



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA**

---

**Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale**  
**Corso di Laurea Magistrale in Scienza e**  
**Ingegneria dei Materiali**

Preparazione, caratterizzazione e applicazioni di film a  
base di bioplastiche

**Relatore**

Prof.ssa Orietta Monticelli

**Correlatore**

Prof.ssa Marina Di Carro

**Laureando**

Andrea Picciotti

**Anno Accademico 2021-2022**



# Sommario

INTRODUZIONE	5
1 LE BIOPLASTICHE	7
1.1 IL PLA E LE SUE PROPRIETA'	8
1.1.1 Film porosi a base di PLA	14
1.1.2 Film a base PLA-PCL	23
1.1.3 Metodi di funzionalizzazione superficiale di film a base di PLA	26
1.2 CAMPIONATORI PASSIVI E ADSORBITORI DI INQUINANTI	30
1.3 MATERIALI UTILIZZATI COME CARRIER DI FARMACI	33
2 MATERIALI E METODI	40
2.1 MATERIALI	40
2.2 PREPARAZIONE DI FILM POROSI ATTRAVERSO IL METODO NIPS	41
2.2.1 Film porosi a base di PLA e PLA/PCL	41
2.2.2 Film porosi a base di PLA/PCL_COOH	44
2.3 PREPARAZIONE DI FILM DENSII A BASE DI PLA	46
2.4 FUNZIONALIZZAZIONE SUPERFICIALE MEDIANTE AMMINOLISI	47
2.5 PROVE DI ADSORBIMENTO CON LA FLUORESCEINA SODICA	48
2.6 EFFETTO MATRICE E PROVE DI ACCUMULO	48
2.7 PROVE DI ADSORBIMENTO CON LA PARAROSANILINA CLORURO	55
2.8 TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE	56
2.8.1 Microscopia elettronica a scansione (SEM)	56
2.8.2 Angolo di contatto ( $\theta$ )	57
2.8.3 Reometro Brookfield	58
2.8.4 Spettroscopia UV-VIS	58
2.8.5 Il cromatografo liquido ad elevate prestazioni accoppiato allo spettrometro di massa a triplo quadrupolo (HPLC-MS-QQQ)	59
2.8.6 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)	60
2.8.7 Analisi termogravimetrica (TGA)	60
3 RISULTATI E DISCUSSIONI	61
3.1 STUDIO DELLE VARIABILI NEL PROCESSO NIPS	61
3.1.1 Valutazione della porosità delle membrane a base di PLA	61
3.1.2 Valutazione della viscosità delle soluzioni polimeriche per le membrane a base di PLA	63
3.1.3 Determinazione dei coefficienti di diffusione	66
3.1.4 Morfologia dei film porosi a base di PLA	67

3.1.5	Valutazione della porosità delle membrane a base di PLA/PCL	71
3.1.6	Valutazione della viscosità delle soluzioni polimeriche per le membrane a base di PLA/PCL	72
3.1.7	Morfologia dei film porosi a base di PLA/PCL	73
3.1.8	Valutazione delle porosità delle membrane a base di PLA/PCL_COOH	75
3.1.9	Valutazione della viscosità delle soluzioni polimeriche per le membrane a base di PLA/PCL_COOH	76
3.1.10	Morfologia dei film porosi a base di PLA/PCL_COOH	77
3.2	STUDIO DELLA FUNZIONALIZZAZIONE SUPERFICIALE DEI FILM	80
3.3	STUDIO DELL'UTILIZZO DI MEMBRANE COME CAMPIONATORI PASSIVI	85
3.3.1	Prove di adsorbimento con la fluoresceina sodica	85
3.3.2	Utilizzo dei film porosi come adsorbitori di inquinanti	87
3.3.3	Effetto matrice	88
3.3.4	Prove di accumulo	90
3.4	SVILUPPI FUTURI: FUNZIONALIZZAZIONE AL PLASMA	92
3.4.1	Film denso	93
3.4.2	Film poroso	94
3.5	PROVE DI ADSORBIMENTO CON LA PARAROSANILINA CLORURO	96
4	CONCLUSIONI	99
	Bibliografia	101

## INTRODUZIONE

La carenza ed il continuo aumento del prezzo delle risorse petrolifere, in concomitanza ad un sempre più diffuso impiego delle materie plastiche, hanno intensificato la ricerca sull'utilizzo di nuovi materiali alternativi a basso impatto ambientale come le bioplastiche. Tra queste l'acido polilattico (PLA) consente di risparmiare circa il 65% dell'energia necessaria per produrre plastica di origine petrolchimica con riduzione delle emissioni dei gas serra di circa il 25%. A partire dal nuovo millennio, l'acido polilattico ha attirato l'attenzione di numerosi ricercatori, come testimoniato dall'aumento del numero di pubblicazioni [Fig. 0.1]. Tale trend è legato sia alle sue proprietà uniche che alle sue promettenti applicazioni in diversi campi incluso quello ambientale, biomedico, biologico e farmacologico.

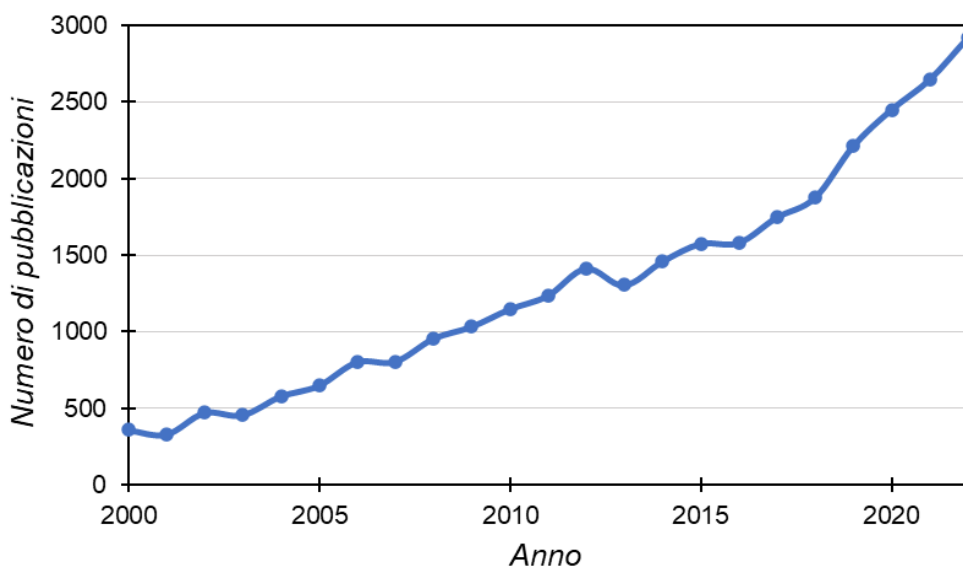


Figura 0.1 Numero delle pubblicazioni dal 2000 ad oggi sulle tematiche inerenti il PLA

Ciononostante, studi recentemente pubblicati [1,2] hanno definito il PLA come un potenziale sistema capace di veicolare gli inquinanti organici e inorganici nell'ambiente, fornendo in questo modo una minaccia per gli ecosistemi di acqua dolce, marina e terrestre. Da un altro punto di vista, si potrebbe sfruttare la capacità del PLA di adsorbire determinanti specie chimiche al fine di creare un sistema ottimale per applicazioni ecologiche come assorbimento, filtrazione e separazione di sostanze recalcitranti dalle acque. In quest'ottica, l'obiettivo del seguente lavoro di tesi è stato quello di sviluppare dei film porosi a base di acido polilattico e di studiare il loro possibile utilizzo come campionatori passivi di contaminanti emergenti nella matrice acquosa.

Nonostante i numerosi vantaggi offerti, è importante tenere presente che i film porosi a base di PLA presentano alcune criticità, come l'elevata fragilità e la mancanza di gruppi funzionali. Per migliorare la sua duttilità, il metodo più efficiente prevede la miscelazione con altri polimeri. Nel presente lavoro si è proposto di aggiungere alla formulazione polimerica il policaprolattone (PCL), un polimero duttile e allo stesso tempo biodegradabile. Inoltre, al fine di funzionalizzare la superficie, e per quindi rendere i film porosi a base di PLA applicabili in svariati settori, nella seconda parte della tesi si è proposto lo sviluppo di membrane ottenute dalla miscelazione del PLA con un PCL sintetizzato *ad-hoc*, caratterizzato da una struttura a stella con terminali carbossilici e da un ridotto peso molecolare. La presenza di tali gruppi funzionali favorisce l'interazione selettiva con molecole cariche positivamente: così facendo si è potuto creare una membrana che potrebbe essere sfruttata come sistema capace di interagire e veicolare in maniera intelligente determinanti medicinali.

# 1 LE BIOPLASTICHE

Se da un lato le materie plastiche rappresentano una classe di materiali a basso costo, facilmente lavorabili e dotate di svariate proprietà, dall'altro la loro produzione è accompagnata da notevoli problemi legati allo smaltimento con il conseguente accumulo nell'ambiente. Inoltre, la maggior parte delle materie plastiche, su cui come società facciamo affidamento, proviene da risorse a base di petrolio, con solo una frazione attualmente derivata da materie prime rinnovabili. Infatti, nel 2018 sono stati generati circa 335 milioni di plastica di cui solo l'1% derivava da fonti biologiche [3]. Esistono prove evidenti che l'utilizzo di sostanze a base fossile per la produzione di materiali plastici porti ad un progressivo inquinamento dell'aria e ad un incremento della temperatura globale.

Questi sono i principali motivi che hanno sollecitato la transizione verso l'utilizzo di una nuova classe di materiali definiti come "bioplastiche".

Secondo la definizione data dalla *European Bioplastic*, si definisce bioplastica una classe di polimeri che può essere biodegradabile o che proviene da fonti rinnovabili (*bio-based*) o che possiede entrambe le caratteristiche.

Più precisamente il termine "*bio-based*" è utilizzato per i polimeri che siano interamente o parzialmente derivati da biomassa come il mais, la canna da zucchero o la cellulosa.

E per biodegradazione si intende quel processo di natura chimico (es. per via ossidativa) o chimico-fisico (es. per foto-ossidazione) nel quale i microorganismi convertono il materiale in sostanze naturali quali l'acqua, l'anidride carbonica e compost. La proprietà della biodegradazione non dipende dalla risorsa da cui otteniamo il nostro materiale ma è principalmente legata alla sua struttura chimica; infatti, è importante sottolineare che *bio-based* non significa necessariamente biodegradabile [4].

Appartenenti al gruppo dei polimeri *bio-based* e allo stesso tempo biodegradabili, si devono citare le miscele di amido termoplastico TPS (*Thermoplastic starch*), i vari poliesteri innovativi come i poliidrossialcanoati PHA (*Polyhydroxyalkanoates*) e l'acido polilattico PLA (*Polylactic acid*). Quest'ultimo ha attirato l'attenzione per merito delle sue promettenti applicazioni in vari campi industriali, non a caso è uno dei biopolimeri più prodotti industrialmente raggiungendo una quota annua di circa 200.000 tonnellate.

## 1.1 IL PLA E LE SUE PROPRIETA'

L'acido polilattico, o meglio definito come PLA, è un poliestere alifatico termoplastico il cui monomero è l'acido lattico [Fig. 1.1].

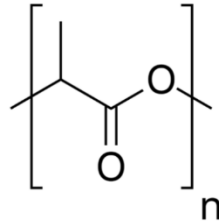


Figura 1.1 Unità di ripetizione dell'acido polilattico (PLA)

Il PLA è caratterizzato da una temperatura di fusione che varia dai 130°C ai 180°C e una temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) di circa 55-60°C.

Tale poliestere è comunemente prodotto per policondensazione diretta dell'acido lattico o per apertura d'anello del lattide. Quest'ultimo è composto da due unità di acido lattico legate da due legami esterei al fine di formare un monomero ciclico.

Generalmente, viene evitata la policondensazione diretta dell'acido lattico in quanto è limitata dalla necessità di rimuovere l'acqua ed è caratterizzata da condizioni di reazioni più severe (basse pressioni fino a 5 mmHg e alte temperature di circa 180-200°C) [5].

L'acido lattico è un acido carbossilico chirale in quanto è caratterizzato dall'assenza di elementi di simmetria o più comunemente dalla presenza di un elemento stereogenico. Quindi l'acido lattico esiste sottoforma di due stereoisomeri: acido (D)-lattico e acido (L)-lattico (o rispettivamente R e S tramite la configurazione assoluta) [Fig. 1.2]. Entrambe le stereoforme si trovano nei sistemi batterici invece nei sistemi mammiferi è presente solo la forma L.

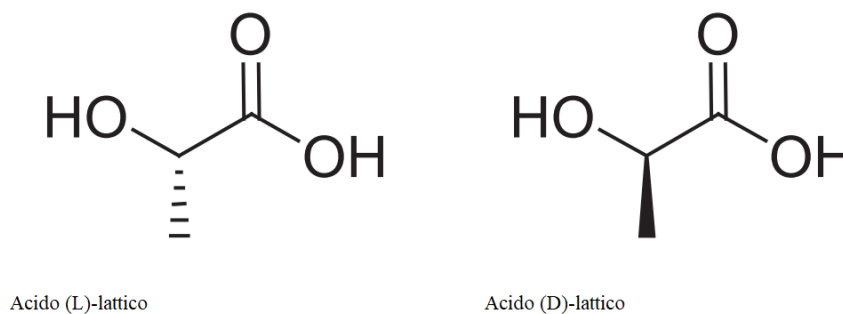


Figura 1.2 Proiezione a cuneo e tratteggio dei due differenti stereoisomeri dell'acido lattico



La produzione di acido lattico può essere ottenuta mediante vie di sintesi chimica o vie di produzione fermentativa (fermentazione dell'acido lattico).

Per via di sintesi chimica si produce solitamente una miscela equimolare di entrambi gli enantiomeri (miscela racemica). In questo caso l'acido carbossilico si ottiene tramite l'idrolisi in condizioni acide del lattonitrile ( $C_3H_5NO$ ) che è generalmente formato dalla reazione di addizione dell'acetaldeide ( $C_2H_4O$ ) e acido cianidrico (HCN) [Fig. 1.3].

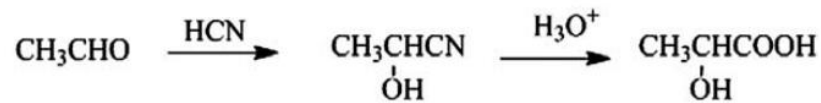


Figura 1.3 Formazione dell'acido lattico attraverso il lattonitrile

Invece, i processi di fermentazione sono caratterizzati dall'utilizzo di substrati rinnovabili economici, da basse temperature di produzione e da un basso consumo energetico riuscendo a ottenere acido D- o L-lattico otticamente puro quando viene selezionato il microrganismo appropriato come produttore di acido lattico. Attualmente, quasi tutto l'acido lattico prodotto in tutto il mondo proviene dalla via di produzione fermentativa [6]. Quest'ultima viene effettuata generalmente in un reattore nel quale vengono introdotti un nutriente contenente azoto, l'amido (ricavato dal mais, manioca, canna da zucchero o polpa di barbabietola da zucchero) e un ceppo di specie microbiche come i batteri, funghi, lieviti e cianobatteri. La selezione del ceppo è di grande importanza, in quanto determina la purezza ottica dell'acido lattico e la resa del processo. Alcuni di essi producono acido L-lattico, altri producono acido D-lattico mentre alcuni una miscela di entrambi gli stereoisomeri.

La [Fig. 1.4] confronta i prodotti di fermentazione indotti da determinati ceppi batterici [5].

Strain	Source	Yield of L-lactic acid <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> sp. <i>Rhamnosus</i> LC0001	IFO3425	97.5
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> LB0004	IAM1120	98.8
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD0008	AHU1056	96.6
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD0012	IAM1197	98.9
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD0025	IFO3534	1.5
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD0028	IFO3202	0.6
<i>Lactobacillus helveticus</i> LH0030	–	49.5
<i>Lactococcus thermophilus</i> LT	ATCC19987	97.0
<i>Lactococcus lactis</i> LL0005	ATCC8000	99.0
<i>Lactococcus lactis</i> LL0016	AHU1101	98.6
<i>Lactococcus lactis</i> LL0018	IFO3443	97.1
<i>Sporolactobacillus inulinus</i> SI0073	ATCC15538	1.1
<i>Sporolactobacillus inulinus</i> SI0074	ATCC15538	1.1

<sup>a</sup>L/(D+L)×100.

Figura 1.4 Prodotti di fermentazione dell'acido lattico dei vari ceppi batterici

Il pH del processo viene mantenuta costante in un intervallo che va da un valore di 5 a un valore di 7 mediante l'utilizzo di agenti neutralizzanti come il carbonato di calcio (CaCO<sub>3</sub>), l'idrossido di calcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) e idrossido di sodio (NaOH).

Il processo inizia con la fermentazione dell'amido in un reattore nel quale si ha la formazione di lattato di ammonio e di prodotti secondari quali acido acetico, anidride carbonica e alcool. Il lattato di ammonio viene successivamente convertito in acido lattico sfruttando l'allontanamento dell'ammoniaca dal lattato di ammonio tramite l'elettrodialisi.

L'acido lattico viene quindi alimentato in un reattore di oligomerizzazione dove l'acqua viene espulsa e l'acido lattico si trasforma in un prepolimero. Il prepolimero che esce dal reattore di oligomerizzazione entra in un reattore di depolimerizzazione dove ogni monomero forma diversi isomeri di anelli di lattide chiamati L-lattide, D-lattide e mesolattide [Fig. 1.5].

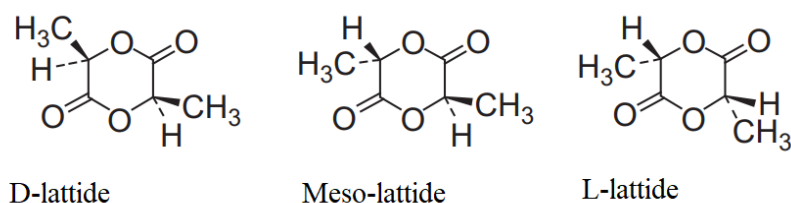


Figura 1.5 Struttura dei vari lattidi

I tre stereoisomeri vengono inviati alla colonna di purificazione dove, con l'ausilio del calore, il mesolattide in forma liquida viene separato dagli L- e D-lattidi. Dopo aver separato il mesolattide, L- e D-lattidi vengono alimentati in un reattore di polimerizzazione dove si verifica l'apertura dell'anello e si ha la formazione del PLA.

L'apertura dell'anello viene effettuata mediante la presenza di un catalizzatore metallico, generalmente a base di stagno. Il PLA puro appena formato è fuso, che si solidifica sfruttando un essiccatore e trasformato nelle forme desiderate.

Il rapporto tra l'isomero L e l'isomero D dell'acido lattico gioca un ruolo cruciale nella cristallinità, nella degradazione e nel comportamento di lavorazione del PLA. La temperatura di fusione e la temperatura di transizione vetrosa del PLA diminuiscono piuttosto rapidamente con il diminuire del tenore dell'isomero L dell'acido lattico [7]. Il PLA con contenuto dell'isomero L superiore al 90% tende ad essere cristallino, mentre quello inferiore è amorfo [8]. La cristallinità influenza molte proprietà del polimero tra cui la durezza, il modulo elastico, la resistenza alla trazione e la rigidità.

Le forme meno stereoregolari come il PLA 98 (dove la cifra indica la percentuale dell'isomero L nel polimero) e il 96 hanno migliori proprietà meccaniche a causa della loro bassa cristallinità [7]. Il PLA 100 (o meglio definito come acido poli-L-lattico, PLLA) è un materiale duro ma fragile.

Uno degli aspetti più interessanti del PLA riguarda la sua biocompatibilità ovvero la sua capacità di essere metabolizzato dagli organismi viventi senza arrecare nessun effetto dannoso sulle loro funzioni vitali. Non a caso, negli ultimi decenni tale poliestere ha attirato molta attenzione nel campo medico dopo che la FDA (*Food and Drug Administration*) ha anche approvato il suo utilizzo in contatto diretto con i fluidi biologici [9]. Infatti, il PLA si degrada attraverso l'idrolisi formando l'acido lattico che, nel corpo umano, viene convertito in acido piruvico per poi essere metabolizzato nel ciclo di Krebs [10].

Però l'etichettatura di materiale biodegradabile può spesso portare a malinteso facendo pensare che il PLA si degraderà facilmente nell'ambiente naturale. La degradazione del PLA è un processo composto da due fasi che inizia con l'idrolisi, seguita dall'attacco batterico ai residui frammentati [11]. Inizialmente, le catene di poliestere ad alto peso molecolare vengono idrolizzate per formare oligomeri di acido lattico a basso peso molecolare. Quando il peso molecolare medio raggiunge circa 10.000 Da, i microrganismi presenti nel terreno iniziano a digerire gli oligomeri a basso peso molecolare, producendo così CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O.

Più è alta la temperatura di fusione del poliestere in questione, più la sua degradazione risulta essere lenta [12]. Infatti, nel terreno la degradazione può richiedere anche il tempo di un anno ad una temperatura del suolo di 20°C, tuttavia temperature maggiori possono aumentare fortemente la velocità della degradazione [13]. La velocità della degradazione non è l'unico criterio da considerare per valutare se un determinato materiale polimerico possa essere idoneo per le applicazioni biomediche, ma bisogna valutare altri fattori quali la

cristallinità, il valore e la distribuzione del peso molecolare, la morfologia ma anche la solubilità dei prodotti di degradazione nell'ambiente cui viene posto. Ad esempio, è stato dimostrato che il deterioramento del PLA risulta essere più rapido nei domini amorfi [14]. E inoltre che la velocità di degradazione aumenta al diminuire del peso molecolare del polimero: non a caso Pierre Mainil-Varlet e collaboratori hanno dimostrato che impianti a base di PLLA a basso peso molecolare (60.000 g/mol) introdotti nel corpo umano per favorire la rigenerazione ossea erano in grado di mantenere le loro proprietà meccaniche per un periodo di tempo solitamente necessario per la guarigione della frattura ossea [15].

Il PLA ha riscontrato, negli ultimi decenni, un notevole interesse nel campo del *packaging* alimentare non solo per le sue, già citate, caratteristiche a basso impatto ambientale ma anche per le sue proprietà ottiche e di impermeabilità nei confronti di determinate specie chimiche. L'impiego di un *packaging* trasparente si traduce in trasparenza qualitativa nei confronti del consumatore: lo si può intendere come una prova visibile della qualità del prodotto destinato alla vendita. Da un punto di vista chimico la trasparenza di un materiale polimerico è strettamente legata alla morfologia delle sue catene: un polimero amorfo è trasparente invece i semicristallini sono opachi.

Da un punto di vista fisico, la propagazione di una radiazione elettromagnetica in un materiale qualunque dipende dal suo indice di rifrazione ( $n$ ) secondo l'equazione (1.1):

$$n(w) = n_1 + in_2 = \sqrt{\varepsilon_r u_r} \quad (\text{equazione 1.1})$$

con  $n_1$  la parte reale dell'indice di rifrazione e  $n_2$  la sua parte immaginaria,  $\varepsilon_r$  la costante dielettrica relativa,  $u_r$  la permeabilità magnetica relativa del materiale e  $w$  è la frequenza della radiazione elettromagnetica.

Quando la frequenza del campo ha un valore alto e se il materiale non è magnetico, allora vale l'approssimazione secondo la quale  $u_r$  è 1. Quando la costante dielettrica del mezzo è positiva allora si ha propagazione della radiazione elettromagnetica e quindi il materiale è trasparente, invece per valori di  $\varepsilon$  negativi il materiale riflette la radiazione elettromagnetica e il mezzo è opaco [16].

La funzione dielettrica dipende dall'indice di rifrazione che è funzione della frequenza e pertanto tramite uno studio di tali parametri si può risalire al comportamento ottico del materiale in esame. In particolare, Matthew H. Hutchinson e collaboratori hanno evidenziato un diminuitamento dell'indice di rifrazione del PLA, possedendo sempre valori positivi, all'aumentare della lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica incidente (nell'intervallo 300 nm – 100 nm) [17].

La permeabilità dei film a base dei principali polimeri utilizzati nel mondo del packaging nei confronti delle specie gassose è riassunta nella tabella sottostante [Fig. 1.6] [8].

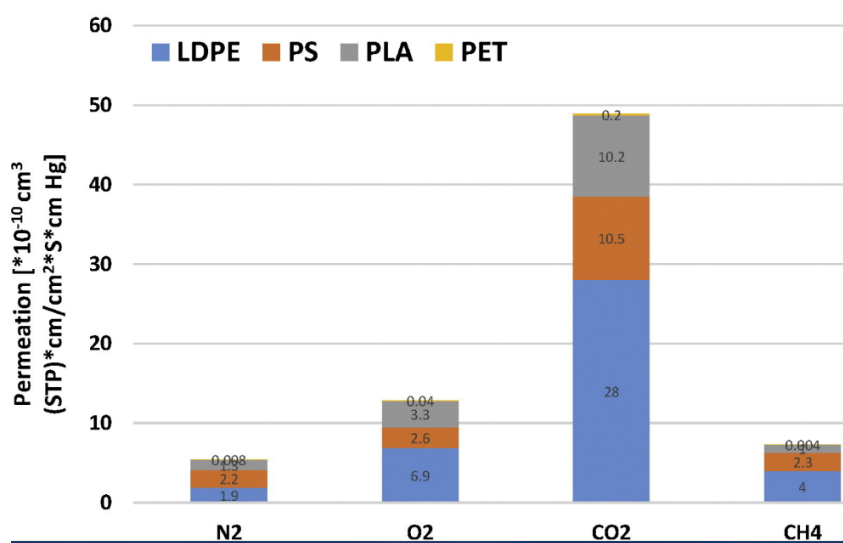


Figura 1.6 Permeabilità del polistirene (PS), polietilentereftalato (PET), polietilene a bassa densità (LDPE) e PLA nei confronti dell'azoto (N<sub>2</sub>), ossigeno (O<sub>2</sub>), anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) e metano (CH<sub>4</sub>)

Si osserva che la permeabilità del PLA nei confronti del metano è 4.5 volte più bassa rispetto ad altri film e inoltre, risulta essere piuttosto bassa anche la probabilità di penetrazione dell'O<sub>2</sub>. L'ossigeno risulta essere uno dei fattori che influisce in maniera determinante sulla velocità della crescita batterica.

In base a recenti studi, il polimero in questione presenta anche bassi valori di trasmissione nei confronti del vapore acqueo, che diminuisce sempre più all'aumentare del grado di cristallinità del campione. Tali caratteristiche rendono il PLA un ottimo materiale ai fini del *packaging* alimentare, anche se, sottoposto all'UV il polimero si colora in giallo, riducendo la sua trasparenza [5].

Le proprietà meccaniche del PLA possono essere significativamente diverse in base alla natura del polimero: il PLA semicristallino presenta proprietà migliori rispetto a quello amorfo. Auras e collaboratori hanno evidenziato che i film a base di PLA presentano buoni risultati di resistenza alla trazione con valori superiori al polistirene (PS) ma inferiori al polietilentereftalato (PET) e un modulo elastico che risulta maggiore al PS, al polipropilene (PP) e al polietilene ad alta densità (HDPE) [18]. Ciononostante, uno degli svantaggi principali del PLA riguarda la sua fragilità, testimoniato da un valore dell'allungamento a rottura del 4%.

Tutte queste proprietà fanno sì che il PLA risulta essere uno dei biopolimeri più utilizzati nei più svariati campi industriali. Grazie alle già citate proprietà barriera, oggi la sua principale applicazione riguarda il *packaging*, non solo nel campo alimentare ma anche ai fini agricoli per proteggere i vegetali [Fig. 1.7].



*Figura 1.7 Tipico telone di PLA utilizzato in campo agricolo*

Dall'inizio delle applicazioni commerciali del PLA, quest'ultimo è stato utilizzato in applicazioni mediche come scaffold biodegradabili, cateteri e molti altri dispositivi in cui la biodegradabilità e la biocompatibilità sono aspetti importanti.

La popolarità dell'acido polilattico nel campo medico deriva dal fatto che l'acido poli-L-lattico ha uno dei moduli elastici più elevati tra i polimeri biodegradabili ( $\sim 2,7$  GPa), che è inferiore al modulo elastico della parte superficiale dell'osso umano ( $\sim 20$  GPa), ma paragonabile alla parte interna ( $\sim 0,1$  GPa) [19].

Circa il 33% della produzione mondiale di questo biopolimero, viene destinata al settore tessile: è molto probabile trovarlo nei sedili dei veicoli e nei tessuti non tessuti [5].

### **1.1.1 Film porosi a base di PLA**

Nel campo dell'ingegneria tissutale, ovvero quel settore che si pone l'obiettivo di riparare o sostituire tessuti e organi sui quali i trattamenti farmacologici non sono più applicabili, i film porosi a base di PLA rappresentano degli ottimi candidati per fungere da scaffold.

Gli scaffold, tradotto letteralmente in italiano come impalcatura, sono delle strutture artificiali con caratteristiche morfologiche nanometriche ingegnerizzate capaci di emulare la matrice extracellulare. Vengono utilizzate per ospitare e sostenere le culture cellulari e

inoltre favorirne la crescita fino all'ottenimento della rigenerazione del tessuto danneggiato senza stimolare alcuna risposta immunitaria.

L'elevata porosità connessa alle già citate proprietà a basso impatto ambientale, viene sfruttata non solo nel campo dell'ingegneria tissutale ma anche come sistema che permette di veicolare medicinali all'interno del nostro corpo e come sistemi di adsorbimento di inquinanti in ambienti acquosi e aeriformi [20].

Esistono differenti metodi per la produzione delle membrane a base di PLA come: la filatura, la stampa 3d, il *casting* seguito dalla lisciviazione, la liofilizzazione e l'inversione di fase. Ciascuno di essi ha pregi e difetti. Ogni metodo ha i suoi diversi effetti sul prodotto finale. Secondo la necessità della membrana, si deve scegliere il metodo di preparazione appropriato.

La filatura consiste nell'estrudere dalla punta dell'ago di una siringa, dei polimeri in fase sol-gel o soluzioni polimeriche, dal quale esce il materiale che solidifica mentre viene tirato da un sistema di pulegge.

Esistono diverse varianti della filatura che possono essere distinte in: *wet spinning*, *dry spinning*, *melt spinning*, *gel spinning* e infine l'*electrospinning*.

Nella filatura ad umido o *wet spinning*, una soluzione polimerica, ottenuta dalla solubilizzazione del polimero in un solvente, viene sottoposta a filatura in cui l'estrusore è immerso in una soluzione liquida (bagno di coagulazione). Quest'ultimo è costituito da un secondo solvente rispetto al quale il polimero non è solubile. La soluzione polimerica coagula al fine di formare delle fibre che in seguito vengono sottoposte a lavaggi per rimuovere il solvente intrappolato.

Nella filatura a secco o *dry spinning*, la soluzione polimerica durante il processo di filatura viene soggetta a un getto di aria, grazie al quale si solidifica per evaporazione del solvente.

Nella filatura da fuso o *melt spinning* il polimero viene portato a temperatura di fusione prima del processo di filatura. Durante la filatura il filo si raffredda e quindi solidifica.

Il *gel spinning* è un processo dove la solidificazione della fibra polimerica avviene sia per merito di un getto di aria e sia per l'immersione in un bagno di coagulazione.

Nel processo di elettrofilatura, il polimero viene sciolto in un solvente e la soluzione ottenuta viene introdotta nella siringa. Applicando una differenza di potenziale, la soluzione dalla siringa viene espulsa su una superficie che funge da collettore su cui avviene la formazione della membrana [Fig. 1.8].

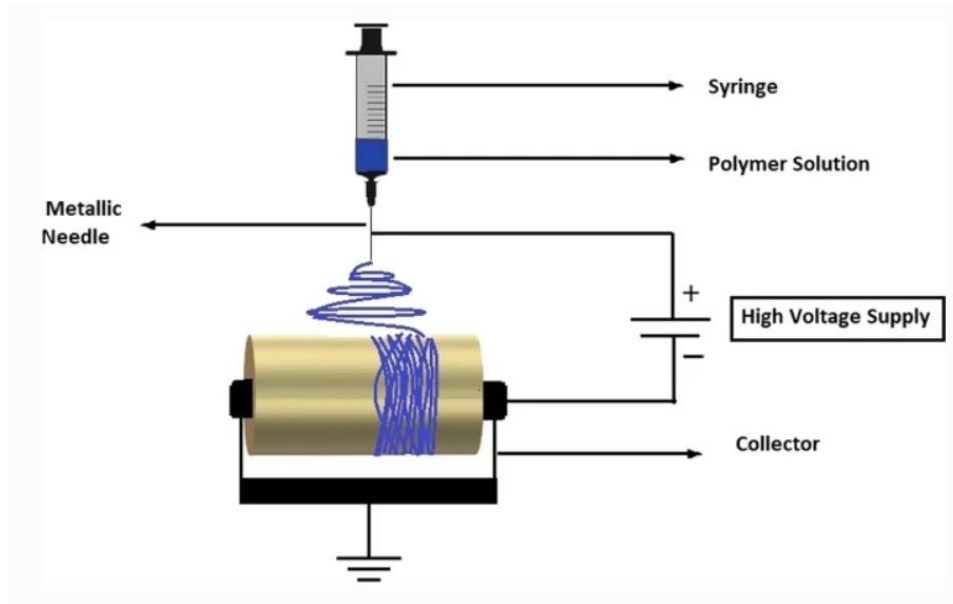


Figura 1.8 Rappresentazione schematica dell'electrospinning

Senza uno specifico controllo le fibre elettrofilate sono deposte sul collettore sotto forma di fogli di fibre non intrecciate disposte in maniera casuale. Sono state sviluppate diverse tecniche per disporre ordinatamente le fibre, sia come fibre allineate sia sotto forma di strutture bidimensionali o tridimensionali.

Una delle tecnologie di stampa 3D utilizzata nel realizzare membrane porose a base di PLA, risulta essere la modellazione a deposizione fusa o FDM (*Fused Deposition Modeling*) che si basa su una lettura di un file CAD.

Gli elementi fondamentali per la FDM sono essenzialmente tre: un piatto sul quale viene stampato il pezzo; un filamento di un polimero termoplastico che funge da materiale di stampa e una testina di estrusione, anche chiamata estrusore. In sintesi, il filamento è fuso dall'estrusore della stampante, che deposita il materiale strato per strato sul piatto [Fig. 1.9].

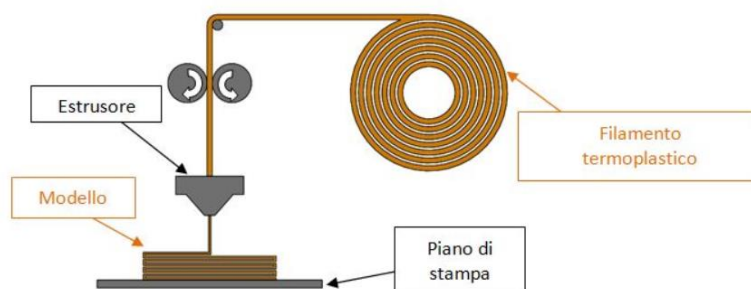


Figura 1.9 Rappresentazione schematica del FDM



La lisciviazione è una tecnica semplice ed economica per produrre strutture porose. La tecnica prevede una solubilizzazione del polimero in un solvente organico. Successivamente, nella soluzione polimerica vengono introdotte particelle (ad esempio sali solubili in acqua), chiamate anche porogeni, con dimensioni specifiche. La soluzione viene quindi colata in uno stampo (ad esempio, capsula di Petri) che detterà la forma della membrana. Successivamente, il solvente può essere alternativamente rimosso mediante evaporazione, lasciando le particelle nella struttura polimerica. Questi passaggi iniziali vengono anche definiti come processo *casting*. L'ultimo passaggio prevede l'immersione dello stampo in un bagno che scioglie le particelle/sali depositati nella matrice polimerica.

La [Fig. 1.10] mostra i passaggi principali di tale tecnica.

