



Università degli studi di Genova

Scuola di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in

SCIENZE CHIMICHE

Tesi di Laurea Magistrale

SVILUPPO DI FILM A BASE DI ACIDO POLILATTICO

Anno accademico

2021/2022

Relatore

Prof.ssa Orietta Monticelli

Correlatore

Prof. Alessandro Pellis

Correlatore

Prof. Pavlo Solokha

Candidato

Luca Valle

INDICE

1	Scopo del lavoro	1
2	Introduzione.....	2
2.1	Acido Polilattico PLA.....	2
2.1.1	Proprietà	3
2.1.2	Sintesi	4
2.2	Film di PLA	13
2.2.1	Caratteristiche.....	13
2.2.2	Preparazione	14
2.3	Tecniche di modifica	16
2.3.1	Amminolisi	16
2.3.2	Trattamento con plasma.....	17
2.3.3	Trattamento laser	18
2.3.4	Trattamento corona.....	18
2.4	Tecnica Layer by Layer	19
2.4.1	Generalità.....	19
2.4.2	Parametri di controllo	20
2.4.3	Interazioni molecolari dominanti	22
2.4.4	Metodi di assemblamento	23
2.4.5	Applicazioni	24

2.4.6	Applicazioni sul PLA	26
3	Materiali e metodi.....	31
3.1	Materiali.....	31
3.2	Sintesi del PCL a stella -COOH terminato	32
3.3	Preparazione dei film di PLA/PCL-COOH	33
3.4	Preparazione dei film di PLA	34
3.5	Reazione di amminolisi	34
3.6	Deposizione dei bilayer di chitosano e DNA.....	35
3.7	Deposizione dei bilayer di CH, DNA e particelle magnetiche di cobalto ferrite .	36
4	Tecniche di caratterizzazione	37
4.1	Spettroscopia ¹ H-NMR.....	37
4.2	Misure di bagnabilità	37
4.3	Spettroscopia vibrazionale IR.....	38
4.4	Microscopia elettronica a scansione	38
4.5	Analisi termogravimetrica	39
4.6	Degradazione enzimatica.....	39
4.7	Prove di permeabilità.....	40
4.8	Prove di ritardo alla fiamma	40
4.9	Prove di elettrostaticità	40

4.10	Prove di attivazione magnetica	41
5	Risultati progetto 1	42
5.1	Prove preliminari interazioni tra CH e DNA	42
5.2	Misure di bagnabilità	43
5.3	Spettroscopia vibrazionale IR	44
5.4	Microscopia elettronica a scansione	47
5.5	Analisi termogravimetrica	48
5.6	Degradazione enzimatica	50
5.7	Prove di permeabilità	52
5.8	Prove di ritardo alla fiamma	54
6	Risultati progetto 2	56
6.1	Ottimizzazione della reazione di amminolisi.....	56
6.2	Microscopia elettronica a scansione	60
6.3	Analisi di bagnabilità	61
6.4	Analisi termogravimetrica	63
6.5	Prove di elettrostaticità	64
6.6	Prove di attivazione magnetica	65
7	Conclusioni.....	67
8	Bibliografia.....	69

1 Scopo del lavoro

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di migliorare le prestazioni e conferire nuove proprietà a film a base di acido polilattico (PLA), applicando la tecnica *Layer by Layer* (LbL) ed utilizzando reagenti a basso impatto ambientale, nel tentativo di sviluppare una metodica a basso impatto. Il lavoro è stato diviso in due progetti differenti.

Durante il primo progetto si è cercato di implementare la resistenza alla fiamma e la permeabilità ai gas di film a base di PLA a cui è stato additivato del policaprolattone a stella, sintetizzato *ad-hoc*, caratterizzato da terminali carbossilici e bassa massa molecolare (PCL-COOH). Si è infatti osservato in lavori precedenti [1] che la presenza del PCL-COOH migliora le proprietà meccaniche e li funzionalizza. La tecnica LbL è stata quindi applicata depositando strati carichi positivamente di chitosano (CH) e carichi negativamente di DNA. La scelta è ricaduta su queste due sostanze in quanto sono biodegradabili, biocompatibili e facilmente ottenibili da fonti naturali. Per questo sono stati studiati film di PLA/PCL-COOH su cui sono stati depositati fino ad un totale di 20 *bilayer*, analizzandoli con diverse tecniche di caratterizzazione, tra cui misure di stabilità alla fiamma, permeabilità all'O₂ e digestione enzimatica.

Nel secondo progetto la tecnica LbL è stata applicata, anche in questo caso, utilizzando soluzioni di chitosano e DNA, alle quali però sono state aggiunte particelle magnetiche di cobalto ferrite (CoFe₂O₄), lasciate in dispersione in modo da partecipare alla formazione del *coating*. L'obiettivo era quello di verificare l'applicabilità della metodica LbL anche utilizzando soluzioni eterogenee, e conferire, tramite le suddette particelle, proprietà magnetiche e conduttive ai film, con il fine ultimo di rendere la plastica facilmente separabile in sede di riciclo e conferirle proprietà antistatiche. Si è inoltre scelto di applicare questa metodica a film di PLA senza PCL-COOH additivato, per cui è stato necessario attivare la superficie mediante reazione di amminolisi, la quale ha richiesto l'ottimizzazione attraverso varie prove a diversi tempi di reazione. Per questo progetto sono stati studiati campioni che presentavano fino a 20 *bilayer* depositati, analizzandoli anche in questo caso con diverse tecniche di caratterizzazione. Non si è però avuta la possibilità di indagare le proprietà conduttive e magnetiche ma sono state effettuate solamente prove fenomenologiche di attivazione magnetica e di elettrostaticità.

2 Introduzione

2.1 Acido Polilattico PLA

L'acido polilattico (PLA) è un polimero termoplastico, appartenente alla famiglia dei poliesteri alifatici. È un polimero biodegradabile in quanto presenta legami esterei facilmente idrolizzabili e si decompone in sostanze che non sono nocive per l'ambiente come H₂O, CO₂, acido lattico o biomassa, a seconda delle condizioni di digestione [2].

Negli ultimi anni la produzione di bioplastiche è aumentata esponenzialmente ogni anno e il PLA è uno dei principali bio-polimeri in circolazione. Questo è dovuto al fatto che le plastiche derivanti dalla chimica del petrolio, pur avendo proprietà meccaniche in genere migliori e costi di produzione più bassi, a causa della loro scarsa biodegradabilità stanno creando sempre più problemi a livello ambientale. Al contrario il PLA, oltre a degradarsi completamente in componenti non tossiche per l'ambiente, è principalmente prodotto da fonti come frumento o mais e permette quindi anche un notevole fissaggio di anidride carbonica durante la produzione [3-4].

Le sue applicazioni, grazie alla sua biocompatibilità, coprono una vasta gamma di utilizzi, i quali vanno dal *food packaging*, la sua principale applicazione, al rilascio controllato di farmaci e l'ingegneria tissutale con la produzione di *scaffold* per la rigenerazione ossea e di tessuti molli [5].

Il monomero di partenza del PLA è l'acido lattico (CH₃-CHOHCOOH) il quale esiste sotto forma di due differenti isomeri, L (+) e D (-), il cui rapporto e tipo di concatenazione influiscono sulle proprietà del polimero risultante.

L'acido lattico può essere preparato sia per sintesi diretta partendo dall'idrolisi di lattonitrili con ausilio di acidi forti, sia per sintesi fermentativa di carboidrati con ausilio di particolari batteri. Quest'ultima viene preferita in quanto ha come base di partenza sostanze naturali e rinnovabili e produce quasi selettivamente l'isomero L, a differenza della sintesi diretta che produce una miscela racemica di L e D [3].

2.1.1 Proprietà

tabella 1: proprietà acido polilattico [2,6]

Temperatura di transizione vetrosa [°C]	Da 40 a 70
Temperatura di fusione [°C]	Da 130 a 180
Modulo di Young [MPa]	Da 48 a 53
Elongazione a rottura [%]	4
Limite di snervamento [MPa]	3500

In *tabella 1* sono riportate le caratteristiche principali dell'acido polilattico, queste sono paragonabili con i più comuni biopolimeri, fatta eccezione per l'elongazione che risulta particolarmente bassa. Le varie proprietà possono variare all'interno di un range più o meno ristretto a seconda del rapporto isomerico, della percentuale di cristallinità e dalla massa molecolare. Le caratteristiche del PLA lo rendono comunque molto competitivo nei confronti degli altri polimeri di origine naturale soprattutto se si tiene conto anche dei bassi costi di produzione [6].

La cella cristallina del PLA è di tipo ortorombico. Le sue proprietà dipendono dalla composizione isomerica, dalla temperatura di lavorazione, dal tempo di ricottura e dal peso molecolare. Il rapporto isomerico determina anche il grado di cristallinità, ovvero il polimero risultante risulta essere cristallino solo per purezze ottiche maggiori del 43%. La massima percentuale cristallina raggiungibile è 37% per l'acido poli-L-lattico (PLLA), contenente quindi esclusivamente l'isomero L. La percentuale cristallina, inoltre, influenza anche la temperatura di transizione vetrosa (Tg) e la temperatura di fusione (Tm) [7].

Diversi studi hanno mostrato come l'acido polilattico mostri un decremento della massa molecolare se lavorato a temperature troppo elevate. Questa variazione ha dipendenze sia dalla temperatura che dal tempo di permanenza in tali condizioni. Questo comportamento è dovuto al legame estereo che tende a degradare sotto condizioni di idrolisi o durante processi termici. Nello specifico il PLA tende a degradare già a temperature inferiori alla temperatura di fusione e la velocità di degradazione aumenta più ci si avvicina a tale valore

senza però raggiungere valori così elevati da non permetterne la lavorazione. Salendo ulteriormente di temperatura, la velocità di degradazione aumenta a tal punto che la perdita di massa molecolare risulta significativa dopo circa 10 minuti se mantenuto a 210°C e dopo 2 minuti se lavorato a 240°C [2]. La degradazione termica avviene principalmente mediante scissioni casuali della catena principale. Prendono parte a questo meccanismo reazioni di idrolisi, depolimerizzazione, degradazione ossidativa e transesterificazioni intramolecolari [8].

A differenza di molte plastiche convenzionali come polietilene (PE), polipropilene (PP), polistirene (PS) e polivinilcloruro (PVC), che sono resistenti agli attacchi microbici, i poliesteri alifatici generalmente vengono degradati dai microorganismi [2]. Il PLA risulta essere però resistente ai microorganismi che si trovano nell'ambiente, specialmente se ad elevate masse molecolari. Effettuando test all'interno di normale compost da giardino non si è osservata praticamente nessuna degradazione dopo 6 settimane [9]. Da altri studi si è però osservato che mantenendo la temperatura a 65°C, favorendo così l'idrolisi, dopo 30 giorni si otteneva la completa degradazione di una bottiglia di plastica [2]. L'utilizzo di proteasi alcaline permette la digestione in tempi ancora più brevi permettendo anche di scendere ulteriormente con la temperatura che dipenderà però dall'enzima utilizzato [10]. Studi condotti all'interno del corpo di animali e uomini hanno invece dimostrato che, in questo ambiente, il PLA viene prima degradato per idrolisi e che gli oligomeri solubili risultanti possono essere metabolizzati dalle cellule ad acido polilattico, il quale, attraverso il ciclo di Krebs, viene convertito in anidride carbonica ed espulso con la respirazione [11].

2.1.2 Sintesi

Il primo step per effettuare la sintesi del PLA è la preparazione del monomero.

Si utilizza preferibilmente la sintesi fermentativa batterica di carboidrati in quanto permette di ottenere il 99.5% di isomero L. I principali tipi di batteri utilizzati sono appartenenti alla specie *Lactobacillus* e le condizioni sono mantenute ad un pH compreso tra 5.4 e 6.4 e ad una temperatura compresa tra 38°C e 42°C [12].

Come si può osservare dalla *figura 1*, per preparare il polimero esistono tre differenti vie sintetiche: la polimerizzazione per condensazione diretta, la policondensazione diretta in

condizioni azeotropiche e la polimerizzazione attraverso la polimerizzazione del lattide [13].

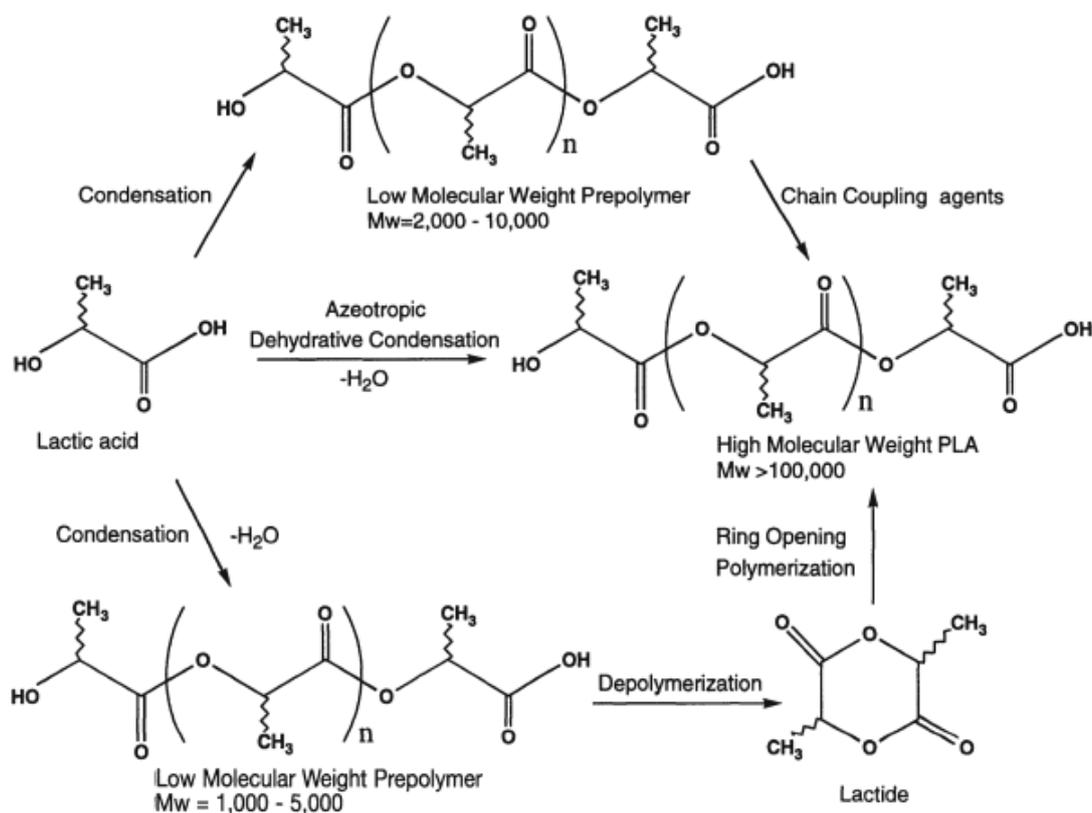


figura 1: strategie di sintesi del PLA [13]

La polimerizzazione per condensazione diretta è la via meno costosa ma risulta difficile ottenere elevate masse molecolari ed è quindi richiesta l'aggiunta di *coupling agents*, i quali però fanno salire i costi aumentando anche la complessità della reazione.

