavori di *Kowalczyk et al.*<sup>23,54</sup>, attraverso polimerizzazione anionica del  $\beta$ -butirrolattone (BL) (Schema 4.1).

**Schema 4.1:** Schema di reazione di sintesi di a-PHB con differenti controione.



Tutti i campioni analizzati sono stati polimerizzati presso l'Istituto di Chimica dei Polimeri di Zabrze dal gruppo del prof. M. Kowalczuk utilizzando come iniziatori di polimerizzazione i seguenti complessi:

1. Potassio acetato (KAc)/etere 18-corona-6 (18C6)
2. Sodio acetato (NaAc)/etere 15-corona-5 (15C5)
3. Tetrabuttilammonio acetato ( $\text{Bu}_4\text{NAc}$ ).

I polimeri (PHB atattico) ottenuti sono indicati con le seguenti sigle:

1. a-PHB/COOK
2. a-PHB/COONa
3. a-PHB/COONBu<sub>4</sub>

Inoltre è stato esaminato il campione numero 3 (a-PHB/COONBu<sub>4</sub>) dopo protonazione (sostituzione del gruppo  $\text{NBu}_4^+$  con  $\text{H}^+$ ) indicato con la sigla:

4. a-PHB/COOH

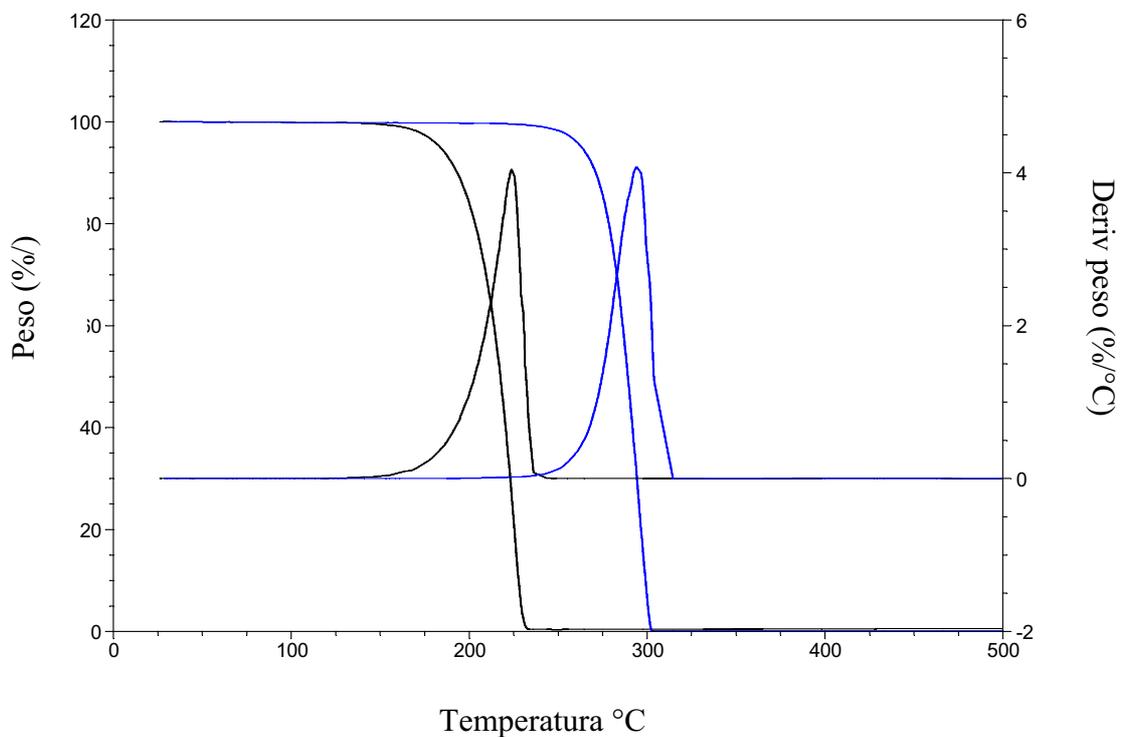
La protonazione dei gruppi terminali di catena è stata eseguita nel seguente modo: una soluzione polimerica del 10% in peso in cloroformio viene acidificata con HCl diluito con un rapporto di  $\text{Bu}_4\text{N}^+/\text{HCl}$  1:2, e quindi agitata per 10 minuti. La fase organica, contenete il polimero, viene quindi lavata per 10 volte con 10cm<sup>3</sup> di acqua distillata. In seguito, il solvente viene evaporato e il polimero essiccato sotto vuoto a temperatura ambiente.