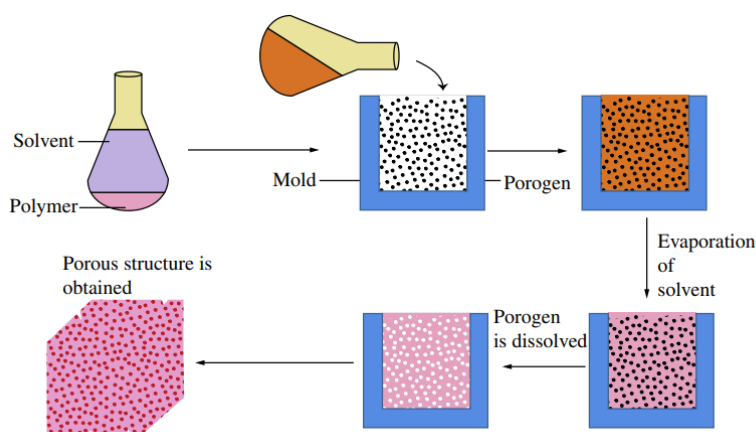


Figura 1.10 Rappresentazione schematica del casting seguito dalla lisciviazione

Recentemente è stata proposta una semplice tecnica per sintetizzare materiali altamente porosi e strutture prive di crepe definito come *freeze extraction* [21][Fig. 1.11]. Questo metodo implica la solubilizzazione di un polimero in un solvente con aggiunta di acqua. La soluzione viene miscelata e versata in uno stampo. Prima della separazione delle fasi, la soluzione viene istantaneamente raffreddata, tramite azoto liquido, per intrappolare il liquido nella struttura. Successivamente, il solvente e l'acqua vengono rimossi mediante liofilizzazione: dopo la rimozione, lo spazio lasciato dal solvente costituirà i pori della membrana. La porosità e la struttura dei pori possono essere controllate dalla concentrazione del polimero, dal solvente, dalla percentuale di fase acquosa e dai parametri di liofilizzazione.

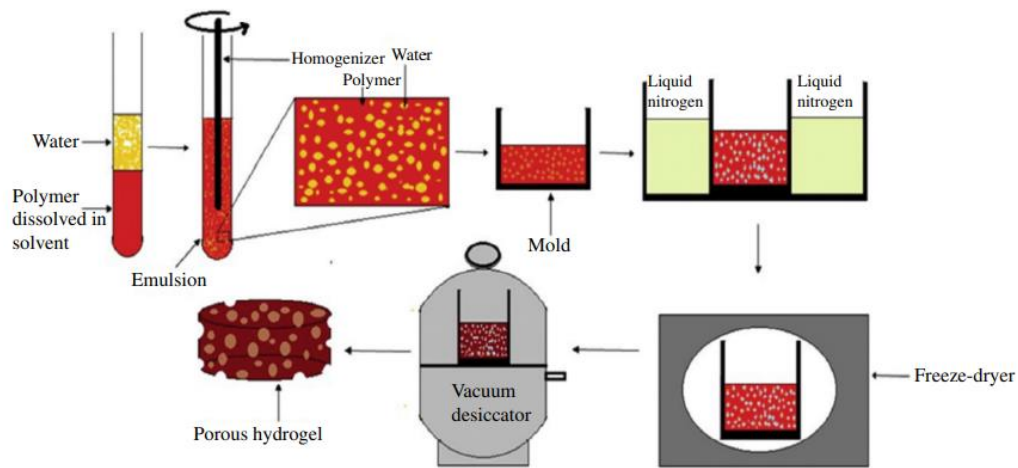


Figura 1.11 Rappresentazione schematica del freeze extraction

Il metodo più utilizzato per ottenere le membrane porose simmetriche o antisimmetriche risulta essere l'inversione di fase [22].

Si definisce membrana antisimmetrica, una struttura caratterizzata da una pellicola esterna densa molto sottile (*skin*) responsabile del suo comportamento permeabile nei confronti di determinate sostanze. Invece, quelle simmetriche sono strutture prive di tale pellicola esterna e sono caratterizzate da pori generalmente interconnessi.

L'inversione di fase è un processo in cui una soluzione polimerica è trasformata in modo controllato da una fase liquida in una fase solida (membrana). Più precisamente avviene per precipitazione di una soluzione polimerica con la successiva formazione di due fasi: una fase solida, ricca in polimero che costituirà la matrice della membrana, ed una liquida, povera di polimero che costituirà i pori della membrana.

La formazione della membrana è un complesso processo nel quale entrano in gioco svariati parametri termodinamici governati dall'equazione di Navier-Stokes, dall'equazione di trasporto di Boltzmann e dall'equazione dei moti convettivi-diffusivi [23].

La struttura generalmente ottenuta è circa spessa diversi micrometri con dimensioni dei pori dell'ordine di 10-1000 nm, e la sua formazione può richiedere diversi secondi o anche ore. L'evoluzione della matrice porosa può essere quantificata attraverso metodi sperimentali come: la spettroscopia Raman, la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier e misure della diffusione della luce [23].

In base a come viene indotta questa separazione di fase, possiamo distinguere l'inversione di fase in quattro diversi metodi [20]:

- ***Inversione di fase indotta da non solvente*** o meglio definita come ***NIPS*** (*Non-solvent Induced Phase Separation*);
- ***Inversione di fase indotta dall'evaporazione del solvente*** o meglio definita come ***EIPS*** (*Evaporation Induced Phase Separation*);
- ***Inversione di fase indotta da una variazione di temperatura*** o meglio definita come ***TIPS*** (*Thermally Induced Phase Separation*);
- ***Inversione di fase indotta dal vapore anti-solvente*** o meglio definita come ***VIPS*** (*Vapor Induced Phase Separation*).

L'inversione di fase indotta da non solvente è il metodo più semplice per ottenere dei film porosi consentendo di ottenere svariate morfologie di membrana.

Il NIPS consiste nella preparazione e poi successiva immersione di una soluzione polimerica in un bagno contenente un non solvente per il polimero stesso.

La soluzione polimerica, dalla quale si ottiene la membrana, è costituita da almeno un polimero, un buon solvente per il polimero stesso e anche, volendo, da diversi additivi.

Dopo aver preparato la soluzione, ed ottimizzata tramite degasaggio per eliminare eventuali bolle d'aria, viene spalmata su di un supporto inerte (generalmente vetro) tramite una lama. Immediatamente il tutto (ovvero il supporto sul quale viene spalmata la soluzione) viene immerso in una matrice liquida contenente il non solvente per il polimero stesso (bagno di coagulo) [Fig. 1.12].

Ciò avvia uno scambio tra il solvente e il non solvente: quest'ultimo andrà a occupare lo spazio lasciato libero dal solvente e viceversa. Il non solvente deve avere un'alta affinità con il solvente e nessuna affinità con il polimero. A questo punto, poiché il polimero non è solubile nel non solvente precipita, formando la fase membrana ricca di polimero. Lo spazio occupato dal non solvente è invece povero di polimero e forma i pori della membrana. In seguito al processo che può durare diverse ore, si ha la formazione di una struttura a doppio strato caratterizzata da uno strato denso (*skin*) ed uno poroso.

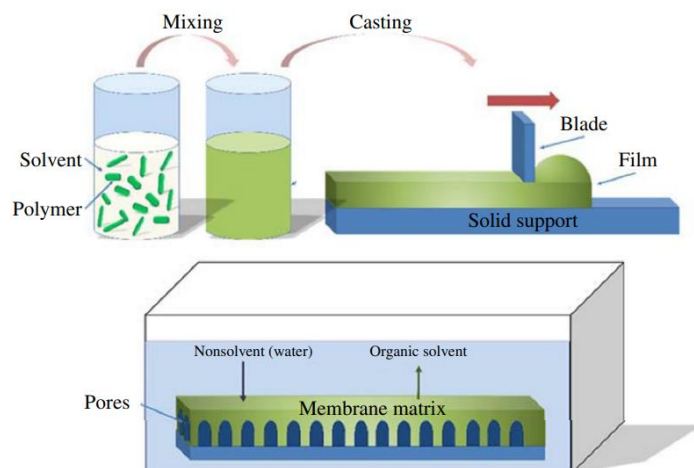


Figura 1.12 Rappresentazione schematica del NIPS

La scelta del solvente e del non solvente dipende dal sistema in esame ma di solito vengono utilizzati come solventi l’N-metil-pirrolidone (NMP), dimetilacetammide (DMAc), dimetilformammide (DMF), tetraidrofurano (THF), e dimetilsolfossido (DMSO) e come non solvente generalmente l’acqua.

Il NIPS è anche caratterizzato da diversi svantaggi quali: l’utilizzo di un’elevata quantità di non solvente e la presenza di solventi tossici e non biocompatibili [24]. Ad ovviare a questi svantaggi, recentemente sono stati proposti diversi solventi sostenibili come il Citroflex® A-4 [Fig. 1.13] e il TEGDA (trietilene glicole diacetato).

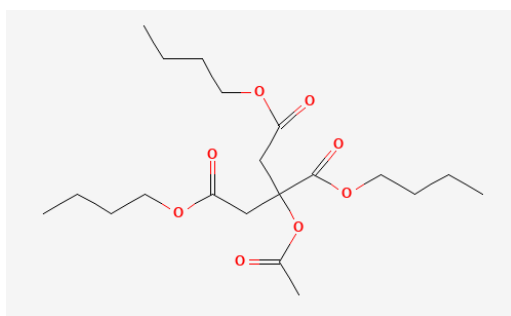


Figura 1.13 Struttura chimica del Citroflex A-4

L’ inversione di fase indotta dall’evaporazione del solvente o meglio definita come EIPS è una procedura che permette di ottenere strutture porose mediante evaporazione controllata del solvente da una soluzione polimerica inizialmente omogenea.

Dopo aver preparato una soluzione polimerica miscelando il polimero con un solvente e in determinati casi anche con un non solvente, si cola e si stende su di un supporto inerte lasciando evaporare il solvente in ambiente inerte a temperatura ambiente.

Man mano che il solvente evapora si ha un aumento della concentrazione del polimero sulla superficie della soluzione spalmata (perché è sottratto solvente), con conseguente precipitazione del polimero sotto forma di un film omogeneo denso.

L'inversione di fase indotta da una variazione di temperatura o meglio definita come TIPS, è una tecnica versatile di recente applicazione, nella quale il polimero si dissolve in un solvente (dotato di alto punto di ebollizione) ad alta temperatura e la soluzione polimerica viene colata su di un supporto inerte. In seguito, il meccanismo di separazione di fase avviene diminuendo la temperatura del bagno d'acqua nella quale viene immerso il supporto sul quale viene spalmata la soluzione polimerica.

Poiché questa tecnica coinvolge solo due reagenti (solvente e polimero), le membrane prodotte mostrano un'elevata riproducibilità e un basso livello di imperfezioni. Tuttavia, non si può formare una membrana con una dimensione dei pori inferiore a 50 nm secondo la procedura TIPS [25].

Il processo VIPS fu introdotto per la prima volta da Zsigmondy e Bachmann nel 1918 [26] dove la lastra su cui è stata spalmata la soluzione polimerica si pone in atmosfera di vapore, che è costituita da un non solvente saturato con il solvente. Il non solvente penetra nella soluzione polimerica e induce la sua precipitazione. Il processo VIPS è molto più simile al processo NIPS ma rispetto a quest'ultimo è caratterizzato da un tempo di formazione del prodotto più lento: ciò può essere attribuito a una cinetica più lenta dei non solventi gassosi rispetto ai non solventi liquidi utilizzati nel NIPS [27].

I diagrammi di fase termodinamici sono la principale fonte di guida per comprendere l'esito dei processi di inversione di fase. Infatti, per comprendere meglio il processo NIPS ma anche quello VIPS, si devono costruire i diagrammi di fase ternari in quanto nel sistema sono presenti tre differenti componenti: polimero, non solvente e solvente.

Un diagramma di fase ternario è una rappresentazione su un triangolo equilatero di un sistema costituito da tre componenti, la cui somma delle corrispondenti frazioni molari vale 1. Sui vertici del triangolo vengono riportati i componenti puri e qualsiasi punto all'interno del triangolo rappresenta una miscela di una certa composizione.

Si considera un diagramma di fase schematico per un sistema ternario polimero-solvente-non solvente a una temperatura fissa, dove il polimero in questione è semicristallino [Fig. 1.14].

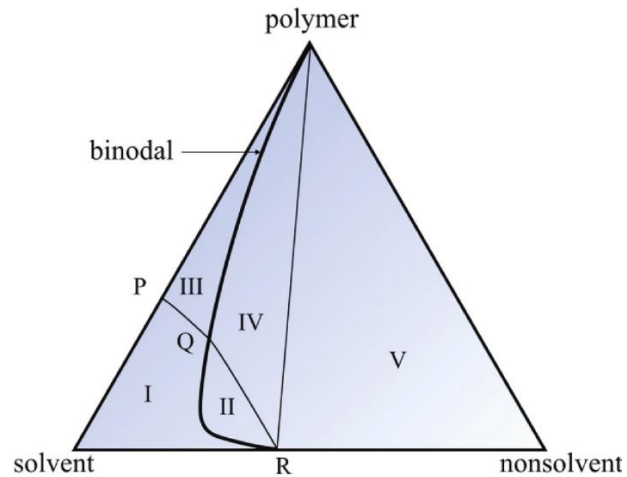


Figura 1.14 Esempio di un diagramma di fase ternario

Attraverso la teoria di Flory Huggins o la determinazione dei *cloud point*, si possono quantificare le fasi (rappresentate in **[Fig. 1.14]** con i numeri romani) che si formano quando una soluzione polimero-solvente liquido viene miscelata con un non solvente in un certo rapporto stechiometrico, come in un processo NIPS.

La regione I indica una zona omogenea in cui tutti i componenti sono miscibili e non si ha nessuna separazione di fase. La regione II indica una zona in cui si ha lo smiscelamento liquido-liquido, ovvero il sistema passa da una condizione omogenea a una condizione in cui si ha la separazione dei componenti di una miscela: il sistema si separa in una fase ricca e povera di polimero. Le regioni III, IV e V indicano zone in cui si hanno altre separazioni di fase. Si definisce linea binodale un insieme di punti che separano la regione di completa miscibilità dalla regione di separazione di fase.

In base a come viene condotto il processo NIPS, la morfologia della membrana può essere completamente differente [28]. Infatti, si consideri la linea tratteggiata della **[Fig. 1.15]**: rappresenta la variazione della composizione della miscela nel momento in cui si immerge la soluzione polimerica nel bagno di un non solvente per favorire la formazione della membrana.

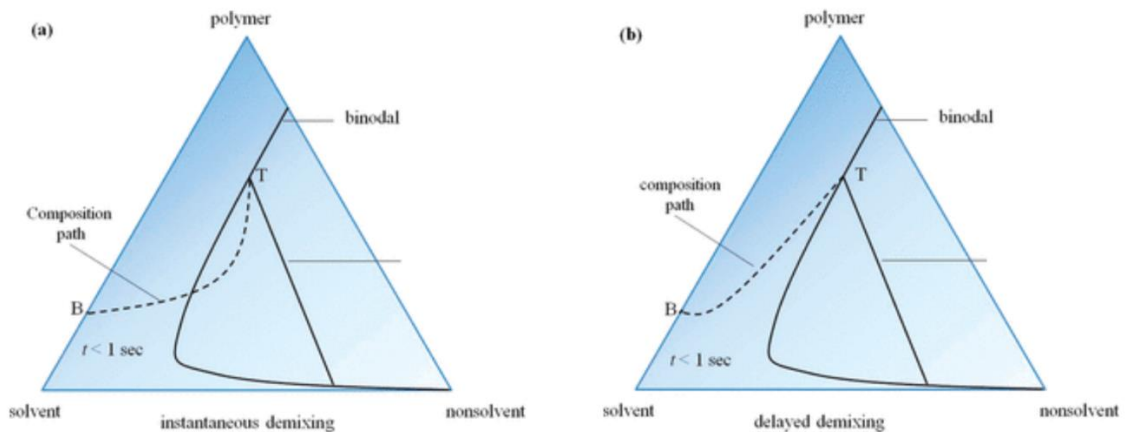


Figura 1.15 Profilo della composizione di una miscela con immediato smiscelamento (a) e ritardato smiscelamento (b)

Prima dell'immersione, si ha solo un sistema costituito da polimero e solvente, quindi ci troviamo in un punto del lato del triangolo opposto al vertice in cui c'è solo il non solvente (punto B nella [Fig. 1.15]).

Nel momento in cui si ha l'immersione, la miscela si arricchisce di non solvente e la composizione viene identificata dal punto T. Gli andamenti della linea tratteggiata della [Fig. 1.15 a] e [Fig. 1.15 b] risultano essere differenti e quindi la morfologia della membrana ottenuta risulta essere diversa. Infatti, nella [Fig. 1.15 a], lo smiscelamento liquido-liquido avviene immediatamente in quanto la linea tratteggiata interseca rapidamente la curva binodale e si ha la formazione di una membrana fortemente porosa con i pori simili a delle dita (morfologia *finger-like*). Invece nella [Fig. 1.15 b], il profilo della composizione non attraversa la curva binodale: quindi il meccanismo di smiscelamento è diverso e la formazione della membrana richiede molto più tempo. È probabile che ciò produrrà una membrana con uno strato superiore relativamente denso e una sottostruttura spugnosa.

Pertanto, tramite lo studio di diagrammi ternari si può determinare la composizione necessaria affinché si abbia la formazione di una membrana e come ottenere una specifica morfologia di essa.

### 1.1.2 Film a base PLA-PCL

Il PLA è caratterizzato da una serie di svantaggi che ne limitano l'utilizzo e la propria applicabilità. Questi inconvenienti includono l'eccessiva fragilità, una bassa "*heat deflection temperature*" (ovvero la temperatura alla quale è possibile sollecitare un polimero per un

breve periodo) la scarsa lavorabilità, formabilità e *foamability* (capacità di un polimero di essere espanso) e bassa resistenza allo stato fuso (capacità del polimero di autosostenersi allo stato fuso).

Un approccio pratico per superare alcuni di questi inconvenienti risulta essere quello di miscelare il PLA con altri polimeri [29]. Tra i polimeri scelti per la miscelazione con il PLA, le opzioni più interessanti sono rappresentate dai polimeri biodegradabili.

In particolare, è stato osservato un drastico aumento dell'allungamento a rottura del PLA, miscelandolo con il poli(butilene adipato-co-tereftalato) (PBAT) o con il polibutilene succinato (PBS) o con il polietilene succinato (PES). Ma senza dubbio, il biopolimero principale utilizzato per risolvere alcuni difetti dell'acido polilattico è proprio il policaprolattone (PCL). Il PCL è un poliesteri alifatico biodegradabile caratterizzato da una temperatura di fusione di circa 60 °C e una  $T_g$  di circa -60 °C [Fig. 1.16].

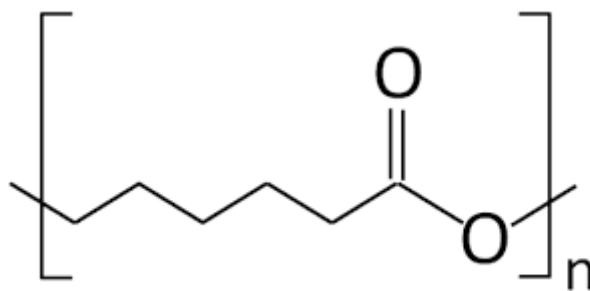


Figura 1.16 Unità di ripetizione del policaprolattone (PCL)

Il PCL può essere preparato mediante polimerizzazione con apertura dell'anello dell' $\epsilon$ -caprolattone utilizzando una varietà di catalizzatori anionici, cationici e di coordinazione o mediante polimerizzazione con apertura dell'anello dei radicali liberi del 2-metilene-1-3-diossano. Il PCL è un polimero semicristallino idrofobico; la cui cristallinità tende a diminuire con l'aumentare del peso molecolare.

La buona solubilità del PCL, il suo basso punto di fusione e l'eccezionale compatibilità nelle miscele hanno stimolato un'ampia ricerca sulla sua potenziale applicazione in campo biomedico: infatti, viene utilizzato nel campo dell'ingegneria tissutale, in quello della *drug delivery* e nelle realizzazioni di dispositivi medici come le suture, sistemi anti-contraccettivi e strutture odontotecniche [30].

In realtà, gli studi operati dalla comunità scientifica sulle proprietà meccaniche dei blend PLA/PCL (con il primo presente in maggiore quantità) sono piuttosto contraddittori.



Nel 2006, López-Rodríguez e collaboratori [31] hanno riscontrato una forte diminuzione della tensione di snervamento e del carico di rottura e nessun aumento della deformazione alla rottura per le miscele PLA/PCL (% in peso 80/20) rispetto al PLA puro.

Successivamente, Vilay e collaboratori [32] hanno riscontrato una moderata diminuzione della tensione di snervamento e un notevole aumento della deformazione a rottura con l'aumento del contenuto di PCL. Invece, Urquijo e collaboratori [33] hanno constatato un notevole miglioramento dell'allungamento a rottura e della resistenza all'urto delle miscele PLA/PCL. Probabilmente queste opinioni contrastanti sono dovute a una differenza della natura chimico-fisiche dei polimeri sottoposti ad analisi da parte dei ricercatori citati.

La comunità scientifica definisce il PLA e il PCL come dei polimeri incompatibili, ovvero delle macromolecole immiscibili a livello molecolare e disuniformi a livello macroscopico. Pertanto, per migliorare la dispersione della fase disperdente nella fase dispersa, si deve aggiungere un agente compatibilizzante. Quest'ultimo è un additivo che ha lo scopo di diminuire la tensione interfacciale tra le due diverse fasi del blend impedendo la coalescenza delle particelle della fase dispersa attraverso la diminuzione del valore di energia libera di miscelazione. Gli agenti compatibilizzanti riescono a legarsi contemporaneamente a entrambi i polimeri tramite reazioni tipiche della specie considerata, creando quindi interazioni tra le macromolecole e abbassando il valore di tensione superficiale. Tra gli agenti compatibilizzanti più utilizzati, vanno sicuramente citati gli estensori di catena e i copolimeri a blocchi. In tal direzione, Gardella e collaboratori [34] hanno osservato che il PLA innestato con l'anidride maleica ha ridotto le dimensioni delle particelle del PCL e ha migliorato l'allungamento a rottura delle miscele PLA/PCL senza diminuire il modulo di Young.

In tal senso, Wang e collaboratori [35] hanno proposto l'aggiunta del 2% in peso di trifenilfosfito a una miscela PLA/PCL (80/20) riscontrando un aumento dell'allungamento a rottura dal valore del 28% al valore del 127%. Oppure Takayama e collaboratori [36] hanno scoperto che l'aggiunta di triisocianato di lisina possa migliorare la compatibilità tra i due polimeri.

Il miglioramento della tenacità delle miscele PLA/PCL mediante l'aggiunta di un compatibilizzante è dovuto principalmente dal fatto che l'additivo influenza la dimensione media delle particelle di PCL. Infatti, la combinazione di una matrice di PLA rigida con particelle di PCL piccole e ben disperse si è rivelata promettente dal punto di vista delle prestazioni meccaniche.

### 1.1.3 Metodi di funzionalizzazione superficiale di film a base di PLA

Per promuovere delle interazioni specifiche con determinati materiali e per apportare modifiche superficiali ai fini di variare l'idrofilia, la rugosità e la topografia, sono stati proposti negli ultimi decenni delle procedure chimico-fisiche che mirano a modificare la composizione chimica della superficie del PLA incorporando determinati gruppi funzionali. Tali procedure permettono un cambiamento delle proprietà chimico-fisiche andando a modificare la struttura superficiale del PLA, ovvero si ha la cosiddetta funzionalizzazione superficiale.

Questa, si può dividere in due gruppi principali [37]:

- **Funzionalizzazione non permanente:** che comporta l'adsorbimento/deposizione non permanente di determinate specie chimiche sulla superficie del PLA;
- **Funzionalizzazione permanente:** che sfrutta la creazione di legami covalenti permanenti tra la superficie del PLA con determinati gruppi funzionali.

La funzionalizzazione non permanente può essere ottenuta tramite un rivestimento superficiale, mediante l'intrappolamento di biomolecole, con degli additivi migratori oppure attraverso un trattamento al plasma. Quest'ultimo risulta essere di gran lunga una delle tecniche non permanenti più soggette a studio, sin dal periodo in cui è stato introdotto ovvero negli anni '60. Il plasma è un gas ionizzato globalmente neutro, costituito da un insieme di elettroni e ioni (la cui carica elettrica totale è nulla). Viene generato quando un gas di alimentazione è sottoposto ad urto anelastico nei confronti di un fascio di elettroni o fotoni dotato di energia sufficiente (rispettivamente definito come impatto elettronico di ionizzazione o fotoionizzazione). Il metodo più comunemente usato per generare e sostenere un plasma a bassa temperatura consiste nell'applicare un campo elettrico ad una quantità di gas neutro. Qualsiasi volume di un gas neutro contiene sempre dei portatori liberi (elettroni o ioni) che si formano, per esempio, in seguito all'interazione di raggi cosmici o di radiazioni radioattive con il gas. Questi portatori di carica liberi vengono accelerati dal campo elettrico e dall'urto di quest'ultimi con atomi, molecole gassose o con le superfici degli elettrodi, vengono generate nuove particelle cariche [38].

Questo processo di funzionalizzazione modifica l'idrofilia, la topografia, la rugosità e l'affinità cellulare del PLA senza influire sulla sua velocità di degradazione.

Il plasma può essere ottenuto a partire dall'ossigeno, elio, azoto o anche dall'ammoniaca. Proprio quest'ultima è stata sfruttata da Yang e collaboratori [39] per introdurre gruppi amminici superficiali al fine di aumentare l'idrofilia e l'adesione cellulare del PLA utilizzato

come scaffold. Informazioni interessanti sono state ottenute, funzionalizzando il PLLA con il plasma di ossigeno favorendo una maggiore adesione e proliferazione delle cellule staminali osteoprogenitrici.

Sebbene il trattamento al plasma venga utilizzato per migliorare la bagnabilità e l'affinità cellulare del PLA, i problemi relativi alla modifica superficiale non permanente lo rendono potenzialmente inadatto per determinate applicazioni biomediche e di consumo. Infatti, si è dimostrato che con il tempo la modifica superficiale indotta dal plasma viene persa, ma tutto ciò può essere ridotto conservando il polimero a basse temperature (per temperature molto inferiori della  $T_g$ ) [39].

Invece la funzionalizzazione permanente può essere ottenuta tramite idrolisi superficiale, amminolisi, o *photografting*.

Il PLA è un polimero idrofobico caratterizzato da un angolo di contatto di circa  $80^\circ$  nei confronti dell'acqua e quindi da una bassa solubilità nei confronti di solventi polari.

Inoltre, è anche contraddistinto da una superficie inerte priva di catene laterali reattive.

Tali problemi possono essere risolti con l'idrolisi alcalina superficiale, che crea gruppi funzionali reattivi come i gruppi carbossilici o idrossilici sulla superficie del PLA.

Generalmente, l'idrolisi è indotta da una miscela NaOH/EtOH, permettendo la scissione del legame estereo (attraverso la saponificazione) producendo un gruppo terminale carbossilico e idrossilico su due differenti catene [Fig. 1.17].

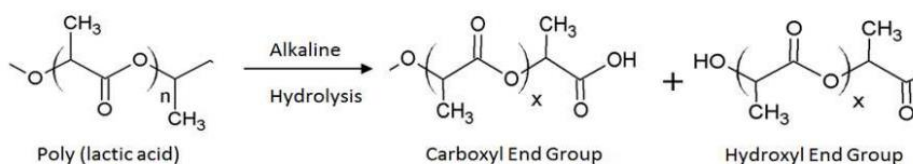


Figura 1.17 Idrolisi alcalina del legame estereo del PLA

Tali nuovi gruppi funzionali possono essere sito di attacco covalente nei confronti di specie chimiche. Tipicamente però i gruppi acidi vengono prima attivati con il cloruro di tionile ( $\text{SOCl}_2$ ) o con il pentacloruro di fosforo ( $\text{PCl}_5$ ) al fine di convertirli in cloruri acilici. Quest'ultimi sono siti di attacco nucleofilo di specie contenenti gruppi amminici o idrossilici, provocando l'uscita dell'alogeno tramite sostituzione nucleofila [Fig. 1.18].

Cai e collaboratori [40], hanno proposto l'innesto del chitosano al fine di favorire l'adesione e la proliferazione degli osteoblasti sugli scaffold a base di PLA.

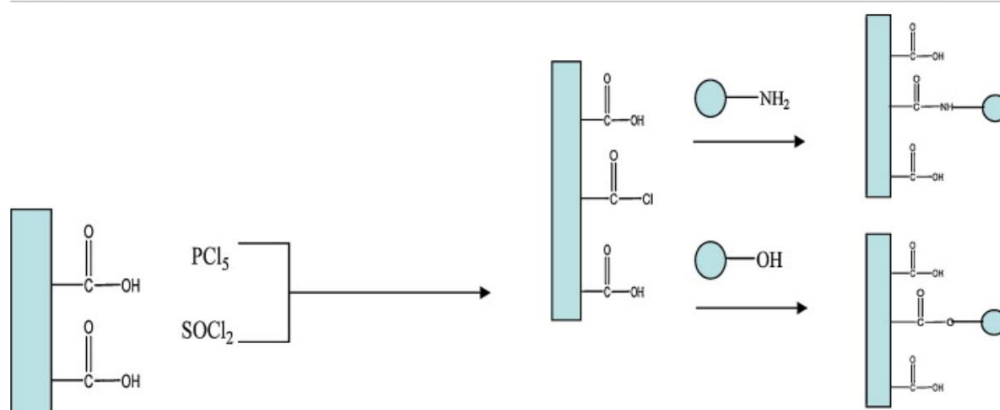


Figura 1.18 Innesco di gruppi ossidrilici e amminici sulla superficie del PLA sottoposta ad idrolisi alcalina

Invece, l'amminolisi è un metodo conveniente e versatile per introdurre gruppi amminici o altri gruppi funzionali sulla superficie del poliestere, che possono essere siti di innesto per altre specie chimiche. È in grado di migliorare l'adesione cellulare, la proliferazione, la crescita di cellule staminali e l'isolamento di determinati sottogruppi di cellule [41].

Il meccanismo di reazione dell'amminolisi indotta da un'ammina primaria nei confronti di una molecola con un gruppo estereo è riportato nella [Fig. 1.19].

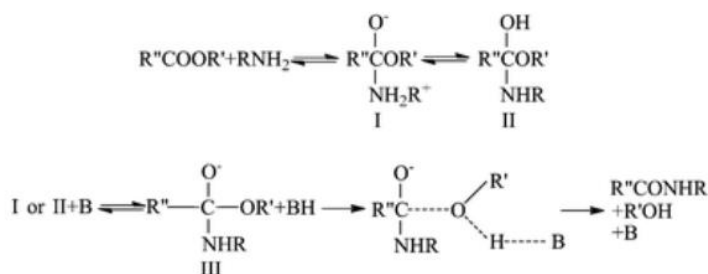


Figura 1.19 Meccanismo di amminolisi indotta da un'ammina primaria. R, R', R'' rappresentano gruppi alchilici invece B una base

È una reazione di sostituzione nucleofila base catalizzata nella quale il gruppo alcossi (OR' nella [Fig.1.19]) funge da gruppo uscente. Inizialmente l'ammina primaria compie un attacco nucleofilo nei confronti del gruppo carbonilico del legame estereo al fine di dare un intermedio tetraedrico instabile. Quest'ultimo deve essere considerato un ibrido al quale contribuiscono due strutture di risonanza. Successivamente, in presenza di una base, si ha l'espulsione del gruppo alcossi che si protona per formare un alcool.

Nella reazione di amminolisi con i poliesteri, i segmenti delle catene polimeriche possono essere visualizzati come R' e R". La reazione di amminolisi provoca la scissione del legame estereo e la generazione simultanea di legami ammidici.

Nella [Fig. 1.20] è riportata l'amminolisi indotta dall'etilendiammina nei confronti del PLA.

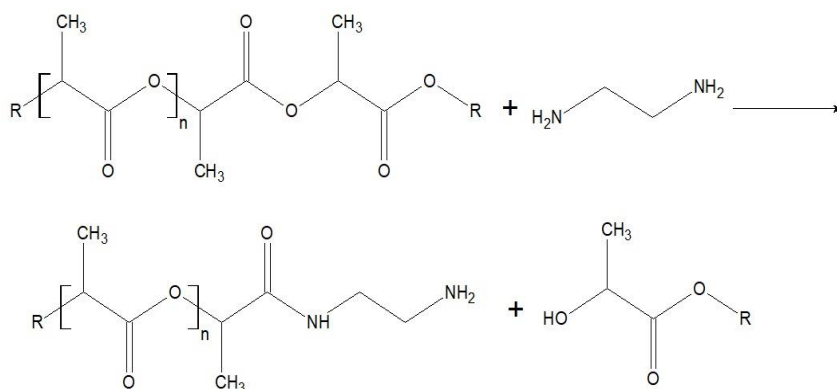


Figura 1.20 Amminolisi del PLA indotta dall'etilendiammina

Generalmente l'amminolisi viene ottenuta tramite un reattivo caratterizzato da due gruppi nucleofili come l'etilendiammina in solventi aprotici o protici [42]. Anche le ammine secondarie possono partecipare all'amminolisi, ma la loro reattività è generalmente trascurabile rispetto alle ammine primarie. L'utilizzo dell'etilendiammina preserva due grandi vantaggi: il gruppo amminico non sottoposto ad attacco nucleofilo può essere sito di ancoraggio di altre biomolecole e inoltre i gruppi (-NH<sub>2</sub>) sono facilmente convertibili in altri gruppi funzionali.

Uno studio effettuato da Bech e collaboratori [43], ha dimostrato che l'innesto di gruppi amminici sulla superficie di un poliestere diminuisce all'aumentare del peso molecolare della diammina utilizzata nell'amminolisi. Questo è attribuito al minor impedimento sterico delle diammine più corte. E inoltre hanno osservato che la reazione fosse più favorita utilizzando il metanolo come solvente [43] e servendosi di un poliestere con un grado di cristallinità inferiore. Poiché quanto più le catene sono compatte, quanto più difficilmente si ha il contatto tra i legami esterei e la diammina.

Inoltre, analizzando il grafico della [Fig. 1.21], si può notare come la densità dei gruppi amminici sulla superficie del poliestere aumenta all'aumentare della concentrazione della diammina, utilizzata come reattivo.

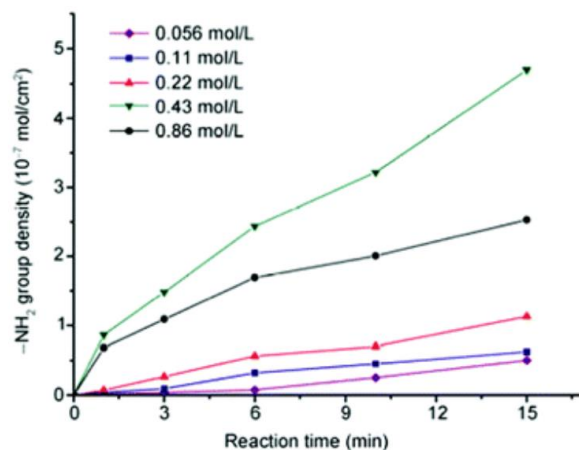


Figura 1.21 Comportamento cinetico dell'amminolisi al variare della concentrazione della diammina in funzione del tempo

Elevati tempi di reazione possono quindi portare ad un aumento del grado di funzionalizzazione, ma anche ad un'eccessiva erosione della superficie del polimero.

Questa variazione di rugosità del film può essere quantificata tramite analisi AFM (*Atomic Force Microscope*) [44]. La degradazione superficiale risulta essere uno dei principali problemi legati all'amminolisi compromettendo inoltre il valore del modulo elastico del polimero. I gruppi amminici introdotti dall'amminolisi non solo danno un beneficio nei confronti dell'idrofilia e dell'adesione cellulare, ma possono essere siti di attacco di biomolecole quali proteine, oligosaccaridi o peptidi.

Il *photografting* è un approccio che si basa sull'attivazione della superficie del PLA tramite luce UV per creare gruppi reattivi seguiti da un innesto di determinate specie chimiche.

Le reazioni di *photografting* possono essere condotte sia in fase liquida che in fase vapore.