Si può inoltre modificare il polimero risultante, ottenendo solamente gruppi ossidrilici come terminali, facendo avvenire la condensazione in presenza di piccole quantità di composti idrossilici multifunzionali, come glicerolo o 1-4-butandiolo, o facendo reagire il prodotto con un epossido monofunzionale come terz-butil-triglicilietere. Allo stesso modo si può ottenere un polimero finale con solo terminali carbossilici additivando alla reazione acidi carbossilici multifunzionali, come acido maleico, succinico o adipico, o aggiungendo in post condensazione anidridi acide, come anidride maleica o succinica. L'utilizzo di composti insaturi, come il 2-butene-1-4-diolo, permette la formazione di radicali liberi che favoriscono la reticolazione e permettono di aumentare ulteriormente la massa molecolare

del prodotto finale, come mostrato in *figura 2*. È stato dimostrato, inoltre, che l'utilizzo di estensori di catena migliora le proprietà meccaniche, a discapito però della purezza del prodotto finale che presenta estensori di catena residui, non biodegradabili e non riassorbibili, residui metallici o impurità polimeriche. In generale, utilizzando questo tipo di approccio sintetico, si ottengono basse masse molecolari e, di conseguenza, materiali con proprietà meccaniche inadatte per essere applicati nel settore del *packaging* o biomedicale. Per questo la polimerizzazione per condensazione diretta è usata principalmente per produrre gomme e lacche biodegradabili [13].

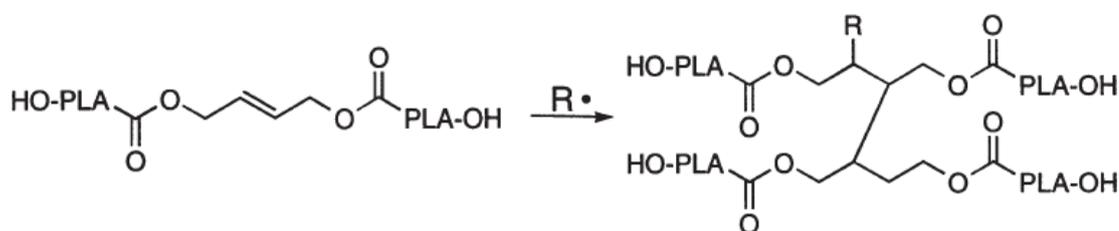


figura 2: reticolazione permessa dalla presenza di radicali liberi

La policondensazione diretta in condizioni azeotropica è un metodo che permette di ottenere polimeri ad elevate masse molecolari senza l'utilizzo di estensori di catena.

Una procedura generale consiste nella distillazione a pressione ridotta dell'acido lattico, per un tempo di 2-3 ore a 130°C, allo scopo di rimuovere la maggior parte dell'acqua di condensazione. Vengono aggiunti il catalizzatore, difenil-etero e viene collegato un tubo riempito di setacci molecolari al recipiente di reazione. A questo punto il sistema viene messo a riflusso per 30-40 ore sempre a 130°C. Il polimero può quindi essere isolato così com'è o disciolto ulteriormente per poi essere purificato mediante precipitazione [14]. Solvente, catalizzatore, temperatura e quantità di impurezze hanno un rilevante effetto sul grado di polimerizzazione e sulla massa molecolare del polimero finale. Si è osservato che la velocità di polimerizzazione aumenta sia con l'utilizzo come solventi di idrocarburi aprotici, che formano azeotropi con l'acqua, sia all'aumentare della temperatura di

ebollizione del solvente, e quindi del sistema, che permette una più veloce rimozione di quest'ultima. L'utilizzo di composti contenenti stagno come catalizzatori permette di ottenere masse molecolari più elevate anche a temperature inferiori (fino a 240000 Da a 130°C).

Un altro effetto sulla massa molecolare finale è dato dalle impurezze che limitano la crescita della catena per *endcapping*. Le principali impurità derivano direttamente dalla fermentazione dell'acido lattico o dai passaggi di separazione e purificazione. Le più comuni sono metanolo, etanolo, acidi come piruvico, acetico, fumarico, metil-lattato o etil-acetato. Per ottenere masse molecolari sufficienti la % di impurezze deve essere inferiore a 100 ppm. Lavorando in questo modo però il prodotto conterrà elevate quantità di catalizzatore, necessario per avere velocità di reazione sufficientemente elevate, il quale però può dare problemi di degradazione o idrolisi incontrollata in eventuali trattamenti successivi. Per questo è necessario effettuare una separazione utilizzando un buon solvente come cloroformio, per disciogliere il polimero e separarlo dal catalizzatore, e un cattivo solvente come metanolo per riprecipitarlo. Nel complesso l'intero procedimento risulta essere lungo, costoso e richiede un largo uso di solventi tossici o infiammabili che devono essere rimossi dal prodotto finale. L'aggiunta di acido fosforico o pirofosforico e due equivalenti di acido con stagno bivalente permette di disattivare il catalizzatore e, distillando le impurità a bassa massa molecolare, si riesce ad ottenere un prodotto finale con una migliore stabilità al calore e una maggiore resistenza agli agenti atmosferici [13].

La sintesi attraverso la polimerizzazione del lattide è stata dimostrata per la prima volta da Carothers e colleghi nel 1932, senza riuscire ad ottenere masse molecolari elevate fino a quando non è stato trovato un meccanismo abbastanza efficiente per la purificazione del lattide. Il quale viene ottenuto per depolimerizzazione di PLA a bassa massa molecolare sotto pressione ridotta. In questo modo si ottiene una miscela di L-lattide, D-lattide e meso-lattide. Le percentuali dei diversi isomeri prodotti dipendono dalla materia prima, dalla temperatura e dal catalizzatore. I lattidi sono mostrati in *figura 3*, dove si può osservare che gli isomeri L e D presentano temperatura di fusione di 97°C mentre il composto meso di 52°C. Inoltre, gli isomeri L e D possono formare uno stereocomplesso racemico 1:1, denominato D,L-lattide per distinguerlo dal composto meso, che fonde a 127°C, una temperatura significativamente più elevata rispetto all'isomero puro [13].

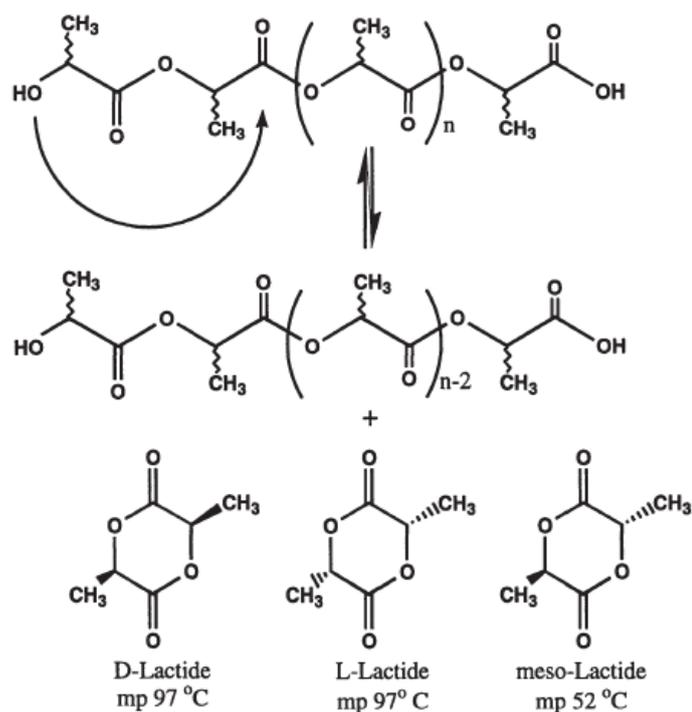


figura 3: isomeri del lattide

I metodi di laboratorio consistono nel condensare l'acido lattico tra i 110°C e i 180°C, a seconda se si utilizza o meno un catalizzatore, rimuovendo l'acqua di condensa sottovuoto a circa 25 mmHg. Si ottiene in questo modo un polimero con massa molecolare compresa tra 1000 e 5000 Da, detto prepolimero. Questo viene sottoposto a temperature e pressioni comprese tra 180°C e 215°C e 0,1 e 15 mmHg per formare e distillare il lattide grezzo, purificato poi per ricristallizzazione in toluene secco o acetato di etile. Si eliminano così il composto meso, l'acido lattico residuo e gli oligomeri rimasti, ottenendo L, D o L,D-lattide in grado di dare un polimero con massa molecolare elevata [13,15].

I metodi commerciali seguono la stessa reazione di base, ma differiscono nello schema reattoristico o nei metodi di purificazione.

La polimerizzazione del lattide può avvenire con tre diversi meccanismi, cationico, anionico o di coordinazione/inserimento, a seconda del tipo di catalizzatore utilizzato.

Meccanismo cationico: gli iniziatori cationici si dividono in tre sottogruppi: acidi protici (tipo HCl e HBr), acidi di Lewis (tipo AlCl₃ e ZnCl₂) e reagenti alchilanti o acilanti (tipo Et₃O+BF₄). Kricheldorf e collaboratori hanno riscontrato che l'acido triflico e metiltriflato

risultano essere i catalizzatori più efficienti. La polimerizzazione procede tramite gruppi terminali estere-triflato che producono un polimero otticamente attivo senza racemizzazione, anche a temperature inferiori a 100°C. La catena continua a crescere per scissione del legame alchile-ossigeno come mostrato in *figura 4*: L'anello lattidico, caricato positivamente, subisce una Sn2 da parte dell'anione triflato che poi reagisce nuovamente con una seconda molecola di lattide, sempre per via Sn2, producendo a sua volta un altro lattide carico positivamente che può continuare ad accrescere la catena [13, 16].

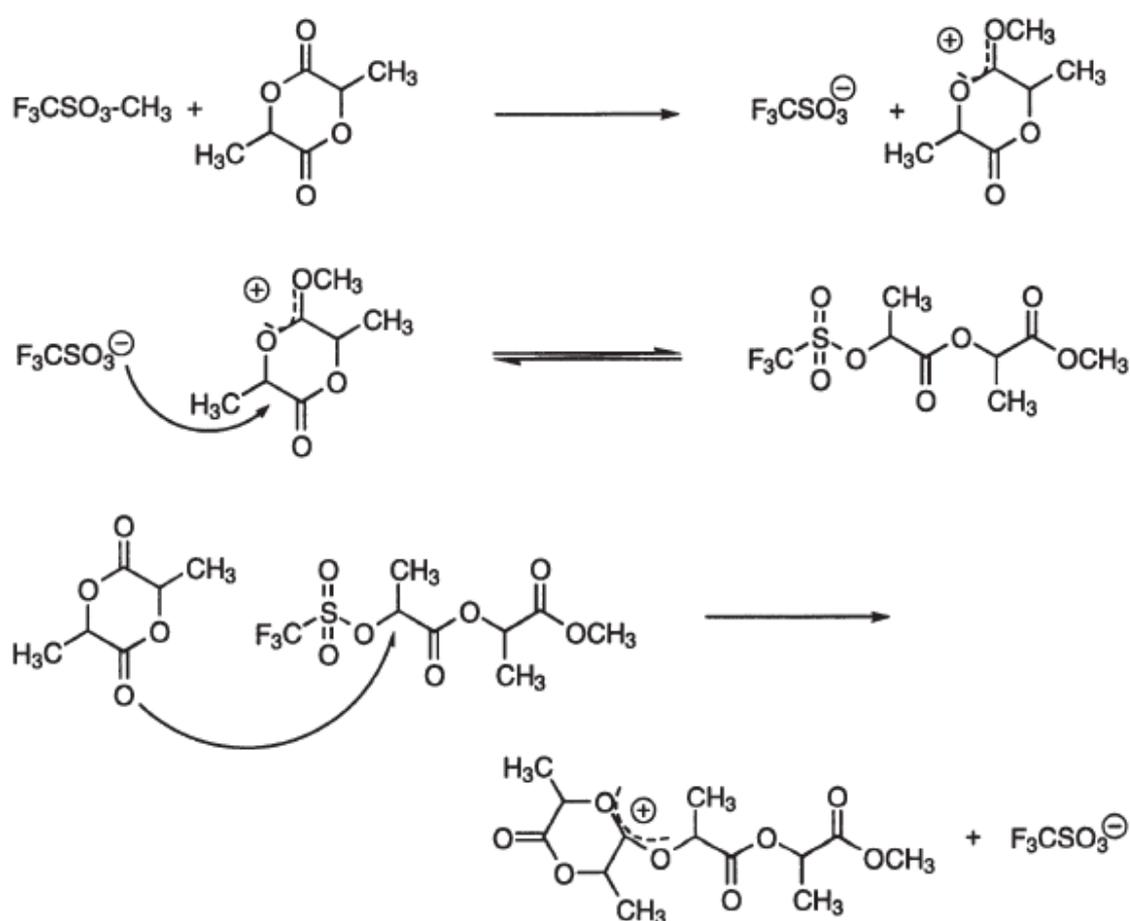


figura 4: meccanismo cationico [13]

Meccanismo anionico: la polimerizzazione anionica procede via addizione nucleofila tra l'iniziatore e il carbonile, con la conseguente scissione del legame acile-ossigeno. In questo modo viene prodotto un gruppo terminale alcossido che può continuare la propagazione della catena (*figura 5*) [13].