Dall'analisi termogravimetrica dei campioni descritti sopra, risulta evidente che, la stabilità termica è influenzata dalla struttura chimica del gruppo terminale (carbossilico o carbossilato) (Tabella 4.7): infatti la  $T_{\text{max}}$  del a-PHB/COOH è molto più alta (291°C) dei a-PHB che hanno un carbossilato come gruppo terminale ( $T_{\text{max}}$  compresa tra 224-231°C). Inoltre, nel caso dei a-PHB non protonato, la natura del controione influenza i valori di  $T_{\text{max}}$  ed in particolare si ha un leggero aumento della stabilità termica in concomitanza con la diminuzione delle dimensioni del controione (Tabella 4.7).

**Tabella 4.7:** Influenza del controione sulla stabilità termica di  $\alpha$ -PHB con peso molecolare compreso tra 6-10 kDa.

Campione	$\alpha$ -PHB/COONBu <sub>4</sub>	$\alpha$ -PHB/COOK	$\alpha$ -PHB/COONa	$\alpha$ -PHB/COOH
T <sub>max</sub> (°C)	224	228	231	291

Per comprendere meglio quanto appena enunciato in Figura 4.41 sono confrontate, a titolo di esempio, le curve TGA del campione  $\alpha$ -PHB/COONBu<sub>4</sub> e del rispettivo  $\alpha$ -PHB protonato.



**Figura 4.41:** Analisi termogravimetrica dello stesso campione di  $\alpha$ -PHB con diverso gruppo terminale:  $\alpha$ -PHB/COOH (blu),  $\alpha$ -PHB/COONBu<sub>4</sub> (nero).

Sono stati, inoltre, condotti esperimenti di degradazione isoterma a 120°C in stufa su campioni di  $\alpha$ -PHB protonato e  $\alpha$ -PHB/COONBu<sub>4</sub> nel seguente modo:

1. sono stati inizialmente pesati 5 campioni, sia per il  $\alpha$ -PHB/COOH che per il  $\alpha$ -PHB/COOBu<sub>4</sub>

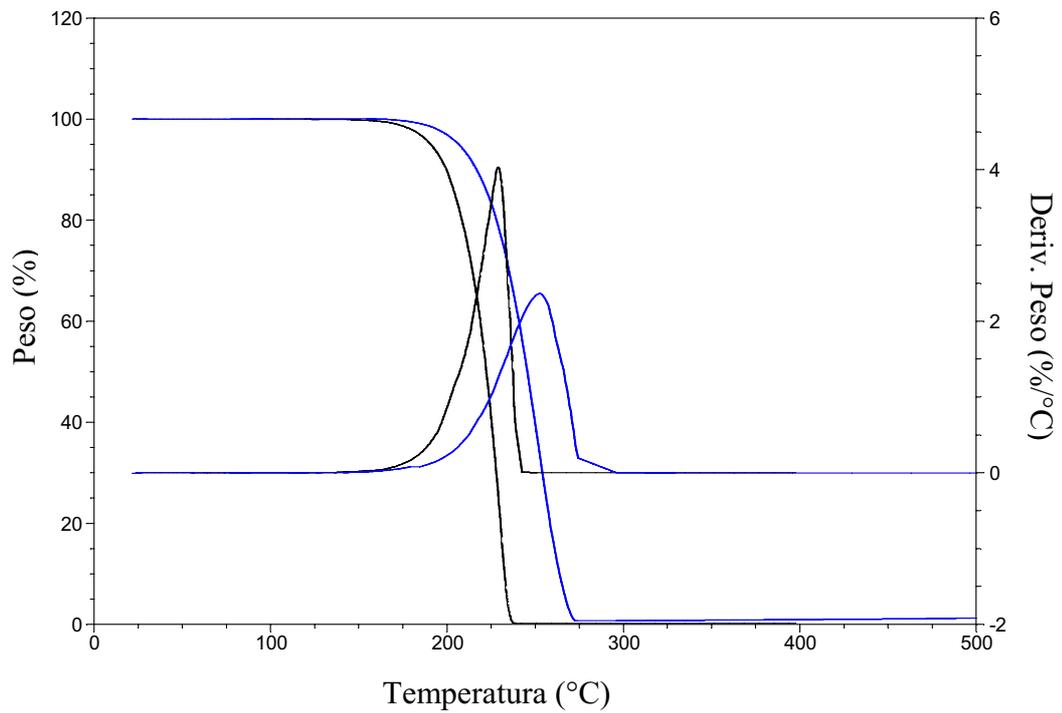
2. i campioni sono stati posti in stufa a 120°C
3. sono stati eseguiti dei prelievi secondo la tempistica riportata in Tabella 4.8
4. ogni campione è stato quindi ripesato ed è stata calcolata la perdita di peso percentuale,  $\Delta m$  (%) (vedi Tabella 4.8).