In genere, tali processi possono essere distinti in "*grafting to*" o in "*grafting from*" tradotti in "innesto a" o "innesto da". Nei processi di "*grafting to*" le specie vengono direttamente innestati sulla superficie polimerica, invece nel "*grafting from*", l'innesto avviene su opportuni iniziatori, posizionati sulla superficie del polimero, sensibili alla luce UV.

## 1.2 CAMPIONATORI PASSIVI E ADSORBITORI DI INQUINANTI

Molto spesso un'analisi chimica viene effettuata su una piccola quantità di materiale di cui interessa la sua natura chimico-fisica, come possono essere pochi grammi di un terreno incontaminato o pochi millilitri di un lago inquinato. Affinché le misure siano affidabili, è necessario che questa porzione di materiale corrisponda quanto più possibile a quella dell'intero materiale.

Il processo attraverso il quale viene acquisito una porzione rappresentativa dell'intero campione viene definito come "campionamento". Quest'ultimo rappresenta molto spesso il passaggio più complesso dell'intera procedura analitica soprattutto quando il materiale sottoposto ad analisi risulta essere un liquido o un solido, di notevoli dimensioni e disomogeneo.

Idealmente, il campione da analizzare, per evitare di perdere l'integrità di quest'ultimo, dovrebbe essere analizzato in situ; ma nel momento in cui ciò non è possibile, sono necessari l'utilizzo di dispositivi definiti come campionatori, utili per isolare, conservare e preconcentrare l'analita. Infatti, un campionatore dovrebbe evitare qualsiasi processo di decomposizione, contaminazione e perdita degli analiti accumulati nel tempo. Tali dispositivi possono essere distinti in campionatori attivi o passivi.

Il principio alla base del campionamento passivo si basa sul flusso spontaneo di analiti dal mezzo di campionamento (aria o acqua) sul mezzo di raccolta (campionatori) attraverso la diffusione, l'adsorbimento o la formazione di legami tra analiti e campionatore. Non a caso, il campionamento passivo, introdotto per la prima volta nel 1973, è anche definito come campionamento diffusivo.

Invece nel caso dei campionatori attivi, gli analiti vengono direttamente raccolti sfruttando determinati strumenti, come un dispositivo di pompaggio.

Quel movimento spontaneo di diffusione, che si osserva nel campionamento passivo, avviene fino a quando il potenziale chimico degli analiti tra il mezzo di raccolta e il mezzo di campionamento viene uguagliato.

Vi sono pregi e difetti nell'uso dei campionatori passivi rispetto a quelli attivi: per esempio, i campionatori d'aria passivi sono facili da preparare e distribuire, senza requisiti di elettricità, il che li rende preferibili per il campionamento di materiali situati in regioni più remote. Invece, il campionamento attivo dell'aria può fornire istantaneamente le concentrazioni degli analiti in un qualsiasi momento della misura con tempi di campionamento tipicamente di circa 24 ore, a differenza dei tempi molto più lunghi richiesti per quelli passivi.

Inoltre, quelli attivi hanno la capacità di separare le concentrazioni degli analiti in fase gassosa rispetto quelli in fase condensata, mentre quelli passivi raccolgono un campione rappresentativo comprendente sia la fase gassosa che quella particellare [45].

Esistono moltissimi tipi di campionatori passivi che possono essere distinti in base alla composizione del campione da analizzare (se è solido, liquido o gassoso) e alla natura del campione (se è un organismo vivente oppure no). Tutti i campionatori passivi condividono

diverse caratteristiche, la cui principale riguarda la presenza di una barriera che separa il mezzo di raccolta con il mezzo campionato [46].

Questa barriera ci permette di valutare la velocità con la quale le molecole di analita vengono raccolte a una determinata concentrazione.

Generalmente, in base a come viene raccolto l'analita, tale barriera viene distinta in barriera di diffusione (l'analita penetra per diffusione) o barriera di permeazione (l'analita penetra attraverso una membrana non porosa).

Nella [Fig. 1.22], si osserva la generica funzione che mostra la quantità di specie adsorbita dal campionatore passivo in funzione del tempo di esposizione. Inizialmente la funzione è lineare, indice di un adsorbimento proporzionale alla concentrazione del contaminante della matrice ma poi si raggiunge una condizione di plateau.

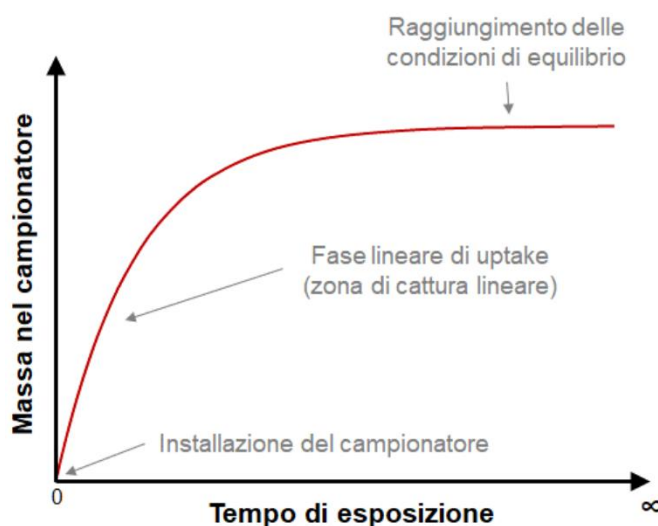


Figura 1.22 Quantità di contaminante adsorbito dal campionatore passivo in funzione del tempo

Una volta completato il campionamento, è necessario determinare la quantità di analita raccolta. Questo viene fatto utilizzando varie procedure, i cui dettagli differiscono a seconda del tipo di campionatore e del mezzo esaminato.

L'ultima fase di qualsiasi procedura è la conversione della quantità di analita nel mezzo esaminato rispetto a quella trovata nel campionatore.

Va inoltre sottolineato che il processo di campionamento deve essere preceduto dalla calibrazione del campionatore. Questa, di solito viene effettuata sottoponendo il dispositivo a una concentrazione nota dell'analita per un periodo di tempo definito, seguito dalla determinazione della quantità dell'analita raccolto e dal calcolo della velocità di campionamento.



Grazie ai campionatori passivi, è possibile individuare una notevole quantità di analiti organici e inorganici nell'aria, analiti organici nell'acqua ma anche inquinanti organici nel suolo.

Negli ultimi decenni, la chimica analitica sta incoraggiando l'uso di metodologie analitiche più ecologiche e più rispettose dell'ambiente, incentivando l'uso di analisi in situ e dirette, di processi automatizzati e miniaturizzati con un trattamento minimo dei campioni riducendo il consumo e gli sprechi di reagenti [47].

Prevedere le tendenze future nell'uso del campionatore è difficile, poiché le decisioni passate di includere dispositivi nel monitoraggio sono state spesso prese sulla base dell'abitudine o dell'esperienza passata di ciascun gruppo di ricerca, piuttosto che oggettivamente. Mentre in passato si tendeva a diminuire le dimensioni dei campionatori passivi e si cercavano materiali più promettenti, ora gli studi hanno sollecitato una transizione verso una nuova politica basata sull'aumento delle dimensioni del dispositivo (in quanto può portare a limiti di rilevamento inferiori nell'acqua di mare) e nel miglioramento delle proprietà meccaniche della membrana [48].

### **1.3 MATERIALI UTILIZZATI COME CARRIER DI FARMACI**

Negli ultimi decenni, grazie ai progressi raggiunti dalla scienza dei materiali e dalle biotecnologie, abbiamo assistito a un'esplosione nella ricerca finalizzata alla creazione di nuovi sistemi di *drug delivery*.

Per *drug delivery* si intende la veicolazione di una sostanza, in maniera precisa verso il sito bersaglio, che può essere un tessuto o un organo, dove il suo conseguente rilascio controllato garantirà la maggiore efficienza. Questi nuovi metodi permettono alternative promettenti alla somministrazione parentale di farmaci, in particolare per le terapie a base di proteine e di corte sequenze di aminoacidi.

Tali sostanze vengono incapsulate all'interno di dispositivi definiti come *nanocarriers* che possono essere di natura polimerica, micellare, vescicolare, biodegradabile, proteica etc. [Fig. 1.23].

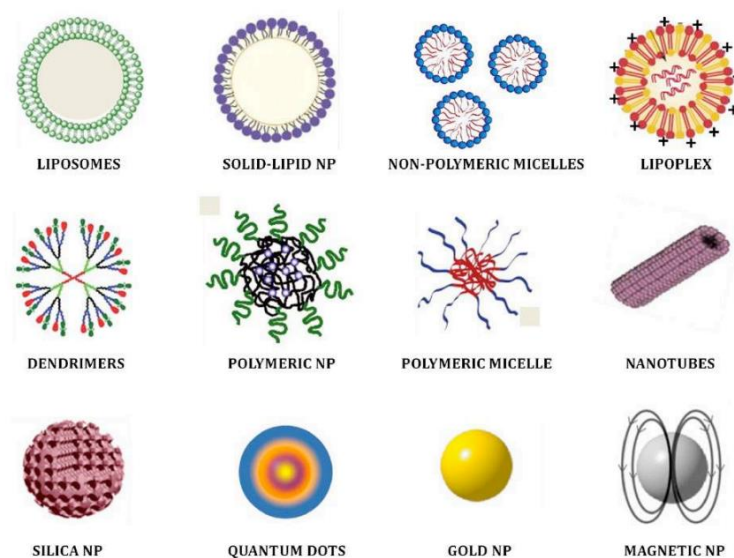


Figura 1.23 Esempi di nanocarriers. np=nanoparticella

Nei tradizionali sistemi di somministrazione dei medicinali, in via orale o in via intravenosa, la sostanza viene distribuita nel corpo umano tramite la circolazione sanguigna: a causa di ciò, solo una piccola frazione di essa raggiungerà il tessuto da guarire. Un sistema di somministrazione mirata, evitando i meccanismi di difesa dell'ospite, fa in modo che una buona percentuale di principio attivo possa raggiungere il sito bersaglio.

Affinché l'effetto sia efficace, i principali metodi di somministrazione dei farmaci si basano sull'assunzione periodica di medicinale in modo tale che il suo principio attivo possa rimanere costante. Una somministrazione di questo genere, definito come multi-dose, produce una curva di concentrazione plasmatica mostrata nel grafico sottostante [curva in nero della Fig. 1.24].

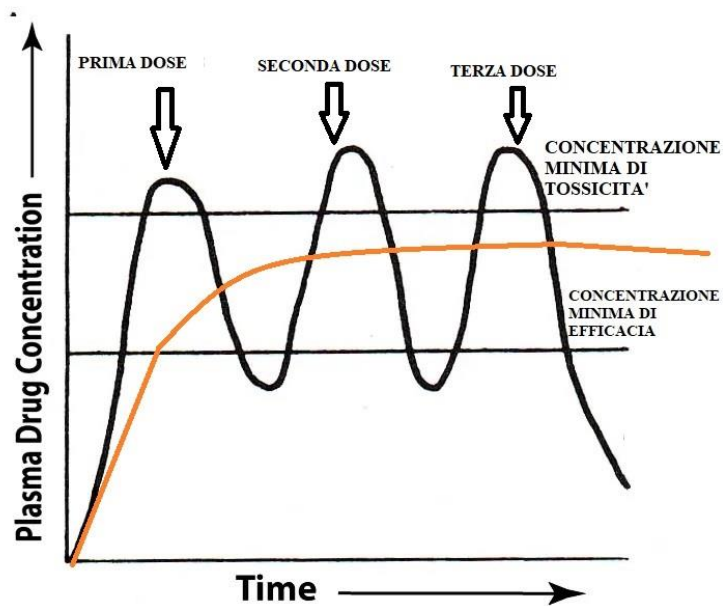


Figura 1.24 La curva in nero rappresenta la curva di concentrazione plasmatica di un generico farmaco assunto in maniera multi-dose; invece, la curva in arancione rappresenta la curva di concentrazione plasmatica di un generico farmaco attraverso un sistema a rilascio controllato

Una curva di concentrazione plasmatica descrive come varia la concentrazione del farmaco nel plasma in funzione del tempo. Risulta necessario che la concentrazione del medicinale rientri all'interno di un range (nella [Fig. 1.24] è rappresentato da due rette orizzontali) il cui massimo estremo rappresenta la soglia di tossicità invece il minimo estremo rappresenta la concentrazione minima purché possa produrre l'azione desiderata.

Dalla [curva in nero della Fig. 1.24], si osserva che la somministrazione multi-dose genera dei picchi che possono causare l'inefficacia del farmaco quando si è sotto il limite di concentrazione richiesto o effetti collaterali dovuti al sovradosaggio.

Per superare questi problemi, si ricorre all'utilizzo di sistemi che rilasciano il medicinale in una maniera controllata e graduale che producono una curva di concentrazione plasmatica evidenziata dalla [curva in arancione della Fig. 1.24].

Dalla prima approvazione, nel 1990, da parte della FDA dei sistemi di somministrazione dei farmaci (Drug Delivery Systems o DDS), sono ora disponibili in commercio più di 10 DDS per il trattamento di diverse malattie che vanno dal cancro alle malattie cardiovascolari e alle infezioni [Fig. 1.25].

Il principale svantaggio di tale somministrazione mirata dei farmaci riguarda l'alto costo che rende difficile la loro produttività.

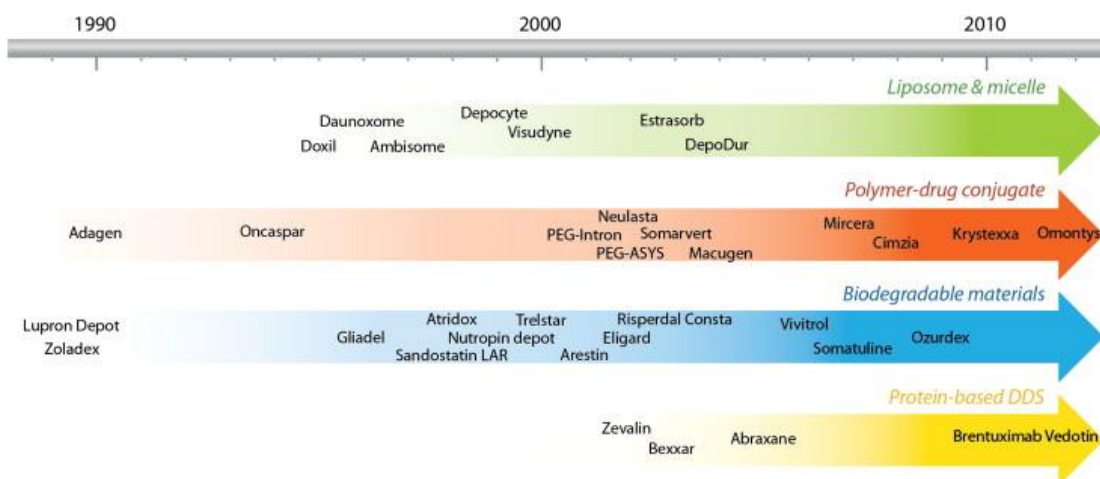


Figura 1.25 Evoluzione temporale dei DDS approvati dalla FDA

Le nanoparticelle polimeriche sono delle particelle solide con una dimensione che va dai 10 nm ai 1000 nm. Tipicamente le nanoparticelle vengono sintetizzate tramite l'omogenizzazione ad alta velocità oppure tramite l'utilizzo di ultrasuoni.

Possono essere utilizzati in dispositivi ottici, magnetici ed elettronici ma soprattutto in campo biomedico. Infatti, grazie alle loro proprietà chimico-fisiche e alle loro dimensioni, le nanoparticelle polimeriche risultano essere degli ottimi candidati come *nanocarriers* in campo farmacologico. I farmaci possono essere incapsulati in questi nano dispositivi oppure ancorati sulla loro superficie.

Questa capacità delle nanoparticelle di concentrarsi selettivamente nel tessuto malato si ottiene attraverso due modi: grazie al *targeting* attivo o passivo.

Per permettere agli agenti terapeutici di accumularsi nel sito corretto, vengono coniugate particolari molecole sulla superficie delle nanoparticelle al fine di riconoscere specifici recettori presenti solo su quel sito. Tale metodo viene definito come *targeting* attivo. Invece il successo nel *targeting* passivo dipende solo dal tempo di circolazione dell'agente terapeutico nel corpo. È tipico rivestire le nanoparticelle con il polietilenglicole (PEG) al fine di renderle idrofile ed inattaccabili dai batteri.

Ci sono diversi vantaggi nell'utilizzare le nanoparticelle polimeriche, tra i quali la facilità nel modificare le loro caratteristiche superficiali, la loro applicabilità (questi *nanocarriers* svolgono la loro azione indifferentemente se vengono somministrati per via orale, nasale, intraoculare, parentale etc.) e la loro capacità di superare diversi ostacoli prima di interagire con il bersaglio (riescono a prevenire l'aggregazione con le proteine del siero, la filtrazione renale e la degradazione enzimatica [49]).

La dimensione delle nanoparticelle è spesso manipolata per essere abbastanza grande da evitare la loro penetrazione nei capillari sanguigni e anche abbastanza piccola da sfuggire ai macrofagi del sistema reticoloendoteliale e impedire l'eliminazione della nanoparticella dal sistema [50]. È stato dimostrato che la capacità di penetrazione delle nanoparticelle nella zona tumorale è inversamente proporzionale alla dimensione della nanoparticella [51]. Oltre alle dimensioni, la forma delle nanoparticelle è stata recentemente identificata come un fattore importante che svolge un ruolo critico nel tempo di circolazione, nell'assorbimento cellulare, nonché nel targeting nella somministrazione di farmaci antitumorali. Esiste un numero considerevole di studi che mostrano migliori proprietà offerte dalle nanoparticelle non sferiche [51].

Diversi tipi di polimeri biocompatibili, sintetici e naturali, possono essere utilizzati per sintetizzare le nanoparticelle. Per la loro elevata biodegradabilità ed elevata disponibilità si preferiscono utilizzare i polimeri naturali come il chitosano, albumina, ciclodestrina o l'alginato ma quest'ultimi possono presentare problemi nella loro breve durata di rilascio del farmaco ma anche problemi di contaminazione degli agenti patogeni [52].

Pertanto, per ovviare a questi svantaggi, si adottano principalmente polimeri sintetici.

Tra tutti, il PLA, il poliglicolide (PGA) e i loro copolimeri, il polilattide-co-glicolide (PLGA) sono i più utilizzati per lo sviluppo di DDS a causa della loro biodegradabilità, biocompatibilità e facilità nella lavorazione. Questi polimeri sono stati utilizzati per la prima volta nella produzione di suture biodegradabili e in seguito si scoprì che avessero proprietà desiderabili per i dispositivi di rilascio controllato.

Il farmaco incapsulato all'interno della matrice polimerica viene rilasciato sfruttando la biodegradazione della macromolecola. Per tali polimeri, per massimizzare il controllo sul rilascio, è auspicabile che il sistema si degradi solo in superficie o non sull'intero volume (erosione di massa) [Fig. 1.26]. Attraverso quest'ultima, non si riuscirebbe a controllare la quantità di medicinale rilasciato.

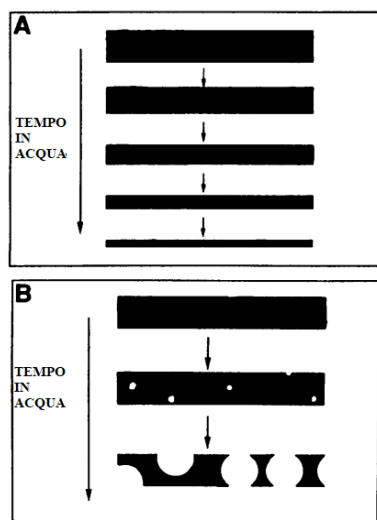


Figura 1.26 A) Erosione superficiale della nanoparticella polimerica in base al tempo in acqua; B) Erosione di massa della nanoparticella polimerica in base al tempo in acqua

Invece, per i sistemi caratterizzati da un'erosione superficiale, il tasso di rilascio del farmaco è proporzionale al tasso di erosione del polimero [53]. Pertanto, regolando lo spessore del sistema e il contenuto del farmaco, si può controllare la quantità di agente terapeutico emesso. I meccanismi di rilascio possono essere anche regolati dal peso molecolare del biopolimero utilizzato. Quanto esso è più alto quanto diminuisce il tasso di rilascio dell'agente terapeutico [54].

I progressi osservati nel campo scientifico, ha permesso l'ingegnerizzazione di materiali polimerici intelligenti capaci di degradarsi in risposta a stimoli esterni. Ad esempio, il *nanocarrier* si può degradare in seguito a variazioni locali di pH, di temperatura o della concentrazione degli enzimi nella zona tumorale. Oppure si possono applicare dei segnali esterni quali la luce, il laser, gli ultrasuoni o il campo magnetico [49].

Negli ultimi anni c'è stato un crescente interesse nell'utilizzo del PLA al fine di veicolare agenti infettivi o agenti antitumorali. Si è osservato che la degradazione del PLLA risulta essere troppo lenta ai fini di un'applicazione nel campo del *drug delivery*; invece, la forma sindiotattica risulta essere caratterizzata da una buona velocità di decomposizione e quindi si è candidato prepotentemente in questo settore [55]. Le nanoparticelle a base di PLA subiscono degradazione idrolitica in seguito alla scissione dei legami esterei liberando il loro contenuto. Pertanto, bisogna aspettarsi che il pH dell'ambiente in cui risulta essere disciolto il PLA riveste un ruolo importante nel meccanismo di rilascio. I prodotti di degradazione del PLA non alterano la normale funzione cellulare e vengono metabolizzati attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici.

Recentemente, la terapia genica ha attirato l'attenzione da parte dei ricercatori nella cura dei tumori. Questa terapia si basa nella correzione della funzione di un gene difettoso della cellula malata, mediante il trasferimento della versione corretta del gene. Tale trasferimento può essere indotto da un *nanocarriers* polimerico.

Ad esempio, Chen e collaboratori [56] hanno proposto per la cura del tumore alla prostata, di utilizzare il PLA al fine di veicolare al sito bersaglio dei geni silenziatori. Per favorire le interazioni con gli acidi nucleici (caratterizzati da cariche negative), la superficie del PLA viene innestata da ammine terziarie, conferendo una buona dose di carica positiva.

Uno dei principali problemi nell'utilizzo di tale poliestere riguarda il suo carattere idrofobico che favorisce tra le altre la fagocitosi indotta dai fagociti mononucleati. Per ovviare a tale problema, si cerca di rivestire il PLA con copolimeri a blocchi di natura anfifilica [5].

Le fibre di PLA ottenute per elettrofilatura presentano delle caratteristiche idonee affinché vengano utilizzati per la somministrazione di farmaci antitumorali, in particolare nelle operazioni post-chirurgiche e nella chemioterapia locale. In generale le fibre di PLA caricate con i farmaci possono essere ottenute tramite due distinte tecniche di elettrofilatura: *blend* e *coaxial*. Nel primo caso, i farmaci vengono miscelati con i polimeri e vengono elettrofilati insieme. Tipicamente questa tecnica permette di ottenere un DDS capace di rilasciare abbondantemente l'agente terapeutico nella fase iniziale. Ciò è ottimo per la somministrazione di antibiotici, invece non è ottimale per la somministrazione di altri farmaci. Invece, nell'elettrofilatura coassiale si ha la realizzazione di una fibra al cui interno vi è incapsulato l'agente terapeutico racchiuso da un guscio polimerico. Il medicinale può trovarsi sia allo stato solido che liquido e può essere rilasciato sfruttando processi diffusivi o di degradazione. He e collaboratori [57], a tal proposito, hanno realizzato una fibra di PLLA nella quale era incapsulato un antibiotico appartenente alla classe delle tetracicline.

Negli ultimi decenni si sta sempre più sviluppando l'utilizzo dei polimeri porosi come sistemi in grado di rilasciare in maniera controllata i medicinali. Rispetto ai materiali porosi inorganici, come le zeoliti, il carbonio poroso, la silice mesoporosa e i MOFs (*Metal organic frameworks*) i polimeri organici porosi offrono un'eccellente stabilità, un'elevata area superficiale specifica e una notevole facilità di funzionalizzazione, rendendoli adatti ad applicazioni avanzate. Sono dei materiali intelligenti in grado di rilasciare le molecole adsorbite in seguito alla presenza di determinati stimoli. Ad esempio, i polimeri contenenti gruppi acidi e basici possono rispondere ai cambiamenti di pH nell'ambiente, mentre quelli contenenti gruppi termo-reattivi, come il poli(N-isopropilacrilammide), sono sensibili alla temperatura e possono cambiare forma e microstruttura [58].

## 2 MATERIALI E METODI

### 2.1 MATERIALI

Per la preparazione dei film porosi a base di bioplastiche attraverso la tecnica dell'inversione di fase indotta da non solvente (NIPS) sono stati sfruttati diversi reattivi, che vengono elencati qui di seguito.

L'acido polilattico (PLA) utilizzato per la preparazione dei film porosi viene identificato con la seguente sigla commerciale "*PLA Luminy® LX175*" caratterizzato da una purezza stereochimica del 96% data dall'isomero L e da un peso molecolare ponderale di 245 kg/mol. Il PLA è stato acquistato dall'azienda Corbion N.V., ubicata ad Amsterdam, nei Paesi Bassi ed è venduto in pellet.

Il policaprolattone (PCL) utilizzato per la preparazione dei film porosi viene identificato con la seguente sigla commerciale "*Capa® 6500*" caratterizzato da un peso molecolare medio numerico di 50.000 g/mol e da un indice di fluidità di 7 g/10 min.

Il PCL è stato acquistato dall'azienda Perstorp AB, ubicata a Malmö, in Svezia ed è venduto in pellet.

L' N,N-dimetilformammide (o DMF) utilizzata come solvente nel processo NIPS, è stata acquistata dall'azienda Alfa Aesar®, ubicata nel Massachusetts, negli Stati Uniti.

Il Cyrene utilizzato come solvente nel processo NIPS è stato acquistato dall'azienda Sigma Aldrich, ubicata nel Missouri, negli Stati Uniti.

L'Astrobio utilizzato come solvente nel processo NIPS è stato acquistato dall'azienda Purmate srl, ubicata a Padova, in Italia.

Per la funzionalizzazione superficiale indotta dall'amminolisi sono stati impiegati i diversi reattivi elencati qui di seguito.

Il 2-propanolo, o meglio definito come isopropanolo, utilizzato come reattivo è stato acquistato dall'azienda Sigma Aldrich.

L'etilendiammina, utilizzato come reattivo è stato acquistato dall'azienda Sigma Aldrich.

Per la preparazione dei film densi, ottenuti tramite la tecnica del casting è stato adoperato come solvente il diclorometano (abbreviato in DCM) che è stato acquistato dall'azienda Sigma Aldrich.

Per le prove di accumulo nei confronti dei film porosi a base di PLA/PCL\_COOH sono stati utilizzati la Pararosanilina cloruro e la Fluoresceina sodica.

Per le prove di accumulo nei confronti dei film porosi a base di PLA/PCL e a base di PLA sono stati utilizzati i seguenti analiti: Acido mefenamico, Caffaina, Paraxantina,



Carbamazepina, Benzofenone-3, Ottil dimetil p-aminobenzoato, Etil esil metossi cinnamato, Octocrylene, Acido perfluoroottanoico, Perfluorottano solfonato, Acesulfame, Sucralosio, Bisfenolo A, Estrone,  $\beta$ -estradiolo,  $17\alpha$ -etinilestradiolo, Ibuprofene, Gemfibrozil, Triclosan, Ketoprofene, Naprossene, Diclofenac, Salbutamolo, Furosemide, Idroclorotiazide e Teofillina.

L'acqua ultrapura è stata ottenuta in laboratorio utilizzando un sistema Milli-Q Millipore (Watford, Regno Unito).

L'acido acetico e l'acetone nitrile sono stati testati come fasi cromatografiche e sono stati forniti da Sigma Aldrich.

E infine il metanolo, utilizzato come solvente, è stato fornito da Sigma Aldrich.

## **2.2 PREPARAZIONE DI FILM POROSI ATTRAVERSO IL METODO NIPS**

### **2.2.1 Film porosi a base di PLA e PLA/PCL**

Per l'ottenimento di membrane a base di PLA e PLA/PCL si è optato nella tecnica dell'inversione di fase indotta da non solvente. Si è deciso nel selezionare tale metodo in quanto quest'ultimo risulta essere di gran lunga il più versatile e il più vantaggioso grazie alla semplicità dell'operazione e alle elevate prestazioni della membrana risultante.

Come si è espresso nelle pagine precedenti, il processo NIPS richiede la presenza di almeno tre componenti: un polimero per determinare le proprietà della membrana, un solvente per solubilizzare la macromolecola e infine un non solvente per indurre la separazione di fase.

In un tipico processo NIPS, viene preparata inizialmente una soluzione polimerica che poi successivamente viene colata e stesa su di un supporto inerte per poi essere immersa in un bagno di non solvente.

Nel seguente lavoro di tesi si sono preparate diverse membrane utilizzando come polimero il PLA oppure un blend polimerico costituito dal PLA e PCL.

Per la realizzazione delle prime, si è partiti dalla preparazione di una soluzione polimerica, ottenuta dalla solubilizzazione di diverse quantità di acido polilattico in tre differenti solventi, ovvero il DMF, il cyrene o l'astrobio.

Più precisamente, sono stati realizzati ben dodici film porosi, di cui quattro ottenuti da una soluzione di PLA in DMF, gli altri quattro da una soluzione di PLA in cyrene e i restanti quattro da una soluzione di PLA in astrobio.

Ciascun quartetto è stato ottenuto a partire da soluzioni polimeriche a quattro concentrazioni differenti: 5, 10, 15, 20 utilizzando la percentuale massa su volume (% m/V) come riportato nella [Tab. 2.1].

*Tabella 2.1 Caratteristiche delle membrane a base di PLA*

<b>CODICE DEL CAMPIONE</b>	<b>TIPO DI SOLVENTE</b>	<b>CONCENTRAZIONE POLIMERICA [%m/V]</b>
PLA_5_DMF	DMF	5
PLA_10_DMF	-	10
PLA_15_DMF	-	15
PLA_20_DMF	-	20
PLA_5_CYR	CYRENE	5
PLA_10_CYR	-	10
PLA_15_CYR	-	15
PLA_20_CYR	-	20
PLA_5_ASTRO	ASTROBIO	5
PLA_10_ASTRO	-	10
PLA_15_ASTRO	-	15
PLA_20_ASTRO	-	20

La solubilizzazione è avvenuta all'interno di una beuta immersa in un bagno ad olio siliconico posto a una temperatura di circa 80°C. A solubilizzazione completa, il contenuto della beuta è stato immediatamente versato su di un supporto vetroso e spalmato con una lama per livellare e formare un film di altezza definita.

Successivamente l'intero sistema è stato immerso in un bagno di acqua deionizzata che fungeva da non solvente, per mezz'ora a temperatura ambiente.

Terminati i 30 minuti, al fine di rimuovere l'eccesso di solvente intrappolato nel sistema poroso, i film sono stati lavati immergendoli in un altro bagno di acqua deionizzata per un'ora. Quest'ultima operazione è stata ripetuta per ben tre volte, ovviamente cambiando il bagno di coagulazione tra una manovra e l'altra.

Portati a termine le azioni precedentemente descritte, si è conclusa la procedura immergendo il film poroso in un ultimo bagno di acqua deionizzata per altre 12 ore.

In seguito alle ripetute prove di lavaggio, il prodotto ottenuto è stato fatto asciugare a temperatura ambiente per circa 24 ore e trascorse ciò, è stato posto in un forno sottovuoto per un altro giorno [Fig. 2.1].

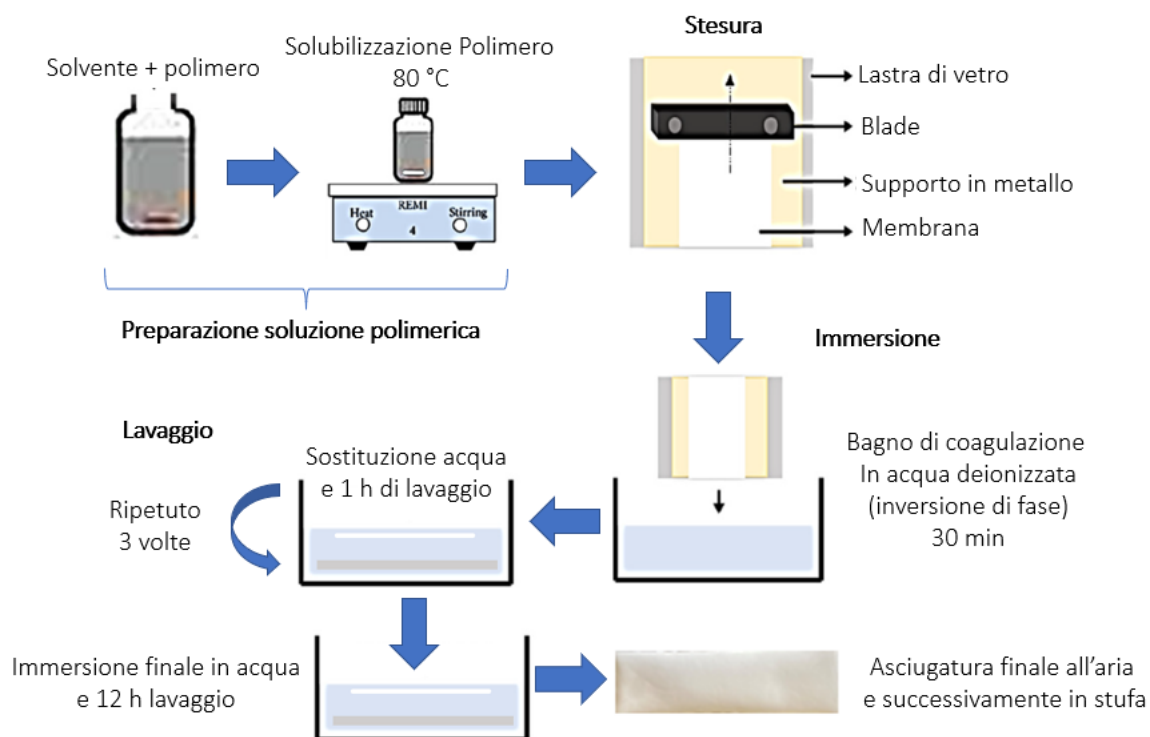


Figura 2.1 Procedura per la realizzazione di un film poroso tramite il metodo NIPS

La temperatura della soluzione al momento della colata è un parametro importante che controlla il processo termodinamico dell'inversione di fase. Secondo gli studi condotti da Zheng e collaboratori [59], un aumento della temperatura porta a una diminuzione della viscosità della soluzione polimerica e ad un conseguente aumento della miscibilità solvente-non solvente. E inoltre hanno anche dimostrato che il tempo di formazione della membrana veniva ridotto in modo significativo all'aumentare della temperatura di solubilizzazione. Questi sono i motivi per i quali, si è cercato di ridurre il più possibile il tempo tra la solubilizzazione completa e la successiva colata al fine di evitare la dissipazione del calore e il successivo calo di temperatura.

Le membrane costituite dal solo PLA sono note per la loro elevata fragilità: un approccio che viene effettuato per risolvere tale problema consiste nella miscelazione con i polimeri duttili come il PCL.

Nel seguente lavoro di tesi, sono state sintetizzate anche delle membrane a base di PLA/PCL, per la cui preparazione è stata scelta una concentrazione di soluzione polimerica del 10% (m/V) adoperando come solvente il DMF; dal momento che tale concentrazione consente lo sviluppo di film con migliori caratteristiche di rigidità-tenacità-porosità, come riportato da Damonte e collaboratori [60].

Sono state ottenute tre diverse membrane a partire da 3 differenti soluzioni polimeriche delle quali variavano solo la composizione del blend polimerico: in una il rapporto PLA/PCL era 95:5 (ovvero il 95% del blend era PLA e il restante PCL), nell'altra il rapporto era 90:10 e nell'ultima 80:20 [Tab. 2.2].

Si sono seguiti i medesimi dettagli affrontati per le membrane a base di PLA al fine di ottenere delle membrane a base di PLA/PCL.