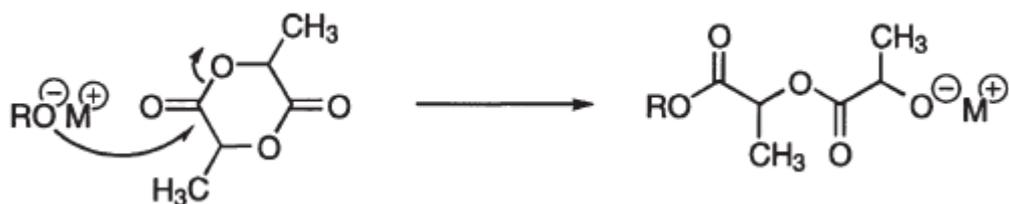


figura 5: iniziazione anionica [13]

Attraverso diversi studi si è osservato che sono necessari iniziatori che siano forti nucleofili. Basi deboli, come benzoato di potassio, fenossido di potassio o stearato di zinco, non funzionano a basse temperature ma devono essere utilizzati sempre sopra i 120°C. Temperature troppo alte però favoriscono racemizzazione e reazioni secondarie, ostacolando così la propagazione. L'utilizzo di tributil-stagno, *tert*-butossido di tributil-stagno o *tert*-butossido di potassio, permettono di operare anche in condizioni più blande ma causano comunque racemizzazione. Temperature sotto lo zero e rapporti elevati monomero/iniziatore riducono il rischio di racemizzazione, riducendo però la velocità di polimerizzazione. Non risulta quindi molto conveniente l'utilizzo di questi reattivi in quanto l'uso di iniziatori ad inserzione non causa racemizzazione anche sopra i 100°C [17]. L'utilizzo di iniziatori di tipo *n*-, *sec*- o *tert*-butil-litio permette un rapido inizio della polimerizzazione anche a basse temperature, ma causa deprotonazione del lattide monomero che porta anche a racemizzazione (*figura 6*) e basse masse molecolari [18]. Kricheldorf ha constatato che l'utilizzo di eteri corona insieme a butil-litio permette di ottenere elevate masse molecolari ma che è preferibile usare iniziatori al potassio o metallici al sodio, meno tossici rispetto ai reattivi di litio, così da preparare polimeri anche biocompatibili [19].

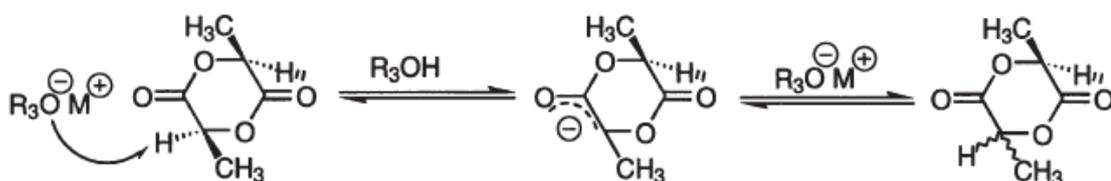


figura 6: deprotonazione e racemizzazione del lattide [13]

Meccanismo coordinazione/inserzione: è il più usato a livello industriale. Sono polimerizzazioni in massa, quindi, permettono di evitare i problemi legati all'utilizzo e lo

smaltimento di solventi. Inoltre, a differenza delle polimerizzazioni anioniche e cationiche, che comprendono sistemi molto reattivi, non sono soggette a racemizzazione e transesterificazione. Masse molecolari elevate sono state ottenute in presenza di stagno o alluminio [13,20].

I catalizzatori a base di stagno sono i più usati grazie alla loro elevata solubilità all'interno dei sistemi utilizzati, alla bassa tossicità, all'elevata attività catalitica e alla capacità di produrre polimeri ad elevata massa molecolare con bassa racemizzazione [16]. Impurezze a base di molecole portanti funzionalità idrossiliche aumentano la velocità di polimerizzazione in funzione della loro concentrazione. Tali impurezze interagiscono con il catalizzatore, di solito stagno-ottanoato, formando derivati più reattivi (*figura 7*). Inoltre, vengono aggiunti alcoli per il controllo della massa molecolare finale. [13].

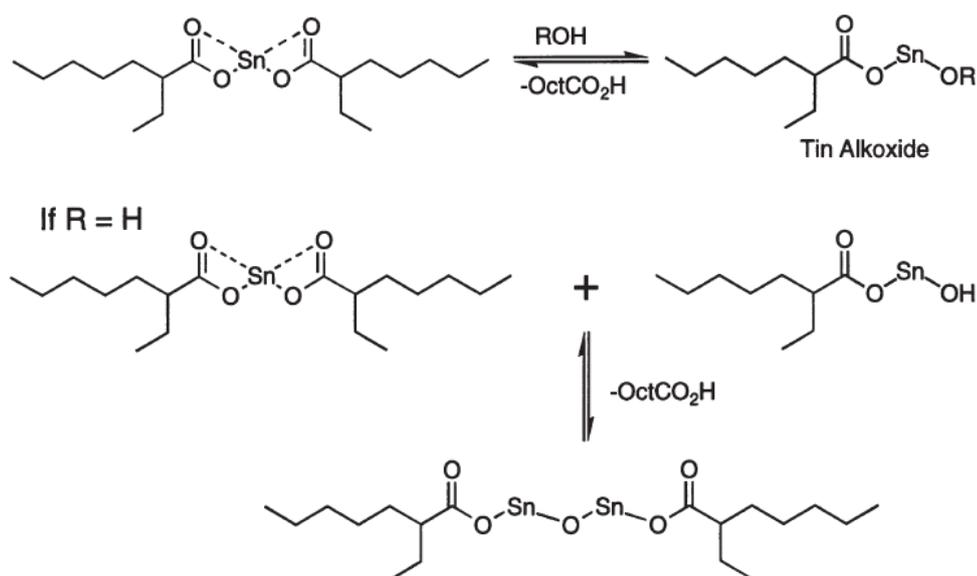


figura 7: reazione Sn-ottanoato con impurezze [13]

In *figura 8* si può osservare il meccanismo di polimerizzazione del lattide utilizzando catalizzatori allo stagno. La reazione inizia con la formazione del legame Sn-O, grazie alla presenza degli orbitali *p* e *d* del metallo, che possono complessare l'ossigeno carbonilico del lattide. Il complesso così formato, incontrando un gruppo idrossile nell'ambiente di reazione, può favorire l'apertura del ciclo lattidico, con conseguente reazione intramolecolare, prima di reagire con un altro lattide, favorendo la crescita della catena

polimerica. In alternativa, il complesso Sn-lattide può reagire direttamente con una catena già formata. Questi due meccanismi procedono fino ad esaurimento del monomero [21].

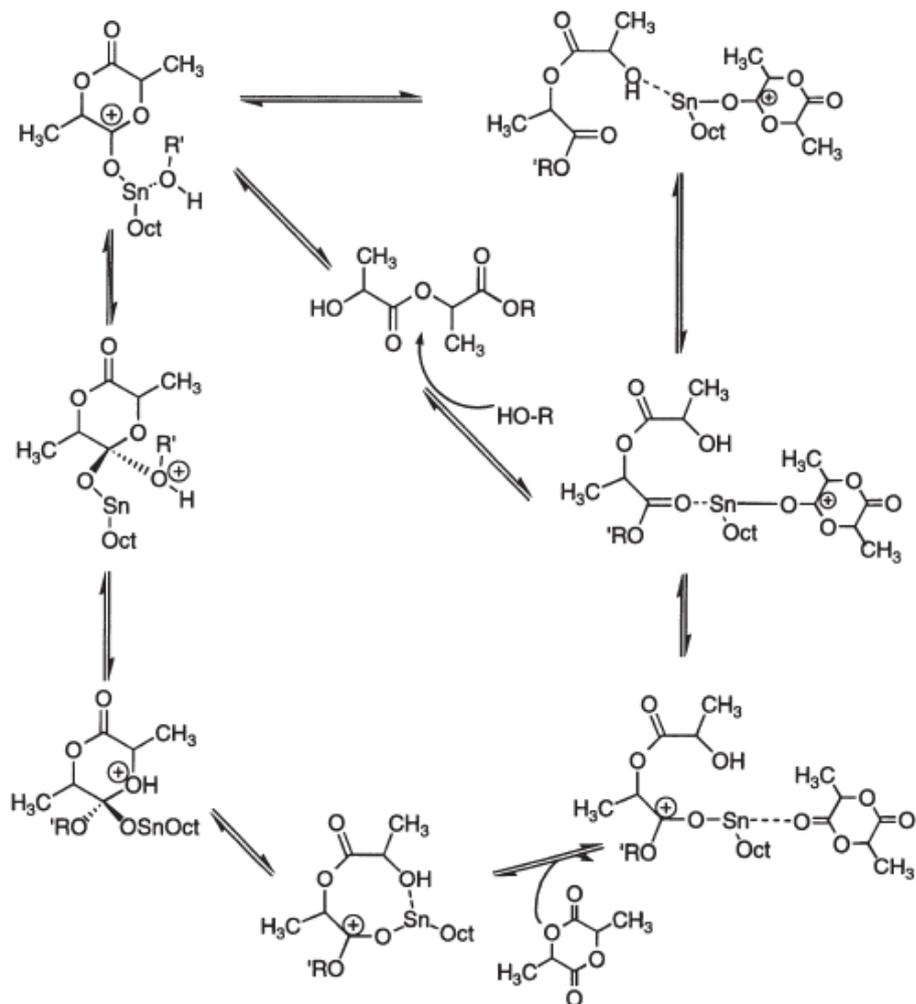


figura 8: meccanismo di reazione polimerizzazione lattide con catalizzatori allo stagno [13]

Alcossidi di alluminio possono essere usati al posto dei derivati dello stagno in quanto permettono un controllo e una bassa dispersione delle masse molecolari finali [22].

In *figura 9* si può osservare il meccanismo di polimerizzazione utilizzando derivati di alluminio [13]. Variare il rapporto monomero/iniziatore permette di controllare la dispersione delle masse molecolari e la lunghezza delle catene.

L'utilizzo di isopropossido di alluminio permette di operare a 70°C, ma necessita dell'utilizzo di un solvente, di solito toluene, con tutti i problemi ad esso collegati.

Il meccanismo consiste nella formazione del legame Al-O e la conseguente rottura del legame acile-ossigeno all'interno del ciclo lattidico. Il ciclo così aperto e coordinato al metallo accresce la lunghezza della sua catena mediante lo stesso meccanismo [23].

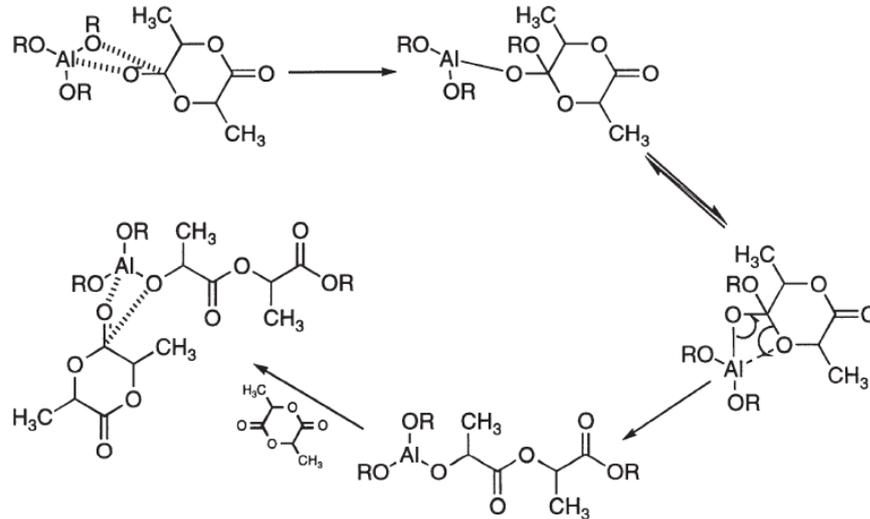


Figura 9: meccanismo di reazione polimerizzazione lattide con catalizzatori all'alluminio [13]

2.2 Film di PLA

2.2.1 Caratteristiche

I film a base di acido polilattico possono essere densi o porosi. Film porosi, o membrane, trovano come principale applicazione la produzione di scaffold per la riparazione tissutale o la crescita cellulare e nella produzione di strutture per il rilascio controllato di farmaci. A questo scopo, il PLA garantisce caratteristiche di biocompatibilità, biodegradabilità e adsorbimento adeguate, così come sufficienti proprietà meccaniche e di resistenza termica [2]. Film densi sono principalmente usati nel *food packaging*, dove, oltre a biocompatibilità e biodegradabilità, sono molto importanti le proprietà di trasparenza, rigidità e permeabilità ai gas. Quest'ultima in particolare risulta particolarmente importante in quanto garantisce una buona conservazione del prodotto e un buon mantenimento di gusto e odore [2].

In *tabella 2* sono riportati i valori di permeabilità ai principali gas del PLA, e di alcuni altri polimeri utilizzati nel *packaging*, a 30°C:

tabella 2: permeabilità del PLA e dei principali polimeri usati nel packaging [24]

POLIMERO	PERMEABILITÀ N ₂ [$\frac{cm^3 \times cm}{cm^2 \times s \times cmHg}$]	PERMEABILITÀ O ₂ [$\frac{cm^3 \times cm}{cm^2 \times s \times cmHg}$]	PERMEABILITÀ CO ₂ [$\frac{cm^3 \times cm}{cm^2 \times s \times cmHg}$]	PERMEABILITÀ CH ₄ [$\frac{cm^3 \times cm}{cm^2 \times s \times cmHg}$]
PLA	1.3×10^{-10}	3.3×10^{-10}	10.2×10^{-10}	1.0×10^{-10}
LDPE	1.9×10^{-10}	6.9×10^{-10}	28.0×10^{-10}	4.0×10^{-10}
PS	2.2×10^{-10}	2.6×10^{-10}	10.5×10^{-10}	2.3×10^{-10}
PET	0.006×10^{-10}	0.04×10^{-10}	0.2×10^{-10}	0.004×10^{-10}

Dalla tabella si osserva che il PLA ha proprietà molto superiori rispetto al polietilene a bassa densità (LDPE), comparabili con il polistirene (PS) e inferiori al polietilene tereftalato (PET). Inoltre, Lehermeier e collaboratori hanno osservato come piccole variazioni di rapporto isomerico L-D o piccole variazioni di percentuale cristallina, non influiscano sulla permeabilità del polimero [24].