**Tabella 4.8:** Perdite di peso percentuale in funzione del tempo.

	a-PHB/COONBu <sub>4</sub>	a-PHB/COOH
$\Delta m$ (%) dopo 1 h	0.4	1.8
$\Delta m$ (%) dopo 2h	0.6	2.2
$\Delta m$ (%) dopo 4h	2.00	2.2
$\Delta m$ (%) dopo 7h	6.1	2.5
$\Delta m$ (%) dopo 24h	31	2.0

Dalla Tabella 4.8 si può osservare che mentre per il a-PHB/COOH la perdita di peso è pressoché costante anche dopo 24h in isoterma a 120°C, per il a-PHB/COONBu<sub>4</sub> si registra un significativo calo del peso già dopo 7h che aumenta successivamente sino ad un valore del 30% dopo 24h. Anche in questo caso si può nuovamente concludere che il terminale carbossilico conferisce maggior stabilità termica del terminale carbossilato.

In Figura 4.42 sono riportate le curve TGA di due campioni di a-PHB/COONBu<sub>4</sub> con diverso peso molecolare. Si può osservare che in questo caso, il campione con peso molecolare maggiore,  $M_n = 36000$ , ha un valore di  $T_{max}$  ( 252°C) superiore a quello del campione con peso molecolare inferiore,  $M_n = 5600$  (227°C). Considerando che in precedenza si è dimostrato che i gruppi carbossilati influenzano la stabilità termica dei a-PHB, tale differenza è imputabile alle diverse concentrazioni di –COONBu<sub>4</sub>, in relazione al diverso peso molecolare dei polimeri: laddove il gruppi carbossilati sono maggiori, minore sarà la stabilità termica (Figura 4.42).



**Figura 4.43:** Analisi termogravimetrica di  $\alpha$ -PHB/COONBu<sub>4</sub> a diverso peso molecolare:  $\alpha$ -PHB con Mn = 36000 (blu),  $\alpha$ -PHB con Mn = 5600 (nero).

Alla luce di tutti i risultati sopra discussi è possibile concludere che la presenza di gruppi terminali di catena carbossilati genera una diminuzione della stabilità termica nei poli 3-idrossibutirrato.

## 5. CONCLUSIONI

Nel corso di questa Tesi di Dottorato sono state preparate leghe di PHB con P(D,L)LA per solubilizzazione di quantità pesate dei due componenti in diclorometano; in seguito alla evaporazione del solvente a temperatura ambiente sono stati ottenuti dei film sottili di leghe a diversa composizione. Sono state studiate quindi, la miscibilità e la cinetica di cristallizzazione del sistema binario PHB/P(D,L)LA attraverso la caratterizzazione termica (TGA e DSC) e morfologica (microscopia ottica in luce polarizzata). L'analisi termogravimetrica eseguita su tutte le leghe preparate ha mostrato che il processo di degradazione avviene, in tutti i casi, attraverso due stadi ben individuabili. Il primo processo si manifesta nel campo di temperatura tipica della degradazione del PHB isotattico, mentre il secondo avviene a temperature più vicine a quelle in cui si ha degradazione del P(D,L)LA. L'entità relativa alle perdite di peso stimate dalle curve termogravimetriche, rispecchia piuttosto bene la composizione di ciascuna lega. Il comportamento osservato indica che la degradazione dei due poliesteri avviene indipendentemente dalla presenza del secondo componente nella lega. Dall'analisi calorimetrica eseguita su tutte le leghe preparate e dall'osservazione tramite microscopio ottico a luce polarizzata, è risultato evidente che, al fine di ottenere un sistema completamente miscibile, è necessario un trattamento isotermico a 220°C per 4 minuti. Il confronto tra scansioni di riscaldamento DSC della medesima lega senza trattamento termico e con trattamento termico ha evidenziato come, nel primo caso la lega presenti due distinte temperature di transizione vetrosa imputabili ai singoli componenti, mentre dopo i 4 minuti di isoterma a 220°C si ottiene una lega con una singola  $T_g$ . Allo stesso modo tramite al microscopio è risultato evidente che il fuso a 220°C delle leghe PHB/P(D,L)LA diventi da bi-fasico a completamente omogeneo durante il trattamento isoterma di 4 minuti. Si può ipotizzare che il trattamento termico sia necessario al fine di rendere miscibile il sistema PHB/P(D,L)LA in tutto il campo di composizioni studiate. Va tuttavia puntualizzato che il trattamento termico applicato alle leghe può aver causato una diminuzione del peso molecolare dei polimeri PHB e P(D,L)LA e quindi aver favorito la miscibilità dei componenti.