*Tabella 2.2 Caratteristiche delle membrane a base di PLA/PCL*

<b>CODICE DEL CAMPIONE</b>	<b>SOLVENTE</b>	<b>PLA</b>	<b>PCL</b>
PLA_PCL_95_5	DMF	95%	5%
PLA_PCL_90_10		90%	10%
PLA_PCL_80_20		80%	20%

### **2.2.2 Film porosi a base di PLA/PCL\_COOH**

Al fine di migliorare la compatibilità con il PLA, favorire le interazioni con determinate molecole e aumentare l'allungamento a rottura [61], nel seguente lavoro di tesi si sono preparate diverse membrane a partire da un blend polimerico costituito dal PLA e da un polimero a base PCL a forma di stella identificato con la sigla PCL\_COOH.

Un polimero a forma di stella è una macromolecola ramificata avente un singolo punto di diramazione (nucleo) da cui si sviluppano diverse catene lineari definite come braccia.

Nel caso del PCL\_COOH si ha la presenza di un sistema polimerico a forma di stella a quattro punte (quindi ci sono quattro braccia) dove ciascuna terminazione è caratterizzata da un gruppo funzionale carbossilico. Ciascuna ramificazione è contraddistinta da un peso molecolare di circa 2000 g/mol.

La sintesi del PCL\_COOH è stata ottenuta mediante l'esterificazione di un altro polimero a stella a quattro braccia (PCL\_OH), nel quale ciascuna terminazione è caratterizzata da un gruppo funzionale ossidrilico, con l'anidride maleica.

La sintesi del PCL\_OH è stata ottenuta sfruttando la polimerizzazione ad apertura di anello dell' $\epsilon$ -caprolattone utilizzando pentaeritritolo come iniziatore e stagno 2-etilesanoato come catalizzatore [61] [Fig. 2.2].

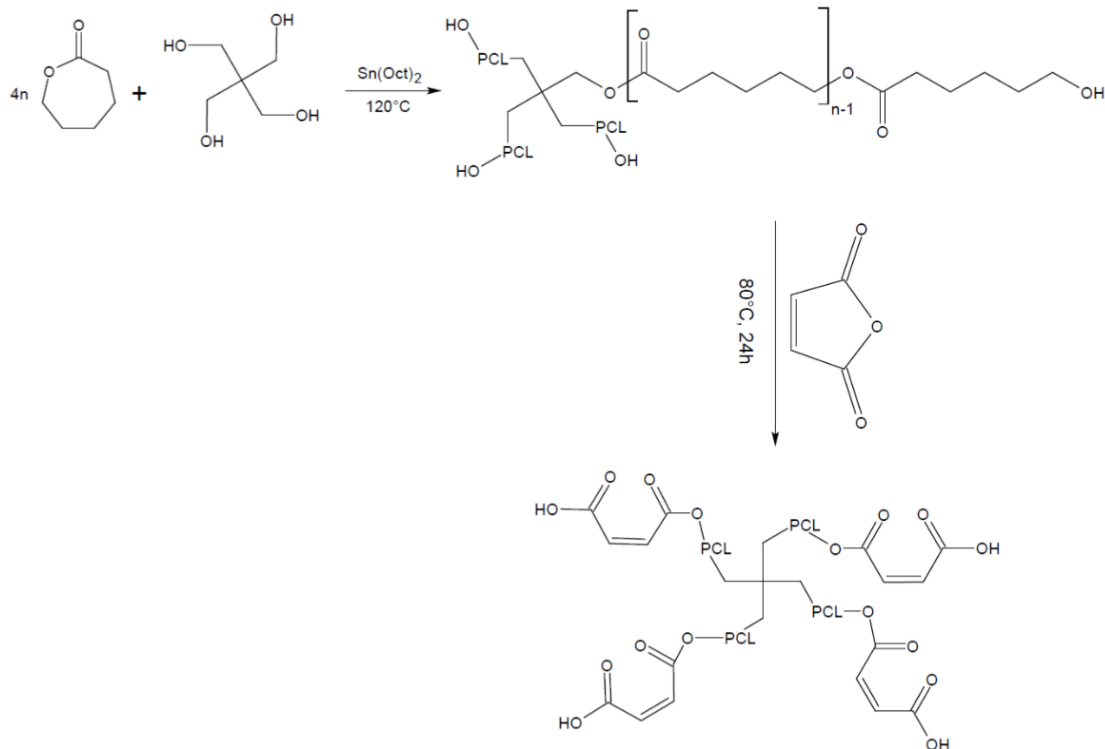


Figura 2.2 Meccanismo di reazione del PCL\_COOH a partire dal PCL\_OH

Analogamente, anche in questo caso, si è sfruttato il processo NIPS per ottenere le strutture porose. Più precisamente sono state realizzate otto membrane di cui quattro preparate a partire da una soluzione polimerica il cui solvente era il cyrene, invece le restanti quattro a partire dal DMF. Per tutte le membrane è stata scelta una concentrazione di soluzione polimerica del 10% (m/V) adoperando come solvente il DMF o il cyrene.

Ciascun quartetto è stato ottenuto a partire da 4 differenti soluzioni polimeriche delle quali variavano solo la composizione del blend polimerico: in una il rapporto PLA/PCL\_COOH era 95:5 (ovvero il 95% del blend era PLA e il restante PCL\_COOH), nell'altra il rapporto era 90:10, nella terza 85:15 e nell'ultima 80:20 [Tab. 2.3].

Tabella 2.3 Caratteristiche delle membrane a base di PLA/PCL\_COOH

CODICE DEL CAMPIONE	TIPO DI SOLVENTE	CONTENUTO DEL PCL_COOH (%)
PLA_PCL_COOH_95_5_DMF	DMF	5
PLA_PCL_COOH_90_10_DMF	-	10
PLA_PCL_COOH_85_15_DMF	-	15
PLA_PCL_COOH_80_20_DMF	-	20
PLA_PCL_COOH_95_5_CYR	CYRENE	5
PLA_PCL_COOH_90_10_CYR	-	10
PLA_PCL_COOH_85_15_CYR	-	15
PLA_PCL_COOH_80_20_CYR	-	20

### 2.3 PREPARAZIONE DI FILM DENSI A BASE DI PLA

Per la preparazione di film densi a base di PLA si è sfruttata la tecnica del *casting*. Consiste nella deposizione di una determinata quantità di una soluzione polimerica su di un substrato e nell'evaporazione del solvente che lascia un sottile strato di film denso solido polimerico. Si è deciso di applicare tale metodo in quanto quest'ultimo risulta essere di gran lunga il più versatile e il più vantaggioso grazie alla semplicità dell'operazione e al ridotto uso dei reattivi. Più precisamente, per la realizzazione di un film a base di PLA sfruttando il metodo del casting, si è partiti dalla preparazione di una soluzione polimerica ottenuta dalla solubilizzazione di 200 mg di PLA e 10 mL di DCM.

La solubilizzazione è facilitata ponendo la beuta su di un agitatore magnetico a temperatura ambiente. In seguito, la soluzione è stata versata all'interno di una capsula di Petri che darà la forma al film e il tutto è stato introdotto all'interno di una stufa posta a 30 °C per 24 ore. Il giorno successivo, al fine di rimuovere l'eccesso di solvente presente nel film denso, quest'ultimo si è lasciato ad asciugare all'aria per ulteriori 24 ore [Fig. 2.3].



*Figura 2.3 Film di PLA ottenuto tramite il casting*

## **2.4 FUNZIONALIZZAZIONE SUPERFICIALE MEDIANTE AMMINOLISI**

Dalle membrane a base di PLA e quelle a base di PLA/PCL ottenute tramite il metodo NIPS, si ricavano delle porzioni rettangolari di dimensioni 2 cm x 1 cm che poi saranno soggette all'amminolisi.

Come si è descritto precedentemente, l'amminolisi è un metodo di funzionalizzazione superficiale permanente, conveniente e versatile utile per introdurre gruppi amminici o altri gruppi funzionali sulla superficie del poliestere, che possono essere siti di innesto per altre molecole. Consiste di una reazione di sostituzione nucleofila indotta da un'ammina nei confronti di un gruppo estereo.

Poiché il nucleofilo (ammina) si attacca al carbonio (estereo) dal lato opposto del gruppo uscente, sostituenti ingombranti legati all'azoto rendono più difficile la sostituzione nucleofila rendendo più lenta la reazione. Quest'ultimo non è solo l'unico fattore che influenza l'andamento cinetico dell'amminolisi in quanto quest'ultima è anche legata dalla forza del nucleofilo [62]. Generalmente delle basi forti stericamente poco impedito sono degli ottimi nucleofili [63].

Per questi motivi, per indurre l'amminolisi nei confronti dei poliesteri, si è utilizzato l'etilendiammina come nucleofilo e l'isopropanolo come solvente.

Tra le ammine primarie più comuni, l'etilendiammina è un composto lineare bifunzionale caratterizzato da un valore di pKa di 10.06, nel quale il gruppo amminico è legato a un gruppo alchilico che funge da elettrone-donatore.

L'amminolisi è stata condotta ponendo ciascuna porzione di membrana all'interno di un contenitore ermetico nel quale vengono introdotti 5 mL di isopropanolo e il tutto viene messo a roteare sfruttando il campo magnetico di un agitatore per cinque minuti.

Passato il tempo previsto, la membrana viene prelevata dall'involucro e successivamente viene immersa in una soluzione al 10% in volume di etilendiammina in isopropanolo all'interno di un altro contenitore ermetico sottoponendola contemporaneamente ad agitazione per trenta minuti.

Infine, si estrae il film dal contenitore per poi lavarlo in isopropanolo, prima per cinque minuti e poi per un'ora, cambiando il bagno di lavaggio sempre con altro isopropanolo.

## **2.5 PROVE DI ADSORBIMENTO CON LA FLUORESCEINA SODICA**

Da un film poroso, ottenuto tramite il metodo NIPS, si ricavano delle porzioni di diametro pari a 6 mm. Tre di essi vengono immerse in una soluzione di fluoresceina in acqua ultra pura a una concentrazione pari a 5  $\mu\text{M}$  per un tempo di 24 ore. Al termine del tempo di accumulo, la soluzione viene analizzata tramite spettroscopia UV-VIS in un intervallo di lunghezza d'onda di 300-600 nm. Per quantificare la concentrazione di fluoresceina in soluzione si costruisce una retta di calibratura: a partire da una soluzione madre vengono effettuate delle diluizioni per ottenere soluzioni a concentrazioni note pari a 0.5, 1, 5 e 10  $\mu\text{M}$ . Se si riporta in grafico la risposta strumentale (assorbanza) nell'asse delle ordinate in funzione delle concentrazioni note degli analiti nell'asse dell'ascisse, si ottiene una funzione chiamata curva di calibratura. Quest'ultima, per un gran numero di tecniche analitiche, è caratterizzata da una linearità tra le due variabili. Tale andamento viene confermato facendo passare una linea di tendenza ovvero una retta corrispondente alla funzione lineare che meglio approssima i punti sperimentali.

Nel seguente caso, la linea di tendenza mostra una relazione tra assorbanza e concentrazione secondo l'equazione (2.2):

$$y = mx + q \quad (\text{equazione 2.2})$$

con  $m$  pari a 0.0273,  $q$  pari a 0.0535 e con un coefficiente di determinazione  $R^2$  pari a 0.985769. Quest'ultimo indice misura il legame tra l'andamento dei punti sperimentali e la correttezza della linea di tendenza utilizzata. Quanto più il coefficiente di determinazione tende ad uno quanto il modello statistico utilizzato approssima esattamente l'andamento sperimentale.

## **2.6 EFFETTO MATRICE E PROVE DI ACCUMULO**

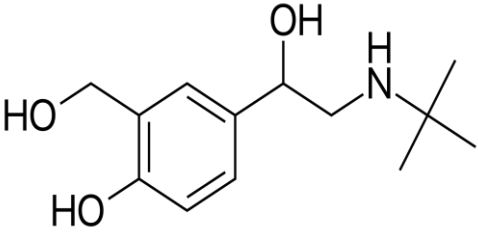
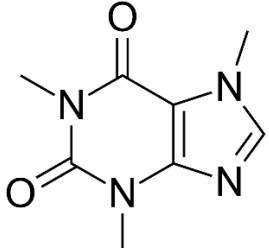
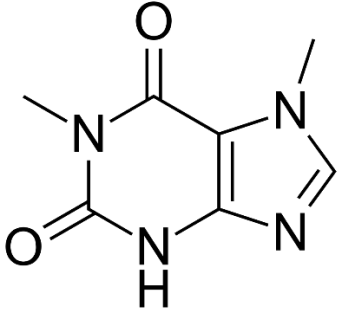
Per dimostrare l'eventuale applicabilità dei film polimerici porosi come campionatori passivi capaci di adsorbire determinanti contaminanti, si sono effettuati una serie di esperimenti che

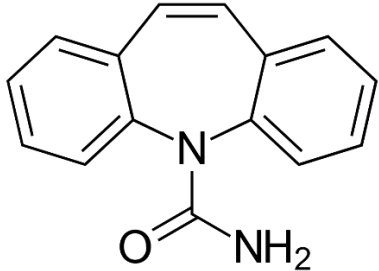
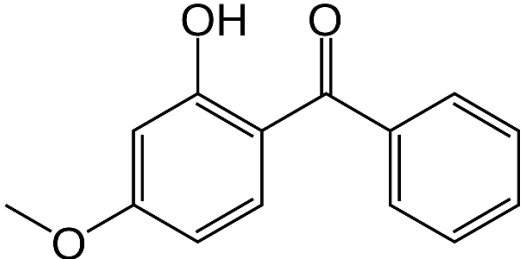
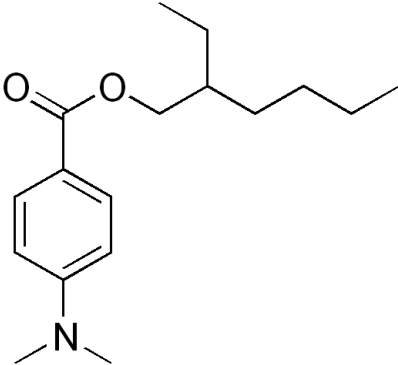
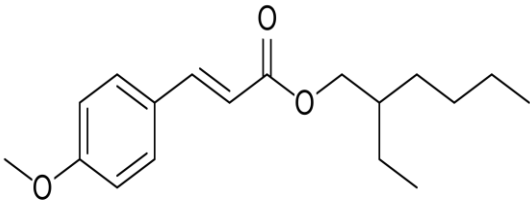
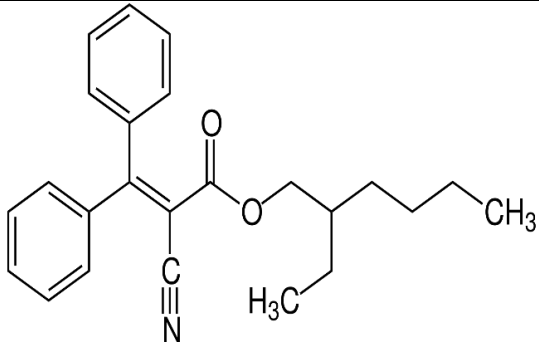
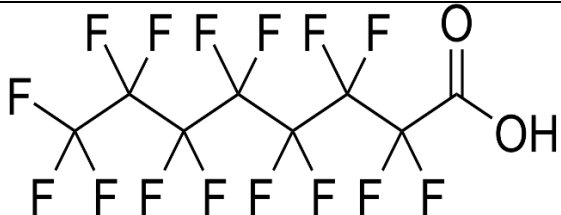


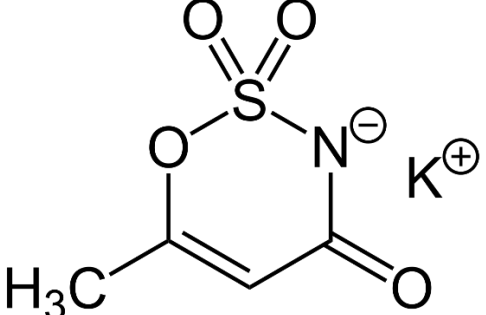
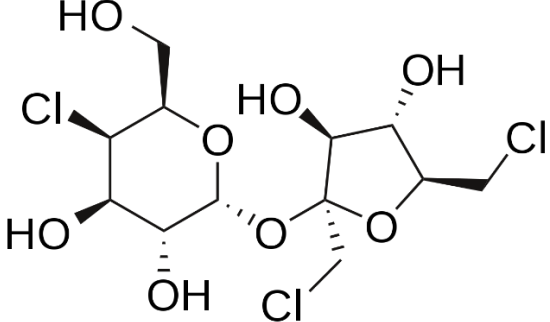
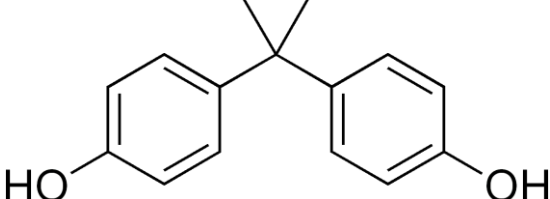
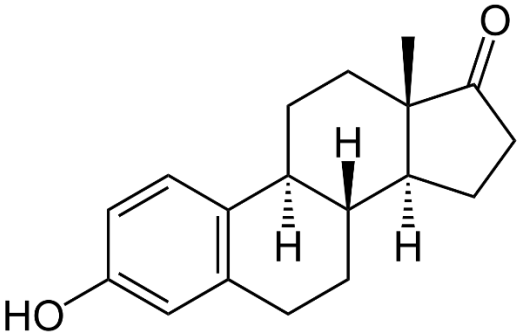
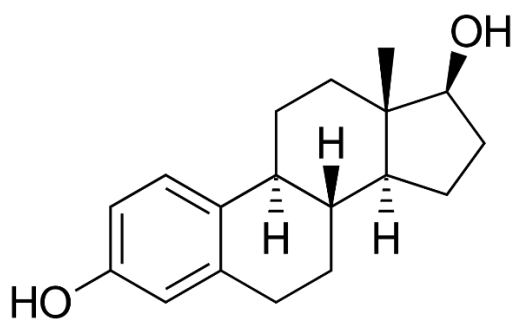
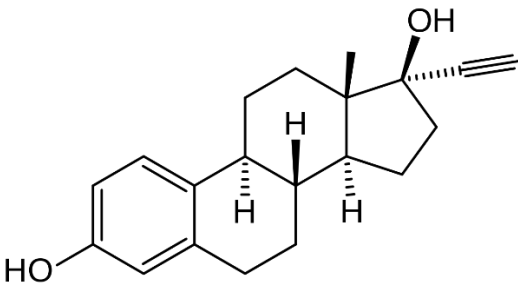
mirano a verificare diversi aspetti della procedura analitica, come: la presenza dell'effetto matrice e l'accumulo di analiti sui film polimerici. L'effetto matrice è quell'effetto in cui la matrice, quindi tutto ciò che è presente in soluzione escluso l'analita, può influenzare la ionizzazione degli analiti durante l'analisi tramite il cromatografo liquido ad elevate prestazioni accoppiato allo spettrometro di massa a triplo quadrupolo (HPLC-MS-QQQ) e quindi portare ad un possibile errore nella sua determinazione quantitativa.

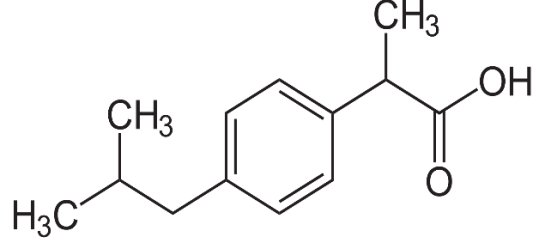
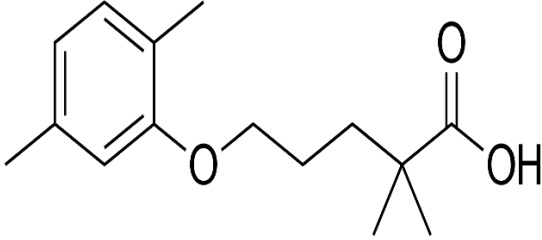
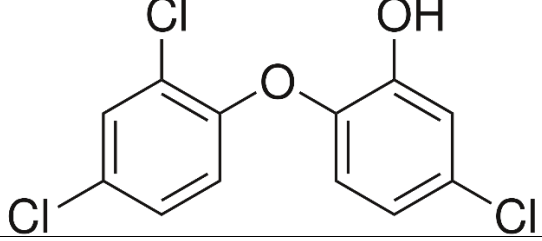
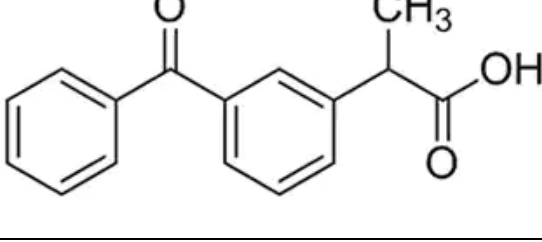
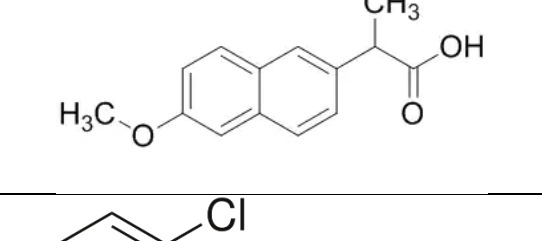
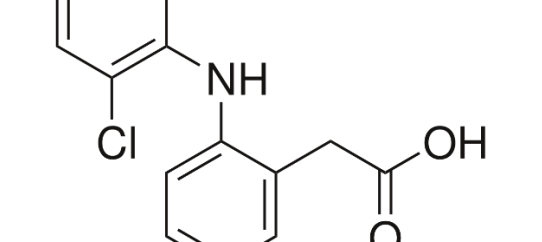
In questo lavoro di tesi, si è valutato se le sostanze eventualmente rilasciate dalla membrana potessero provocare un effetto matrice, portando a un incremento o un decremento del segnale analitico. Più precisamente nel seguente lavoro di tesi, sono stati considerati come analiti 22 sostanze, appartenenti al gruppo di contaminanti detti "emergenti", perché non ancora normati dalla legislazione vigente e la cui tossicità è tuttora in fase di studio [Tab. 2.4].

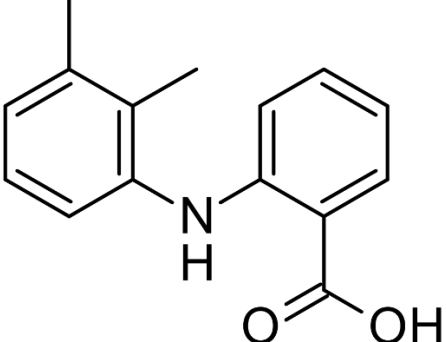
Tabella 2.4 Elenco dei 22 analiti utilizzati nei processi di campionamento

COMPOSTO	APPLICAZIONE	STRUTTURA CHIMICA
Salbutamolo	Farmaco broncodilatatore	
Caffeina	Alcaloide naturale	
Paraxantina	Metabolita della caffeina	

Carbamazepina	Farmaco antiepilettico	
Benzofenone-3	Filtro UV	
Otil dimetil p-amminobenzoato	Filtro UV	
Etil esil metossi cinnamato	Filtro UV	
Octocrylene	Filtro UV	
Acido perfluorooctanoico (PFOA)	Applicazioni in campo tessile	

<p>Acesulfame K (ACE K)</p>	<p>Dolcificante artificiale</p>	
<p>Sucralosio</p>	<p>Dolcificante artificiale</p>	
<p>Bisfenolo A</p>	<p>Additivo nella produzione di materie plastiche</p>	
<p>Estrone</p>	<p>Estrogeno</p>	
<p><math>\beta</math>-estradiolo</p>	<p>Estrogeno</p>	
<p>17<math>\alpha</math>-etinilestradiolo</p>	<p>Estrogeno</p>	

Ibuprofene	Farmaco analgesico, antiinfiammatorio e antipiretico	
Gemfibrozil	Farmaco ipolipidemizzante	
Triclosan	Antibatterico	
Ketoprofene	Farmaco antiinfiammatorio	
Naprossene	Farmaco antiinfiammatorio	
Diclofenac	Farmaco antiinfiammatorio	

Acido mefenamico	Farmaco analgesico, antiinfiammatorio e antipiretico	
------------------	--	--

L'effetto matrice viene determinato sottoponendo il campione alla procedura di analisi, di seguito descritta.

- 1) Per prima cosa i film porosi sono soggetti a due processi di lavaggio immergendo inizialmente i campioni in un bagno di un solvente alcolico (metanolo o isopropanolo) e poi successivamente in acqua ultra pura. Il primo lavaggio è durato 15 minuti per lato e invece il secondo 30 minuti per lato e sono stati intervallati da un'asciugatura all'aria.
- 2) Successivamente i campioni sono sottoposti all'applicazione di 20 µL di metanolo per simulare il drogaggio che verrà effettuato con la soluzione di analiti durante le prove di accumulo.
- 3) Quindi, terminato il tempo di 60 minuti necessario per l'asciugatura del campione, sono stati effettuati due processi di estrazione con 5 mL di metanolo, il risultato è stato trasferito in un pallone per poi essere portato a secco dal rotavapor.
- 4) Infine, il residuo dell'evaporazione è stato ripreso con 1 mL di metanolo, filtrato e trasferito in un becker.
- 5) La soluzione è stata diluita con una miscela equimolare di acqua e metanolo in un rapporto di diluizione pari a 1:5. Successivamente la soluzione è stata trasferita in una fiala pronta ad essere analizzata tramite un cromatografo liquido ad elevate prestazioni accoppiato allo spettrometro di massa a triplo quadrupolo (HPLC-MS-QQQ).

Applicando la metodica sopra descritta si ottiene una soluzione che costituisce quindi il bianco procedurale. A partire da una quantità del bianco procedurale, si aggiunge una certa percentuale di soluzione (spike) contenenti tutti gli analiti ad una determinata concentrazione (questo saggio viene definito come "campione spike post trattamento").

Infine, si è analizzata anche una soluzione standard avente la stessa concentrazione di analiti introdotti nella fiala precedente. Per calcolare l'effetto matrice (ME) si è fatto riferimento alla seguente equazione (2.3):

$$ME (\%) = \frac{A_{SA} - A_{NS}}{A_{STD}} \cdot 100 \quad \text{equazione 2.3}$$

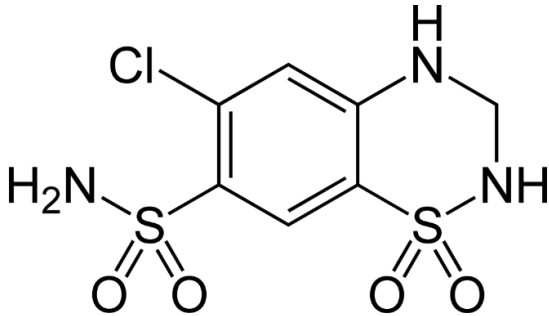
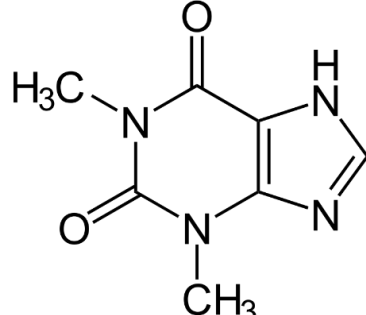
dove  $A_{SA}$  rappresenta l'area del picco cromatografico di ciascun analita presente nel saggio definito come "campione spike post trattamento",  $A_{NS}$  rappresenta l'area del picco cromatografico di ciascun analita della soluzione del bianco di riferimento e  $A_{STD}$  rappresenta l'area del picco cromatografico di ciascun analita della soluzione standard. Da questa espressione si deduce facilmente che più il valore ME si avvicina al 100%, maggiore è l'accuratezza. Più precisamente, l'effetto matrice per ciascun analita dovrebbe essere in un intervallo di  $\pm 20$  dal valore del 100%. Quindi se un analita presentasse un valore di effetto matrice maggiore del 120% o minore dell'80%, allora la membrana modificherebbe le caratteristiche chimico-fisiche di tale analita provocando un'alterazione del suo segnale in cromatografia. Più precisamente un valore maggiore del 120% provoca un incremento del segnale vero; invece, un valore minore dell'80% provoca un suo decremento.

Per determinare la quantità di analiti che viene effettivamente adsorbita dalla membrana si sono effettuate delle prove di accumulo. Quest'ultime consistono semplicemente nell'immersione dei campioni in una soluzione acquosa caratterizzata dalla presenza di una determinata quantità di contaminanti per un determinato tempo (in questo caso quattro giorni). Più precisamente per simulare il valore del pH di un tipico ambiente acquoso marino, i campioni sono stati immersi in una soluzione di acqua ultra pura a un valore di pH pari a 8, ottenuto a partire da un sistema tamponante costituito da acetato d'ammonio e idrossido di sodio.

Per le prove di accumulo, oltre ai 22 analiti già citati, sono stati aggiunti altri tre sostanze, anch'essi appartenenti alla classe dei contaminanti emergenti [Tab. 2.5].

Tabella 2.5 Elenco dei tre analiti aggiunti per le prove di accumulo

COMPOSTO	APPLICAZIONE	STRUTTURA CHIMICA
Furosemide	Diuretico	

Idroclorotiazide	Diuretico	
Teofillina	Alcaloide naturale	

Le misure di accumulo sono state effettuate sottoponendo i campioni alla seguente procedura di analisi, descritta di seguito.

A partire da un film poroso, si ottengono delle porzioni rettangolari di dimensioni 2 cm x 1 cm, tutti forati con un apposito strumento. Il buco viene sfruttato per fissare ciascuna porzione di membrana su di un supporto metallico per poi essere messo a bagno in una soluzione di acqua ultra pura a pH 8, nella quale viene aggiunto uno spike di ciascun analita al fine di ottenere una soluzione a una concentrazione finale di 10 mg/l. Il becker, nel quale viene messo la soluzione, viene sottoposto ad agitazione per quattro giorni.

Per quantificare effettivamente gli analiti che vengono adsorbiti dalle membrane, quest'ultime in seguito alle prove di accumulo, vengono sciacquate con l'acqua ultra pura per poi essere immerse in 10 mL di metanolo. L'alcool agisce come solvente utile per estrarre dai campioni tutti le sostanze che hanno interagito nelle prove di accumulo. Più precisamente tale procedimento è stato ripetuto due volte, per garantire maggiore accuratezza, e il risultato di essi viene trasferito in un pallone per poi essere portato a secco dal rotavapor. Il risultato dell'evaporazione è stato ripreso con 1 mL di metanolo per poi filtrarlo e trasferirlo in una fiala pronta ad essere analizzata tramite HPLC-MS-QQQ.

## 2.7 PROVE DI ADSORBIMENTO CON LA PARAROSANILINA CLORURO

Da un film poroso, ottenuto tramite il metodo NIPS, si ricava una porzione cilindrica di diametro pari a 1 cm. Quest'ultima viene immersa in una soluzione di pararosanilina cloruro

in acqua ultra pura ad una concentrazione pari a 5 µg/ml per un tempo di 24 ore. Al termine del tempo di accumulo, la soluzione a contatto con il campione viene analizzata tramite spettroscopia UV-VIS in un intervallo di lunghezza d'onda di 300-600 nm. Per quantificare la concentrazione di pararosanilina adsorbita dal campione si fa riferimento alla costruzione di una retta di calibratura. Si preparano una serie di soluzioni standard a concentrazioni note pari a 0.5, 1, 2, 5, 10 µg/ml a partire da una soluzione madre ad una concentrazione di 100 µg/ml. Gli standard vengono usati per definire una funzione di calibrazione dello strumento, che si ottiene mettendo in relazione la risposta dello strumento (assorbanza) in funzione delle concentrazioni note degli standard. Di ciascuna soluzione, analizzando lo spettro di assorbimento, si identifica il massimo di assorbanza. Successivamente, si riporta in un grafico l'assorbanza massima in funzione delle concentrazioni note degli analiti, per ottenere una curva di calibrazione, o anche chiamata curva di lavoro. Quest'ultima, per un gran numero di tecniche analitiche, mostra una linearità tra le due variabili. Tale andamento viene confermato, facendo passare una linea di tendenza ovvero una retta corrispondente alla funzione lineare che meglio approssima i punti sperimentali.

Nel seguente caso, la linea di tendenza mostra una relazione tra assorbanza e concentrazione secondo l'equazione (2.4):

$$y = mx + q \quad (\text{equazione 2.4})$$

con m pari a 0.21758, q pari a 0.02848 e un coefficiente di determinazione  $R^2$  pari a 0.99769.

## 2.8 TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE

### 2.8.1 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Il microscopio elettronico è uno strumento che permette di ottenere informazioni morfologiche e strutturali di un campione in seguito all'emissione di un fascio di elettroni, anziché di fotoni come in un microscopio ottico. La risoluzione raggiunta da un microscopio elettronico risulta essere maggiore rispetto a quello ottico in quanto i fotoni che compongono un raggio di luce possiedono una lunghezza d'onda maggiore rispetto a quella degli elettroni. Nel seguente lavoro di tesi si è utilizzato un particolare modello del SEM (*Scanning electron microscope*), prodotto dall'azienda Zeiss®, identificato con il nome commerciale "Zeiss Supra 40VP".

Il fascio elettronico non viene generato tramite effetto termoionico (riscaldando un filamento di tungsteno o di esaboruro di lantanio) ma grazie all'applicazione di un forte campo elettrico sulla punta del filamento che abbassa la funzione lavoro del metallo e permette l'emissione



di un'alta corrente elettronica (definito come emettitore di campo Schottky). Il solo effetto termoionico permette agli elettroni di raggiungere esigue energie di pochi eV.

L'emettitore di campo Schottky è stato sviluppato per superare i punti deboli degli emettitori tramite effetto termoionico, pur mantenendo i suoi punti di forza che sono l'elevata luminosità e la bassa diffusione di energia. Gli elettroni che vengono raccolti dal rivelatore provengono da un'area di emissione circa cento volte maggiore di quella dell'emettitore termoionico producendo una corrente di circa cinquanta volte superiore [64].

Il microscopio in dotazione è caratterizzato da un obiettivo GEMINI®, che è capace di acquisire tutti i segnali emessi dal campione, ma presenta in particolare un'elevata efficienza nell'acquisizione degli elettroni secondari e degli elettroni retrodiffusi.

Nel seguente lavoro di tesi, per osservare le sezioni trasversali al SEM, la membrana viene prima fratturata alla temperatura dell'azoto liquido (circa  $-200^{\circ}\text{C}$ ), quindi fissata perpendicolarmente al portacampione. Tutti i campioni sono stati rivestiti di carbonio sfruttando il processo di deposizione sputtering attraverso il Polaron E5100.

### **2.8.2 Angolo di contatto ( $\theta$ )**

L'angolo di contatto ( $\theta$ ) è un parametro fisico utilizzato per definire la bagnabilità di un composto o di un materiale allo stato solido rispetto ad un liquido, definito come liquido bagnante.

Sulla base dell'angolo di contatto viene costruita una classificazione: un materiale si dice facilmente bagnabile (o idrofilo, se il liquido bagnante è l'acqua) quando l'angolo di contatto è compreso tra  $0^{\circ}$  e  $90^{\circ}$ ; è perfettamente bagnabile se l'angolo è, o rasenta, gli  $0^{\circ}$ ; è difficilmente bagnabile (o idrofobo) se l'angolo è compreso tra  $90^{\circ}$  e i  $180^{\circ}$  [65].

Come suggerito da Lazghab e collaboratori [66], esistono molti più metodi per determinare  $\theta$ : per questo lavoro di tesi si applica il metodo della goccia sessile, dove una goccia di liquido (acqua) viene adagiata su un supporto solido e si ha l'acquisizione ottica del suo profilo.

È stato sfruttato un misuratore di angolo di contatto prodotto dall'azienda Nordtest, identificato con il nome commerciale "Attension".

Su un lato dello strumento è presente una telecamera con focus, zoom manuale e con ottima risoluzione; essa ha la possibilità di eseguire sia piccoli filmati che singoli frame. È dotata inoltre di un'illuminazione LED che ha lo scopo di eliminare l'aberrazione cromatica formata dai raggi luminosi che colpiscono la goccia.