2.2.2 Preparazione

Film porosi di PLA possono essere prodotti attraverso l'uso di diverse tecniche, tra cui l'inversione di fase, la stampa 3D e l'*elettrospinning*.

Inversione di fase: questa tecnica richiede l'utilizzo di un solvente, in grado di solubilizzare il polimero, e di un non-solvente, miscibile con il solvente ma non con il polimero. L'utilizzo di questa tecnica richiede lo studio di diagrammi ternari polimero-solvente-non solvente e conoscere quindi gli equilibri di fase al variare delle concentrazioni. Questo perché il polimero deve solubilizzarsi all'interno del solvente ma, una volta aggiunta la soluzione così formata al non solvente, non deve essere solubile all'interno del sistema solvente-non solvente e quindi precipitare. Variando concentrazioni e tipi di solventi e non solventi è anche possibile variare la dimensione e la densità dei pori, come studiato da Guillen e collaboratori [25].

Stampa 3D: L'utilizzo di una stampante 3D per la preparazione di membrane è abbastanza recente ma mostra diversi vantaggi. I metodi convenzionali tendenzialmente, in quanto industrializzati, producono membrane sempre delle stesse forme e dimensioni; l'utilizzo di stampa 3D invece permette di variare di volta in volta questi parametri e di conseguenza di poter preparare strutture con caratteristiche individuali, grosso vantaggio in campo biomedicale in cui si possono produrre, ad esempio, scaffold per la rigenerazione ossea *ad-hoc* per ciascun paziente. Per lo stesso motivo anche le dimensioni e la densità dei pori risultano più facilmente controllabili e si è inoltre osservato che queste membrane posseggono proprietà meccaniche più performanti rispetto a quelle prodotte con i metodi convenzionali. Come principale svantaggio ci sono le tempistiche di produzione che risultano più lente [26].

Elettrospinning: è una tecnica semplice e affidabile che garantisce una vasta varietà di morfologie differenti. Si basa sull'applicazione di un campo elettrico elevato per generare nanofibre da una soluzione polimerica carica o da fuso. L'elettrofilatore utilizza la differenza di potenziale applicato per caricare la soluzione che esce dall'ago. Evaporando il solvente, se presente, rimarrà solamente la nanofibra carica che potrà essere utilizzata per assemblare la membrana su un collettore posizionato a terra. Variando parametri come orientazione delle fibre, concentrazione della soluzione e carica si possono ottenere strutture differenti [27].

I film densi vengono principalmente prodotti per *casting* da solvente ed estrusione.

Casting da solvente: questa tecnica comprende la solubilizzazione in un opportuno solvente, la colata in un contenitore e l'essiccazione o evaporazione del solvente, il quale, lascerà adeso al contenitore il film polimerico.

La scelta del solvente influisce sulle caratteristiche del film risultante; l'utilizzo di un solvente che ha forti interazioni con il PLA provoca una risultante diminuzione di cristallinità rispetto all'utilizzo di un solvente meno affine che favorirà le interazioni tra le varie catene di polimero, mentre l'utilizzo di solventi che evaporano più lentamente aumenterà la rugosità superficiale [28].

Estrusione: al PLA si possono applicare sia l'estrusione di film in bolla che l'estrusione di film semplice.

Nell'estrusione di film in bolla il polimero fuso è estruso, a regime costante, attraverso una fenditura circolare mentre viene insufflata aria al suo interno. È il principale metodo di preparazione di film per *packaging* ma la bassa elasticità del PLA complica la metodica e spesso è necessario aggiungere plastificanti [29].

Nell'estrusione di film semplice il polimero è estruso attraverso una fessura sottile a temperature vicine a quelle di fusione del polimero. Durante il raffreddamento il film viene fatto passare attraverso una serie di rulli; questo non solo permette di controllare lo spessore ma anche di orientare la microstruttura, garantendo migliori prestazioni meccaniche [30].

2.3 Tecniche di modifica

Come è già stato specificato, i film di PLA sono utilizzabili in un'ampia gamma di applicazioni. Tuttavia, spesso non presentano gruppi funzionali in grado di interagire con molecole bioattive, nel caso di applicazioni biomedicali, o con sostanze usate durante i trattamenti in un qualsiasi processo produttivo. Alcune tra le tecniche utilizzate per funzionalizzare i film sono l'amminolisi, il trattamento con il plasma, il trattamento con laser e il trattamento corona [31].

2.3.1 Amminolisi

L'amminolisi è un metodo economico e versatile per funzionalizzare la superficie con gruppi $-NH_2$ tramite reazione del gruppo estereo con diammine di piccole dimensioni. La reazione avviene tramite sostituzione nucleofila al carbonio carbonilico, con formazione di un intermedio tetraedrico e conseguente formazione del legame ammidico, tramite trasferimento protonico ed espulsione del gruppo alcossido.

Studi cinetici hanno evidenziato come la reazione avvenga più velocemente in ambiente basico rispetto ad ambienti acidi o neutri, a confermare che il meccanismo è lo stesso sia per i poliesteri, sia per gli esteri di piccole dimensioni.

Si è inoltre osservato che la reazione è poco influenzata dal tipo di *bulk* utilizzato, mentre risulta essere più influente la scelta del solvente; di solito si utilizzano isopropanolo o etanolo. Studi su altri poliesteri hanno constatato che i poliesteri presentano una maggiore

bagnabilità da parte di questi solventi, i quali solvatano anche maggiormente i composti azotati. Questi due fattori contribuiscono a favorire l'interazione tra la diammina e il substrato

Per quanto riguarda i composti azotati, le diammine, avendo più gruppi funzionali, reagiscono meglio rispetto alle ammine e ammine primarie danno rese maggiori rispetto alle secondarie, in quanto presentano meno ingombro sterico dovuto ai sostituenti.

Variando la temperatura e la concentrazione di diammina si ha effetto sulla resa e sulla velocità di reazione, che aumentano all'aumentare di questi due parametri. Questo risulta essere un fattore determinante in quanto si è osservato un deterioramento della superficie nei campioni amminolizzati con la presenza di gruppi ammidici fino a 10 μm di profondità [31].

2.3.2 *Trattamento con plasma*

Negli ultimi anni i trattamenti al plasma sono sempre più utilizzati in quanto sono ecologici e permettono la funzionalizzazione selettiva della superficie per campioni di diverse forme e strutture.

Il campione viene posizionato sotto un elettrodo all'interno di una camera. Viene applicato il vuoto fino ad una pressione di 10 Pa e successivamente la camera viene riempita con il gas necessario alla funzionalizzazione del substrato. Una volta stabilizzata la pressione fino al valore desiderato, che può variare da processo a processo, viene attivato il plasma che, vista la sua elevata energia, viene utilizzato per attivare le molecole gassose con cui si vuole funzionalizzare il *target*, favorendo in questo modo meccanismi di sostituzione o ricombinazione con i gruppi funzionali delle catene polimeriche [32].

I vantaggi principali di questa tecnica sono che può essere condotta a temperatura e pressione ambiente, il processo può essere svolto in continuo e non genera scarti.

A livello superficiale, questi trattamenti, causano un aumento della rugosità dovuto a microabrasioni che però non causano una perdita di massa significativa. Risulta però importante regolare la distanza ugello-substrato in modo da limitare questo fenomeno [33].

2.3.3 Trattamento laser

Il trattamento al laser sfrutta l'elevata energia della radiazione elettromagnetica per modificare, in maniera precisa, le proprietà superficiali di piccoli frammenti o superfici di forme complesse, inviando una serie di impulsi laser pulsati.

Le modifiche sono dovute a più processi simultanei come fotoossidazione, fotodegradazione, termodegradazione e ablazione. Tutti questi fenomeni causano una variazione della morfologia superficiale, con conseguente aumento della rugosità, la quale può essere controllata modificando durata ed energia degli impulsi laser [34].

2.3.4 Trattamento corona

È una tecnologia di modifica superficiale, molto usata nell'industria degli imballaggi, per migliorare la tensione superficiale e aumentare la polarità dei film al fine di incrementare le proprietà di adesione, bagnabilità e stampaggio [35].

Il trattamento consiste nel generare una scarica elettrica, utilizzando una serie di elettrodi, sulla superficie del film. La scarica deve avere bassa tensione, tra i 10 kV e i 40 kV, e alta frequenza, tra 1 kHz e 4 kHz. In questo modo, la scarica, causa la parziale ionizzazione delle specie presenti nell'atmosfera, andando a formare ioni, radicali o elettroni. Questi possono reagire a loro volta con la superficie del film, formando gruppi idrossile, carbonile, carbossile e ammidi.

Influiscono sul processo la tensione e la frequenza della scarica, l'atmosfera circostante, la geometria di campione ed elettrodo e il tempo. Quest'ultimo, se troppo breve, non porta ad una funzionalizzazione sufficiente, ma se troppo lungo causa un aumento della fragilità e può produrre fori a causa di una modifica della superficie fisica del film a seguito di un fenomeno di abrasione, definito incisione.

Fatta eccezione per questo ultimo accorgimento, il trattamento corona risulta essere sicuro ed economico, adatto per il trattamento di materiali stampati. Inoltre, le velocità di esecuzione non causano rallentamenti durante i processi produttivi [35].

Inoltre, trattamenti di *coating* superficiale o LbL possono essere usati sia per favorire sia il tipo di interazioni sopra citate o direttamente per modificare determinate proprietà come bagnabilità e permeabilità.

2.4 Tecnica Layer by Layer

2.4.1 Generalità

Negli ultimi decenni è stato dedicato un interesse sempre maggiore alla fabbricazione di materiali nanostrutturati, con composizione, struttura e dimensioni regolabili tramite tecniche di assemblaggio. Il controllo preciso sulle caratteristiche dimensionali, di forma, morfologia e concentrazione, su questo tipo di materiali, gioca un ruolo fondamentale per ottimizzare le loro caratteristiche chimico-fisiche come le proprietà ottiche, elettriche e meccaniche [36].

La tecnica di assemblaggio *Layer-by-Layer* (LbL) è una tecnica semplice, robusta, versatile e può essere applicata ad un grand numero di film sottili, per creare strutture multistrato o nanostrutture. Attraverso la messa a punto del tipo di materiale e della sequenza di deposizione, vari componenti possono essere combinati andando a modificare e migliorare una vasta gamma di proprietà per diverse applicazioni come si può osservare in *figura 10*, dove sono mostrate le principali caratteristiche di questa tecnica [37].

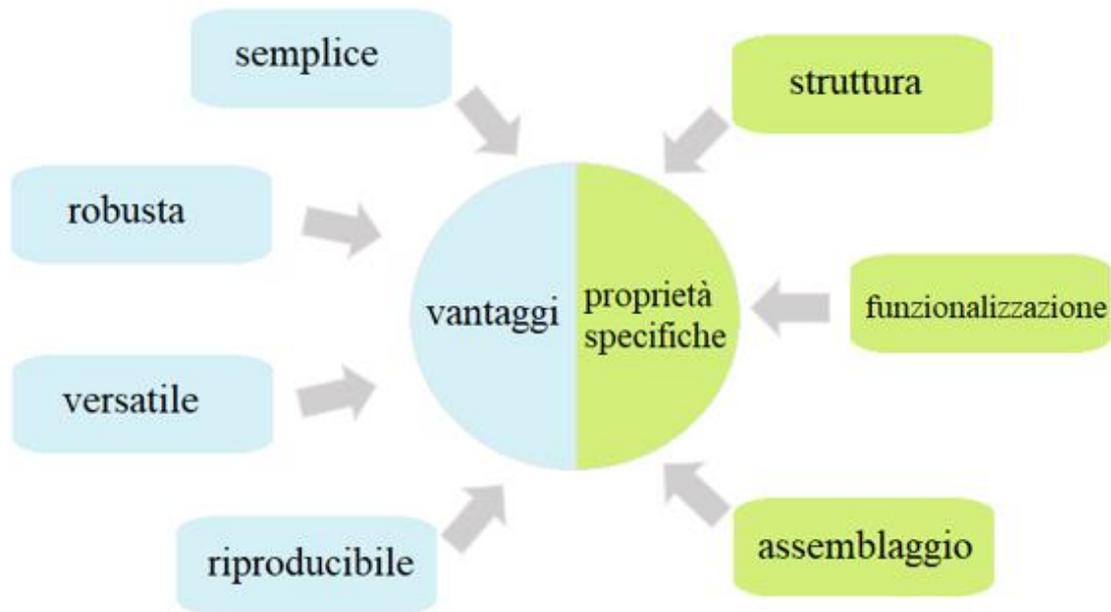


figura 10: caratteristiche tecnica LbL

Questa tecnica consiste principalmente nella deposizione di strati carichi positivamente e negativamente ma può essere influenzata da diversi parametri.

2.4.2 Parametri di controllo

pH: Il valore di pH di una soluzione esercita una rilevante influenza sulla composizione, struttura e densità di reticolazione di film multistrato, principale a causa della differenza nel grado di ionizzazione dei vari polielettroliti (PE) a seconda delle condizioni [38].

Per PE forti queste considerazioni valgono meno in quanto risultano carichi indipendentemente dalle condizioni di pH.

Per PE deboli invece, come acidi carbossilici e ammine, i gruppi funzionali risultano altamente sensibili al pH della soluzione, permettendo quindi, al variare di tale parametro, di controllare il numero di gruppi funzionali carichi sulla superficie del target e, di conseguenza, la densità di carica. Questo permette un controllo diretto sullo spessore, sulla rugosità e sulla struttura interna del multistrato dato che in questo modo vengono influenzate le interazioni fra i vari *layer* depositi [39].

È stato inoltre osservato un ruolo determinante del pH nel comportamento di rigonfiamento dei multistrati contenenti PE deboli, che può influenzare direttamente l'integrità della struttura [40].

Temperatura: risultati sperimentali mostrano che l'aumento della temperatura durante il processo di deposizione ha una significativa influenza sulla velocità di crescita dei vari strati. Si è inoltre osservato un aumento del regime di accumulo che passa da avere un andamento lineare per basse temperature, ad un andamento esponenziale per alte temperature. Sulla base di ciò è stato sviluppato un modello nel quale la temperatura ha un ruolo fondamentale nel regolare la diffusione durante il processo di deposizione. Infatti, l'accumulo degli strati ha un andamento intrinsecamente esponenziale, ma che diventa lineare ogni qual volta la diffusione non è abbastanza veloce. Aumentando la temperatura, si favoriscono i fenomeni diffusivi permettendo così al sistema di mantenere l'andamento esponenziale di accumulo [41].