A sostegno di questa ipotesi, prove termogravimetriche effettuate sulla stessa lega, prima e dopo trattamento termico a 220°C, hanno dimostrato come la stabilità termica sia risultata leggermente modificata, ed in particolare diminuita dopo l'isoterma ad alta temperatura. Un abbassamento della stabilità termica è sintomo di una diminuzione del peso molecolare ed è noto, infatti, che la stabilità termica dei poliesteri dipende fortemente dalla lunghezza delle catene: se il peso molecolare è minore saranno necessari un numero di eventi di rottura di legame minore per generare oligomeri volatili, la cui evaporazione provoca la perdita di peso.

I processi di cristallizzazione delle leghe di PHB con P(D,L)LA sono stati esaminati con il microscopio ottico in luce polarizzata utilizzando una procedura di cristallizzazione non isoterma. In questa Tesi di Dottorato sono stati eseguiti inoltre, studi di cristallizzazione isoterma sul medesimo sistema PHB/P(D,L)LA al fine di dimostrare l'eccellente accordo tra i risultati ottenuti tramite i due differenti metodi di cristallizzazione. In entrambi i casi le sferuliti che si osservano hanno una forma regolare, ed inoltre, in tutte le leghe considerate, le sferuliti crescono in modo regolare in tutto il campo di temperature analizzate, anche quando vi è un'elevata quantità di P(D,L)LA. Il vantaggio dell'utilizzo di una metodologia non isoterma sta nel fatto che si può ottenere con una singola misura l'intera campana di cristallizzazione, mentre in condizioni isoterme ad ogni misura corrisponde un singolo valore di G. Dalle curve di cristallizzazione delle leghe di PHB/P(D,L)LA ottenute in condizioni non-isoterme si può osservare che la campana di cristallizzazione del PHB si abbassi gradualmente all'aumentare del contenuto di P(D,L)LA, passando da un valore massimo di G pari a 4.40  $\mu\text{m}/\text{sec}$  a 1.03  $\mu\text{m}/\text{sec}$  nel caso della lega contenente il 65% di acido polilattico amorfo. Inoltre, la velocità massima di cristallizzazione si sposta a temperature crescenti a seguito dell'aumento della temperatura di transizione vetrosa e del conseguente un restringimento della finestra di cristallizzazione. I dati ottenuti dalle cinetiche di cristallizzazione confermano le conclusioni basate sui risultati calorimetrici cioè che il sistema binario PHB/P(D,L)LA è miscibile e il fuso risulta omogeneo in tutto l'intervallo di composizioni analizzato.

In questa Tesi di Dottorato sono state studiate anche le proprietà termiche e meccaniche di terpolimeri costituiti da unità di acido L-lattico, acido glicolico e trimetilencarbonato distribuite in modo casuale nella catena polimerica. Dalle analisi

termogravimetriche è risultato che tutti i campioni degradano attraverso un singolo processo, che le temperature alle quali la velocità di degradazione dei campioni è massima ( $T_{max}$ ) sono comprese tra 335-346°C ed infine, che i terpolimeri termodinamicamente stabili nell'intervallo tra temperatura ambiente e 200°C. Dalle analisi calorimetriche è risultato che tutti i terpolimeri sono allo stato amorfo e mostrano un'unica  $T_g$  che varia con la composizione in modo razionalizzabile sulla base dell'equazione empirica di Fox opportunamente modificata per tener conto dei tre termini. Le proprietà meccaniche dei terpolimeri variano notevolmente con la composizione, passando da materiali rigidi con bassa deformazione a rottura (< 5%), a materiali duttili e a gomma a basso modulo e grande estensibilità.

In questo lavoro di Dottorato sono state, inoltre, ottimizzate le condizioni di elettrofilatura di due copolimeri dell'acido lattico e dell'acido glicolico con differente composizione: 11% e 36% moli di unità dell'acido glicolico. Le condizioni ottimali sono state ottenute innanzitutto, ricercando il solvente e la concentrazione ideale della soluzione polimerica e in un secondo tempo, individuando i parametri strumentali (differenza di potenziale, distanza ago-collettore, velocità di flusso) tali da permettere di ottenere fibre di dimensioni nanometriche e prive di difetti. È risultato evidente come il processo di elettrofilatura è controllato da molteplici parametri tra loro strettamente correlati.