La telecamera acquisisce le immagini della goccia che viene depositata sul campione, che si trova su di un supporto piano dotato di un meccanismo capace di rendere possibile il suo movimento orizzontalmente o verticalmente. Sopra a quest'ultima è collocata un braccio meccanico in cui è possibile inserire una siringa che è gestita, attraverso alcuni collegamenti, da un software che, permette di erogare una quantità precisa di liquido.

Una volta catturata l'immagine della goccia che risiede sul nostro substrato solido, il software sfrutta un algoritmo basato sull'equazione di Young per ottenere un fitting accurato del profilo della goccia che, in base alle caratteristiche del liquido usato, calcolerà il valore dell'angolo di contatto.

### **2.8.3 Reometro Brookfield**

In questo lavoro di tesi si è sfruttato un viscosimetro identificato con il nome commerciale "Brookfield modello DV-II+", prodotto dall'azienda Brookfield Engineering®. È un reometro rotazionale, nel quale il rotore (spindle) è immerso nel fluido in esame. Tramite un programma computazionale si impone una determinata velocità angolare con la quale il rotore si muove e si misura il momento torcente necessario per farlo ruotare in maniera costante. Attraverso il rapporto tra il momento torcente e la velocità angolare e facendo uso della costante di calibrazione si ricava la viscosità. È un reometro che fornisce una misura rigorosa della viscosità per i fluidi newtoniani ma valori indicativi per i fluidi non-newtoniani.

A partire dalla soluzione polimerica posta a 80°C cui si vuole determinare la viscosità, se ne preleva una quantità di circa 8 ml e vengono introdotti all'interno di una camera sulla quale viene aggiunta la girante. Tramite un software è stato impostato il programma di misura nel quale si prefissano determinati valori di velocità rotazionali necessari per lavorare all'interno del regime newtoniano.

### **2.8.4 Spettroscopia UV-VIS**

Per il lavoro di questa tesi si è utilizzato uno spettrofotometro identificato dal nome commerciale "Shimadzu UV-1800" prodotto dall'azienda Shimadzu®.

Come la maggior parte degli spettrofotometri esso è costituito [67]: da una sorgente di energia radiante, rappresentata nel caso dello Shimadzu da una lampada a deuterio e una a tungsteno/alogeno, da un filtro che seleziona un determinato intervallo di lunghezza d'onda, da due contenitori per il campione, da un fotodiodo a base di silicio che converte l'energia

radiante in un segnale elettrico misurabile e infine da un processore e da un registratore del segnale.

Più precisamente lo Shimadzu UV-1800 è uno spettrofotometro a doppio raggio in quanto vengono emesse due radiazioni elettromagnetiche: un raggio attraversa la soluzione di riferimento fino al fotodiodo e invece il secondo attraversa la cuvetta nella quale c'è il campione per poi andare a finire in un secondo fotodiodo. Tramite un software, si determina il rapporto dei segnali ricevuti dai due fotodiodi.

Prima di iniziare la misurazione, con i portacampioni vuoti, bisogna aspettare circa venti minuti affinché venga effettuato un controllo delle componenti interne dello strumento ed è necessario eseguire un'analisi del bianco in modo tale da sottrarlo successivamente dagli spettri ottenuti. Tale misura è stata effettuata su due cuvette, aventi un cammino ottico di 0.2 cm, contenenti solo il riferimento, ovvero il solvente utilizzato per preparare la soluzione del campione da analizzare.

Il bianco serve a ottenere un'indicazione di quanto analita giunga da fonti esterne; ciò è indispensabile per calcolare i limiti di rivelabilità e di quantificazione. Serve anche a individuare eventuali contaminanti presenti nel laboratorio o accidentalmente aggiunti dall'operatore e a valutare il livello di pulizia delle attrezzature e del laboratorio in generale. Terminata la misurazione, viene svuotata la cuvetta nella postazione vicina all'operatore e successivamente viene riempita fino ai  $\frac{4}{5}$  della sua altezza con la soluzione soggetta in esame.

### **2.8.5 Il cromatografo liquido ad elevate prestazioni accoppiato allo spettrometro di massa a triplo quadrupolo (HPLC-MS-QQQ)**

Le analisi effettuate nel corso del lavoro di tesi hanno richiesto, per via delle concentrazioni molto basse e della complessità della matrice trattata, una sensibilità e una selettività raggiungibili solamente tramite l'accoppiamento di un cromatografo con la spettroscopia MS-MS. La cromatografia liquida è una tecnica che permette la separazione dei componenti di una miscela sfruttando la distribuzione di quest'ultimi tra due fasi, chiamate fase mobile (di natura liquida) e fase stazionaria (di natura solida). Più precisamente si è fatto riferimento a uno strumento identificato dal nome commerciale "Serie 1200" prodotto dall'azienda Agilent®.

Invece lo spettrometro di massa è una tecnica applicata nell'identificazione di campioni sfruttando la ionizzazione e successiva frammentazione delle molecole del campione. Dalla frammentazione si ottengono gli ioni che vengono classificati in funzione del rapporto

massa/carica. Ciascuna molecola presenterà un percorso di frammentazione diverso dando vita a dei ioni con un determinato rapporto massa/carica. Più precisamente si è fatto riferimento a uno strumento identificato dal nome commerciale “QQQ 6430” prodotto dall’azienda Agilent®.

Nel momento in cui la miscela di analiti viene separata tramite cromatografia, si giunge alla sorgente di ionizzazione dello spettrometro di massa. Per il lavoro di questa tesi si è utilizzata la ionizzazione elettrospray (ESI) in cui il campione viene fatto passare in un tubo sottoposto a tensione grazie al quale si ha la nebulizzazione e la successiva ionizzazione.

### **2.8.6 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)**

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier è una tecnica spettroscopica di assorbimento normalmente utilizzata nel campo della caratterizzazione dei materiali per lo studio dei legami chimici. Essa sfrutta la trasformata di Fourier al fine di ottenere uno spettro nel quale viene riportata la frequenza normalmente espressa in numero d’onda o lunghezza d’onda nell’asse delle ascisse e la trasmittanza in ordinata.

Lo spettrometro utilizzato è un FT-IR modello Vertex 70 prodotto dalla Bruker che permette di effettuare misure in un ampio intervallo spettrale (dall’ultravioletto fino al lontano infrarosso) ad alta risoluzione spettrale, inoltre permette di operare in condizioni di vuoto, abbattendo così i contributi generati dalla presenza di vapore d’acqua e anidride carbonica. Essa offre inoltre la possibilità di misurare sia nella configurazione di trasmissione che in modalità di riflettanza totale attenuata (ATR).

### **2.8.7 Analisi termogravimetrica (TGA)**

L’analisi termogravimetrica (TGA) è una tecnica sperimentale usata per determinare la stabilità termica di un campione misurando la sua variazione di massa a seguito di un trattamento termico controllato e programmato. La variazione di peso viene misurata tramite una microbilancia mentre il campione è posto in una fornace in un’atmosfera controllata.

Per questo lavoro di tesi si è fatto riferimento a uno strumento identificato dalla sigla commerciale “TGA1 STARe System” prodotto dall’azienda Mettler Toledo®. Le misure sono state effettuate su campioni di peso di circa 10 mg, sottoposti a un riscaldamento ad una velocità di 10°C/min posto in un’atmosfera controllata di azoto.

### 3 RISULTATI E DISCUSSIONI

Il lavoro di questa tesi ha due diversi obiettivi:

- il primo riguarda lo sviluppo e la caratterizzazione di film porosi a base di PLA e a base di un blend costituito da PLA e PCL commerciale ad alta massa al fine di poterli utilizzare come campionatori passivi;
- il secondo riguarda lo sviluppo e la caratterizzazione di film porosi a base di PLA e un PCL sintetizzato *ad-hoc*, caratterizzato da una struttura a stella con terminali carbossilici e ridotto peso molecolare (PCL\_COOH), verificando una possibile loro applicabilità nel settore biomedico, in particolare nel campo dell'ingegneria tissutale e della *drug delivery*.

#### 3.1 STUDIO DELLE VARIABILI NEL PROCESSO NIPS

Come già illustrato nei capitoli precedenti, tutte le membrane sono state preparate tramite la tecnica dell'inversione di fase indotta da non solvente (NIPS). Nel processo NIPS si sfrutta la precipitazione del polimero quando quest'ultimo (presente sotto forma di soluzione polimerica) viene immerso in un non solvente, al fine di ottenere un sistema poroso.

La formazione di una membrana e la sua morfologia dipendono principalmente dai seguenti fattori [22]: dalla concentrazione della soluzione polimerica, dal rapporto tra solvente e non solvente, dalla temperatura della soluzione polimerica e del bagno di coagulazione e dal tipo di solvente e di non solvente utilizzato.

Pertanto, in questo lavoro di tesi, si è cercato di effettuare una caratterizzazione esaustiva sulle proprietà dei film porosi preparati e di comprendere una relazione tra i fattori sopra citati e la morfologia delle membrane preparate.

##### 3.1.1 Valutazione della porosità delle membrane a base di PLA

Sono stati realizzati dodici film porosi, di cui quattro ottenuti da una soluzione di PLA in DMF, gli altri quattro da una soluzione di PLA in cyrene e i restanti quattro da una soluzione di PLA in astrobio. Ciascun quartetto è stato ottenuto a partire da soluzioni polimeriche a quattro concentrazioni differenti: 5, 10, 15, 20 utilizzando la percentuale massa su volume (% m/V).

Si è quindi determinato il grado di porosità delle membrane a base di PLA, facendo riferimento alla seguente equazione (3.1):

$$\text{Porosità (\%)} = \frac{V_m - V_p}{V_m} \times 100 = \left(1 - \frac{W_m}{D \times A \times \rho_p}\right) \quad (\text{equazione 3.1})$$

Dove  $V_m$  è il volume del campione, che è determinato dal prodotto dell'area (A) e dallo spessore del campione (D); mentre  $V_p$  è il volume del polimero all'interno della membrana che è calcolato dal rapporto della massa del campione ( $W_m$ ) e la densità del PLA ( $\rho_p$ ).

Nella [Tab. 3.1] vengono riportati i valori di porosità per le membrane a base di PLA.

Tabella 3.1 Grado di porosità delle differenti membrane a base di PLA

CODICE DEL CAMPIONE	POROSITA' (%)	CODICE DEL CAMPIONE	POROSITA' (%)	CODICE DEL CAMPIONE	POROSITA' (%)
PLA_5_DMF	92	PLA_5_CYR	-	PLA_5_AST	-
PLA_10_DMF	85	PLA_10_CYR	-	PLA_10_AST	-
PLA_15_DMF	81	PLA_15_CYR	-	PLA_15_AST	-
PLA_20_DMF	80	PLA_20_CYR	85	PLA_20_AST	-

Come riportato successivamente nel paragrafo 3.1.4 che tratta dell'analisi morfologica delle membrane, è stato possibile quantificare la porosità solo per i campioni ottenuti a partire dal DMF e per il campione preparato dalla soluzione di PLA in cyrene a una concentrazione del 20% (m/V). Le altre soluzioni polimeriche non garantivano le proprietà ideali necessarie per ottenere una struttura porosa sfruttabile a livello applicativo. Nella [Tab. 3.1], focalizzandoci sulle prime due colonne, si osserva una diminuzione del grado di porosità all'aumentare della concentrazione polimerica. Il medesimo risultato è stato ottenuto anche da Chinyerenwa e collaboratori [25] in uno studio condotto nel 2018 dove sono state analizzate diverse membrane preparate tramite il metodo NIPS a partire da soluzioni a concentrazioni differenti di PLA. Quest'ultimo era solubilizzato in 1,4 diossano e il non solvente era rappresentato da goccioline di acqua calda. I ricercatori supposero che la diminuzione di porosità fosse collegata ad una minore velocità di diffusione delle catene polimeriche causato dall'aumento del numero di molecole per unità di volume. La formazione dei pori in una membrana nel processo NIPS è causata dalla precipitazione del polimero, quando quest'ultimo entra in contatto con il non solvente. Nello specifico, in una soluzione ad elevata concentrazione, la limitata mobilità della macromolecola si traduce in una maggiore difficoltà di precipitazione

e quindi ad una riduzione della porosità del film. In base a questo comportamento, Maggay e collaboratori [68] sono riusciti ad ottenere delle membrane caratterizzate da una ridotta quantità di cavità semplicemente a partire da soluzioni polimeriche ad elevata concentrazione. Nello specifico, la porosità delle membrane è stata gradualmente ridotta dall'88% al 76% quando la concentrazione del polimero è stata aumentato dall'8% al 15% in peso.

Al fine di comprendere meglio la relazione tra la porosità e la concentrazione, sono state effettuate misure di viscosità delle soluzioni utilizzate per preparare le membrane porose.

### 3.1.2 Valutazione della viscosità delle soluzioni polimeriche per le membrane a base di PLA

Nella [Fig. 3.1] è riportato l'andamento della viscosità in funzione della concentrazione ottenuta attraverso misure effettuate con il viscosimetro Brookfield ponendo la soluzione costituita dal PLA e DMF a differenti concentrazioni a 80°C. In particolare, sono state effettuate quattro differenti misure, dove nella prima la concentrazione polimerica era del 5%, nella seconda del 10%, nella terza del 15% e nell'ultima del 20%.

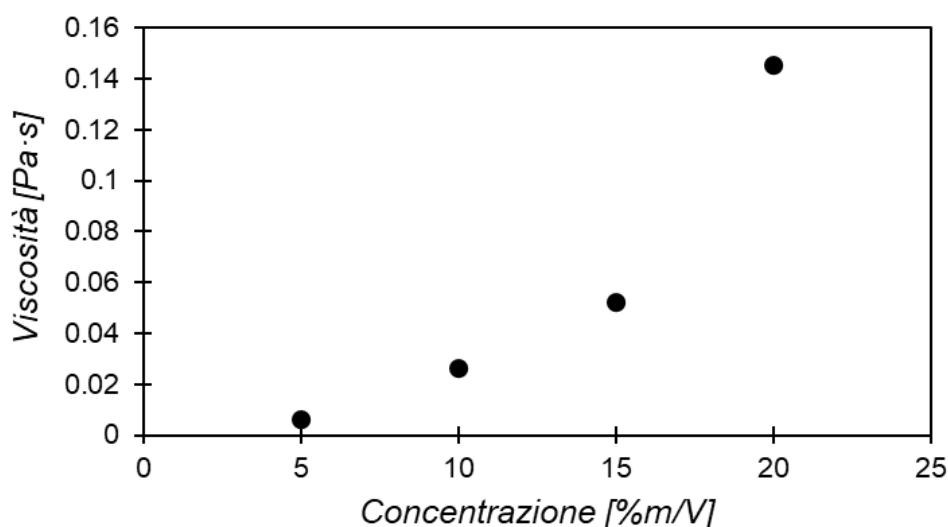


Figura 3.1 Variazione della viscosità della soluzione del PLA in DMF in funzione della concentrazione

I valori ottenuti sono riassunti nella [Tab. 3.2].

Tabella 3.2 Valori di viscosità delle soluzioni di PLA in DMF

CODICE DEL CAMPIONE	VISCOSITA' (Pa·s)
PLA_5_DMF	0.006
PLA_10_DMF	0.026
PLA_15_DMF	0.052
PLA_20_DMF	0.145

Nella [Fig. 3.2] è riportata la curva reologica, sempre ottenuta attraverso il viscosimetro Brookfield, ponendo la soluzione costituita dal PLA e cyrene a differenti concentrazioni a 80°C. Bisogna rimarcare che il cyrene è un solvente aprotico biobased e biodegradabile, tali caratteristiche hanno attirato la nostra attenzione al fine di proporre un prototipo di campionatore passivo preparato non solo partendo da un polimero *bio-based*, ma anche utilizzando un sistema a basso impatto.

Nella [Tab. 3.3], vengono mostrati i valori della viscosità determinati dal viscosimetro.

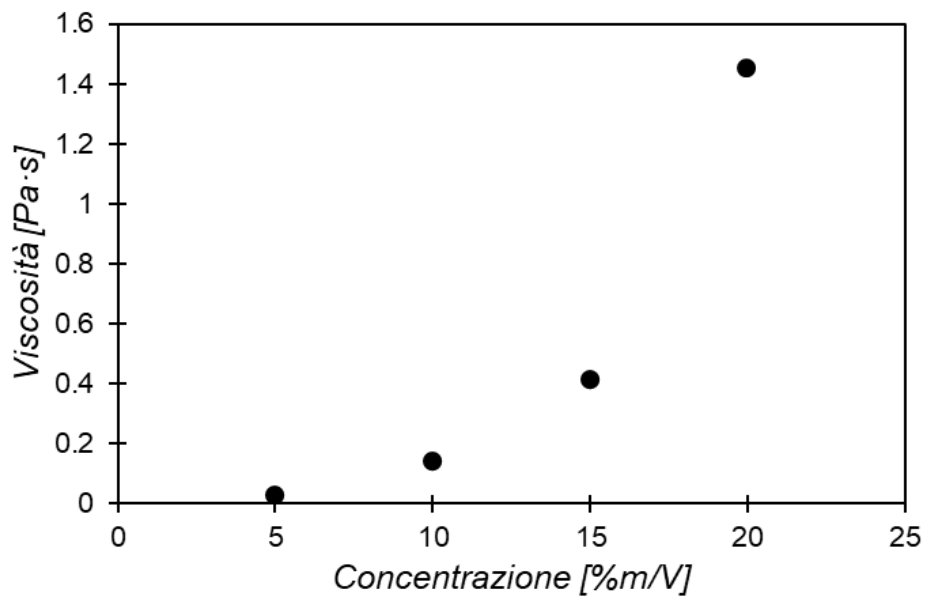


Figura 3.2 Variazione della viscosità della soluzione del PLA in cyrene in funzione della concentrazione



Tabella 3.3 Valori di viscosità delle soluzioni di PLA in cyrene

CODICE DEL CAMPIONE	VISCOSITA' (Pa·s)
PLA_5_CYR	0.030
PLA_10_CYR	0.142
PLA_15_CYR	0.416
PLA_20_CYR	1.452

Nella [Fig. 3.3] è riportato l'andamento a partire dalla soluzione costituita dal PLA e astrobio a differenti concentrazioni a 80°C. L'astrobio è un solvente non ancora commercializzato, interessante perché, al pari del cyrene, è biodegradabile e preparato da fonti rinnovabili. Infine, nella [Tab. 3.4] vengono mostrati i valori della viscosità quantificati dal reometro rotazionale.

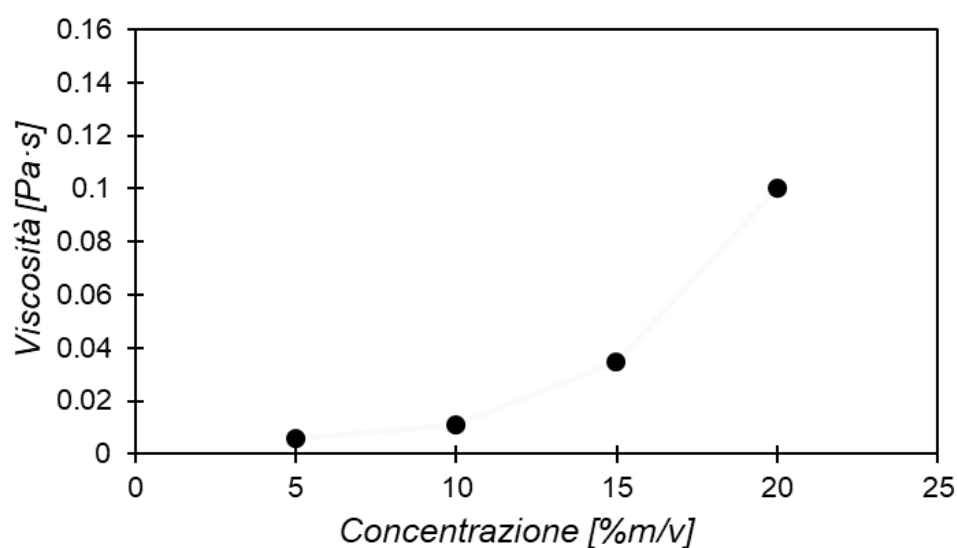


Figura 3.3 Variazione della viscosità della soluzione del PLA in astrobio in funzione della concentrazione

Tabella 3.4 Valori di viscosità delle soluzioni di PLA in astrobio

CODICE DEL CAMPIONE	VISCOSITA' (Pa·s)
PLA_5_AST	0.005
PLA_10_AST	0.010
PLA_15_AST	0.034
PLA_20_AST	0.100

Per tutte le soluzioni si può osservare un andamento esponenziale della viscosità all'aumentare della concentrazione polimerica. Inoltre, esaminando la [Tab. 3.2] e la [Tab. 3.4], si possono osservare dei valori piuttosto simili di viscosità per le soluzioni in DMF e astrobio, a medesima concentrazione, mentre dalla [Tab. 3.3] possiamo notare una netta differenza dei valori di viscosità delle soluzioni polimeriche in cyrene. Per comprendere meglio questi risultati si potrebbe fare riferimento alla viscosità del solvente tal quale. Infatti, il cyrene è caratterizzato da un valore di viscosità cinematica di  $11.6 \text{ mm}^2/\text{s}$  a  $20^\circ\text{C}$  [69] contro il valore di  $0.8947 \text{ mm}^2/\text{s}$  a  $20^\circ\text{C}$  del DMF [70]. Di conseguenza la resistenza allo scorrimento offerta dal solvente biodegradabile risulta essere notevolmente maggiore rispetto quella garantita dal solvente ammidico.

### 3.1.3 Determinazione dei coefficienti di diffusione

Per analizzare nel dettaglio la formazione del film poroso, è necessario considerare che nel momento in cui la soluzione polimerica viene immersa nel bagno costituito dal non solvente, avvengono movimenti diffusivi tra il solvente e il non solvente: quest'ultimo andrà a occupare lo spazio lasciato libero dal solvente e viceversa [28]. La concentrazione del polimero è così bassa da poter considerare nullo il suo movimento diffusivo.

In questo lavoro ci siamo limitati a determinare i coefficienti di diffusione per le varie coppie di solvente-non solvente utilizzate e si è cercato di comprendere la relazione tra il loro valore e le caratteristiche del film poroso conseguito.

Per una soluzione binaria costituita da un soluto A nel solvente B, il coefficiente di diffusione  $D_{A,B}^0$  in condizioni di infinita diluizione viene calcolato tramite il metodo di Tyn e Calus [71], come riportato nell'equazione (3.2):

$$D_{AB}^{\circ} = 8.93 \times 10^{-8} \frac{V_B^{0.267}}{V_A^{0.433}} \frac{T}{\eta_B} \left( \frac{\sigma_B}{\sigma_A} \right)^{0.15} \quad (\text{equazione 3.2})$$

dove  $V_B$  e  $V_A$  sono rispettivamente il volume molare del solvente e del soluto in  $cm^3/mol$ ,  $T$  è la temperatura del processo in K,  $\eta_B$  è la viscosità del solvente in cP e  $\sigma_B$  e  $\sigma_A$  sono, rispettivamente, la tensione superficiale del solvente e del soluto in dyn/cm.

Da sottolineare che l'acqua funge da non solvente e il DMF, cyrene e astrobio rappresentano i sistemi solventi. Pertanto, tramite l'equazione di Tyn e Calus, si è potuto determinare il coefficiente di diffusione del non solvente (A) nel soluto (B) e viceversa [Tab. 3.5].

Tabella 3.5 Determinazione del coefficiente di diffusione per la coppia acqua/DMF e acqua/cyrene

NON SOLVENTE	SOLVENTE	COEFFICIENTE DI DIFFUSIONE DEL NON SOLVENTE NEL SOLVENTE ( $m^2/s$ )	COEFFICIENTE DI DIFFUSIONE DEL SOLVENTE NEL NON SOLVENTE ( $m^2/s$ )
ACQUA	CYRENE	0.003	0.001
	DMF	0.260	0.110

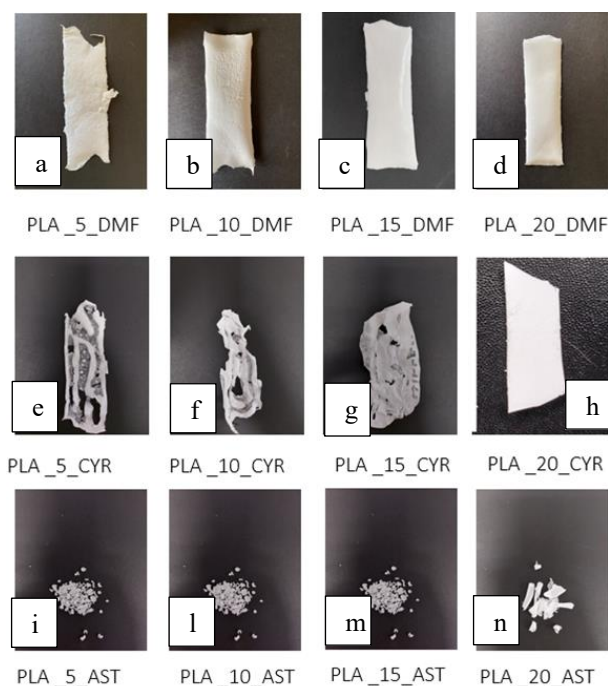
Dai risultati ottenuti si osserva che i valori dei coefficienti di diffusione per la coppia acqua/cyrene risultano essere inferiori rispetto a quelli della coppia acqua/DMF, che determinano tempi di formazione della membrana più lunghi. È importante sottolineare che elevati valori dei coefficienti di diffusione, cioè bassa velocità di trasferimento di materia, possono limitare la precipitazione del polimero e quindi la formazione di una membrana. Invece ad elevati valori del coefficiente di diffusione corrisponde la formazione di una membrana ad elevata porosità, le cui cavità sono di forma simile a delle dita, detta “*finger-like*” [28].

Nel caso dell'astrobio, non essendo un solvente commerciale, non si sono avuti a disposizione i valori delle grandezze necessarie per applicare il metodo di Tyn e Calus.

### 3.1.4 Morfologia dei film porosi a base di PLA

I film porosi ottenuti utilizzando diversi tipi di solventi e partendo da concentrazioni polimeriche differenti sono stati caratterizzati preliminarmente analizzandone la struttura visiva e poi per mezzo di misure FE-SEM. Di seguito, [Fig. 3.4], sono riportate delle foto

che mettono a confronto i campioni ottenuti tramite la tecnica NIPS a partire dal DMF, cyrene o astrobio al variare della concentrazione del polimero.



*Figura 3.4 Aspetto morfologico delle membrane ottenute dalle soluzioni del PLA in DMF a una concentrazione del 5% (a), del 10% (b), del 15% (c) e del 20% (d); dei film porosi preparati a partire dalle soluzioni del PLA in cyrene a una concentrazione del 5% (e), del 10% (f), del 15% (g), del 20% (h); e infine di quelle ottenute a partire dalle soluzioni del PLA in astrobio a una concentrazione del 5% (i), del 10% (l), del 15% (m) e del 20% (n)*

Focalizzandoci sui campioni preparati con DMF, [Fig. 3.4 a,b,c,d], i film risultano tutti integri e quelli ottenuti partendo da soluzioni con una bassa concentrazione di PLA (PLA\_5\_DMF; PLA\_10\_DMF; PLA\_15\_DMF) risultano essere molto sottili (650  $\mu\text{m}$ ), mentre quelli preparati a partire dalla soluzione piú concentrata (PLA\_20\_DMF) risultano essere piú spessi (800  $\mu\text{m}$ ).

Considerando i campioni preparati con cyrene [Fig. 3.4 e,f,g,h], i film preparati da soluzioni con una bassa concentrazione di PLA risultano essere totalmente disomogenei (con alcune zone prive di matrice polimerica). Tale risultato può essere correlato alle caratteristiche della coppia acqua/cyrene, che, come precedentemente descritto, è caratterizzata da coefficienti di diffusioni minori rispetto alla coppia acqua/DMF. Solo nel caso del campione ottenuto da una soluzione di PLA in cyrene al 20%, il film appare omogeneo ed integro, nonostante ciò, sulla superficie del film si forma un *layer* che tende a distaccarsi dal resto della struttura. Sulla base dei risultati ottenuti, possiamo supporre che l'elevata viscosità del cyrene può essere un limite per applicare il solvente nella fabbricazione di film porosi. Invero, recentemente, sono stati sviluppati diversi metodi al fine di risolvere questo problema: uno

dei principali consiste nel mescolare due (o più) componenti in un determinato rapporto per ottenere una soluzione caratterizzata da una viscosità complessiva minore. Nella direzione di tale approccio si è provato a miscelare il cyrene con alcuni dei più comuni solventi organici tra cui:  $\gamma$ -valerolattone, 2-metiltetraidrofurano, acetonitrile etc. ottenendo dei blend con valori di viscosità del 75% inferiori di quelli del cyrene puro [72].

L'astrobio, [Fig. 3.4 i,l,m,n], non risulta essere il solvente ideale con il quale si può effettuare il processo NIPS. Infatti, dopo aver colato la soluzione sul supporto vetroso ed averla livellata con una lama, si è potuto osservare che la soluzione polimerica rimaneva adesa sulla superficie rendendo impossibile l'ottenimento di una struttura porosa sfruttabile a livello applicativo [Fig. 3.5].



*Figura 3.5 Residuo di soluzione di PLA in astrobio rimasto adeso sul supporto vetroso*

Dai risultati ottenuti, possiamo ipotizzare dei valori dei coefficienti di diffusione della coppia astrobio/acqua notevolmente inferiori rispetto a quelli calcolati per il DMF e il cyrene, in quanto, in questo lavoro, molto raramente sono state ottenute delle membrane integre tramite tale solvente.

Come riportato nei paragrafi precedenti la natura superficiale e la struttura dei pori risultano essere dipendenti dalle condizioni con le quali è stato condotto il processo NIPS. Tramite l'analisi al FE-SEM, si è cercato di dedurre la correlazione tra morfologia e i parametri sperimentali utilizzati. La caratterizzazione SEM ha permesso di analizzare in dettaglio la sezione trasversale dei film a base PLA, preparati a partire da soluzioni a differente concentrazione in DMF ([Fig. 3.6]).

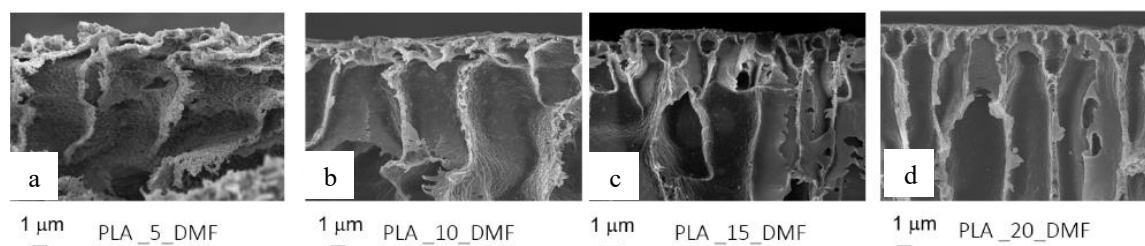


Figura 3.6 Analisi FE-SEM dei film a base PLA in DMF ottenuti da una soluzione a una concentrazione del 5% (a); 10% (b), 15% (c) e 20% (d)

Per osservare le sezioni trasversali al SEM, la membrana viene prima fratturata alla temperatura dell'azoto liquido, quindi fissata perpendicolarmente al portacampione.

In tutti i campioni la struttura delle membrane risulta essere asimmetrica, con una parte più densa superficiale ed una zona caratterizzata da pori di forma allungata simile a delle dita, “finger-like”. Tutto ciò indica che la precipitazione del polimero avviene poco dopo l’immersione della soluzione nel bagno costituito dal non solvente: possiamo quindi ipotizzare che a contatto con l’acqua il sistema rapidamente passa da una condizione di elevata stabilità (tutti i componenti sono miscibili) a una condizione di elevata instabilità con conseguente formazione di una struttura costituita da pori di forma allungata.

È rilevante sottolineare che le cavità che attraversano l’intera membrana possono presentare morfologie diverse a seconda della cinetica di inversione di fase e della termodinamica. La presenza di macrovuoti nelle membrane può risultare sia vantaggiosa che svantaggiosa, questi infatti potrebbero provocare il collasso delle membrane e quindi limitare l'applicazione nei processi ad alta pressione come l'osmosi inversa. D'altra parte, una struttura ricca di cavità è adatta per processi di ultrafiltrazione (29). La diffusione del solvente espulso dalla soluzione polimerica provoca la formazione di macrovuoti.

I risultati ottenuti da Maggay e collaboratori [68], secondo cui all’aumentare della concentrazione polimerica risulta essere maggiore la probabilità di avere una membrana caratterizzata da una struttura “spugnosa”, sono stati raggiunti anche nel seguente lavoro [Fig. 3.6 a.d].

La [Fig. 3.7] mostra la micrografia a differenti ingrandimenti della sezione trasversale della PLA\_20\_CYR. Possiamo notare che la morfologia ottenuta concorda con quanto riportato sull’argomento in letteratura, ovvero che la conformazione morfologica del film poroso possa essere variata al variar delle condizioni sperimentali. Il più basso coefficiente di diffusione che si è calcolato per la coppia cyrene/acqua rispetto alla coppia DMF/acqua si traduce in un lento movimento diffusivo che comporta una precipitazione ritardata e maggior tempo nella formazione della membrana. Tutto ciò porta ad una struttura “spugnosa” priva

di macrovuoti che attraversano l'intera membrana da una parte all'altra come peraltro anche confermato dalla letteratura di riferimento [28,59,68].

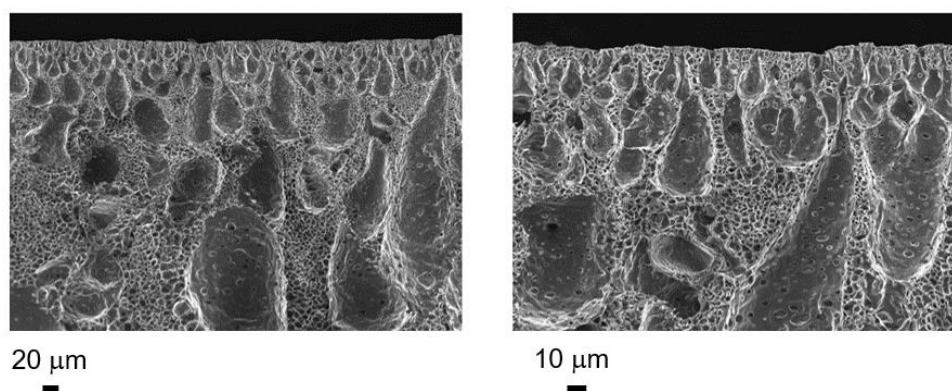


Figura 3.7 Analisi FE-SEM della membrana PLA\_20\_CYR a due differenti ingrandimenti

### 3.1.5 Valutazione della porosità delle membrane a base di PLA/PCL

Come già descritto nei paragrafi precedenti, nel seguente lavoro di tesi sono state preparate anche delle membrane a base di PLA e un PCL commerciale lineare ad elevato peso molecolare, per la cui preparazione è stata scelta una concentrazione di soluzione polimerica del 10% (m/V) adoperando come solvente il DMF. Tale concentrazione è stata scelta considerando i risultati ottenuti dalla preparazione dei film a base di solo PLA.

Sono state ottenute tre diverse membrane a partire da tre differenti soluzioni polimeriche delle quali variava solo la composizione del *blend* polimerico: in una il rapporto PLA/PCL era 95:5, nell'altra il rapporto era 90:10 e nell'ultima 80:20. Per quantificare il grado di porosità delle membrane ottenute da tale blend, si è fatto riferimento all'equazione (3.3):

$$Porosità\% = 1 - \frac{\rho_{film}}{\rho_{polimero}} \times 100\% \quad (\text{equazione 3.3})$$

$$\rho_{polimero} = \frac{m}{V} = \frac{m_1 + m_2}{V_1 + V_2} = \frac{m_1 + m_2}{\frac{m_1}{\rho_1} + \frac{m_2}{\rho_2}} = \frac{1}{\frac{X_1}{\rho_1} + \frac{X_2}{\rho_2}}$$

Dove  $\rho_{film}$  è la densità del film che è determinata dalla massa e dal volume del campione invece la densità del polimero ( $\rho_{polimero}$ ) è determinato sfruttando la percentuale in peso del PLA e PCL ( $X_1$  e  $X_2$ ) e le loro densità ( $\rho_1$  e  $\rho_2$ ). Utilizzando questa equazione si è potuto calcolare il grado di porosità, i cui valori sono espressi nella [Tab. 3.6].