Solvente: si è osservato che, durante una deposizione LbL, c'è un aumento dello spessore degli strati al diminuire della qualità del solvente, ma sempre rimanendo nei limiti di solubilità della soluzione, ad esempio aggiungendo etanolo ad una soluzione acquosa. In questo modo si favoriscono la precipitazione e le interazioni elettrostatiche tra il *target* e la sostanza da depositare favorendo la deposizione di una maggiore quantità di materia [42].

Proprietà dei polielettroliti: spessore e morfologia dei film sono influenzati dalle caratteristiche degli elettroliti. Nello specifico si è osservata una diminuzione dello spessore dei film depositati al diminuire della densità di carica dei polielettroliti [43]. Inoltre, aumentando la massa molecolare di quest'ultimi si è visto un aumento della rugosità interna e delle proprietà di *swelling*, con effetti simili a quelli portati da una variazione di pH [44].

Forza ionica: lo spessore dei *layer* può essere influenzato anche dalla forza ionica della soluzione. Infatti, aggiungendo basse concentrazioni di sali all'interno del sistema, gli ioni formati dalla loro dissociazione vanno a compensare le cariche superficiali del *target*, riducendo così lo spessore dei film depositati [45].

2.4.3 Interazioni molecolari dominanti

Legame a idrogeno: rispetto alla semplice interazione elettrostatica, *layer* assemblati via legame a idrogeno mostrano proprietà superiori ma hanno lo svantaggio di risultare molto sensibili al pH, forza ionica, temperatura e condizioni esterne a causa della loro natura reversibile [46]. *Layer* assemblati in questo modo possono risultare quindi utili per applicazioni di *drug delivery* in quanto permetterebbero il rilascio del farmaco anche in semplici condizioni fisiologiche [47].

Trasferimento di carica: strutture LbL possono essere costruite anche senza l'utilizzo di gruppi carichi, ma che presentino semplicemente gruppi funzionali elettron accettori ed elettron donatori [48]. Inoltre, questi film possono essere preparati facilmente anche in presenza di solventi non acquosi, permettendo quindi di incorporare funzionalità idrofobiche, ampliando ulteriormente il campo di applicazione di questa tecnica [49].

Interazioni biospecifiche: le deposizioni LbL possono essere effettuate anche sfruttando interazioni biospecifiche. Questo tipo di metodica si è visto essere dipendente dalla forza ionica e dal pH della soluzione, ottimizzando questi due parametri si può anche utilizzare un'interazione con un'elevata domanda sterica. Si è visto invece essere poco dipendente, considerando i limiti di solubilità, dalla scelta del solvente [50].

Legame covalente: l'assemblaggio di *layer* mediante legame covalente offre determinati vantaggi. Primo fra tutti la stabilità della struttura, che risulta notevolmente rafforzata, riuscendo a resistere in condizioni più estreme rispetto alle strutture assemblate con altri tipi di interazione. Inoltre, permette l'integrazione di una vasta gamma di proprietà a favore della costruzione di una vasta gamma di materiali multifunzionali. Si possono però riscontrare alcune problematiche durante la costruzione dei *layer*, in quanto la scelta dei materiali deve essere molto accurata visto che devono presentare gruppi funzionali complementari e, inoltre, alcuni prodotti collaterali potrebbero essere introdotti nell'assemblaggio multistrato, rendendolo così la metodologia più complessa [36].

Interazioni di coordinazione: sono interazioni forti stabilite tra ioni metallici e leganti organici, utilizzate per costruire film orientati e strutture tridimensionali di solito per attività di filtraggio o catalitiche. Comprendono l'uso di ossidi, polimeri e nanocompositi

organici e/o inorganici [51]. L'utilizzo di questo tipo di interazione è limitato dalla limitata quantità di materiali utilizzabili e dal fatto che il processo di assemblaggio risulta molto lento. Inoltre, è facile che alcune impurità vengano incorporate nelle strutture risultanti [36].

2.4.4 Metodi di assemblamento

Il metodo di assemblaggio usato durante una deposizione LbL influenza sia le proprietà del processo, come tempo e scalabilità, sia le proprietà chimico fisiche del prodotto finale, come spessore e omogeneità dei film [36].

Sono state perciò sviluppate diverse tecniche di applicazione dei *layer*: *dipping*, *spin-coating* e *spraying* (figura 11).

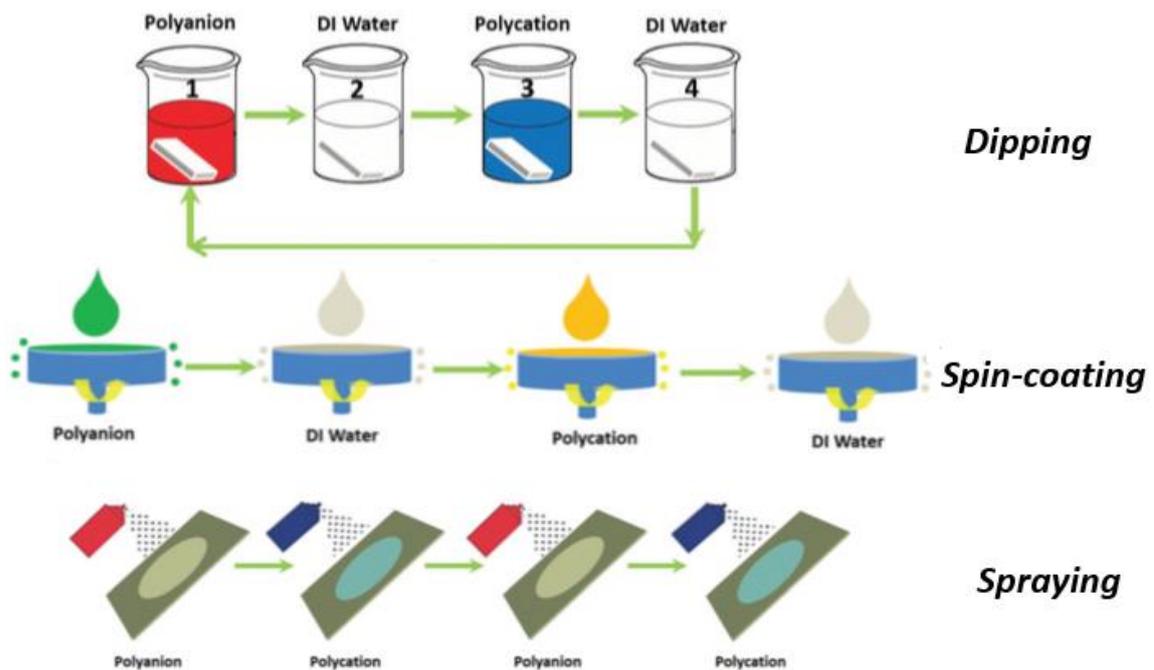


figura 11: metodologie Layer-by-Layer [36]

Tra tutti i metodi, quello del *dipping*, o immersione, è vantaggioso perché permette di applicare substrati su *target* di tutte le geometrie, ma l'eccessivo residuo che rimane adeso dopo ogni passaggio e le procedure relativamente laboriose, ne limitano l'efficienza per applicazioni pratiche. Metodiche LbL per *spin-coating* e *spray* permettono di ridurre tempo e costi; perciò, sono considerate migliori a livello industriale [52-53].

La deposizione per *spin-coating* viene effettuata facendo ruotare velocemente il substrato, sul quale è stata posizionata la soluzione da depositare, in modo che la forza centrifuga generata dalla rotazione faccia in modo che il primo strato si formi velocemente e con una struttura ordinata. Successivamente si effettua un lavaggio per rimuovere la soluzione in eccesso e si ripete il procedimento fino alla formazione del numero di *layer* desiderato.

I vantaggi di questa tecnica sono, oltre alla velocità e ad un ridotto spreco di materiale, la possibilità di sfruttare anche interazioni covalenti o di legami a idrogeno per l'assemblamento e la bassa interpenetrazione fra i vari strati che garantisce una crescita lineare [54].

La tecnica di deposizione *spraying* richiede l'utilizzo di soluzioni cariche, per sfruttare quindi l'interazione elettrostatica. Ha però il vantaggio di poter essere applicata a substrati di diverse forme e dimensioni, a differenza della tecnica per *spin-coating*, e di un rapido adsorbimento dei *layer*.

La procedura consiste nello spruzzare soluzioni colloidali cariche che aderiscono sul substrato. La soluzione in eccesso viene drenata e lavata con acqua. Ottimizzando parametri come drenaggio e tempo di esposizione allo *spray* si possono modificare le caratteristiche dei film risultanti, il cui assemblamento può variare da qualche minuto a pochi secondi [54].

2.4.5 Applicazioni

Data la versatilità della tecnica di deposizione *Layer-by-Layer*, la si può utilizzare al fine di funzionalizzare materiali o costruire strutture per una vasta gamma di applicazioni. Se ne riportano alcune nel paragrafo seguente:

1. Yu e collaboratori hanno assemblato nanostrutture tubolari a base di rutilo e anatasio, due forme allotropiche del titanio, con ottime proprietà fotocatalitiche [55].

In questo caso la tecnica LbL è stata usata per costruire una struttura e non per funzionalizzare una superficie. Come supporto si è utilizzata una membrana in policarbonato (PC) su cui sono stati depositati un precursore al titanio solubile in acqua, bis-ammonio-lattato diidrossido di Ti(IV) (TALH), carico

negativamente, e polietilenimina (PEI), carica positivamente che avrà la funzione di collante tra i vari strati di titanio.

La deposizione è stata effettuata per *dipping* con aggiunta di due minuti di sonicazione per favorire la diffusione della soluzione nei pori della membrana di PC.

Diametro e lunghezza dei tubi dipendono dalle dimensioni del supporto utilizzato, mentre variando le tempistiche di immersione si può controllare lo spessore dei tubi.

Terminata la deposizione il sistema è stato lasciato a 95°C per 24h. In queste condizioni il TALH cristallizza formando un *network* nanocristallino.

La fase organica, PEI e PC, è stata poi eliminata per calcinazione, la quale è stata effettuata a 450°C o a 900°C a seconda se si vuole ottenere il reticolo finale in anatasio o in rutilo [55].

2. Kozlovskaya e collaboratori hanno sviluppato dei gusci per la preservazione cellulare a lungo termine attraverso la tecnica LbL [56].

Questo tipo di strutture hanno lo scopo di proteggere le cellule da ambienti ostili, regolarne il funzionamento e la diffusione dei nutrienti. Tuttavia, questo tipo di strutture sono, solitamente, costruite, tramite interazione covalente o ionica, da *bilayer* di proteine e fosfolipidi, che vengono però assorbiti dalle cellule. Al contrario, l'utilizzo di materiali sintetici compromette la diffusione dei nutrienti, abbassando la durata vitale delle cellule.

In questo studio sono stati depositati *bilayer* di poli-N-vinilpirrolidone (PVPON) e acido tannico (TA). Quest'ultimo è stato scelto per la capacità di instaurare legami a idrogeno con il PVPON stabili in un ampio range di pH, inoltre, possiede proprietà antiossidanti e antibatteriche.

La metodica prevede la deposizione di un primo strato precursore di polietilenimina. Dopodichè il guscio è stato costruito depositando per *dipping* sei *bilayer*, sfruttando l'interazione ad idrogeno tra l'ossigeno del gruppo chetonico del PVPON e uno degli ossidrili del TA.

Dalle analisi si è riscontrato un aumento della vitalità cellulare del 79% contro il 20% dei sistemi più comuni. Inoltre, il design del guscio costruito via LbL legato per interazione ad idrogeno apre nuove possibilità per creare un

incapsulamento sensibile al pH per l'ingegneria della superficie cellulare, assemblando componenti non citotossiche e non ioniche [56].

1. Dubas e collaboratori hanno utilizzato la tecnica LbL per effettuare un *coating* con attività antimicrobica, utilizzando polidialildimetil ammonio cloruro (PDADMAC) e nanoparticelle di argento, su nylon e seta [57].

Le fibre tessili sono state avvolte attorno un foglio di alluminio di dimensioni 2.5 cm x 3.5 cm e immersi prima in una soluzione di PDADMAC, per 1 min, e successivamente in una soluzione nanoparticelle di argento, per 2 min. Dopodichè sono state fatte essiccare una notte e avvolte in un supporto in plastica prima di effettuare le analisi. Con questa metodica sono stati preparati campioni di fibre con 2, 4, 8, 16 e 20 *bilayer*.

Dalle analisi di caratterizzazione si è osservata una maggiore affinità del rivestimento con la seta rispetto al nylon, di conseguenza, si è osservata una maggiore riduzione dell'attività microbica nei campioni di seta con 20 *bilayer* depositati, pari all'80%, rispetto al 50% dei campioni di nylon. La miglior affinità verso le fibre di seta è dovuta alla presenza delle funzionalità carbossiliche, le quali interagiscono più efficientemente con il PDADMAC.

Si è osservato inoltre, che un ruolo importante è occupato dalla chimica delle fibre, può quindi risultare utile effettuare pretrattamenti sulle fibre al fine di migliorare le interazioni col coating.

Questo tipo di materiali potranno quindi essere utilizzati nella purificazione di acque e nella produzione di prodotti antimicrobici [57].

2.4.6 Applicazioni sul PLA

Si riportano alcuni esempi di applicazioni della tecnica *Layer-by-Layer* direttamente sul PLA:

1. Guduric e collaboratori hanno utilizzato la tecnica LbL per costruire strutture tridimensionali a base acido polilattico da utilizzare come *scaffold* per la crescita cellulare [58].

Membrane 2D di PLA sono state preparate tramite stampa 3D. Sono state sterilizzate con una soluzione di etanolo al 70% e sono state ricoperte da agarosio per favorire l'adesione cellulare.

Due diversi tipi di celle sono stati depositati: cellule stromali da midollo osseo (HBMSCs) e cellule endoteliali progenitrici (EPCs), le quali sono state etichettate con una proteina fluorescente per poterne poi valutare la migrazione all'interno dell'impalcatura 3D.