Prove di degradazione idrolitica a 37°C, sono state condotte sui "mats", di entrambi i copolimeri, ottenuti tramite elettrofilatura. I campioni analizzati sono stati caratterizzati termicamente (TGA e DSC) e morfologicamente (SEM). La caratterizzazione termica tramite TGA dei campioni di PL11GA ha evidenziato una modesta diminuzione della stabilità termica all'aumentare dei giorni di idrolisi, mentre per il PL36GA l'entità della diminuzione della stabilità termica risulta notevole. In entrambi i casi, tale risultato può essere attribuito ad un calo del peso molecolare per effetto dell'idrolisi: modesto nel PL11GA, più consistente nel PL36GA. Le analisi calorimetriche del PL11GA hanno dimostrato che le transizioni termiche dei campioni risultano costanti man mano che aumentano i giorni di idrolisi, il che fa concludere che se i campioni hanno subito modifiche a livello molecolare durante la permanenza in tampone, come un calo del peso molecolare, queste non hanno tuttavia, alterato le proprietà calorimetriche delle fibre elettrofilate. Nel caso del copolimero PL36GA,

dalle analisi calorimetriche si è registrato un abbassamento delle  $T_g$  al crescere del tempo di idrolisi imputabile alla presenza di catene a basso peso molecolare, che si sviluppano e che fungono da plastificante. Dalle micrografie SEM dei campioni di P11LGA idrolizzati per tempi diversi risulta evidente come le fibre non presentino cambiamenti morfologici per effetto dell'idrolisi mentre nei campioni di PL36GA le fibre hanno mostrato evidenti variazioni morfologiche. I diversi risultati ottenuti per i due copolimeri sono imputabili alla diversa composizione: il PL36GA rispetto al PL11GA contiene più unità dell'acido glicolico che lo rendono maggiormente idrofilico e quindi più facilmente idrolizzabile in condizioni fisiologiche.

Nel caso del PL11GA sono state anche condotte prove di degradazione idrolitica su campioni in forma di film ottenuti tramite pressatura ad alta temperatura. Una parte dei campioni è stata trattata a  $100^\circ\text{C}$  per 1h al fine di ottenere lo sviluppo di una fase cristallina (c-PL11GA) stabile alla temperatura in cui sono state effettuate le prove di idrolisi. L'analisi termogravimetrica dei campioni privi di fase cristallina ha evidenziato come il processo di degradazione del a-PL11GA risulta, essere eterogeneo: la degradazione all'interno è maggiore rispetto che all'esterno. Si può ipotizzare che nei campioni degradati permangano pesi molecolari elevati e che all'aumentare del tempo di idrolisi si sviluppino pesi molecolari bassi che non risultano solubili nel mezzo acquoso e perciò permangono all'interno del campione innescando un processo di autocatalisi. L'analisi calorimetria conferma questa ipotesi in quanto la  $T_g$  dei campioni cala al crescere del tempo di idrolisi in quanto le catene a basso peso molecolare fungono da plastificante. L'abbassamento della  $T_g$  permette, inoltre, al polimero di cristallizzare per effetto della maggior mobilità delle catene. Le micrografie SEM della superficie e della sezione di campioni di a-PL11GA idrolizzati per diversi periodi, confermano che la degradazione avviene in modo eterogeneo: la superficie appare ancora abbastanza integra ad elevati tempi di idrolisi (154 giorni), mentre in sezione compaiono dei fori a tempi minori (47 giorni). Nel caso dei campioni di c-PL11GA l'analisi termogravimetrica suggerisce che per tempi di idrolisi inferiori a 200 giorni, degradano in modo eterogeneo come per il a-PL11GA mentre per tempi superiori la diminuzione della stabilità termica è accompagnata anche da un abbassamento notevole dei valori di  $T_{\text{max}}$ . Inoltre, come nel caso del a-PL11GA si registra al DSC un abbassamento della temperatura di transizione vetrosa

al crescere del tempo di idrolisi, tale da permettere al polimero di cristallizzare. Diversamente dal a-PL11GA, le analisi morfologiche eseguite al SEM dei campioni di c-PL11GA, evidenziano che mentre la superficie resta invariata, in sezione compaiono le lamelle e tale fenomeno è spiegabile, in accordo con i dati di letteratura, con il fatto che la fase amorfa subisce idrolisi in tempi più brevi rispetto alla fase cristallina in virtù del differente comportamento diffusivo dell'acqua in queste matrici.