Tabella 3.6 Grado di porosità delle tre membrane a base di PLA/PCL

CODICE DEL CAMPIONE	POROSITA' (%)
PLA_PCL_95_5	90
PLA_PCL_90_10	88
PLA_PCL_80_20	88

I dati riportati in [Tab. 3.6] mostrano una leggera diminuzione della porosità all'aumentare del contenuto del policaprolattone nel blend polimerico. Inoltre, la porosità offerta dalle membrane ottenute dal blend polimerico PLA/PCL è circa pari al 90 %, un valore di poco superiore al grado di porosità offerto dalla membrana PLA\_10\_DMF con la stessa concentrazione polimerica, che è pari all'85% [Tab. 3.2].

È rivelante sottolineare che gli studi sul grado di porosità di film preparati a partire da dei blend polimerici sono piuttosto contraddittori. Come riportato da Xing e collaboratori [73], le membrane ottenute da PLLA e poliuretano (PU) mostrano una porosità maggiore rispetto alle membrane costituite dal solo acido polilattico studiate nelle stesse condizioni. Questo fenomeno è causato dalla contemporanea separazione di fase dei due polimeri, che comporta la maggiore penetrazione del non solvente all'interfaccia tra PLLA e PU, con conseguente aumento della porosità. Un risultato diverso è riportato nello studio condotto da Kang e collaboratori [74], nel quale si è quantificata una leggera diminuzione della porosità di alcune membrane ottenute da un blend PLA/PBAT rispetto a quelle ottenute dal PLA tal quale a parità di concentrazione. Secondo i ricercatori, il risultato è probabilmente dovuto all'elasticità del PBAT che porterebbe al restringimento dei pori e quindi a un conseguente calo della porosità.

### 3.1.6 Valutazione della viscosità delle soluzioni polimeriche per le membrane a base di PLA/PCL

Le medesime condizioni sperimentali sono state mantenute per quantificare la viscosità delle tre soluzioni polimeriche dalle quali si sono ottenuti i tre diversi film porosi (PLA\_PCL\_95\_5; PLA\_PCL\_90\_10 e PLA\_PCL\_80\_20). Pertanto, per la determinazione delle caratteristiche reologiche, è stato utilizzato un viscosimetro Brookfield. L'andamento



della viscosità al variare del contenuto in percentuale del PCL nel blend è riportato nel grafico di [Fig. 3.8].

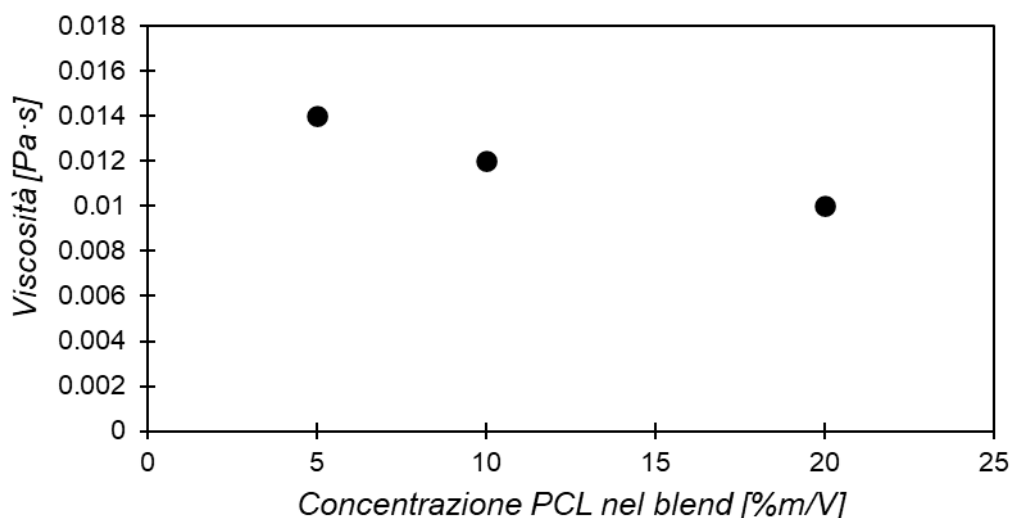


Figura 3.8 Andamento della viscosità della soluzione PLA/PCL in DMF al variare del contenuto del PCL

Esaminando i relativi valori, riassunti nella [Tab. 3.7], si può notare come la viscosità del blend aumenti, anche se non in modo significativo, all'aumentare del contenuto di PLA nel blend. Tale risultato può essere correlato al maggior peso molecolare del PLA rispetto al PCL e quindi alla maggiore viscosità della soluzione. Invero, a parità di concentrazione polimerica, soluzioni di solo PLA mostrano una viscosità di circa 0.03 Pa·s.

Tabella 3.7 Valori di viscosità offerti dalle soluzioni PLA/PCL in DMF

CODICE DEL CAMPIONE	VISCOSITA' (Pa·s)
PLA_PCL_95_5	0.014
PLA_PCL_90_10	0.012
PLA_PCL_80_20	0.010

### 3.1.7 Morfologia dei film porosi a base di PLA/PCL

Confrontando le foto dei film a base del blend PLA/PCL [Fig. 3.9], si nota un aumento significativo della disomogeneità strutturale all'aumentare della concentrazione di PCL nella miscela polimerica. Questo effetto può essere legato alla scarsa compatibilità tra le due matrici polimeriche.

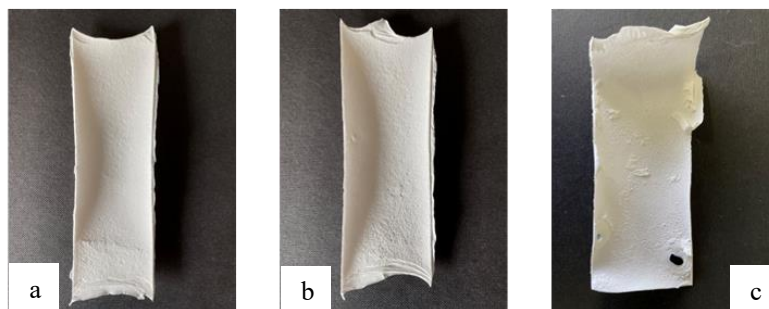


Figura 3.9 Foto di a) PLA\_PCL\_95\_5; b) PLA\_PCL\_90\_10; c) PLA\_PCL\_80\_20

Medesime caratteristiche osservate per le membrane a base di PLA in DMF si possono riscontrare anche nelle immagini SEM dei campioni a base di PLA e PCL: nella [Fig. 3.10] si sono messe a confronto le analisi delle sezioni, a due differenti ingrandimenti, di tre differenti membrane dove si notano chiare somiglianze strutturali. In particolare, si è valutata la sezione dei film PLA\_PCL\_90\_10, PLA\_PCL\_95\_5 in confronto a quella del PLA\_10\_DMF, ma non quella del PLA\_PCL\_80\_20.

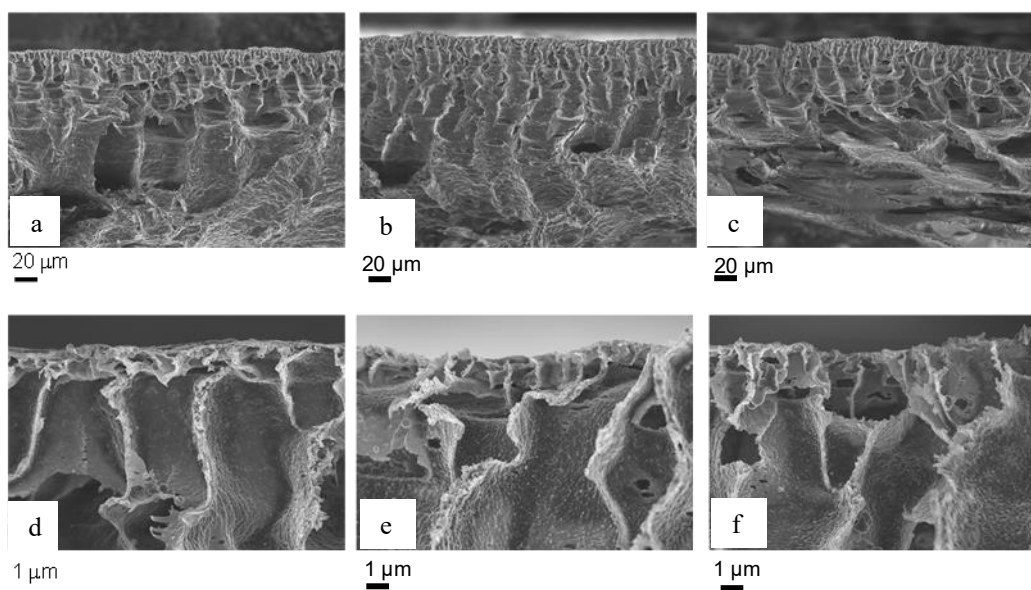


Figura 3.10 Analisi FE-SEM: a) PLA\_10\_DMF a minor ingrandimento; b) PLA\_PCL\_90\_10 a minor ingrandimento; c) PLA\_PCL\_95\_5 a minor ingrandimento; d) PLA\_10\_DMF a maggior ingrandimento; e) PLA\_PCL\_90\_10 a maggior ingrandimento; f) PLA\_PCL\_95\_5 a maggior ingrandimento e quelle a base di PLA/PCL

Confrontando i film a base di PLA/PCL con quello di PLA tal quale, si nota che la presenza del PCL influisce leggermente sulla morfologia delle sezioni. La sezione del film a base di PLA/PCL risulta essere sempre caratterizzata, in prevalenza, dalla presenza di cavità *finger-like* anche se si osserva che il PCL contribuisce allo sviluppo di una struttura “spugnosa” caratterizzata da pori di dimensione inferiore [Fig. 3.10 d,e,f].

### 3.1.8 Valutazione delle porosità delle membrane a base di PLA/PCL\_COOH

In questo lavoro di tesi sono state realizzate otto membrane a partire da un blend a base di PLA e PCL, sintetizzato *ad-hoc* con struttura stellare e terminali carbossilici, PCL\_COOH di cui quattro preparate a partire da una soluzione polimerica il cui solvente era il cyrene, invece le restanti quattro a partire dal DMF. Per tutte le membrane è stata scelta una concentrazione di soluzione polimerica del 10% (m/V).

Ciascun quartetto è stato ottenuto a partire da 4 differenti soluzioni polimeriche delle quali variavano solo la composizione del blend polimerico: in una il rapporto PLA/PCL\_COOH era 95:5, nell'altra il rapporto era 90:10, nella terza 85:15 e nell'ultima 80:20.

Approssimando la densità del PCL\_COOH a quella del PCL ( $1.15 \frac{g}{cm^3}$ ) e facendo riferimento all'equazione 3.3 si è potuto determinare il grado di porosità delle membrane preparate a partire dal *blend* polimerico con il polimero a stella [Tab. 3.8].

Ovviamente il calcolo è stato effettuato solo su quei film porosi che potevano essere sottoposti alla misura del calibro senza osservare alcun degrado superficiale.

Tabella 3.8 Grado di porosità offerto dai film porosi preparati dalle soluzioni di PLA/PCL\_COOH in DMF e cyrene

CODICE DEL CAMPIONE	POROSITA' (%)
PLA_PCL_COOH_95_5_DMF	92
PLA_PCL_COOH_90_10_DMF	92
PLA_PCL_COOH_85_15_DMF	92
PLA_PCL_COOH_80_20_DMF	93
PLA_PCL_COOH_95_5_CYR	-
PLA_PCL_COOH_90_10_CYR	-
PLA_PCL_COOH_85_15_CYR	-
PLA_PCL_COOH_80_20_CYR	-

La porosità delle membrane ottenute dal blend polimerico PLA/PCL\_COOH è pari a circa 92 %, un valore superiore al grado di porosità della membrana PLA\_10\_DMF con la stessa concentrazione polimerica, che è pari all'85% [Tab. 3.2]. La disomogeneità morfologica delle membrane in cyrene non ha permesso la determinazione del grado di porosità.

### 3.1.9 Valutazione della viscosità delle soluzioni polimeriche per le membrane a base di PLA/PCL\_COOH

Facendo riferimento al viscosimetro Brookfield, sono stati quantificati i valori di viscosità delle soluzioni in DMF al variare del contenuto del polimero a stella nel blend polimerico [Fig. 3.11]. Più precisamente sono state effettuate quattro differenti misure: nella prima la quantità di PCL\_COOH nel blend era del 5%, nella seconda del 10%, nella terza del 15% e nell'ultima del 20%.

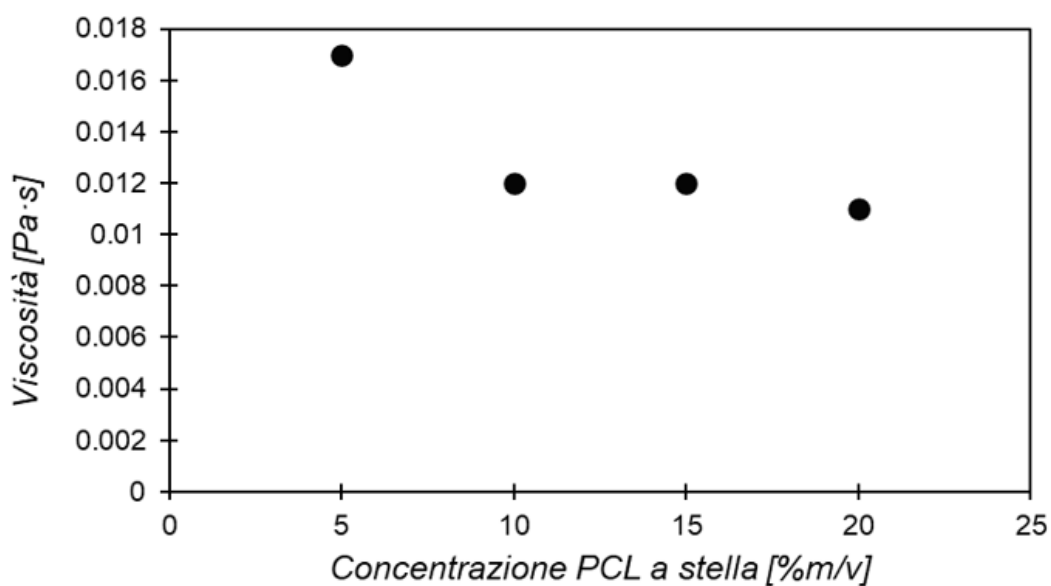


Figura 3.11 Variazione della viscosità della soluzione PLA/PCL\_COOH in DMF in funzione del contenuto del polimero a stella

Dalla [Tab. 3.9] si osserva una leggera diminuzione della viscosità all'aumentare della quantità del polimero a stella. In base alla peculiare geometria a forma di stella, e al minor peso molecolare ci si poteva attendere per le soluzioni contenenti PCL\_COOH, una minore resistenza allo scorrimento rispetto a quelle a base di PCL lineare. In realtà, confrontando le soluzioni a parità di concentrazione, si osservano dei valori piuttosto simili di viscosità: probabilmente il carattere reologico del blend è governato principalmente dal PLA, che funge da componente maggioritario.

Tabella 3.9 Viscosità del PLA/PCL\_COOH in DMF

CODICE DEL CAMPIONE	VISCOSITA'(Pa·s)
PLA_PCL_COOH_95_5_DMF	0.017
PLA_PCL_COOH_90_10_DMF	0.012
PLA_PCL_COOH_85_15_DMF	0.012
PLA_PCL_COOH_80_20_DMF	0.011

### 3.1.10 Morfologia dei film porosi a base di PLA/PCL\_COOH

I film ottenuti partendo da soluzioni a base di cyrene e DMF sono stati studiati dal punto di vista morfologico, valutandone l'integrità e analizzando la struttura della sezione e della superficie attraverso analisi FE-SEM.

Come per le membrane a base di solo PLA anche per quelle contenente il PCL a stella, si nota una rilevante differenza tra i film preparati da DMF e cyrene [Fig. 3.12].

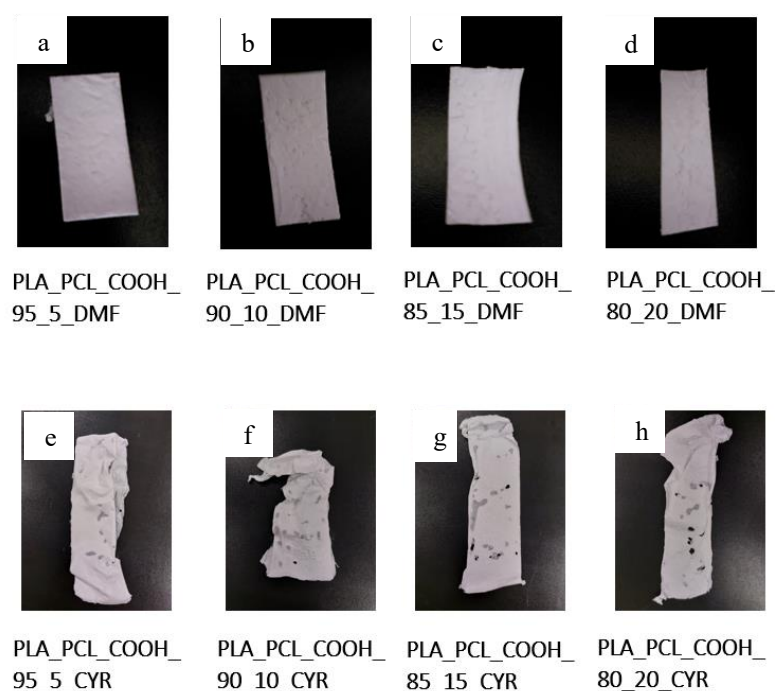


Figura 3.12 Foto di a) PLA\_PCL\_COOH\_95\_5\_DMF; b) PLA\_PCL\_COOH\_90\_10\_DMF; c) PLA\_PCL\_COOH\_85\_15\_DMF; d) PLA\_PCL\_COOH\_80\_20; e) PLA\_PCL\_COOH\_95\_5\_CYR; f) PLA\_PCL\_COOH\_90\_10\_CYR; g) PLA\_PCL\_COOH\_85\_15\_CYR; h) PLA\_PCL\_COOH\_80\_20\_CYR

In particolare, il DMF ha permesso la formazione di strutture omogenee, prive di difetti [Fig. 3.12 a,b,c,d], mentre l'utilizzo del cyrene ha portato alla formazione di film non compatti e poco omogenei [Fig. 3.12 e,f,g,h]. Questo risultato può essere correlato sia all'elevata viscosità offerta dal solvente biodegradabile e sia ai parametri diffusivi. Come descritto nei paragrafi precedenti, la formazione di una struttura porosa e compatta può essere legata alla velocità con la quale il solvente diffonde nel non solvente: il cyrene in acqua è caratterizzato da un coefficiente di diffusione di due ordini di grandezza inferiore di quello del DMF in acqua [Tab. 3.5]. Tutto ciò sembra spiegare la differenza nell'aspetto morfologico tra le membrane preparate in DMF da quelle preparate nel solvente biodegradabile. Considerando le micrografie SEM delle sezioni delle membrane preparate, la presenza del PCL\_COOH [Fig. 3.13] sembra non modificare la struttura porosa dei film rispetto a quella dei sistemi preparati partendo da PLA e dal blend PLA/PCL [Fig. 3.14]. Inoltre, non si notano differenze rilevanti in funzione della concentrazione del PCL a stella.

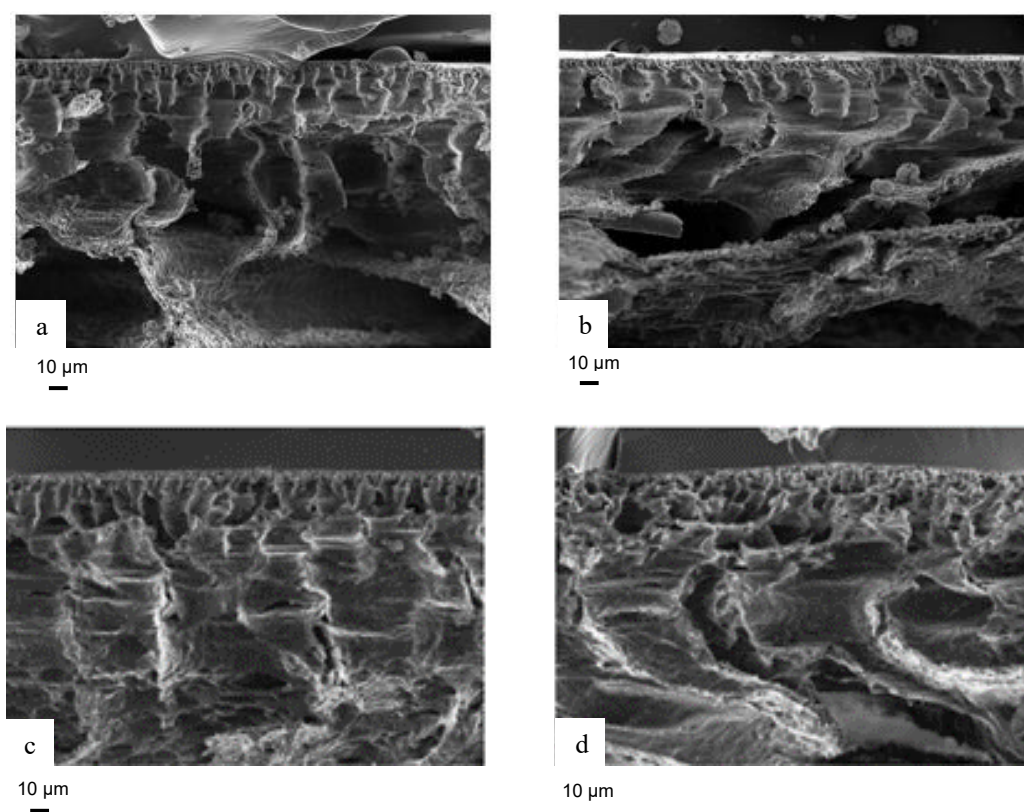


Figura 3.13 Analisi FE-SEM di a) PLA\_PCL\_COOH\_80\_20\_DMF; b) PLA\_PCL\_COOH\_85\_15\_DMF; c) PLA\_PCL\_COOH\_90\_10\_DMF; d) PLA\_PCL\_COOH\_95\_5\_DMF

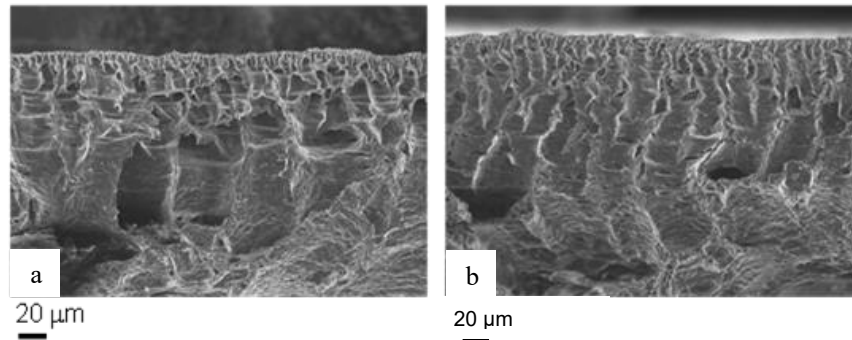


Figura 3.14 Analisi FE-SEM di a) PLA\_10\_DMF; b) PLA\_PCL\_90\_10

Al fine di verificare nel dettaglio anche la dispersione del PCL nei film, peraltro difficile da valutare analizzando la sola sezione, è stata confrontata la morfologia delle superfici di due campioni, a base di PCL lineare ad alta massa e del PCL\_COOH, preparati usando un rapporto PLA/PCL di 90/10 [Fig. 3.15].

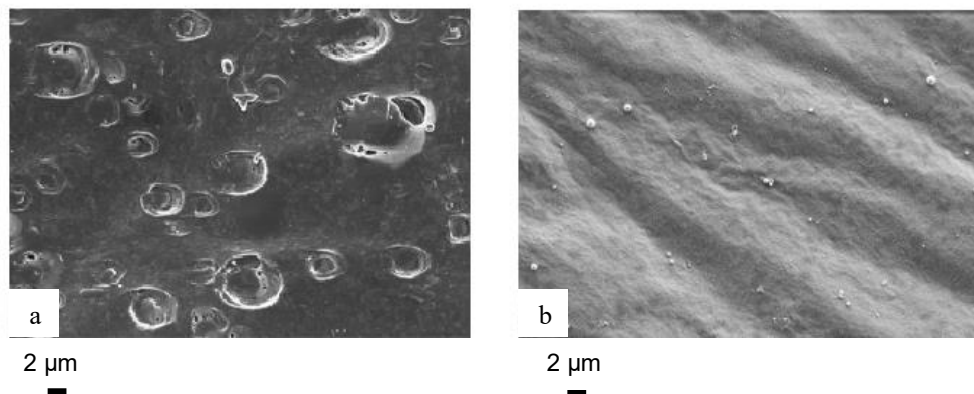


Figura 3.15 Confronto di analisi superficiale di una membrana a) PLA\_PCL\_90\_10; b) PLA\_PCL\_COOH\_90\_10\_DMF

Le proprietà di un polimero bifasico dipendono fortemente dalla morfologia della fase dispersa. In una miscela di due polimeri l'ottenimento di una morfologia regolare, omogenea e fine a livello nanometrico è limitata sia dalla tensione interfacciale tra le due fasi che destabilizza la fase dispersa che dal fenomeno della coalescenza che favorisce la formazione di domini con un diametro grande e irregolare. Per ovviare a tali criticità, generalmente si utilizzano dei copolimeri a blocchi che fungono da agenti compatibilizzanti. Come messo in evidenza in un lavoro precedente [61], l'adesione tra le due fasi sembra migliore nei film preparati per inversione di fase rispetto a quelli da casting, probabilmente a causa del differente processo chimico e del differente solvente utilizzato nella preparazione della soluzione polimerica. Infatti, la formazione di una membrana mediante il processo per inversione di fase comporta sempre una fase di tempra (quenching), cioè l'immersione della soluzione polimerica in un bagno di non solvente, posto a una temperatura minore di quella

della soluzione. Durante il processo di tempra, l'elevata velocità di raffreddamento inibisce i processi diffusivi che contribuiscono al fenomeno della coalescenza della fase dispersa e la conseguente scarsa adesione tra le fasi. A testimonianza di ciò, viene riportata l'analisi FE-SEM della superficie del PLA\_PCL\_90\_10 [Fig. 3.15 a], che è caratterizzata da una morfologia ad isola tipica dei blend PLA/PCL, come viene riportato in letteratura [34,74]. Nonostante risulta esserci un'adesione tra i due polimeri, la fase dispersa però è presente sottoforma di domini sferici con un diametro irregolare su scala micrometrica.

È interessante osservare come la superficie del film a base di PCL a stella risulti essere caratterizzata da una morfologia compatta e regolare contraddistinta da una bassa percentuale di domini della fase minoritaria, cioè quella costituita da PCL [Fig. 3.15 b]. Inoltre, la dimensione delle particelle disperse risulta essere molto inferiore rispetto al caso delle membrane preparate a partire da soluzioni a base di PCL lineare: tali peculiarità superficiali dimostrano una migliore compatibilità e adesione di fase tra i due componenti del blend polimerico. Pertanto, dall'analisi FE-SEM si può ipotizzare che la particolare geometria e l'elevata concentrazione dei gruppi funzionali del polimero a stella, ha contribuito a una drastica riduzione della tensione interfacciale tra le due fasi garantendo una maggiore compatibilità nei confronti del PLA, rispetto al PCL lineare ad alta massa.

### **3.2 STUDIO DELLA FUNZIONALIZZAZIONE SUPERFICIALE DEI FILM**

I film porosi a base di PLA presentano due principali criticità: l'elevata fragilità e la mancanza di gruppi funzionali. Per funzionalizzare la superficie di film di PLA, rendendoli, quindi, applicabili in campo analitico, è stato studiato il processo di amminolisi. La presenza di gruppi funzionali amminici e ammidici favorisce l'interazione selettiva con specie chimiche cariche negativamente: così facendo si è potuto creare una membrana biodegradabile che funge da prototipo di campionatore passivo selettivo.

Il processo di amminolisi è stato applicato solo sui campioni ottenuti a partire dalla soluzione di PLA in DMF e sui campioni ottenuti a partire dal blend polimerico PLA/PCL in DMF. Si è deciso di escludere le membrane ottenute a partire da una soluzione di PLA in cyrene in quanto risultavano fragili e disomogenee. Come descritto nei paragrafi precedenti, l'amminolisi è una reazione di sostituzione nucleofila nella quale il reattivo caratterizzato da gruppi amminici funge da nucleofilo, e il gruppo estereo del PLA funge da gruppo uscente.



L'accesso dell'ammina nei confronti dell'atomo di carbonio che subisce la sostituzione è facilitato quanto più il nucleofilo è stericamente poco impedito ed è caratterizzato da una buona basicità. Pertanto, in questo studio, per indurre l'amminolisi si è optato nell'etilendiammina, come nucleofilo, e isopropanolo, come solvente. La scelta di quello specifico nucleofilo è dettata dalla sua conformazione (è un composto lineare) e dalla sua basicità (con un pKa di 10.06). Inoltre, l'utilizzo dell'etilendiammina presenta due grandi vantaggi: il gruppo amminico non sottoposto ad attacco nucleofilo può essere sito di ancoraggio di altre biomolecole e inoltre i gruppi (-NH<sub>2</sub>) sono facilmente convertibili in altri gruppi funzionali. Anche il solvente ha un significativo impatto sull'andamento della reazione. Come viene suggerito da Zhu e collaboratori [41], la scelta del solvente nel quale è condotta una sostituzione nucleofila ha un marcato effetto sulla reazione. In particolare, quanto è più solvatato il nucleofilo, quanto più si favorisce il contatto tra la molecola amminica e i carboni carbonilici dei legami esterei. Pertanto, la scelta è ricaduta sull'isopropanolo, un solvente polare protico noto per la sua capacità di solvatare le molecole diamminiche.

L'andamento cinetico dell'amminolisi è influenzato da diversi parametri: la durata della reazione, la concentrazione del nucleofilo, la temperatura del processo e il rapporto film-reagente. Nel seguente lavoro, è stata analizzata come la durata del processo possa influenzare l'andamento della reazione, tenendo costante tutti gli altri parametri. In particolare, è stata analizzata l'influenza del tempo di contatto con la soluzione di diammina sulla struttura delle membrane ottenute da una soluzione di PLA al 10% (m/V) in DMF [Fig. 3.16].

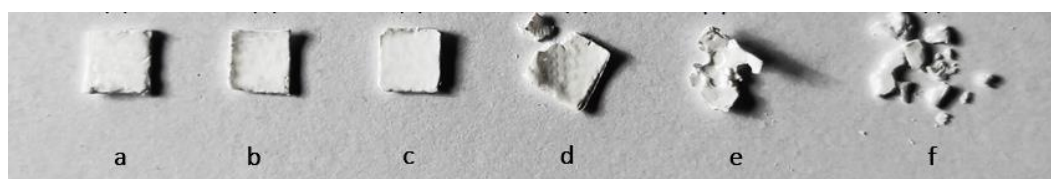


Figura 3.16 Foto di: a) PLA\_10\_DMF tal quale; e PLA\_10\_DMF sottoposto a un processo di amminolisi per b) 15 minuti; c) 30 minuti; d) 60 minuti; e) 120 minuti e f) 180 minuti

Più precisamente l'immagine raffigura sei differenti porzioni di membrana PLA\_10\_DMF, di cui una tal quale [Fig. 3.16 a] e le restanti funzionalizzate a differenti tempi di reazione pari a 15, 30, 60, 120 e 180 minuti [Fig. 3.16 b,c,d,e,f]. Le foto mostrate in figura dimostrano come già applicando tempi di reazione di 60 minuti [Fig. 3.16 d], la membrana si infragilisce in modo rivelante. È importante sottolineare che il processo di amminolisi comporta la rottura delle catene macromolecolari che si trovano sulla superficie del film polimerico.

Questo fenomeno causa un'erosione, in quanto macromolecole a basso peso molecolare possono passare in soluzione.

I medesimi campioni raffigurati nella [Fig. 3.16], sono stati sottoposti a spettroscopia FT-IR al fine di evidenziare l'avvenuta funzionalizzazione superficiale. Più in dettaglio la [Fig. 3.17] confronta lo spettro infrarosso del film di PLA tal quale con le misure dello stesso film amminolizzato per diversi tempi di reazione pari a 15, 30, 60, 120 e 180 minuti.

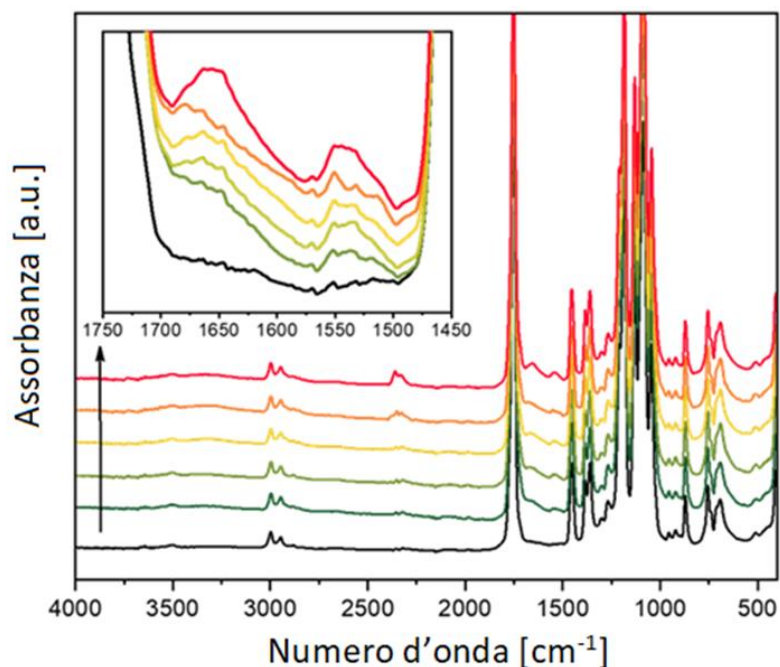
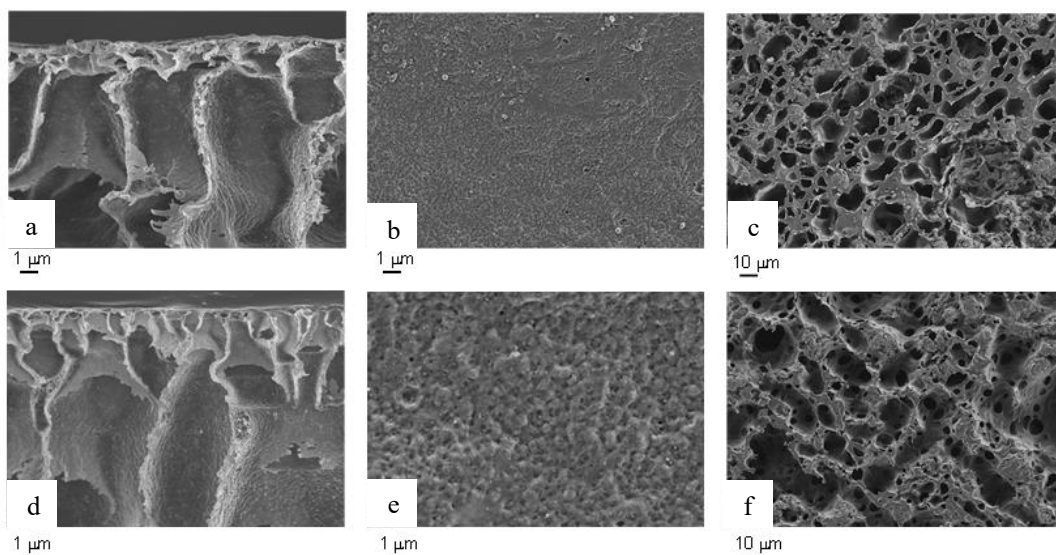


Figura 3.17 Lo spettro in nero viene prodotto dal film PLA tal quale (—); quello in verde scuro dal film di PLA funzionalizzato per 15 minuti (—), quello in verde chiaro dal film di PLA funzionalizzato per 30 minuti (—), quello in giallo per 60 minuti (—), quello in arancione per 120 minuti (—) e infine quello in rosso per 180 minuti (—)

Nel campione tal quale si osservano segnali intensi a  $1760\text{ cm}^{-1}$ , che possono essere associati allo stretching del gruppo carbonilico, e i segnali a  $2900\text{ cm}^{-1}$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$  corrispondenti rispettivamente allo stretching del legame sigma C-H e quello C-C. Nei campioni amminolizzati, oltre ai segnali citati sono presenti bande a circa  $1660\text{ cm}^{-1}$  e  $1530\text{ cm}^{-1}$ , che sono dovute allo stretching del legame C=O e al bending del legame sigma N-H, entrambi appartenenti al gruppo ammidico e la cui intensità aumenta all'aumentare del tempo di reazione. Questi risultati trovano un riscontro sia negli spettri IR ottenuti dalla caratterizzazione di particelle di PLLA/PDLA amminolizzate da Boi e collaboratori [76] che da quelli ottenuti dallo studio effettuato da Jeznach e collaboratori [77]. Da sottolineare che in entrambe le ricerche si sono utilizzati i medesimi solventi e reagenti, ovvero isopropanolo e etilendiammina.