Dopo aver depositato le cellule sulle membrane, e averle fatte proliferare per tre giorni, sono stati costruiti, tramite tecnica LbL, sfruttando il bioassemblaggio cellulare, quattro differenti tipi di *scaffold*, ognuno dei quali caratterizzato da quattro strati di membrane di PLA:

- campione A: mono-coltura di HBMSCs;
- campione B: alternanza di mono-colture di HBMSCs e EPCs;
- campione C: co-colture di HBMSCs e EPCs in ogni strato;
- campione D: *layer* alternati di mono-colture di HBMSCs e co-colture;

La prima caratterizzazione è stata effettuata valutando la migrazione delle cellule all'interno degli *scaffold* e successivamente, per osservare la colonizzazione cellulare all'interno dell'intera struttura tridimensionale, i campioni sono stati osservati tramite microscopia con eccitazione di fluorescenza a due fotoni.

Dai risultati delle analisi *live and death* si è osservato, dopo quattordici giorni di coltura, una elevata percentuale di cellule vive, specialmente nelle mono-colture. Inoltre, dalle analisi al microscopio si è visto che la distribuzione delle cellule vive risulta più omogenea rispetto agli *scaffold* convenzionali.

Si è concluso che la tecnica LbL per la costruzione di questo tipo di strutture promuove un'omogenea distribuzione cellulare e che il bio-assemblaggio tra i vari *layer* migliora la proliferazione cellulare [58].

2. Jiao e collaboratori hanno applicato la tecnica LbL a nanoparticelle di PLA e layer di polietilenimmina (PEI), per assemblare sistemi per il trasporto e rilascio di farmaci [59].

Le nanoparticelle di PLA sono state preparate per precipitazione: il polimero e pirene, che ha lo scopo di simulare la presenza di un farmaco all'interno del

sistema, sono stati solubilizzati in una soluzione di acetone e diclorometano. Tale soluzione è stata gocciolata in una soluzione acquosa sotto agitazione e le nanoparticelle risultanti dalla precipitazione sono state separate per centrifugazione.

La prima fase di deposizione è stata effettuata su substrati di quarzo, il quale è stato prima opportunamente lavato con soluzione piranha e poi acqua. Dopodichè è stato esposto alla PEI per 15 minuti per formare un primo layer.

Questo primo film formato è stato poi immerso in una soluzione contenente le nanoparticelle e in una soluzione contenente PEI e fluoreiscina isotiocianato (FITC), per cinque minuti ciascuna, fino a formare il numero di *layer* desiderati.

Le prove di rilascio sono state condotte a 37°C in soluzione acquosa contenente un buffer fosfato a pH 7.4.

L'efficienza di assemblamento è stata valutata tramite spettroscopia UV, IR, SEM e DLS, mentre la presenza del pirene è stata verificata tramite spettroscopia di fluorescenza, prima e dopo gli esperimenti di rilascio.

Dalle varie prove e analisi si è osservato che la dimensione delle nanoparticelle è un fattore fondamentale per l'efficienza della deposizione, infatti, se queste hanno dimensioni troppo grandi, circa 1 µm, precipitano e rendono difficile l'assemblamento.

Si è osservato che, in condizioni fisiologiche, avviene un efficiente rilascio di pirene, a dimostrare che il sistema funziona e può essere testato con vari tipi di farmaci [59].

3. Aulin e collaboratori hanno applicato la deposizione LbL su film di PLA, destinati ad applicazioni di *packaging*, per migliorarne la permeabilità ai gas e al vapor d'acqua [60].

La tecnica LbL è stata applicata per immersione e sono state testate due diverse formulazioni: polietilenimina ramificata (PEI), come polielettrolita cationico, e cellulosa nanofibrillata (NFC), come polielettrolita anionico, nel primo caso; nel secondo caso è stata sempre usata PEI, ma accoppiata con carbossimetil cellulosa (CMC).

I film di PLA sono stati preparati per pressatura da fuso, hanno uno spessore di circa 113 μm e, prima di essere utilizzati, hanno subito una serie di lavaggi in acqua, etanolo e acqua seguiti da un trattamento di 3 minuti in un forno al plasma per rendere la superficie più idrofila.

Il periodo di ogni immersione è stato di cinque minuti e tra la soluzione di PEI e NFC o CMC, a seconda del campione, i film sono stati immersi in acqua deionizzata per eliminare la soluzione in eccesso. Questi passaggi sono stati ripetuti fino ad ottenere il numero desiderato di *bilayer*, nello specifico venti e cinquanta sia per i campioni con PEI/NFC che quelli con PEI/CMC.

Analisi superficiali e strutturali, effettuate allo scopo di osservare quantità, distribuzione e struttura dei *bilayer* sono state fatte tramite microbilancia a cristalli di quarzo con dissipazione (QCM-D), microscopia a forza atomica (AFM), Spettrometria UV e microscopia a scansione elettronica (SEM) con detector per elettroni secondari. In entrambi i casi i *bilayer* risultano essere depositi in modo omogeneo sulla superficie del film. I campioni contenenti NFC risultano essere più affini ai substrati di PLA in quanto, dalle analisi effettuate si è visto formare strati più spessi, rispettivamente 844 nm e 3177 nm, per venti e cinquanta *bilayer* di PEI/NFC contro 550 nm e 1803 nm per i *bilayer* di PEI/CMC, e più consistenti in massa, $33 \frac{\text{mg}}{\text{m}^2}$ per 10 *bilayer* di PEI/NFC e $5 \frac{\text{mg}}{\text{m}^2}$ per 10 *bilayer* di PEI/CMC.

La permeabilità all'ossigeno è stata misurata a 23°C e 50% di umidità relativa e a 38°C e 90% di umidità relativa. In entrambi i casi le misure sono state condotte su campioni con un'area di 5 cm^2 e 1 atm.

La permeabilità al vapor d'acqua è stata misurata utilizzando campioni delle stesse dimensioni e condizioni di temperatura e umidità identiche rispetto alla permeabilità all'ossigeno. È stata però aggiunta una pressione parziale di vapore acqueo di 0.01387 atm, durante le misure a 23°C e 50% di umidità relativa, e una pressione parziale di 0.05826 atm, durante le misure a 38°C e 90% di umidità relativa.

Sono state condotte tre repliche per tutti i campioni analizzati e si è osservato un andamento simile per entrambe le formulazioni, con i campioni con

PEI/NFC che sono risultati più performanti, anche in funzione di uno spessore maggiore dei *bilayer*.

Dalle analisi di permeabilità all'ossigeno si è osservata una diminuzione rispettivamente del 68 % del 94 % rispettivamente per i campioni con venti e cinquanta *bilayer* di PEI/NFC. I campioni con PEI/CMC hanno invece mostrato una riduzione del 64 % e 93 %.

Le analisi di permeabilità al vapor d'acqua hanno invece mostrato una riduzione del 31 % e 52 % per i campioni con PEI/NFC. Riduzioni del 23% e del 48 % si sono osservate per i campioni con PEI/CMC [60].

3 Materiali e metodi

3.1 Materiali

- PLA Luminy® LX175 ad elevata massa molecolare (purezza stereochimica: 96% stereoisomero L, $M_w=245$ kg/mol)
 - ϵ -caprolattone PCL CAPA 6500 (Perstorp®)
 - Pentaeritritolo (Alfa Aesar®)
 - PCL a stella –COOH terminato (sintetizzato *ad-hoc*)
 - Chitosano (CHI) a bassa massa molecolare da Sigma-Aldrich® ($M_w=190.000-300.000$ g/mol)
 - DNA da sperma di aringa
 - Stagno (II) 2-etilesanoato Sn(Oct)₂ (Alfa Aesar®)
 - *Humicola insolens cutinase* (HiC) (Novozymes, Beijing, China)
 - Tampone fosfato salino PBS (Sigma-Aldrich®)
 - Diclorometano CH₂Cl₂ stabilizzato con 0.002% di 2-metil-2-butene (Sigma-Aldrich®)
 - Toluene anidro (purezza 99.7%) (Sigma-Aldrich®)
 - Metanolo CH₃OH (Sigma-Aldrich®)
 - Cloroformio CHCl₃ (purezza $\geq 99.5\%$ stabilizzato con 100-200 ppm di amilene) (Sigma-Aldrich®)
 - Anidride maleica (Merck®)
 - Acido acetico (Merck®)
 - Idruro di calcio CaH
 - Acqua milliQ (resistenza 18.2 M Ω , prodotta con sistema Millipore Q20)
 - Etilendiammina (purezza $\geq 99,5\%$) (Sigma-Aldrich®)
 - Isopropanolo (Supelco®)
 - Particelle magnetiche di cobalto ferrite CoFe₂O₄

3.2 Sintesi del PCL a stella -COOH terminato

La sintesi del PCL a stella -COOH terminato ha richiesto diversi passaggi, primo tra tutti la sintesi del PCL a stella -OH terminato.

La polimerizzazione è stata effettuata tramite polimerizzazione di ϵ -caprolattone con pentaeritritolo, utilizzando stagno ottanoato come catalizzatore.

La reazione è stata condotta per 24h in bagno d'olio a 120°C in atmosfera di Ar e in condizione anidre per evitare che l'acqua presente nell'ambiente di reazione dia reazioni parassite che andrebbero ad inficiare sulla resa e sulla qualità del prodotto finale.

All'interno di un pallone a due colli si solubilizzano 12,6 g di ϵ -caprolattone in 10 ml di diclorometano insieme a 0.214 g di pentaeritritolo che ha anche funzione di iniziatore. Una volta che i reagenti sono solubilizzati si aggiungono 90 μ L di soluzione all'1% m/V di stagno ottanoato in toluene anidro.

Il giorno seguente si toglie il pallone dal bagno d'olio e, una volta raffreddato fino a temperatura ambiente, si separa il polimero dal catalizzatore utilizzando una siringa e un setto poroso. Si travasa la soluzione contenente il prodotto in un becker e si fa precipitare aggiungendo 50 mL di metanolo ghiacciato. Si filtra su buckner, lavando il filtrato sempre con metanolo, e si essicca in stufa sottovuoto a 30°C per 24h.

La sintesi del PCL a stella -COOH terminato è stata effettuata tramite acetilazione, con anidride maleica, del PCL a stella -OH terminato.

Lavorando sempre in atmosfera di Ar e in condizioni anidre, si trasferiscono in un pallone a due colli 11 g di PCL a stella -OH terminato e si solubilizzano in 25 mL di toluene anidro. Alla soluzione si aggiungono 3.2 g di anidride maleica (almeno 6 eq), il più velocemente possibile vista la sua bassa tensione superficiale, e si lascia la reazione proseguire ad 80°C per 24h.

Il giorno seguente si aggiungono lentamente 50 mL di metanolo ghiacciato per favorire la precipitazione del polimero, si filtra su buckner, lavando sempre con metanolo, e si essicca il prodotto sottovuoto a 30°C per 24h.

In *figura 12* si può osservare il meccanismo di reazione.

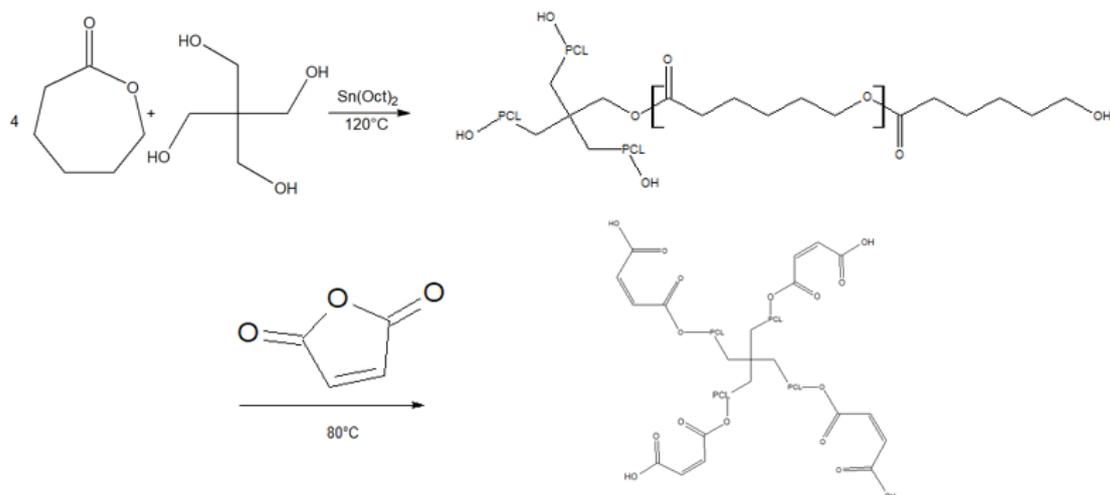


figura 12: meccanismo di reazione produzione PCL a stella -COOH terminato

Il prodotto è stato poi caratterizzato attraverso analisi di spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ e IR, per verificare il successo della reazione di funzionalizzazione del polimero e per valutare un'eventuale variazione di massa molecolare delle catene polimeriche:

$^1\text{H-NMR}$ *chemical shifts* del PCL a stella -COOH terminato: 4.09 ppm (- CH_2 - pentaeritritolo, s); 4.05 ppm (- CH_2 -, t); 3.63 ppm (- CH_2 -OH PCL terminale di catena, t); 2.29 ppm (- CH_2 -, t); 1.64 (- CH_2 -, m); 1.38 (ppm - CH_2 -, m); 6.42 ppm (R-OOC-CH=CH-COOH, d) e a 6.31 ppm (R-OOC-CH=CH-COOH, d).

Segnali IR PCL a stella -COOH terminato: 2945 cm^{-1} (*stretching* asimmetrico - CH_2 -); 2870 cm^{-1} (*stretching* simmetrico - CH_2 -); 1725 cm^{-1} (*stretching* simmetrico $>\text{C}=\text{O}$); 1297 cm^{-1} (*stretching* - $\text{C}-\text{O}$ - e - $\text{C}-\text{C}$ -); 1242 cm^{-1} (*stretching* asimmetrico - $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ -); 1179 cm^{-1} (*stretching* simmetrico - $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ -); 1640 cm^{-1} (*stretching* - $\text{C}=\text{C}$ - dell'unità maleica) e a 822 cm^{-1} (*bending* - Csp^2-H dell'unità maleica).