Infine, in questo lavoro di Dottorato è stata studiata la stabilità termica del poli 3-idrossibutirrato atattico in funzione di diverse condizioni di sintesi, che comportano gruppi terminali diversi sulla catena polimerica. L'analisi termogravimetrica eseguita su campioni di a-PHB, con Mn compreso tra 6-10 kDa, preparati con diversi iniziatori di polimerizzazione ha evidenziato che: (i) nel caso in cui i gruppi terminali di catena sono protonati (-COOH), invece che carbossilati (-COO<sup>-</sup>), il polimero risulta notevolmente più stabile termicamente indipendentemente dall'iniziatore di polimerizzazione utilizzato; (ii) inoltre, è risultato che la natura del controione influenza leggermente i valori di T<sub>max</sub> ed in particolare si ha un aumento della stabilità termica in concomitanza con la diminuzione delle dimensioni del controione (Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup> < K<sup>+</sup> < Na<sup>+</sup>). Prove di degradazione isoterma a 120°C in stufa per diversi tempi hanno confermato nuovamente come la stabilità termica sia in stretta connessione con la presenza o meno di gruppi COO<sup>-</sup>.



## 6. BIBLIOGRAFIA

- 1) D.F. Williams, “*The Williams Dictionary of Biomaterials*”, Liverpool, UK, 42, (1999).
- 2) C. Di Bello, “*Biomateriali*”, Patron Editore, Bologna (2004).
- 3) [www.ecplanet.com](http://www.ecplanet.com)
- 4) [www.sei.co.jp/RandD\\_e/materi/images/mate\\_03.jpg](http://www.sei.co.jp/RandD_e/materi/images/mate_03.jpg)
- 5) [www.tecnica.net](http://www.tecnica.net)
- 6) S. Li, M. Vert, “Biodegradation of polyesters” in *Gerald Scott and Dan Gilead, eds. Degradation Polymers*, Chapman & Hall, London, 43-87, 1995.
- 7) A. U. Daniel, M.K. O Chang, K. P. Adriano, J. Keller, *Journal of Applied Biomater.*, **1**, 57, 1990.
- 8) M. Vert, G. Schwarch, J. Coudane, *J. M. S.- Pure Appl. Chem.*, **A32**(4), 787, 1995.
- 9) J. C. Middleton, A. J. Tipton, *Biomaterials*, **21**, 2335, 2000.
- 10) J.E. Bergsma, W.C. de Bruijn, F.R. Rozema, R.R.M. Bos, G. Boering, *Biomaterials*, **16** (1), 25, 1995.
- 11) M. Vert, *Macromol. Symp.*, **153**, 333, 2000.
- 12) D.K. Gilding, A.M. Reed, *Polymer*, **20**, 1459, 1979.
- 13) J. C. Middleton, A. J. Tipton, *Medical Plastics and Biomaterials Magazine*, **5** , 30, 1998.
- 14) J. Khon, R. Langer, “Bioresorbable and bioerodible materials”, in *Biomaterial Science*, B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, Editors, Academic Press, N.Y. (1996).
- 15) S.W. Shalaby, R.A. Johnson, “Synthetic absorbable polyester”, in *Biomedical polymers. Designed to degrade systems*, S. W. Shalaby Editor, Hanser, N.Y. (1994).
- 16) X.S. Wn, “Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers”, in *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, Wise et al. Editors, Marcel Dekker, N.Y.(1995).