Pertanto, in questo lavoro di tesi, considerando sia i risultati relativi alla caratterizzazione morfologica che quelli IR, si è deciso di far durare il processo di funzionalizzazione per trenta minuti, in quanto tale tempistica consente lo sviluppo di film con migliori caratteristiche di tenacità-rigidità e allo stesso tempo si raggiunge un grado di funzionalizzazione sufficiente.

Per evidenziare, quindi, l'effetto del trattamento sulla morfologia dei film, sono state effettuate misure FE-SEM. In particolare, in **[Fig. 3.18]** sono state messe a confronto delle micrografie che ritraggono l'aspetto superficiale e la sezione di una membrana PLA\_10\_DMF tal quale e di una PLA\_10\_DMF sottoposta ad amminolisi per il tempo di 30 minuti.



*Figura 3.18 Analisi FE-SEM: a) della sezione di una membrana PLA\_10\_DMF tal quale; b) e c) della superficie di una membrana PLA\_10\_DMF tal quale; d) della sezione di una membrana PLA\_10\_DMF amminolizzata per 30 minuti; e) e f) della superficie di una membrana PLA\_10\_DMF amminolizzata per 30 minuti*

Nelle figure *a,b,c* dell'immagini superiore vengono raffigurate tre micrografie della membrana tal quale ( nella figura *a* viene raffigurata la sezione del campione invece nelle figure *b* e *c* la superficie a due differenti ingrandimenti) e nelle figure *d,e,f* vengono rappresentate tre micrografie della membrana amminolizzata nelle stesse condizioni di analisi. Confrontando la sezione dei due differenti campioni possiamo concludere che la morfologia finger-like non viene perturbata dal trattamento chimico **[Fig. 3.18 a]**, **[Fig. 3.18 d]**, a conferma che il fenomeno si verifica prevalentemente sulla superficie, senza modificare il bulk della membrana. Invece, dalle micrografie che mostrano la superficie del film, si nota come l'amminolisi conferisce una maggiore rugosità, dovuto al fenomeno di erosione tipico di tale funzionalizzazione, e una maggiore porosità. In realtà, come suggerito da Zhu e

collaboratori [41], l'erosione superficiale indotta da tale processo chimico è un fenomeno tipico del PLA e il PET ma non del PCL, la cui morfologia superficiale non viene alterata in modo significativo.

Al fine di indagare se l'amminolisi potesse influenzare la stabilità termica dei campioni, quest'ultimi sono stati sottoposti all'analisi termogravimetrica (TGA). Nello specifico, in [Fig. 3.19], sono riportati i termogrammi del film PLA\_10 tal quale e amminolizzato con un tempo di 30 minuti. Sull'asse delle ascisse è riportata la temperatura in °C e sull'asse delle ordinate la variazione di massa in percentuale (%). Generalmente per quantificare la degradazione, si fa riferimento alla temperatura di massima di velocità di degradazione ( $T_{vmax}$ ) che corrisponde al punto di flesso del termogramma.

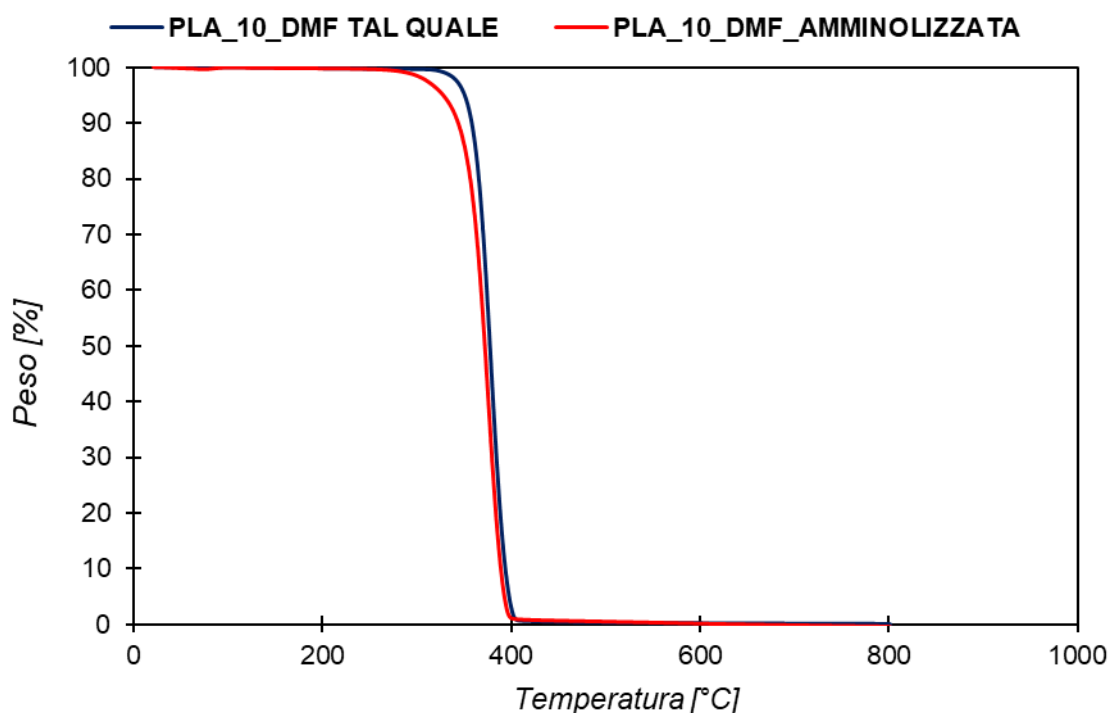


Figura 3.19 Termogrammi di PLA\_10\_DMF tal quale rappresentata in blu e PLA\_10\_DMF amminolizzata per il tempo di 30 minuti in rosso

Dalla [Fig. 3.19] è possibile osservare come la temperatura di massima velocità di degradazione ( $T_{vmax}$ ) del polimero messo a contatto con la diammina per 30 minuti (330 °C) sia simile rispetto a quella del polimero tal quale (335 °C). Questo risultato indica che l'amminolisi ha uno scarso effetto sulle proprietà termiche del film oltre ad essere un fenomeno prettamente superficiale per il PLA.

Nonostante i buoni risultati evidenziati dalla spettroscopia infrarossa e dall'analisi termogravimetrica, i film porosi amminolizzati a base di PLA presentano proprietà meccaniche non idonee al fine di un loro possibile utilizzo in campo analitico [Fig. 3.20].



Figura 3.20 Notevole fragilità di una membrana PLA\_10\_DMF aminolizzata per il tempo di 30 minuti

La notevole fragilità mostrata dai film a base di PLA in seguito all'amminolisi, ci ha pertanto indotto nel prendere come riferimento, nelle funzionalizzazioni future, le membrane ottenute da un blend a base di PLA e PCL in un rapporto 95:5, in quanto il policaprolattone è noto per migliorare le proprietà meccaniche del PLA.

### 3.3 STUDIO DELL'UTILIZZO DI MEMBRANE COME CAMPIONATORI PASSIVI

#### 3.3.1 Prove di adsorbimento con la fluoresceina sodica

Al fine di studiare le interazioni specifiche tra le funzionalità create sulla superficie dei film porosi a seguito della reazione di amminolisi e specie cariche negativamente, sono state effettuate delle prove di accumulo utilizzando fluoresceina sodica, una sostanza carica negativamente comunemente usata come molecola modello per medicinali e sostanze inquinanti [Fig. 3.21].

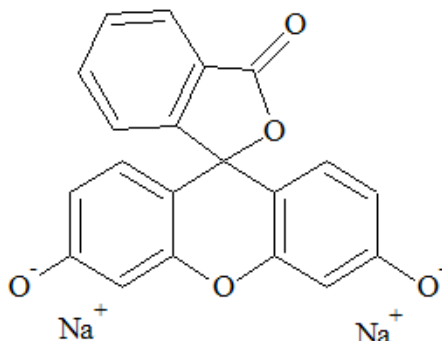


Figura 3.21 Struttura chimica della fluoresceina sodica

A partire da una membrana PLA\_PCL\_95\_5\_DMF tal quale e da una membrana PLA\_PCL\_95\_5\_DMF sottoposta al processo di amminolisi per il tempo di trenta minuti, sono ricavati tre porzioni del medesimo diametro di 6 mm. Quest'ultimi vengono immersi in una soluzione di fluoresceina sodica a una concentrazione di 5  $\mu\text{M}$  per 24 ore. Al termine del tempo di accumulo, la concentrazione del colorante adsorbito dai due film porosi viene quantificata tramite la spettroscopia UV-VIS [Fig. 3.22].

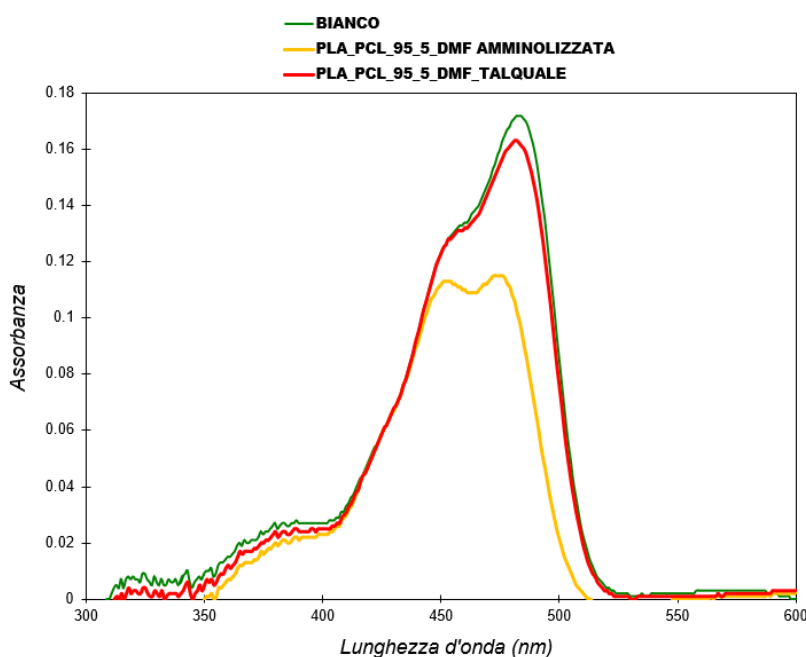


Figura 3.22 Confronto spettri UV-VIS delle soluzioni a base di fluoresceina su cui sono state immersi tre porzioni di membrana PLA\_PCL\_95\_5\_DMF tal quale (—) o amminolizzata (—); in verde (—) è raffigurato lo spettro UV-VIS del bianco

In [Fig. 3.22] sono riportate le curve relative all'analisi UV-VIS delle due soluzioni a base di fluoresceina su cui sono stati immersi i tre campioni ottenuti da due membrane diverse. Gli spettri UV sono in buon accordo con quelli riportati in precedenti lavori [78], con un massimo di assorbanza ben evidenziato ad una lunghezza d'onda di 483 nm. Confrontando lo spettro in arancione con quello in rosso, possiamo notare che, come la membrana amminolizzata, ha maggiormente adsorbito la fluoresceina. Questo risultato può essere correlato alle interazioni di natura elettrostatica tra i gruppi amminici introdotti sulla superficie del film poroso e i gruppi carichi negativamente della fluoresceina. Il diverso accumulo di fluoresceina nei due campioni è evidenziato anche visivamente, confrontando la colorazione assunta dal campione amminolizzato rispetto a quello del film tal quale [Fig. 3.23].

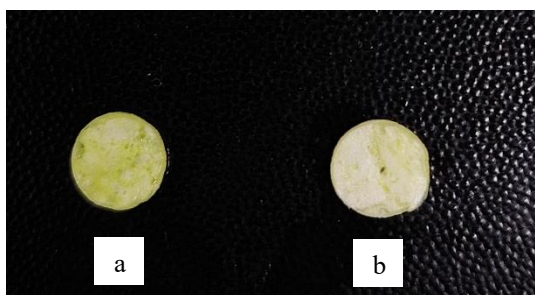


Figura 3.23 Foto di: a) membrana PLA\_PCL\_95\_5\_DMF amminolizzata; b) membrana PLA\_PCL\_95\_5\_DMF tal quale

Attraverso la retta di calibrazione e facendo riferimento alla misura del bianco, si è potuto risalire alla quantità di colorante adsorbita dai due diversi campioni [Tab. 3.10].

Tabella 3.10 Valori di massimo di assorbanza del bianco, delle soluzioni in cui sono state immersi tre porzioni della membrana PLA\_PCL\_95\_5\_DMF tal quale e quella della membrana PLA\_PCL\_95\_5\_DMF sottoposta al processo di amminolisi per il tempo di 30 minuti e concentrazione di fluoresceina adsorbita da parte di ciascun campione

CAMPIONE	ASSORBANZA	CONCENTRAZIONE DI COLORANTE ADSORBITO (ppm)
BIANCO	0.17	-
PLA_PCL_95_5_DMF TAL QUALE	0.16	46.63
PLA_PCL_95_5_DMF AMMINOLIZZATA	0.11	225.76

Da questi risultati possiamo concludere che la funzionalizzazione superficiale contribuisce ad aumentare la capacità del film poroso a trattenere la fluoresceina, ampliando così le possibili applicazioni cui si possono sfruttare tali membrane.

### 3.3.2 Utilizzo dei film porosi come adsorbitori di inquinanti

Sulla base della capacità dei film sviluppati di interagire con specie cariche negativamente, si è pensato di proporre l'utilizzo delle membrane a base PLA (amminolizzate e tal quali) e quelle a base PLA/PCL (amminolizzate e tal quali) in campo analitico come campionatori passivi. È rivelante sottolineare che il seguente lavoro di tesi si è svolto in sinergia con un progetto di tesi magistrale in chimica analitica coordinato dalla Prof.ssa Di Carro, finalizzato a studiare l'utilizzo di questi film polimerici per il campionamento in ambiente acquoso di determinati contaminanti. Più precisamente, per studiare il loro possibile utilizzo in campo analitico, sono stati presi in dettaglio i seguenti campioni:

- Membrana funzionalizzata tramite amminolisi per un tempo di tempo di 30 minuti ottenuta da una soluzione polimerica di PLA in DMF a una percentuale in peso del 10% m/V;
- Membrana tal quale ottenuta da una soluzione polimerica di PLA/PCL in DMF, in rapporto composizionale di 95:5, a una percentuale in peso del 10% m/V;
- Membrana funzionalizzata tramite amminolisi per un tempo di 30 minuti ottenuta da una soluzione polimerica di PLA/PCL in DMF, in rapporto composizionale di 95:5, a una percentuale in peso del 10% m/V.

I risultati raggiunti nel seguente ambito sono stati ottenuti tramite l'accoppiamento di un cromatografo liquido ad elevate prestazioni con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (HPLC-MS-QQQ). L'accoppiamento è necessario per separare gli analiti prima della loro rivelazione con la spettrometria di massa.

### 3.3.3 Effetto matrice

Come descritto nei paragrafi precedenti, l'analisi di campioni reali è resa complicata dalla presenza della matrice del campione. Tale matrice può contenere specie con proprietà simili all'analita, generando una risposta strumentale che difficilmente si può distinguere da quella proveniente dall'analita. Di conseguenza, questo provocherà un errore consistente dal punto di vista quantitativo.

Si è studiato l'effetto matrice per tre diverse membrane:

- PLA\_10\_DMF, funzionalizzata tramite l'amminolisi per il tempo di 30 minuti, utilizzando il metanolo come solvente di lavaggio;
- PLA\_PCL\_95\_5\_DMF funzionalizzata tramite l'amminolisi per il tempo di 30 minuti, utilizzando l'isopropanolo come solvente di lavaggio;
- PLA\_PCL\_95\_5\_DMF funzionalizzata tramite l'amminolisi per il tempo di 30 minuti, utilizzando il metanolo come solvente di lavaggio.

L'effetto matrice, in questo caso, ha il solo scopo di determinare se i nostri campioni risultano essere dei buoni mezzi per campionare i 22 contaminanti scelti.

In [Tab. 3.11] è riportato l'effetto matrice percentuale presentato dai 22 contaminanti per i due tipi di formulazione di film polimerici con due lavaggi differenti.



Tabella 3.11 Effetto matrice nei confronti delle tre membrane

CAMPIONE	NUMERO DI ANALITI CON EFFETTO MATRICE NEL RANGE CONSIDERATO ACCETTABILE (80% < X > 120%)
PLA_10_DMF lavato con metanolo	9
PLA_PCL_95_5_DMF lavato con isopropanolo	15
PLA_PCL_95_5_DMF lavato con metanolo	12

Prendendo come riferimento la membrana PLA\_10\_DMF, su 22 contaminanti emergenti, 9 analiti presentano un effetto matrice accettabile: l'Acesulfame k, la Paraxantina, la Caffèina, il Triclosan, l'Estrone, 17 $\alpha$ -etinilestradiolo, il Bisfenolo A, il Salbutamolo e l'Acido perfluorooctanoico.

Per quanto riguarda la membrana PLA\_PCL\_95\_5\_DMF lavata con isopropanolo, ben 15 contaminanti su 22 presentano un effetto matrice accettabile: la Paraxantina, la Caffèina, il Salbutamolo, l'Acido perfluorooctanoico, il Sucralosio, il Naprossene, l'Ibuprofene, il Benzofenone-3, il Gemfibrozil, l'Etil esil metossi cinnamato, l'Octocrylene, il Bisfenolo A,  $\beta$ -Estradiolo, 17 $\alpha$ -etinilestradiolo e l'Estrone.

Invece di quella lavata con il metanolo, 12 contaminanti presentano un effetto matrice accettabile: l'Acesulfame k, l'Acido perfluorooctanoico, il Sucralosio, il Ketoprofene, il Salbutamolo, l'Ibuprofene, il Benzofenone-3, l'Etil esil metossi cinnamato, l'Ottil dimetil p-amminobenzoato, il Bisfenolo A,  $\beta$ -estradiolo e l'Estrone.

Tra il lavaggio effettuato in isopropanolo o in metanolo, è da preferire il primo, non solo per i risultati raggiunti dall'effetto matrice ma anche perché il metanolo provoca una maggiore erosione superficiale, a causa di reazioni di alcolisi, che rende il campione non sfruttabile a livello applicativo.

Nel complesso i risultati sono da considerarsi soddisfacenti, poiché, anche se è stata finora eseguita una sola replica di questo esperimento, la maggior parte degli analiti rientra nell'intervallo 80-120% prima definito. È possibile quindi concludere che sia la membrana a base di PLA che quella a base di PLA/PCL risultano essere dei buoni mezzi per campionare gli analiti in un ambiente acquoso.

### 3.3.4 Prove di accumulo

Nonostante i risultati incoraggianti ottenuti analizzando l'effetto matrice, si è deciso di prendere come riferimento solo le membrane a base del blend costituito da PLA e PCL lavate con isopropanolo. Invero, sia le membrane a base di PLA che quelle a base di PLA e PCL trattate con il metanolo, risultavano essere troppo fragili da poterle sfruttare in campo analitico. Per le prove di accumulo si sono utilizzati 21 dei 22 analiti presi come riferimento per l'effetto matrice (viene escluso l'Acido mefenamico perché il suo segnale era poco intenso da poter essere rivelato) più la Furosemide, l'Idroclorotiazide e la Teofillina.

Tramite HPLC-MS-QQQ, sono state analizzate due soluzioni di cui una proveniente dall'accumulo della membrana PLA\_PCL\_95\_5\_DFM tal quale e una proveniente dall'accumulo della membrana PLA\_PCL\_95\_5\_DFM sottoposta al processo di amminolisi per il tempo di 30 minuti [Fig. 3.24].

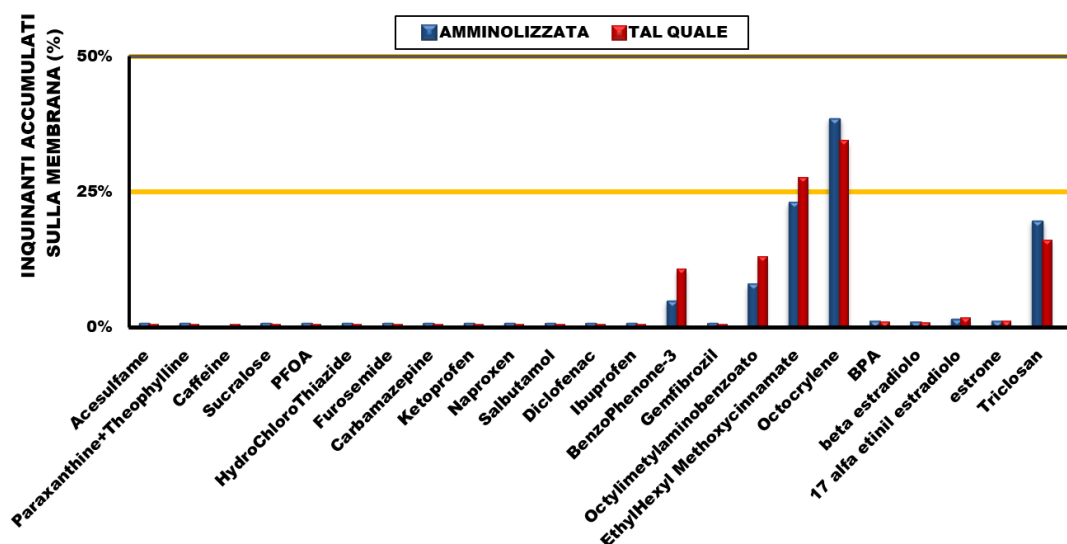


Figura 3.24 Quantità in percentuale di analita adsorbito da parte della membrana PLA\_PCL\_95\_5\_DMF tal quale (segnale in rosso) e quella amminolizzata (segnale in blu)

Lo ione molecolare e i vari ioni che si originano per frammentazione della Paraxantina e della Teofillina risultano essere identici. Pertanto, il rivelatore dello spettrometro di massa non riesce a distinguere le due differenti sostanze producendo un unico segnale.

Dalla [Fig. 3.24], si osserva che le due membrane hanno adsorbito maggiormente il Triclosan, l'Octocrylene, l'Ottil dimetil p-amminobenzoato, il Benzofenone-3 e l'Etil esil metossi cinnamato e una ridotta quantità (minore dell'1%) di Estrone, Bisfenolo A e 17 $\alpha$ -etinilestradiolo. Tutti i restanti contaminanti non sono stati accumulati dalle due membrane durante i 4 giorni di attività sperimentale. Esaminando la struttura chimica degli analiti che

vengono maggiormente intrappolati dalla membrana, si può notare che la maggior parte di essi sono caratterizzati da lunghe catene idrocarburiche, che conferiscono alle molecole un carattere apolare. Tali contaminanti (ad eccezione del Triclosan che è un antibatterico) sono composti utilizzati in creme solari e in vari cosmetici per assorbire i raggi UV.

Più precisamente, si nota che la membrana amminolizzata [segnale in blu di Fig. 3.24] ha adsorbito maggiore quantità di Octocrylene e Triclosan rispetto il film tal quale e invece quest'ultimo [segnale in rosso di Fig. 3.24] ha sviluppato maggiori interazioni nei confronti del Benzofenone-3, dell'Ottil dimetil p-amminobenzoato e dell'Etil esil metossi cinnamato. Per comprendere meglio le interazioni che si sviluppano tra la membrana e tali analiti, si deve ricordare che la capacità di adsorbimento è fortemente influenzata da molteplici fattori, tra i quali il pH, la costante di ripartizione ottanolo/acqua ( $\log K_{ow}$ ) e la salinità della soluzione. Di seguito, nella tabella [Tab. 3.12], sono riportati i valori di pKa e il  $\log K_{ow}$  dei contaminanti maggiormente adsorbiti dalle membrane. In letteratura non sono presenti i valori del pKa dell'Octocrylene e dell'Etil esil metossi cinnamato.

Tabella 3.12 Valori del pKa e del  $\log p_{ow}$  degli inquinanti maggiormente assorbiti dalla membrana PLA\_PCL\_95\_5\_DMF tal quale e amminolizzata

COMPOSTO	pKa	Log $K_{ow}$
Triclosan	8.1	5.0
Octocrylene	-	7.1
Ottil dimetil p-amminobenzoato	6.0	5.8
Benzofenone-3	7.0	3.3
Etil esil metossi cinnamato	-	5.5

Nel seguente lavoro di tesi, le prove di accumulo sono state effettuate in una soluzione a pH 8: quando il valore del pH è maggiore del pKa di un determinato inquinante allora quest'ultimi sono presenti in soluzione nella forma dissociata (anionica), invece quando il pH è minore del pKa le molecole sono presenti nella forma non dissociata.

L'adsorbimento dipende anche dalle caratteristiche chimico fisiche della membrana: si fa riferimento al punto di carica zero (PZC) che è il valore del pH al quale la densità di carica elettrica netta su di una superficie è zero. Dalla letteratura, si evince che il PZC del PLA è circa uguale a 7.3 e invece quello del PCL è circa compreso tra 7 e 8 [79]. Quando il valore del pH della soluzione è maggiore del PZC allora la superficie del film polimerico si carica

negativamente. Quindi la principale forza che guida l'interazione tra il triclosan (carico positivamente) e la membrana (carica negativamente) è la forza elettrostatica come viene confermato dalla letteratura [2]. Tutto ciò spiega il motivo per il quale una membrana amminolizzata è riuscita ad adsorbire più triclosan rispetto quella tal quale [Fig. 3.24]: i gruppi amminici innestati sul PLA a pH 8 si trovano nella forma protonata e quindi la densità di carica positiva aumenta.

Basandosi sul valore del coefficiente di ripartizione degli analiti presi come riferimento [Tab. 3.12], si può affermare che anche le interazioni idrofobiche svolgono un ruolo importante nell'adsorbimento. A questo proposito, è importante sottolineare che il PLA e il PCL sono materiali idrofobici caratterizzati da un valore di angolo di contatto rispettivamente pari a circa 80° e 110°. Analizzando in dettaglio la [Fig. 3.24], si osserva che la membrana PLA\_PCL\_95\_5\_DMF tal quale, presenta una maggiore interazione nei confronti del Benzofenone-3, dell'Ottil dimetil p-amminobenzoato e dell'Etil esil metossi cinnamato rispetto quella amminolizzata. Tutto ciò potrebbe esser spiegato sulla base di quello che si è discusso precedentemente: una membrana amminolizzata è caratterizzata da un grado di idrofobicità inferiore rispetto a quella tal quale e quindi le interazioni idrofobiche che si svilupperanno saranno di conseguenza maggiormente attenuate.

Al fine di ottenere una soluzione a pH pari a 8, è stato utilizzato un sale sodico e un sale ammonico. La salinità è un fattore importante che potenzialmente influenza la capacità di adsorbimento: quando la forza ionica della soluzione aumenta, i cationi provenienti dalla dissociazione dei composti ionici competeranno con gli inquinanti per i siti di adsorbimento. In questa direzione, Lang e collaboratori [2] hanno osservato che il Na<sup>+</sup>, proveniente dalla dissociazione del NaCl, compete con il Triclosan per i siti di adsorbimento del PLA.

Allo stesso tempo all'aumentare della concentrazione salina la solubilità degli inquinanti in soluzione diminuisce e quindi gli analiti si ripartiscono preferibilmente nella matrice porosa piuttosto che restare in soluzione.

### **3.4 SVILUPPI FUTURI: FUNZIONALIZZAZIONE AL PLASMA**

L'elevata fragilità e la notevole erosione superficiale sono i principali fattori che ci hanno spinto a valutare un altro processo di funzionalizzazione superficiale: il trattamento al plasma. È noto che i trattamenti fisici basati su tecnologie di irradiazione al plasma, oltre ad essere ecosostenibili, modificano selettivamente gli strati più superficiali del materiale non provocando cambiamenti sulle sue proprietà di *bulk* [80].

La Plasmapps Srl è un'azienda italiana ubicata a Modugno (BA), con la quale è nata una collaborazione volta ad effettuare un trattamento superficiale di natura plasmochimico sui film a base di PLA. Più precisamente, due diversi campioni sono stati soggetti a un trattamento al plasma alimentato con gas azotato:

- Un film denso preparato tramite il metodo *casting*, a partire da una soluzione polimerica ottenuta dalla solubilizzazione del PLA in DCM a una percentuale in peso del 2% m/V;
- Un film poroso preparato tramite il metodo NIPS, a partire da una soluzione polimerica ottenuta dalla solubilizzazione del PLA in DMF a una percentuale in peso del 10% m/V.

Di seguito, verranno descritte le procedure adottate per i due campioni.

### 3.4.1 Film denso

L'avvenuta funzionalizzazione del film denso in seguito al trattamento al plasma alimentato con un gas azotato è stata dimostrata tramite misure di angolo di contatto, depositando una goccia di acqua di 3  $\mu$ L sulla superficie del film denso e valutandone il suo profilo ottico. In [Fig. 3.25] viene mostrato la foto di una goccia d'acqua depositata su un film di PLA tal quale [Fig. 3.25 A] e sul film trattato con il plasma [Fig. 3.25 B].

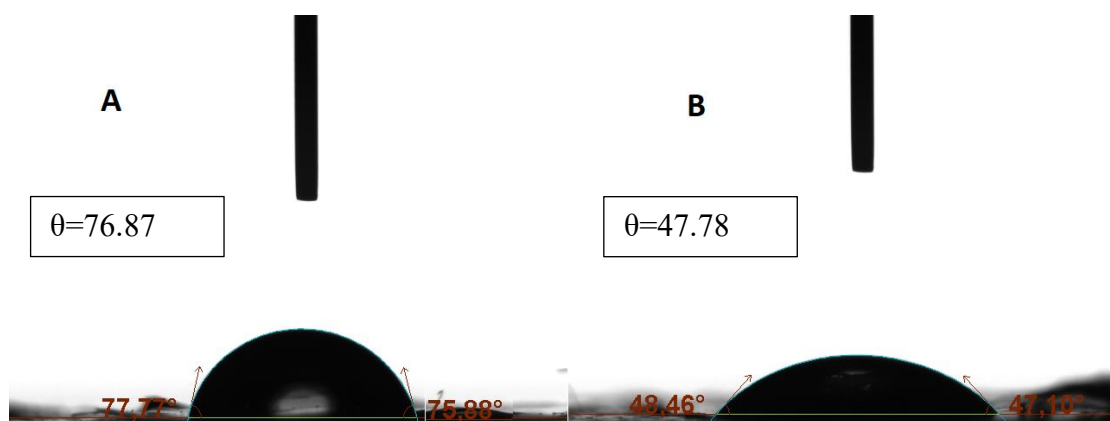


Figura 3.25 A) Profilo ottico della goccia di acqua depositata sulla superficie del film denso tal quale; B) Profilo ottico della goccia di acqua depositata sulla superficie del film denso funzionalizzato al plasma

Dalla [Fig. 3.25 A], si può osservare che il film denso tal quale sia caratterizzato da un angolo di contatto medio  $\theta$  pari a  $76.87^\circ$ , valore caratteristico di un materiale idrofobo. In seguito alla funzionalizzazione, il film subisce la conversione dallo stato idrofobico a quello idrofilico, come testimoniato dal valore di  $\theta$  uguale a  $47.78^\circ$  [Fig. 3.25 B]. Questo fenomeno è legato al trattamento plasmochimico realizzato per conferire al materiale polimerico una funzionalità superficiale, senza modificarne le caratteristiche meccaniche e fisiche. È importante sottolineare che i plasmi alimentati con gas azotati, come quello utilizzato per trattare il nostro campione, innestano gruppi essenzialmente polari azotati e ossigenati

(questi ultimi per effetto della ossidazione da parte dell'aria), che sviluppano forti interazioni nei confronti della gocciolina di acqua. In particolare, come dimostrato da Schröder e collaboratori [81], la funzionalizzazione via plasma è il risultato delle reazioni che si sviluppano tra i radicali amminici, provenienti dalla sorgente, ed i radicali metilici o metilenici situati sulla superficie polimerica. I risultati raggiunti tramite le misure di angolo di contatto vengono anche confermati da alcuni lavori riportati in letteratura. Ad esempio, Yang e collaboratori [82] hanno notato una diminuzione di circa 50° dell'angolo di contatto di film densi a base di PLA sottoponendo a ionizzazione l'azoto gassoso ed un calo di circa 40° utilizzando l'ammoniaca gassosa.

Successivamente, sono state effettuate delle analisi tramite la spettroscopia IR. Ricordando che i trattamenti fisici basati su tecnologie al plasma sono processi di funzionalizzazione che interessano solo la superficie del campione, l'analisi dell'intero campione, tipica dello FT-IR, potrebbe non evidenziare l'avvenuta modifica superficiale. Infatti, mettendo a confronto lo spettro del film tal quale rispetto a quello del film funzionalizzato non si sono osservate sostanziali differenze. Al fine di evidenziare questa modifica superficiale, come suggerito da Duran e collaboratori [80], si potrebbe far riferimento alla spettroscopia fotoelettronica a raggi x (XPS) capace di rivelare la composizione elementare di una qualsiasi superficie polimerica. Tuttavia, i risultati raggiunti tramite le misure dell'angolo di contatto possono essere sufficienti al fine di dimostrare l'avvenuta funzionalizzazione superficiale.

### **3.4.2 Film poroso**

Come viene suggerito da Chau e collaboratori [83], le varie misure per determinare l'angolo di contatto, devono essere preferibilmente effettuate su un materiale solido liscio, piatto, omogeneo, inerte e soprattutto non poroso. In particolare, il modello di Wenzel descrive come la porosità di una superficie possa influenzare il valore dell'angolo di contatto [84]. Al contrario, l'adsorbimento di molecole risulta essere più efficace in sistemi porosi. Per questo motivo, al fine di determinare la possibilità di utilizzare i materiali funzionalizzati come adsorbitori di molecole cariche negativamente, sono stati utilizzati film porosi trattati.

A partire da una membrana PLA\_10\_DMF tal quale e da una membrana PLA\_10\_DMF funzionalizzata via plasma, vengono ricavati tre porzioni circolari del medesimo diametro di 6 mm. Quest'ultimi vengono immersi in una soluzione di fluoresceina sodica a una concentrazione di 5  $\mu$ M per 24 ore per consentire lo sviluppo delle forze elettrostatiche tra il PLA carico positivamente e il colorante carico negativamente. Al termine del tempo di

accumulo, la concentrazione del colorante adsorbito dai due film porosi viene quantificata tramite la spettroscopia UV-VIS. I risultati ottenuti non mostrano una sostanziale differenza di adsorbimento per i due differenti campioni. Una possibile ipotesi per comprendere questo risultato riguarda la densità dei gruppi amminici effettivamente innestati sulla superficie dei film porosi a base di PLA. Un'opportuna scelta dei parametri sperimentali, come la potenza, la durata del tempo di trattamento e il flusso del gas immesso garantisce l'effettivo inserimento delle funzionalità desiderate, come peraltro viene confermato dallo studio condotto da Yang e collaboratori [82]. Quindi nel nostro caso, un'ipotesi plausibile, è che si siano utilizzati delle particolari condizioni sperimentali che non hanno permesso un'efficace funzionalizzazione.