3.3 Preparazione dei film di PLA/PCL-COOH

I film di PLA/PCL-COOH sono stati preparati con il metodo del *solvent casting*, ovvero attraverso la solubilizzazione in opportuno solvente, in questo caso diclorometano (DCM), dei componenti, quindi PLA e PCL-COOH terminato, rispettivamente in un rapporto 80:20 m/m.

In una beuta da 25 ml sono stati pesati 160 mg di PLA e 40 mg di PCL-COOH terminato. Successivamente sono stati disciolti in 10 mL di DCM e solubilizzati, con l'ausilio di una piastra munita di ancoretta magnetica, a temperatura ambiente. La soluzione risultante è stata poi versata in una capsula di petri dal diametro di 54 mm, la quale è stata lasciata tutta la notte in stufa a 30°C.

Successivamente, il film ottenuto è stato, utilizzando delle pinzette in metallo, staccato con molta cautela dalla capsula petri e lasciato prima una notte sotto cappa e poi una notte in stufa sottovuoto a temperatura ambiente. Per quest'ultima operazione il film è stato capovolto per permettere al solvente di evaporare completamente [1].

Prima di passare ai trattamenti e analisi successive i campioni sono stati fustellati ad ottenere film circolari di diametro 2 cm per renderli più maneggiabili.

3.4 Preparazione dei film di PLA

Anche in questo caso i film sono stati preparati con la tecnica del *solvent casting*.

La differenza, rispetto al procedimento visto precedentemente per la preparazione dei film di PLA/PCL-COOH, è che in questo caso vengono disciolti nei 10 mL di DCM direttamente 200 mg di PLA mentre il resto dei passaggi preparativi rimane invariato.

3.5 Reazione di amminolisi

La reazione di amminolisi è stata effettuata sui film di PLA tal quale, utilizzati nel progetto 2, allo scopo di aumentare le funzionalità superficiali adatte ad interagire con il coating applicato.

La reazione è stata effettuata in un contenitore chiuso, data la natura volatile dei reagenti, a 30°C, utilizzando un bagnomaria e mantenendo la soluzione in agitazione.

La metodica prevede di lasciare 5 minuti i campioni in 5 mL di isopropanolo allo scopo di aumentare la bagnabilità della superficie dei film. Dopodichè si aggiungono al contenitore 5 mL di soluzione al 10 % V/V di etilendiammina in isopropanolo e si lascia il sistema reagire per un tempo prestabilito. Dato che la resa di reazione di amminolisi è influenzata dalla temperatura, dalla concentrazione e dal tempo, si è scelto di mantenere costanti i

primi due parametri e di variare il terzo. Sono perciò state condotte reazioni per tempi di 0.5h, 1h, 2h, 3h, 4h e 5h.

Terminata la reazione, i campioni hanno subito due lavaggi in isopropanolo, per eliminare l'etilendiammina che poteva essere rimasta adesa al film, e sono stati essiccati 24h sotto cappa e 24h a 30°C in forno sottovuoto.

I campioni risultanti da questo trattamento sono stati rinominati, in vista delle analisi di caratterizzazione, in funzione del tempo di reazione (ad es. PLA_2h_A, ad indicare un film di PLA amminolizzato per 2h).

3.6 Deposizione dei bilayer di chitosano e DNA

Chitosano e DNA sono stati deposti sui film di PLA/PCL-COOH, relativi al progetto 1.

La deposizione dei *bilayer* è stata effettuata per *dipping*, immergendo i campioni prima in una soluzione di chitosano, carico positivamente, allo 0.5% m/m e poi in una soluzione di DNA, carico negativamente, allo 0.5% m/m.

La soluzione di chitosano è stata preparata solubilizzando, in un matraccio da 100 mL, 0.5g di chitosano a bassa massa molecolare. Inoltre, sono stati aggiunti, prima di portare a volume il matraccio con acqua Milli-Q, 0.24 mL di acido acetico (CH₃COOH) in modo da protonare, e quindi attivare, il gruppo amminico del chitosano.

La soluzione di DNA è stata invece preparata solubilizzando, in un matraccio da 100 mL, 0.5g di DNA, in acqua Milli-Q.

La deposizione è stata effettuata immergendo i campioni prima nella soluzione di chitosano perché i gruppi NH₃⁺ sono adatti ad interagire con il gruppo carbossilico terminale del PCL a stella.

La metodica di deposizione di un singolo *bilayer* comprendeva prima l'immersione dei film all'interno di un becker contenente 20 mL di soluzione di chitosano, una successiva immersione in un becker contenente acqua Milli-Q, al fine di eliminare la soluzione rimasta in eccesso sul film, poi l'immersione in 20 mL di soluzione di DNA ed infine un altro lavaggio in acqua Milli-Q. I tempi di permanenza all'interno di ciascuna soluzione sono stati di 5 min, durante i quali l'operatore non ha mai permesso al film di aderire al

fondo o alle pareti del becker per non compromettere l'omogeneità della deposizione. Tra le varie immersioni, inoltre, i campioni venivano asciugati delicatamente su carta assorbente per una più efficace rimozione della soluzione in eccesso vista la viscosità delle due soluzioni. Questo procedimento è stato ripetuto per ogni *bilayer* depositato.

Le soluzioni all'interno dei becker sono state cambiate ogni 5 *bilayer* depositati e i campioni sono stati essiccati una giornata ad una temperatura di circa 20°C.

In questo modo sono stati preparati campioni contenenti 10 e 20 *bilayer*, i quali sono stati nominati in funzione del numero di deposizioni effettuate (ad es. PLA/PCL-COOH_10, ad indicare 10 *bilayer* di CH e DNA sul film di PLA/PCL-COOH).

3.7 Deposizione dei bilayer di CH, DNA e particelle magnetiche di cobalto ferrite

Chitosano, DNA e particelle magnetiche sono state deposte per *dipping* su campioni di PLA amminolizzato relativi al progetto 2.

Alle soluzioni di chitosano e DNA, di cui si è già descritta la preparazione, è stata aggiunta una quantità di particelle magnetiche pari all'1 % in massa e sono state sottoposte a sonicazione.

La deposizione è stata effettuata con la stessa metodica vista nel procedimento 1, con la differenza che in questo caso sono state utilizzate delle eppendorf contenenti 5 mL di soluzione anziché i becker.

In questo modo sono stati preparati campioni contenenti 5, 10, e 20 *bilayer*, denominati in funzione del trattamento di amminolisi subito e numero di deposizioni effettuate (ad es. PLA_2h_A_10, ad indicare un film di PLA amminolizzato per 2h su cui sono stati depositati 10 *bilayer* di CH, DNA e particelle di cobalto ferrite).

4 Tecniche di caratterizzazione

4.1 Spettroscopia ¹H-NMR

Gli spettri acquisiti mediante spettroscopia ¹H-NMR sono stati utilizzati in seguito alla reazione di funzionalizzazione del PCL a stella-OH con i gruppi -COOH, sia per verificare la presenza dei picchi caratteristici, sia per osservare qualitativamente un eventuale variazione della massa molecolare del polimero.

Lo strumento impiegato è stato un Mercury 300 della Varian®, che opera ad una frequenza di 300 MHz. La scala dei picchi è stata azzerata utilizzando trimetilsilano (TMS) e i campioni sono stati analizzati a T ambiente ad una concentrazione di 30 mg/mL.

4.2 Misure di bagnabilità

Questa tecnica è utilizzata per determinare l'idrofilia di un materiale, la cui variazione permette di verificare, anche se solo qualitativamente, se la funzionalizzazione della superficie dei film è riuscita.

Le analisi sono state effettuate con lo strumento Nordtest Attension® Navtar, utilizzando il metodo sessile drop e il software OneAttension in almeno due punti per ogni film. La misura consiste nella deposizione di una goccia d'acqua dal volume fisso di 3 µL sulla superficie dei film, il quale è stato posizionato su un vetrino con l'ausilio di nastro biadesivo. Utilizzando una telecamera ad alta velocità viene misurato l'angolo che si forma tra la superficie del film e la tangente tracciata dal bordo della goccia, detto angolo di contatto.

Le misure sono state prese per un tempo totale di 60 s per permettere alle gocce di stabilizzarsi.

Per evitare che l'umidità presente sulla superficie del campione falsi la misura, andando così ad inficiare sulla riproducibilità del metodo, i film sono stati tenuti una notte in essiccatore.

4.3 Spettroscopia vibrazionale IR

La spettroscopia infrarossa è una tecnica di assorbimento utilizzata per analisi qualitative. Permette di identificare determinati gruppi funzionali grazie alle vibrazioni di legame caratteristiche, in seguito all'assorbimento di una radiazione luminosa nel range compreso tra 400 e 4000 cm^{-1} .

Per le analisi sono stati usati uno spettrometro IR a trasformata di Fourier Vertex 70 della Bruker®, operante in *attenuated total reflectance* (ATR), equipaggiato con cristallo di diamante come elemento di riflessione interna, e uno spettrometro IR a trasformata di Fourier Perkin Elmer Frontier con una risoluzione di 4 cm^{-1} .

Questa tecnica è stata utilizzata per osservare i picchi caratteristici di chitosano e DNA in seguito al trattamento di deposizione *Layer by Layer* e la presenza dei gruppi azotati in seguito alla reazione di amminolisi.

Nello specifico, per osservare l'incremento dell'intensità di tali picchi all'aumentare dei bilayer depositati è stato sottoposto ad analisi un dischetto di silicio ottico, attivato con polietilenimmina ramificata (BPEI), dopo ogni *bilayer* depositato fino ad un totale di dieci. Per lo stesso scopo sono stati analizzati film di PLA/PCL-COOH contenenti rispettivamente 0, 10, e 20 *bilayer*.

Analisi su film di PLA amminolizzato sono state condotte a diverse tempistiche di reazione per trovare il giusto compromesso tra funzionalizzazione e integrità strutturale.

4.4 Microscopia elettronica a scansione

Il microscopio elettronico a scansione (SEM) è uno strumento utilizzato per studiare la morfologia superficiale dei campioni e la sezione di un pezzo di silicio su cui sono stati depositati 10 *bilayer*, i quali sono stati ricoperti da un sottile strato di grafite in modo che risultino conduttori utilizzando uno *sputter* Polaron E5100.

Per esaminare le morfologie superficiali dei film è stato usato un microscopio elettronico a scansione ed emissione di campo Zeiss Supra® 40VP, andando a osservare nello specifico gli elettroni *backscattered* e mantenendo fasci a basse intensità (3.00 kV) per non rovinare i film, essendo molto sottili.

4.5 Analisi termogravimetrica

L'analisi termogravimetrica (TGA) è una tecnica di caratterizzazione che permette di indagare sulla stabilità termica del campione andando a misurare la variazione di peso in funzione della variazione della temperatura.

Lo scopo dell'analisi è andare a studiare come i *bilayer* e i trattamenti effettuati influiscono sul comportamento dei film al variare della temperatura.

Si è utilizzato lo strumento TGA1 STARe System® della Mettler Toledo impostando il programma termico da 30°C a 800°C con una velocità di riscaldamento di 10°C al minuto sotto un flusso di N₂ di 80 mL/min. Terminata la fase di riscaldamento, il campione è stato lasciato 10 min in isoterma, sempre a 800°C, in flusso di O₂ di 80 mL/min.

Il crogiuolo utilizzato ha una capienza di 40 µL ed è stato riempito con circa 10 mg di materiale.

4.6 Degradazione enzimatica

Le prove di degradazione enzimatica sono state condotte allo scopo di verificare se la presenza dei *bilayer* modificasse il comportamento dei film in condizioni di degradazione.

L'enzima che è stato usato è l'*Humicola insolens cutinase* (HiC), specializzato nel saponificare i legami esterei e quindi molto affine al sistema studiato.

Durante l'analisi sono stati esaminati sia film di PLA/PCL-COOH tal quali, sia con 20 *bilayer* depositati. Per ogni campione sono stati preparati 3 dischetti dal diametro di 1 cm immersi in 1mL di soluzione tampone a pH 7.4, denominato *buffer*, e 3 dischetti delle stesse dimensioni immersi in 1 mL di soluzione all'1% V/V di enzima all'interno del *buffer*. I 12 campioni così preparati sono stati lasciati in stufa a 50°C per 10h, 16h e 72h. Dopodiché i campioni sono stati lavati e lasciati asciugare una notte all'aria e una notte in stufa sottovuoto.

I film sono stati pesati prima e dopo il trattamento per poterne valutare la variazione di peso.

4.7 Prove di permeabilità

Per osservare se il bilayer depositati sui film hanno effetto sulla permeabilità dei gas, sono state effettuate analisi di permeabilità di O₂ utilizzando un apparato Extrapern, Extra Solutions.

I test sono stati effettuati a 23°C in tre differenti condizioni di umidità, rispettivamente 0%, 50% e 90%.

I film di PLA/PCL-COOH analizzati presentavano 0 e 10 *bilayer* di chitosano e DNA depositati e avevano una dimensione di 2.5cm x 2.5cm. Dei fogli di alluminio sono stati usati per ridurre la superficie utile all'analisi a 2.01 cm².

4.8 Prove di ritardo alla fiamma

Le prove di ritardo alla fiamma sono state effettuate su tre campioni di PLA/PCL-COOH tal quale, con 10 e 20 *bilayer*, allo scopo di osservare gli effetti del coating sui film.

I campioni, di forma rettangolare di dimensione 1 cm x 4 cm, sono stati posti tramite l'utilizzo di una morsa in configurazione orizzontale, con inclinazione di 45°, e sottoposti ad una fiamma a metano di 20 mm mentre erano ripresi da una telecamera.

Sotto i campioni è stato posizionato del cotone per poter valutare il gocciolamento del polimero fuso che risulta una delle principali fonti di pericolo durante la combustione di componenti in plastica.

4.9 Prove di elettrostaticità

Sono state condotte prove fenomenologiche di accumulo di elettricità statica su film di PLA amminolizzato, su cui sono state depositi *bilayer* contenenti particelle magnetiche, allo scopo di verificare che quest'ultime impedissero l'accumulo di elettroni sulla superficie dei film.

La metodica prevede di strofinare con della lana sia campioni contenenti particelle magnetiche, sia campioni di PLA senza rivestimento, e osservare l'eventuale accumulo di

elettricità statica passando i film in prossimità e a contatto di piccoli pezzi di plastica, i quali saranno attratti dai campioni statici.