- 17) D.H. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers", in *Biodegradable polymers as drug delivery systems*, M. Chasiu, R. Langer, Editors, Marcel Dekker, N.Y.(1990).
- 18) T.R. Tice, D.R. Cowsar, *Pharm. Technol.*, **11**, 26, 1984.
- 19) R. Jalil, J.R. Nixon, *J. Microencapsulation*, **7**, 297, 1990.
- 20) Y. Doi, "*Microbial Polyesters*", VHC Publishers Inc., New York (1990).
- 21) P.A. Holmes, *Phys. Tech.*, **16**, 32, 1985.
- 22) M. Scandola, "Biodegradazione dei polimeri" in *Degradazione e stabilizzazione dei materiali polimerici*, AIM, XVIII Convegno- Scuola, 9-14 giugno 1996.
- 23) Z. Jedlinski, P. Kurkok, M. Kowalczyk, J. Kasperkzyc, *Makromol. Chem.*, **187**, 1651, 1986.
- 24) S. Blombergen, D.A. Holden, T.L. Bluhm, G.K. Hamer, R.H. Marchessault, *Macromolecules*, **22**, 1656, 1989.
- 25) Y. Zhang, R.A. Gross, R.W. Lenz, *Macromolecules*, **23**, 3206, 1990.
- 26) Z. Jedlinski, M. Kowalczyk, W. Glowkoski, J. Grobelny, *Macromolecules*, **24**, 349, 1991.
- 27) N. Tanahashi, Y. Doi, *Macromolecules*, **24**, 5732, 1991.
- 28) P. Kurkok, M. Kowalczyk, K. Hennek, Z. Jedlinski, *Macromolecules*, **25**, 2017, 1992.
- 29) P.J. Hocking, R.H. Marchessault, *Polymer Bulletin*, **30**, 163, 1993.
- 30) H.R. Kricheldorf, S. Eggerstedt, *Macromolecules*, **30**, 5693, 1997.
- 31) D. Seebach, A. Brunner, B.M. Bachmann, T. Hoffmann, F.N.M. Kühnel, U.D. Lengweiler, "*Biopolymers and-oligomers of (R)-3-Hydroxyalckanoic Acid-Contributions of Synthetic Organic Chemists*", Vol. 28, Ernst Schering Research Foundation Editor, Berlin (1995).
- 32) G.L.S. Pawan, S.J.G. Semple, *Lancet*, **15**, 1983.
- 33) P.C. Heimenz, *Polymer Chemistry*, Marcel Dekker, N.Y. (1990).
- 34) E. Pedemonte, G.C. Alfonso, "Lo stato cristallino" in *Macromolecole, Scienza e Tecnologia*, Vol. 2, Pacini Editore, Pisa (1986).
- 35) B. Wunderlich, *Macromolecular Physics, Crystal Nucleation, Growth, Annealing*, Vol. 2, Academic Press, N.Y (1976).

- 36) C.T. Chung, M. Chen, *Polym. Prepr.*, **33**, 420, 1992
- 37) M. Chen, C.T Chung, *J. Polym. Sci. B*, **36**, 2393, 1998.
- 38) M.L. Di Lorenzo, *Polymer*, **42**, 9441, 2001.
- 39) M.L. Di Lorenzo, C. Silvestre, *Thermochimica Acta*, **396**, 67, 2003.
- 40) M.L. Di Lorenzo, S. Cimmino, C. Silvestre, *Macromolecules*, **33**, 3828, 2000.
- 41) K. Rezwani, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, A. R. Boccaccini, *Biomaterials*, **27** (18), 3413, 2006.
- 42) L.C. Lu, A.G. Mikos in Mark JE, editor. *Polymer data handbook*, Oxford: Oxford Press, 527-633 (1999).
- 43) S. Yang, K.F. Leong, Z. Du, C.K. Chua, *Tissue Engineering*, **7**, 679, 2001.
- 44) S. Ramakrishna, Z.M. Huang, G.V. Kumar, A.W. Batchelor, J. Mayer, “*An introduction to biocomposites*”, London: Imperial College Press; 36, 2004.
- 45) B.L. Seal, T.C. Otero, A. Panitch, *Mater. Sci. Eng.*, **34**, 147, 2001.
- 46) M. Hakkarainen, A.C. Albertsson, S. Karlsson, *Polymer Degradation and Stability*, **52**, 283, 1996.
- 47) M. Vert, S. Li, H. Garreau, J. Mauduit, M. Boustta, G. Schwach, R. Engel, J. Coudane, *Die Angewandte Makromolekular Chemie*, **247**, 239, 1997.
- 48) S. Li, *J. of Biomedical Mat. Res.*, **48**, 342, 1999.
- 49) S.K. Saha, H. Tsuji, *Macromolecular materials and engineering*, **291**, 357, 2006.
- 50) T.G. Park, *Biomaterials*, **16**, 1123, 1995.
- 51) I. Grizzi, H. Garreau, S. Li, M. Vert, *Biomaterials*, **16**, 305, 1995.
- 52) M. Vert, G. Schwach, R. Engel, J. Coudane, *Journal of Controlled Release*, **53**(1-3), 85, 1998.
- 53) C.G. Pitt, M.M Gratzel, G.L., Kimmel, *Biomaterials*, **2**, 215, 1981.
- 54) P. Dobrzynski, M. Smiga, Z. Jedlinski, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, **40**, 2184, 2002.
- 55) M.L. Focarete, M. Scandola, *Macromolecules*, **35**, 8472, 2002.
- 56) P. Dobrzynski, J. Kasperczyk, H. Janeczek, M. Bero, *Macromolecules*, **34**, 5090, 2001.
- 57) P. Dobrzynski, *J. Of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, **42**, 1886, 2004.