Un'altra ipotesi per comprendere i risultati raggiunti dalla spettroscopia UV-VIS riguarda il fenomeno chiamato "recupero idrofobico" o anche definito come invecchiamento superficiale [85]. L'innesto di gruppi polari su superfici idrofobiche determina un innalzamento dell'energia superficiale portando ad una migliore bagnabilità ma nello stesso tempo anche ad un'instabilità. Pertanto, per ripristinare la condizione di equilibrio, al fine di abbassare l'energia superficiale, si osserva la migrazione dei gruppi polari innestati in superficie verso il bulk del materiale portando ad un conseguente calo dell'efficacia del trattamento. Per supportare tale ipotesi, sarà necessario effettuare uno studio più dettagliato sulla variazione del grado di idrofilia dei film porosi in seguito al trattamento al plasma.

A tal proposito, Duran e collaboratori [80] hanno esaminato il recupero idrofobico misurando gli angoli di contatto di film polimerici a intervalli di tempo regolari, per un periodo di 15 giorni in seguito alla funzionalizzazione. In particolare, hanno osservato che i valori degli angoli di contatto per i film a base di PLA trattati con il plasma alimentato con un gas azotato, sono aumentati nel tempo fino a raggiungere, in alcuni casi, un valore vicino a 65°.

Oltre a questo fenomeno, esistono altri meccanismi responsabili della modificazione della composizione chimica superficiale. Ad esempio, in conseguenza all'esposizione dei materiali funzionalizzati all'aria, si osservano diversi fenomeni, tra i quali l'adsorbimento di contaminanti e le reazioni di ossidazione. Per ottenere superfici stabili nel tempo, come suggerisce Favia e collaboratori [86], è dunque necessario ridurre la mobilità delle catene polimeriche superficiali, sottoponendo il campione ad un processo di reticolazione prima della funzionalizzazione o altrimenti conservare il substrato in ambienti polari come l'acqua.

### 3.5 PROVE DI ADSORBIMENTO CON LA PARAROSANILINA CLORURO

Al fine di verificare la possibilità di utilizzare dei film porosi costituiti da un blend PLA/PCL\_COOH come adsorbitori, sono state effettuate delle prove di adsorbimento di una molecola carica positivamente, la pararosanilina cloruro. Tale composto è un colorante solido utilizzato generalmente in campo istologico per preparare il reattivo di Schiff necessario per marcare i mucopolisaccaridi conferendo loro una colorazione violacea [Fig. 3.26].

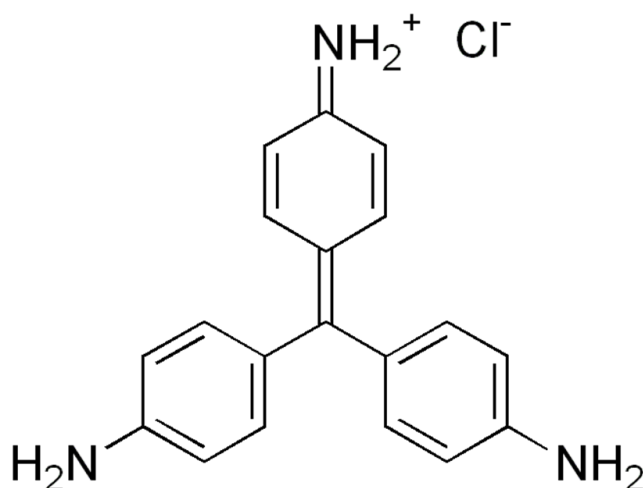


Figura 3.26 Struttura della pararosanilina cloruro

Alla luce della struttura chimica caratterizzata da gruppi amminici, la pararosanilina cloruro viene presa come molecola modello per simulare il comportamento di un medicinale nei confronti dei nostri campioni [87]. Più precisamente sono state effettuate delle prove di accumulo prendendo come riferimento cinque differenti membrane identificate con il consueto codice:

- PLA\_PCL\_COOH\_95\_5\_DMF;
- PLA\_PCL\_COOH\_90\_10\_DMF;
- PLA\_PCL\_COOH\_85\_15\_DMF;
- PLA\_PCL\_COOH\_80\_20\_DMF;
- PLA\_10\_DMF.

Da ciascuna membrana, è stata ricavata una porzione circolare del diametro di 1 cm che successivamente è stata immersa in una soluzione di 3 ml di pararosanilina cloruro in acqua ultra pura ad una concentrazione di 5 µg/ml per 24 ore. Al termine del tempo di accumulo, la soluzione è stata trasferita in cuvetta ed analizzata tramite lo spettrofotometro al fine di rivelare la concentrazione del colorante adsorbito dai cinque film porosi [Fig. 3.27].



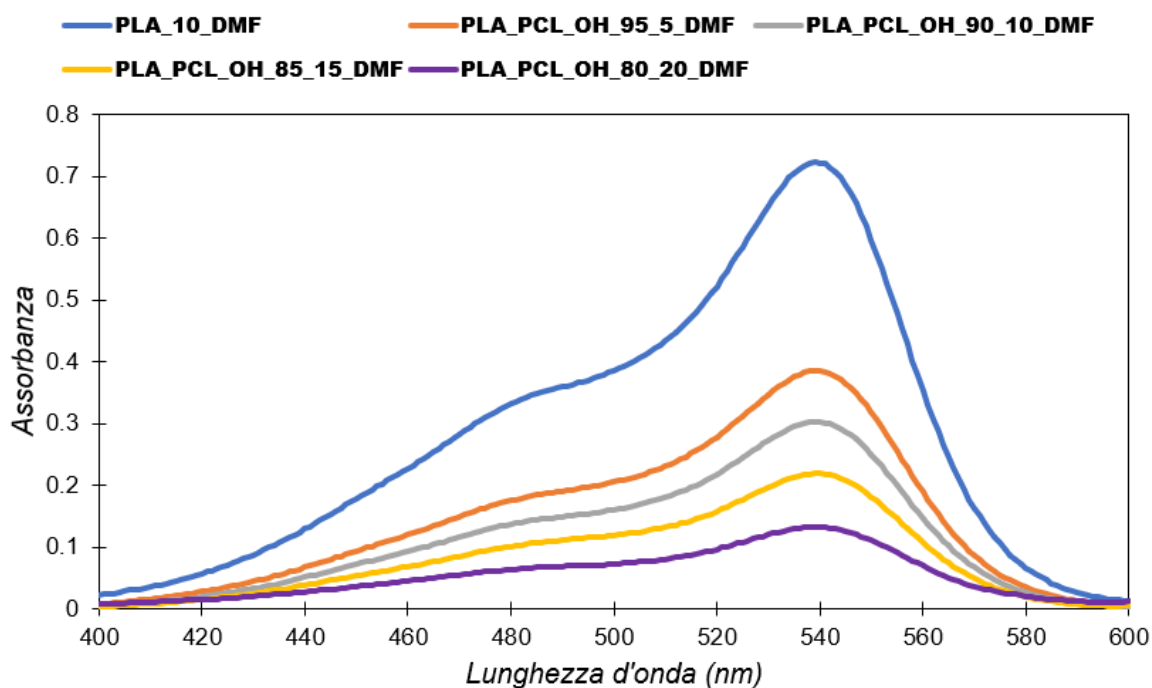


Figura 3.27 Confronto spettri UV-VIS delle soluzioni nelle quali è stata immersa una porzione di membrana PLA\_10\_DMF (—); o di PLA\_PCL\_COOH\_95\_5\_DMF (—); o di PLA\_PCL\_COOH\_90\_10\_DMF (—); o di PLA\_PCL\_COOH\_85\_15\_DMF (—); o infine di PLA\_PCL\_COOH\_80\_20\_DMF (—)

Gli spettri di adsorbimento sono in buon accordo con quelli riportati in precedenti lavori [88] che hanno mostrato un massimo di assorbimento a una lunghezza d'onda di 546 nm.

Grazie alle interazioni elettrostatiche che si instaurano tra le funzionalità carbossiliche del polimero a geometria stellare e le funzionalità amminiche del colorante, l'assorbimento mostrata dalle soluzioni nelle quali sono state immerse le membrane a base del PCL\_COOH risultano essere inferiori rispetto a quella in cui è stata introdotta la membrana PLA\_10\_DMF. Più precisamente, dalla [Fig. 3.27], focalizzando l'attenzione sull'analisi UV-VIS delle membrane a base del polimero a stella, osserviamo un calo dell'assorbimento all'aumentare della percentuale in peso del PCL\_COOH nel *blend* polimerico. Le maggiori interazioni elettrostatiche che si sviluppano all'aumentare della densità dei gruppi carbossilici sono evidenziate visivamente facendo riferimento alla colorazione assunta dalle diverse membrane in seguito alle prove di accumulo [Fig. 3.28].

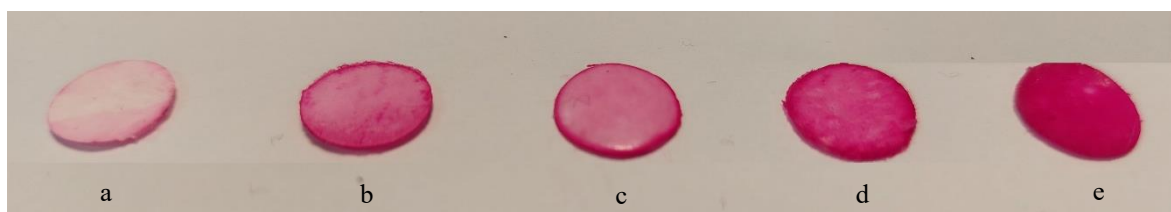


Figura 3.28 Foto di: a) PLA\_10\_DMF; b) PLA\_PCL\_COOH\_95\_5\_DMF; c) PLA\_PCL\_COOH\_90\_10\_DMF; d) PLA\_PCL\_COOH\_85\_15\_DMF; e) PLA\_PCL\_COOH\_80\_20\_DMF

Dalla [Tab. 3.13], attraverso la retta di calibratura e la misura del bianco, si è determinata la quantità di pararosanilina cloruro effettivamente adsorbita da ciascuna membrana.

*Tabella 3.13 Volume di ciascun campione (prima delle prove di accumulo) ottenuto dalla membrana PLA\_10\_DMF, PLA\_PCL\_COOH\_95\_5\_DMF, PLA\_PCL\_COOH\_90\_10\_DMF, da PLA\_PCL\_COOH\_85\_15\_DMF, da PLA\_PCL\_COOH\_85\_15\_DMF e dalla membrana PLA\_PCL\_COOH\_80\_20\_DMF; valori di assorbanza nel picco massimo per ciascun campione e per il bianco e infine viene anche riportata la concentrazione di pararosanilina cloruro adsorbita da parte di ciascun campione in seguito alle 24 ore di accumulo*

CAMPIONE	VOLUME ( $cm^3$ )	ASSORBANZA	CONCENTRAZIONE DI COLORANTE ADSORBITO ( $\mu g/ml$ )
BIANCO	-	1.142	-
PLA_10_DMF	0.054	0.722	1.813
PLA_PCL_COOH_95_5_DMF	0.054	0.386	3.357
PLA_PCL_COOH_90_10_DMF	0.054	0.302	3.743
PLA_PCL_COOH_85_15_DMF	0.054	0.219	4.129
PLA_PCL_COOH_80_20_DMF	0.054	0.132	4.619

Nonostante il PLA risulti essere caratterizzato da gruppi funzionali carbossilici, la bassa percentuale di questi ne limita l'interazione con i sistemi carichi positivamente: ciò spiega la netta differenza di adsorbimento nei confronti della pararosanilina cloruro da parte della membrana PLA\_10\_DMF rispetto quelle ottenute da un blend caratterizzato dalla presenza del polimero a geometria stellare. La scarsa interazione tra l'acido polilattico ed il colorante, trova riscontro anche nello studio condotto da Karst e collaboratori [89], nel quale si dimostra come il polimero forma deboli interazioni con le sostanze caratterizzate dalla presenza di alogeni.

Sulla base dei risultati mostrati, possiamo dedurre che le membrane ottenute dal blend caratterizzato dalla presenza del PCL\_COOH, la cui sintesi è facilmente scalabile, rappresentano dei materiali promettenti per un utilizzo applicativo nel campo della *drug delivery*. Infatti, sfruttando l'interazione selettiva con i gruppi carichi positivamente, queste membrane potrebbero rappresentare dei sistemi capaci di adsorbire determinate sostanze e veicolarle in maniera intelligente nel tessuto bersaglio.

## 4 CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono stati sviluppati film porosi a base di PLA, dimostrando una loro possibile applicazione sia nel campo della chimica analitica, come campionatori passivi, che in quella della *drug delivery* come sistemi capaci di interagire in maniera selettiva con determinate sostanze.

In particolare, al fine di ottenere un prototipo di campionatore passivo, sono state preparate diverse membrane, tramite il metodo dell'inversione di fase indotta dal non solvente, a partire da soluzioni costituite dal PLA (o da una miscela bifasica PLA e PCL commerciale ad alta massa) e da diversi tipi di solventi, quali DMF, Cyrene e Astrobio. La caratterizzazione dei sistemi preparati ha evidenziato che le membrane che presentano le migliori caratteristiche di rigidità-tenacità-porosità sono quelle ottenute da una soluzione polimerica di PLA/PCL in DMF, in rapporto composizionale di 95:5, con una percentuale in peso del 10% m/V (definita dal codice PLA\_PCL\_95\_5) e quelle preparate da una soluzione di PLA in DMF con una percentuale in peso del 10% m/V (PLA\_10\_DMF).

Al fine di funzionalizzare i film porosi è stato applicato un trattamento di amminolisi. Dalla spettroscopia in assorbimento nell'infrarosso, si è dimostrato che l'amminolisi risulta essere un processo capace di innestare nella superficie del film poroso gruppi funzionali amminici e amidici. In particolare, si è optato nel far durare il processo di funzionalizzazione per 30 minuti, tempo necessario al fine di introdurre una sufficiente densità di gruppi amminici e allo stesso tempo di preservare le caratteristiche meccaniche della membrana. Inoltre, si è valutato un ulteriore processo di funzionalizzazione, capace di introdurre gruppi funzionali sulla matrice polimerica sfruttando il plasma alimentato con un gas azotato. Tale metodo non è risultato però efficace nel rendere i film adsorbitori di molecole cariche negativamente.

Questo lavoro è stato svolto in sinergia con un altro progetto di tesi, finalizzato a studiare l'utilizzo dei film polimerici per il campionamento in ambiente acquoso di sostanze inquinanti. Dai risultati ottenuti, si è potuto concludere che sia la membrana PLA\_10\_DMF che quella PLA\_PCL\_95\_5 risultano sistemi capaci di campionare gran parte dei contaminanti presi come riferimento. In particolare, la membrana PLA\_PCL\_95\_5 è risultata la formulazione più adatta fornendo risultati migliori rispetto agli altri campioni esaminati.

Dai risultati ottenuti dalle prove di accumulo possiamo suggerire l'utilizzo della membrana PLA\_PCL\_95\_5 come campionatore passivo biodegradabile capace di adsorbire in maniera selettiva i filtri UV in un ambiente acquoso. Tra i possibili sviluppi futuri di questo lavoro

c'è quello di svolgere le medesime prove di accumulo direttamente in acqua di mare per studiare la capacità di adsorbimento della membrana al variare delle condizioni sperimentali come il pH, temperatura e salinità.

In questo lavoro di tesi, si è messo anche a punto lo sviluppo di film porosi preparati a partire da un blend costituito dal PLA e da un polimero sintetizzato *ad-hoc* caratterizzato da una forma a stella e da gruppi terminali carbossilici. La geometria e la presenza di tali gruppi funzionali, conferisce non solo una buona adesione tra le due fasi (come viene confermato dall'analisi FE-SEM) ma anche l'abilità di interagire con specie chimiche caratterizzate da gruppi funzionali amminici. Sfruttando l'interazione selettiva con i gruppi carichi positivamente, queste membrane possono anche rappresentare dei sistemi capaci di adsorbire selettivamente determinate sostanze e quindi svolgere un importante ruolo nel campo della *drug delivery*. Un'altra applicazione può essere trovata nel campo dell'ingegneria tissutale, infatti la porosità offerta da tali sistemi può essere sfruttata al fine di creare un prototipo di scaffold biodegradabile utile per ospitare e sostenere le culture cellulari.

## Bibliografia

- [1] N. M. Ainali, D. Kalaronis, E. Evgenidou, G. Z. Kyzas et al., *Do poly(lactic acid) microplastics instigate a threat? A perception for their dynamic towards environmental pollution and toxicity*. Science of the total environment. Vol. 832, 2022
- [2] Z. Lang and L. Xue, *Can polylactic Acid (PLA) act as an important vector for triclosan?* Sustainability. Vol. 14, 2022
- [3] R. Hatti-Kaul, L. J. Nilsson, B. Zhang, N. Rehnberg et al., *Designing biobased recyclable polymers for plastics*. Trends in biotechnology. Vol. 38, pp. 50-67, 2020
- [4] European bioplastic, *What are bioplastics?*  
[https://docs.european-bioplastics.org/publications/fs/EuBP\\_FS\\_What\\_are\\_bioplastics.pdf](https://docs.european-bioplastics.org/publications/fs/EuBP_FS_What_are_bioplastics.pdf)
- [5] A. Jimenez, M. Peltzer and R. Ruseckaite, *Poly(Lactic acid) science and technology*. The royal society of chemistry. Cambridge, UK, 2015, ISBN: 978-1-84973-879-8
- [6] L. Ranakoti, B. Gangil, S. K. Mishra, T. Singh et al., *Critical review on polylactic acid: properties, structure, processing, biocomposites, and nanocomposites*. Materials. Vol. 15, 2022
- [7] M. Vert, G. Schwarch and J. Coudane, Present and future of PLA polymer. Journal of macromolecular science, Part A. Vol. 32:4, pp. 787-796, 1995
- [8] S. Farah, D. G. Anderson and R. Langer, *Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review*. Advanced drug delivery reviews. Vol. 107, pp. 367-392, 2016
- [9] B. Gupta and N. Revagadea, *Poly(lactic acid) fiber: an overview*. Progress in polymer science. Vol. 32, pp. 455-482, 2007
- [10] K. Athanasiou and G. Niederauer, *Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers*. Biomaterials. Vol. 17, pp. 93-102, 1996
- [11] G. Rajeshkumar, A. Seshadri, G.L. Devnani, M.R. Sanjay et al., *Environment friendly, renewable and sustainable poly lactic acid (PLA) based natural fiber reinforced composites – A comprehensive review*. Journal of cleaner production. Vol. 310, 2021
- [12] F. S. Shahar, M. T. H. Sultan, S. S. N. Azrie, M. Jawaidd et al., *Fatigue and impact properties of 3D printed PLA reinforced with kenaf particles*. Journal of materials research and technology. Vol. 16, pp. 461-470, 2022
- [13] P. McKeown and M. D. Jones, *The Chemical recycling of PLA: a review*. Sustainable chemistry. Vol. 1, pp. 1-22, 2020
- [14] M. Shive and J. Anderson, *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*. Advanced drug delivery review. Vol. 28, pp. 5-24, 1997
- [15] P. Mainil-Varlet, R. Curtis and S. Gogolewski, *Effect of in vivo and in vitro degradation on molecular and mechanical properties of various low-molecular-weight polylactides*. Journal of biomedical materials research. Vol. 36, pp. 283-425, 1997
- [16] E. N. Economou, *The physics of solids*. Springer nature. Berlino, DE, 2010, ISBN:978-3-642-02068-1

- [17] M. H. Hutchinson, J. R. Dorgan, D. K. Hait and Sukhendu, *Optical properties of polylactides*. Journal of polymers and the environment. Vol. 14, pp. 119-124, 2006
- [18] R. A. Auras, S. P. Singh and J. J. Singh, *Evaluation of oriented poly(lactide) polymers vs. existing PET and oriented PS for fresh food service containers*. Packaging technology and science. Vol. 18, pp. 207-216, 2005
- [19] A. Ostafinska, I. Fortelny, M. Nevoralova and J. Hodan, *Synergistic effects in mechanical properties of PLA/PCL blends with optimized composition, processing, and morphology*. RSC advances. Vol. 5, pp. 98971-98982, 2015
- [20] N. More, M. Avhad, S. Utekar and A. More, *Polylactic acid (PLA) membrane—significance, synthesis, and applications: a review*. Polymer bulletin. Vol. 80, pp. 1117-1153, 2023
- [21] P. Martinsa, J. Nunes-Pereiraa, S. Lanceros-Méndez and C. Costa, *Chapter 17-Synthetic polymer-based membranes for lithium-ion batteries*. Synthetic polymeric membranes for advanced water treatment, gas separation, and energy sustainability. Pp. 383-415, 2020
- [22] Unipi, *Membrane e fibre cave*.  
<https://www.centropiaggio.unipi.it/sites/default/files/course/material/2014-05-22%20-%20Membrane%20e%20Fibre%20Cave.pdf>
- [23] Y. Tang, Y. Li, D. Ford, X. Qian et al., *A review on models and simulations of membrane formation via phase inversion processes*. Journal of membrane science. Vol. 640, 2021
- [24] J. T. Jung, J. F. Kim, E. di Nicolo and E. Drioli, *Understanding the non-solvent induced phase separation (NIPS) effect during the fabrication of microporous PVDF membranes via thermally induced phase separation (TIPS)*. Journal of membrane science. Vol. 514, pp. 250-263, 2016
- [25] A. C. Chinyerenwa, H. Wang, Q. Zhang and Y. Zhuang, *Structure and thermal properties of porous polylactic acid membranes prepared via phase inversion induced by hot water droplets*. Polymer. Vol. 141, pp. 62-69, 2018
- [26] R. Zsigmondy, W. Bachmann and E. de Haen, *Über neue filter*. Zeitschrift für anorganische und allgemeine chemie. Vol. 103, pp. 119-128, 1918
- [27] N. Ismail, A. Venault, J.-P. Mikkola and D. Bouyer, *Investigating the potential of membranes formed by the vapor induced phase separation process*. Journal of membrane science. Vol. 597, pp. 250-263, 2020
- [28] G. R. Guillen, Y. Pan, M. Li and V. Hoek, *Preparation and characterization of membranes formed by nonsolvent induced phase separation: a review*. Industrial engineering chemistry research. Vol. 7, pp. 3798-3817, 2011
- [29] M. Nofar, A. Tabatabaei, C. B. Park and H. Sojoudiasli, *Mechanical and bead foaming behavior of PLA-PBAT and PLA-PBSA blends with different morphologies*. European polymer journal. Vol. 90, pp. 231-244, 2017
- [30] M. A. Woodruff and D. W. Hutmacher, *The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century*. Progress in polymer science. Vol. 35, pp. 1217-1256, 2010
- [31] N. López-Rodríguez, A. López-Arraiza, E. Meaurio and J. Sarasua, *Crystallization, morphology, and mechanical behavior of polylactide/poly( $\epsilon$ -caprolactone) blends*. Polymer engineering and science. Vol. 46, pp. 1299-1308, 2006

- [32] V. Vilay, M. Mariatti, Z. Ahmad and K. Pasomsouk, *Characterization of the mechanical and thermal properties and morphological behavior of biodegradable poly(L-lactide)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) and poly(L-lactide)/poly(butylene succinate-co-L-lactate) polymeric blends*. Journal of applied polymer science. Vol. 114, pp. 1784-1792, 2009
- [33] J. Urquijo, G. Guerrica-Echevarría and J. I. Eguiazábal, *Melt processed PLA/PCL blends: Effect of processing method on phase structure, morphology, and mechanical properties*. Journal of applied polymer science. Vol. 132, 2015
- [34] L. Gardella, M. Calabrese and O. Monticelli, *PLA maleation: an easy and effective method to modify the properties of PLA/PCL immiscible blends*. Colloid and polymer science. Vol. 292, pp. 2391-2398, 2014
- [35] L. Wang, W. Ma, R. Gross and S. McCarthy, *Reactive compatibilization of biodegradable blends of poly(lactic acid) and poly( $\epsilon$ -caprolactone)*. Polymer degradation and stability. Vol. 59, pp. 161-168, 1998
- [36] T. Takayama, M. Todo and H. Tsuji, *Effect of annealing on the mechanical properties of PLA/PCL and PLA/PCL/LTI polymer blends*. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials. Vol. 4, pp. 255-260, 2011
- [37] R. M. Rasal, A. V. Janorka and D. E. Hirt, *Poly(lactic acid) modifications*. Progress in polymer science. Vol. 35, pp. 338-356, 2010
- [38] H. Conrads and M. Schmidt, *Plasma generation and plasma sources*. Plasma sources science and technology. Vol. 9, 2000
- [39] J. Yang, G. Shi, J. Bei and S. Wang, *Fabrication and surface modification of macroporous poly(L-lactic acid) and poly(L-lactic-co-glycolic acid) (70/30) cell scaffolds for human skin fibroblast cell culture*. Journal of biomedical materials research. Vol. 62, pp. 438-446, 2002
- [40] K. Cai, K. Yao, Y. Cui and S. Lin, *Surface modification of poly (D,L-lactic acid) with chitosan and its effects on the culture of osteoblasts in vitro*. Journal of biomedical materials research. Vol. 60, pp. 398-404, 2002
- [41] Y. Zhu, Z. Mao and G. Changyou, *Aminolysis-based surface modification of polyesters for biomedical applications*. RSC advances. Vol. 3, pp. 2509-2519, 2012
- [42] N. Rabiei and M. H. Kish, *Aminolysis of polyesters for cracking and structure clarifying: A review*. Polymers advanced technology. Vol. 33, pp. 3903-3919, 2022
- [43] L. Bech, T. Meylheuc, B. Lepoittevin and P. Roger, *Chemical surface modification of poly(ethylene terephthalate) fibers by aminolysis and grafting of carbohydrates*. Journal of polymer science. Vol. 45, pp. 2172-2183, 2007
- [44] A. Monnier, E. A. Tawil, Q. T. Nguyen, J.-M. Valleton et al., *Functionalization of poly(lactic acid) scaffold surface by aminolysis and hyaluronan immobilization: How it affects mesenchymal stem cell proliferation*. European polymer journal. Vol. 107, pp. 202-217, 2018
- [45] F. Y. Lai, C. Rauert, L. Gobelius and L. Ahrens, *A critical review on passive sampling in air and water for per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs)*. Trends in analytical chemistry. Vol. 121, 2019
- [46] T. Górecki and J. Namiesnik, *Passive sampling*. Trends in analytical chemistry. Vol. 21, pp. 276-291, 2002

- [47] A. Gałuszka, Z. Migaszewski and J. Namieśnik, *The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices*. Trends in analytical chemistry. Vol. 50, pp. 78-84, 2013
- [48] H. MacKeown, B. Benedetti, M. D. Carro and E. Magi, *The study of polar emerging contaminants in seawater by passive sampling: A review*. Chemosphere. Vol. 299, 2022
- [49] J. Karlsson, H. J. Vaughan and J. J. Green, *Biodegradable polymeric nanoparticles for therapeutic cancer treatments*. Annual review of chemical and biomolecular engineering. Vol. 9, pp. 105-127, 2018
- [50] M. P. Desai, V. Labhasetwar, G. L. Amidon and R. J. Levy, *Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size*. Pharmaceutical research. Vol. 13, pp. 1828-1845, 1976
- [51] S. Raj, S. Khurana, R. Choudhari and K. K. Kesari, *Specific targeting cancer cells with nanoparticles and drug delivery in cancer therapy*. Seminars in cancer biology. Vol. 69, pp. 166-177, 2021
- [52] E. Rytting, J. Nguyen, X. Wang and T. Kissel, *Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary drug delivery*. Expert opinion on drug delivery. Vol. 5, pp. 629-239, 2008
- [53] R. Langer, *New methods of drug delivery*. Science. Vol. 249, pp. 1527-1533, 1990
- [54] J. Panyam, M. M. Dali, S. K. Sahoo, W. Ma et al., *Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles*. Journal of controlled release. Vol. 92, pp. 173-187, 2003
- [55] M. Yamagata, T. Kawano, K. Shiba and T. Mori, *Structural advantage of dendritic poly(L-lysine) for gene delivery into cells*. Bioorganic & medicinal chemistry. Vol. 15, pp. 526-532, 2007
- [56] K. Chen, W.-C. Law, R. Aalinkeel, B. Nair et al., *Well-Defined degradable cationic polylactide as nanocarrier for the delivery of siRNA to silence angiogenesis in prostate cancer*. Advanced healthcare materials. Vol. 1, pp. 751-761, 2012
- [57] C. L. He, Z. M. Huang and X.-J. Han, *Fabrication of drug-loaded electrospun aligned fibrous threads for suture applications*. Journal of biomedical material research. Vol. 89A, pp. 80-95, 2008
- [58] Y. Tang, A. Varyambath, Y. Ding, B. Chen et al., *Porous organic polymers for drug delivery: hierarchical pore structures, variable morphologies, and biological properties*. Biomaterial science. Vol. 10, pp. 5369-5390, 2022
- [59] Q.-Z. Zheng, P. Wang and Y.-N. Yang, *Rheological and thermodynamic variation in polysulfone solution by PEG introduction and its effect on kinetics of membrane formation via phase-inversion process*. Journal of membrane science. Vol. 279, pp. 230-237, 2006
- [60] G. Damonte, R. Spotorno, D. Di Fonzo and O. Monticelli, *Multifunctional porous films based on polylactic acid/polycaprolactone blend and graphite nanoplatelets*. ACS Applied polymer material. Vol. 4, pp. 6521-6530, 2022
- [61] G. Damonte, B. Barsanti, A. Pellis, G. M. Guebitz et al., *On the effective application of star-shaped polycaprolactones with different end functionalities to improve the properties of polylactic acid blend films*. European polymer journal. Vol. 176, 2022



- [62] E. M. Arnett, J. G. Miller and A. R. Day, *Effect of structure on reactivity: aminolysis of esters with primary amines*. Journal of the American Chemical Society. Vol. 12, pp. 5635-5638, 1950
- [63] W. Brown, B.L. Iverson, E.V. Anslyn and C.S. Foote, *Chimica organica*. Edises. Napoli, IT, 2014, ISBN: 978-8879598309
- [64] Zeiss, *SUPRA® Series*.  
<https://wiki.smfi.unipr.it/dokuwiki/lib/exe/fetch.php?media=lmn:brochure.pdf>
- [65] T. Chau, *A review of techniques for measurement of contact angles and their applicability on mineral surfaces*. Minerals Engineering. Vol. 22, pp. 213-219, 2009
- [66] M. Lazghab, I. Pezron, K. Saleh, P. Guigon et al., *Wettability assessment of finely divided solids*. Powder Technology. Vol. 157, pp. 79-91, 2005
- [67] J. F. Holler and S. R. Crouch, *Fondamenti di chimica analitica di Skoog e West*. Edises. Napoli, IT, 2015, ISBN: 978-8879598651
- [68] I. V. Maggay, M.-L. Yu, D.-M. Wang, C.H. Chiang et al., *Strategy to prepare skin-free and macrovoid-free polysulfone membranes via the NIPS process*. Journal of Membrane Science. Vol. 655, 2022
- [69] Carloth, *Scheda dati di sicurezza: Diidrolevo-glucosene*.  
<https://www.carloth.com/medias/SDB-1E89-IT-IT.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyNDc0OTg8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oYjcvaDMYLzkwNjEyOTM1NTU3NDIucGRmfDFmYjZkY2UyODZmZDY0ZWJhMmEyMmZlNDdmYWEmMjg2NDkNzkwZDYyODAyMmVWmNWFmN2M3NTYzNmM5MGI2MzE>
- [70] Carloth, *Scheda dati di sicurezza: N,N-Dimetilformamide*.  
<https://www.carloth.com/medias/SDB-CP79-IT-IT.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzMDc0MTV8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oNzkvaDczLzkwODk3NTM2MTIzMTgucGRmfDI4YzU0MmVWmNzc3ZmUyNGFmNTBjZjgzODNiYTllODEzYzY1ZmRlOTRhN2IxOGI0NDI5ZjA5MGNhZDM3ZWZmZDA>
- [71] B.E. Poling, J.E. Prausnitz, J.P. O'Connell, *The properties of gases and liquids*. McGraw-Hill Education. Stati Uniti d'America, USA, 2005, ISBN: 978-0071189712
- [72] C. Sullivan, Y. Zhang, G. Xu, L. Christianson et al., *Cyrene™ blends: a greener solvent system for organic syntheses*. Green Chemistry, Vol. 24, pp. 7184-7193, 2022
- [73] Q. Xing, X. Dong, R. Li, H. Yang et al., *Morphology and performance control of PLLA-based porous membranes by phase separation*. Polymer. Vol. 54, pp. 5965-5973, 2013
- [74] Y. Kang, P. Chen, X. Shi, G. Zhang et al., *Preparation of open-porous stereocomplex PLA/PBAT scaffolds and correlation between their morphology, mechanical behavior, and cell compatibility*. RSC Advances. Vol. 8, pp. 12933-12943, 2018
- [75] M. Rizzuto, L. Marinetti, D. Caretti, A. Mugica et al., *Can poly(ε-caprolactone) crystals nucleate glassy polylactide*. CrystEngComm. Vol. 23, 2017
- [76] S. Boi, E. Dellacasa, P. Bianchini, P. Patrini et al., *Encapsulated functionalized stereocomplex PLA particles: an effective system to support mucolytic enzymes*, Colloids and Surfaces Biointerfaces. Vol. 179, pp. 190-198, 2019

- [77] O. Jeznach, D. Kolbuk and P. Sajkiewicz, *Aminolysis of various aliphatic polyesters in a form of nanofibers and films*. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. Vol. 11, 2019
- [78] R. Sjöback, J. Nygren and M. Kubista, *Absorption and fluorescence properties of fluorescein*. Spectrochimica acta Part A: molecular and biomolecular spectroscopy. Vol. 51, pp. L7-L-51, 1995
- [79] S. S. Tripathy and S. B. Kanungo, *Adsorption of Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> from 0.5 M NaCl and major ion sea water on a mixture of  $\delta$ -MnO<sub>2</sub> and amorphous FeOOH*. Journal of colloid and interface science. Vol. 284, pp. 30-38, 2005
- [80] I. R. Durán, S. Vanslambrouck, P. Chevallier, C. A. Hoesli et al., *Atmospheric pressure cold plasma versus wet-chemical surface treatments for carboxyl functionalization of polylactic acid: A first step toward covalent immobilization of bioactive molecules*. Colloids and surfaces: biointerfaces. Vol. 189, 2020
- [81] K. Schroder, A. Meyer-Plath, D. Keller and W. Besch et al., *Plasma-induced surface functionalization of polymeric biomaterials in ammonia plasma*. Contribution plasma physics. Vol. 6, pp. 562-572, 2001
- [82] J. Yang, J. Bei and S. Wang, *Enhanced cell affinity of poly (d,l-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage*. Biomaterials. Vol. 23, pp. 2607-2614, 2002
- [83] T. Chau, *A review of techniques for measurement of contact angles and their applicability on mineral surfaces*. Minerals engineering. Vol. 22, pp. 213-219, 2009
- [84] E. Bormashenko, *Physics of wetting: phenomena and applications of fluids on surfaces*. De Gruyter. 2017, ISBN: 978-3110444803
- [85] T. Jacobs, H. Declercq, N. D. Geyter, R. Cornelissen et al., *Plasma surface modification of polylactic acid to promote interaction with fibroblasts*. Journal of materials science: materials in medicine. Vol. 24, pp. 469-478, 2012
- [86] P. Favia, F. Fracassi and R. d'Agostino, *Plasma processing of polymers*. Springer science & business media. Vol. 346, 1997
- [87] D. A. Gopakumar, V. Arumukhan, R. V. Gelamo, D. Pasquini et al., *Carbon dioxide plasma treated PVDF electrospun membrane for the removal of crystal violet dyes and iron oxide nanoparticles from water*. Nano-structures e nano-object. Vol. 18, 2019
- [88] J. Kowalska and A. Jeżewska, *Determination of pararosaniline hydrochloride in workplace air*. Environmental monitoring and assessment. Vol. 191, pp. 1-9, 2019
- [89] D. Karst, D. Nama and Y. Yang, *Effect of disperse dye structure on dye sorption onto PLA fiber*. Journal of colloid and interface science. Vol. 310, pp. 106-111, 2007