- 58) L.E. Nielsen, *“Mechanical Properties of Polymers”*, Reinhold Publ. Corporation, N.Y.-London (1992).
- 59) S. Ramakrishna, K. Fujihara, W. Teo, T. Lim, Z. Ma, *“An introduction to Electrospinning and Nanofibers”* World Scientific Publishing, Co. Pte. Ltd., Singapore (2005).
- 60) T. Collina, Tesi di Laurea, corso di laurea in Chimica *“Messa a punto del processo di elettrofilatura per la produzione nanofibre polimeriche”*, Bologna, (2006).
- 61) G. Ceccorulli, M. Scandola, *J. Macromol Sci, Pure Appl Chem.*, **A36**, 327, 1999.
- 62) G. Ceccorulli, M. Scandola, G. Adamus, *J. of Polymer Sci, Part B: Polymer Physics*, **40**, 1390, 2002.
- 63) L.A. Wood, *J. Polym. Sci.*, **28**, 319, 1958.
- 64) T. Nishi, T.T. Wang, *Macromolecules*, **8**, 909, 1975.
- 65) P.J. Flory, *Principles of Polymer Chemistry; Cornell University Press: Ithaca, N.Y.* (1953).
- 66) M. Pizzoli, M. Scandola, G.; Ceccorulli, *Macromolecules*, **35**, 3937, 2002.
- 67) E.W. Fischer, H.J. Sterzel, G. Wegner, *Polymer*, **251**, 980, 1973.
- 68) P.J. Barham, A. Keller, E. Otun, *J. of Materials Science*, **19**, 2781, 1984.
- 69) L. Zhang, C. Xiong, X. Deng, *Polymer*, **37**, 235, 1996.
- 70) N. Koyama, Y. Doi, *Can. J. Microbiol.*, **41**, 316, 1995.
- 71) A. Keller, *J. Polym. Sci.*, **39**, 151, 1959.
- 72) V.F. Holland, P.H. Lindenmeyer, *J. Polym. Sci.*, **57**, 589, 1962.
- 73) H.D. Keith, F.J. Padden, *J. Appl. Phys.*, **35**, 1270, 1964.
- 74) J.H. Magill, *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, **4**, 243, 1966.
- 75) D. Wasserman, C. Versfelt, USA Patent, US3839297, (1974).
- 76) T.G. Fox, *Bull. Am. Phys. Soc.*, **1**, 123, 1956.
- 77) A.P. Pego, A.A. Poot, D.W. Grijpma, J. Feijen, *J. of Materials Science: Materials in Medicine*, **14**, 767, 2003.
- 78) S.L. Shenoy, W.D. Bates, H.L. Frisch, G.E. Wnek, *Polymer*, **46**, 3372, 2005.

- 79) J.S. Choi, S.W. Lee, L. Jeong, S. Bae, B.C. Min, J.H. Youk, W.H. Park, *International Journal of Biological Macromolecules*, **34**, 249, 2004.
- 80) E. Kenawy, J.M. Layman, J.R. Watkins, G.L. Bowlin, J.A. Matthews, D.G. Simpson, G.E. Wnek, *Biomaterials*, **24**, 907, 2003.
- 81) K.H. Lee, H.Y. Kim, H.J. Bang, Y.H. Jung, S.G. Lee, *Polymer*, **44**, 4029, 2003.
- 82) N. Grassie, E.J. Murray, P.A. Holmes, *Polym. Degrad. Stab.*, **6**, 47, 1984.
- 83) N. Grassie, E.J. Murray, P.A. Holmes, *Polym. Degrad. Stab.*, **6**, 95, 1984.
- 84) N. Grassie, E.J. Murray, P.A. Holmes, *Polym. Degrad. Stab.*, **6**, 127, 1984.
- 85) F.D. Kopinke, M. Remmler, K. Mackenzie, *Polym. Degrad. Stab.*, **52**, 25, 1996.
- 86) F.D. Kopinke, K. Mackenzie, *J. Anal. Appl. Pyrolysis.*, **40-41**, 43, 1997.
- 87) P. Kurcok, M. Kowalczyk, G. Adamus, Z. Jedlinski, *J. M. S.-Pure Appl. Chem.*, **A32**, 875, 1995.