4.10 Prove di attivazione magnetica

Sono state effettuate prove fenomenologiche di attivazione magnetica per verificare che la quantità di particelle magnetiche depositate sul PLA amminolizzato fosse sufficiente per far reagire i film in presenza di un campo magnetico e quale fosse il numero minimo di *bilayer* da depositare per poter osservare degli effetti.

Campioni con 0, 5, 10 e 20 *bilayer* sono stati posti a diversi centimetri da un magnete di NdFeB, avvicinandoli man mano fino a quando non venivano attirati da quest'ultimo.

Successivamente è stata condotta un'altra prova per provare che i campioni trattati con particelle di cobalto ferrite fossero separabili da altri tipi di plastica mediante l'utilizzo di un magnete. Sono stati perciò messi insieme campioni di PLA amminolizzato su cui erano stati depositi 20 *bilayer* e altri pezzi di plastica non trattati (PLA e altre plastiche commerciali). Si è poi osservato, avvicinando un magnete di NdFeB se e quanti campioni venissero attratti e separati.

5 Risultati progetto 1

5.1 Prove preliminari interazioni tra CH e DNA

La formazione di una ricopertura del film polimerico attraverso la tecnica LbL è basata sull'interazione tra il CH, carico positivamente, e il DNA, carico negativamente. Per verificare che queste due sostanze possano interagire ionicamente, sono state poste all'interno di una provetta nelle stesse condizioni di concentrazione, temperatura e pH utilizzate durante la deposizione. Il risultato è stato la formazione di un precipitato bianco, osservabile in *figura 13*, che va a confermare appunto le interazioni tra i due componenti.



figura 13: foto del precipitato formato quando una soluzione di CH viene posta a contatto con una di DNA

5.2 Misure di bagnabilità

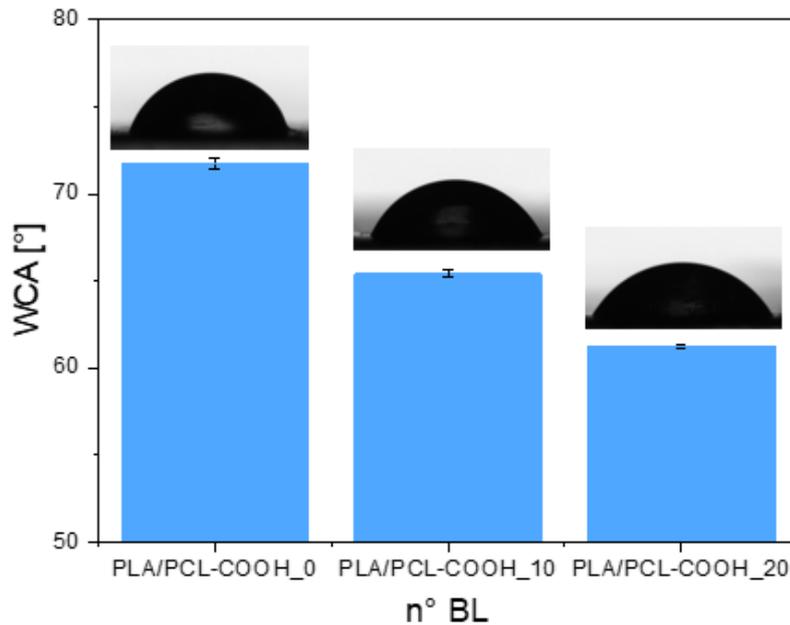


figura 14: istogramma WCA con foto della goccia d'acqua depositata sopra al film

Le misure di bagnabilità sono state effettuate confrontando l'angolo di contatto statico tra il campione di PLA/PCL-COOH e quelli trattati con dieci e venti *bilayer*. In *figura 14* è rappresentato l'istogramma contenente i valori di angolo di contatto con relativa foto della goccia sulla superficie del film. I risultati sono inoltre riassunti in *tabella 3*. Il film senza *coating* mostra un angolo di contatto di 71.7° , in accordo con i risultati trovati in letteratura [1]. Questo dimostra che la bagnabilità del PLA, che presenta valori di angolo di contatto intorno a 80° , viene incrementata dalla maggiore concentrazione di funzionalità del PCL a stella [1]. Inoltre, l'aggiunta del rivestimento di CH e DNA porta ad un ulteriore incremento dell'idrofilia superficiale del film. I campioni di PLA/PCL-COOH_10 e PLA/PCL-COOH_20 hanno mostrato angoli di contatto rispettivamente di 65.4° e 61.2° .

tabella 3: risultati analisi angolo di contatto

Campione	WCA [°]
PLA/PCL-COOH	71.7 ± 0.3
PLA/PCL-COOH_10	65.4 ± 0.2
PLA/PCL-COOH_20	61.2 ± 0.1

Al fine di spiegare i risultati si è studiato il comportamento dei singoli componenti del coating. Considerando il CH tal quale, si è osservato che presenta un valore di angolo di contatto dipendente dal tempo di osservazione, essendo maggiore nella fase iniziale, probabilmente a causa della riorganizzazione delle frazioni metiliche dei gruppi acetilici residui, arrivando però a valori di 52° dopo 60 s di misura grazie ai gruppi polari e carichi positivamente presenti nel polimero [61], infatti, tenendo conto di questo fenomeno, gli angoli di contatto sono stati misurati fino a quando descritto in letteratura. Deposizioni di DNA su vari substrati hanno portato alla formazione di superfici idrofile, principalmente grazie alla presenza dei gruppi fosfato, caratterizzati da angoli di contatto di circa 60° [62]. Si può quindi concludere che il carattere idrofilo dei due componenti ha contribuito ad aumentare l'idrofilia superficiale dei film. Inoltre, la variazione di angolo di contatto conferma l'effettiva deposizione dei *bilayer* e che l'uniformità del *coating*, che aumenta all'aumentare del numero di deposizioni, rende questo effetto più significativo.

5.3 Spettroscopia vibrazionale IR

Analisi di spettroscopia FT-IR sono state utilizzate per monitorare la crescita dei *bilayer*. A questo scopo, sono state effettuate misure su campioni di CH e DNA (*figura 15*), utili per avere un confronto con i film trattati.

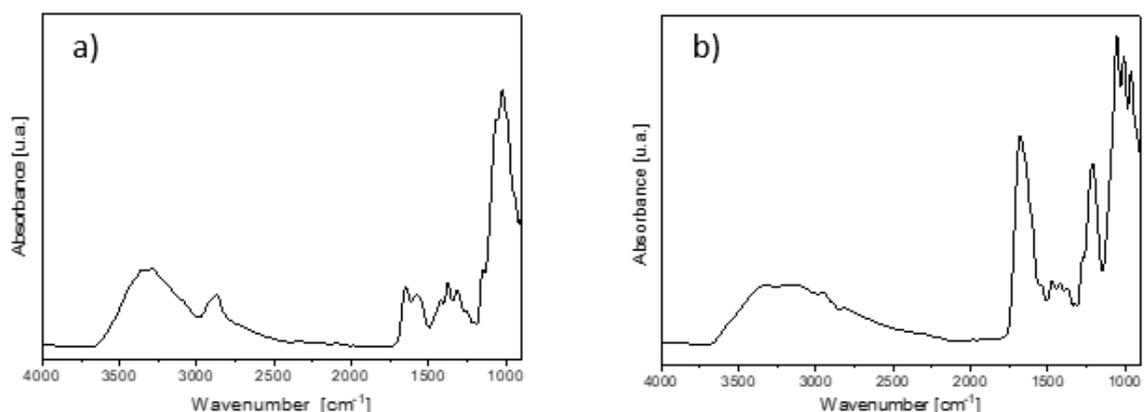


figura 15: spettri IR: a) chitosano b) DNA

Il chitosano presenta picchi slargati intorno a 3351 e 3287 cm^{-1} relativi allo *stretching* dei gruppi O-H e N-H. I segnali a 2919 , 2873 , 1420 , 1375 e 1314 cm^{-1} sono stati attribuiti ai legami C-H, mentre il picco a 1647 cm^{-1} e la spalla a 1583 derivano dallo *stretching* simmetrico e asimmetrico del gruppo NH_2 . I segnali a 1150 e 1060 cm^{-1} sono invece relativi al *bending* dell'ammino gruppo e all'anello piranosico [63]. Il DNA presenta anch'esso un picco slargato relativo al legame O-H derivante dall'acqua legata a 3300 cm^{-1} [64]. Il segnale a 1680 cm^{-1} deriva dal doppio legame C=O, presente in guanina, citosina e timina, mentre quelli a 1541 , 1479 , 1420 e 1373 cm^{-1} sono relativi ai doppi legami C=C e C=N di pirimidina e purina. La presenza di desossiribosio fosfato è confermata dai segnali a 1211 , 1054 e 961 cm^{-1} caratteristici dei legami P=O, C-O-C e P-O-C [65].

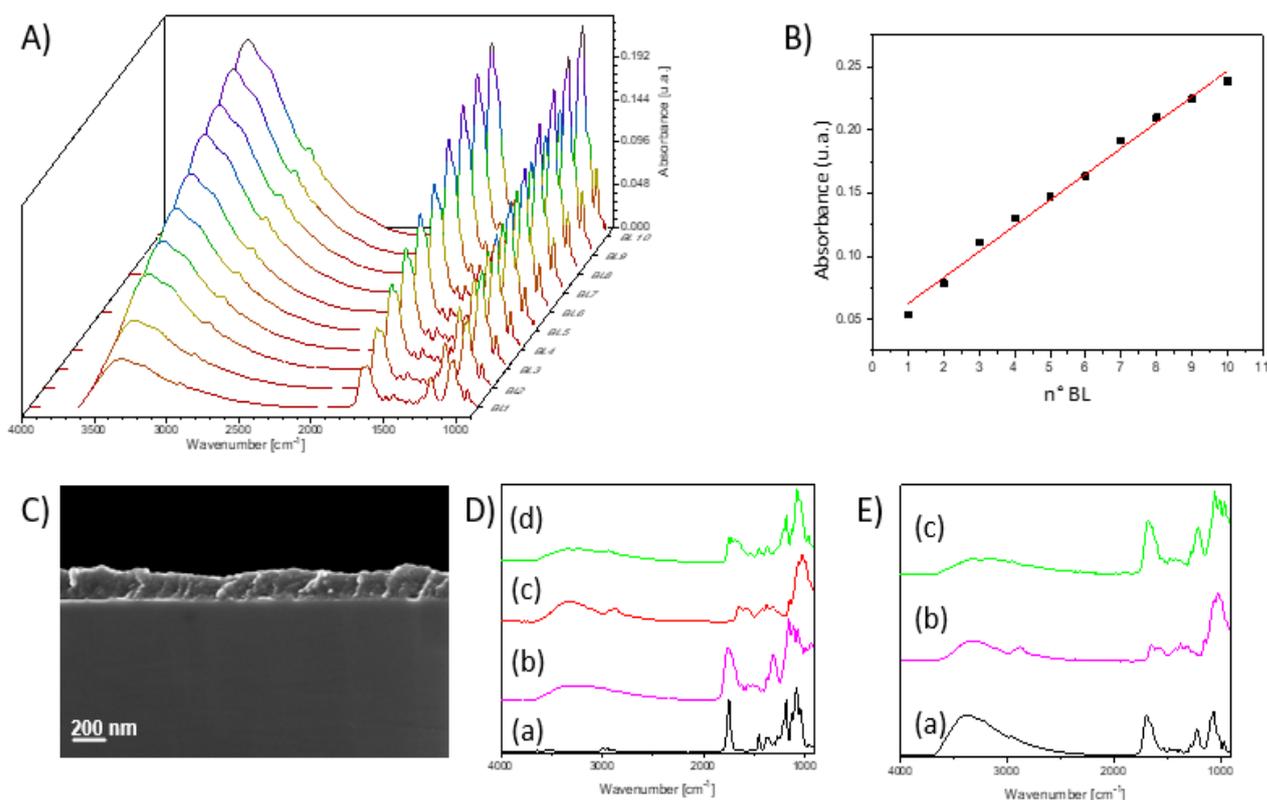


figura 16: A) spettro IR 3D crescita su silicio ottico B) crescita intensità picco a 1060 cm⁻¹ C) immagini SEM sezione del silicio con 10 BL depositati D) sovrapposto spettri (a) PLA/PCL-COOH (b) DNA (c) CH (d) PLA/PCL-COOH_20 E) sovrapposto spettri (a) DNA (b) CH (c) 10 BL su silicio

Effettuando le deposizioni su un disco di silicio ottico attivato con BPEI, nelle stesse condizioni usate per i trattamenti dei film, ed effettuando analisi IR dopo ogni *bilayer* depositato, si è potuto costruire un grafico 3D (*figura 16A*). In questo modo è possibile osservare l'aumento dell'intensità dei picchi in funzione del numero di deposizioni effettuate. Tale andamento è stato confermato prendendo in esame un singolo picco, nello specifico quello a 1060 cm⁻¹, caratteristico del legame C-O-C e quindi comune ad entrambe le sostanze usate nel *coating*, e costruendo un grafico assorbanza/numero di *bilayer* (*figura 16B*), in cui si osserva un andamento di crescita lineare. Inoltre, in *figura 16C* è osservabile l'immagine della sezione del disco di silicio, effettuata al SEM, in cui si vede la formazione di uno strato omogeneo caratterizzato da uno spessore elevato, circa 200 nm, già dopo la deposizione di 10 *bilayer*. Gli spettri IR sovrapposti di CH, DNA, PLA/PCL-COOH e PLA/PCL-COOH_20 (*figura 16D*) e quelli di CH, DNA e 10 *bilayer*

sul silicio ottico (*figura 16E*), sono stati utilizzati per analizzare più efficientemente gli effetti della deposizione. Nello specifico, prendendo in esame il primo caso, si osserva che lo spettro del film senza coating mostra un picco a 1740 cm^{-1} , relativo allo *stretching* del carbonile [1]. Il film trattato invece, mostra i picchi a 3340 e 1640 cm^{-1} caratteristici di CH e DNA, dimostrando l'effettiva modifica del film. Questi picchi risultano leggermente spostati rispetto agli spettri dei componenti singoli a causa delle interazioni tra le fasi che causano un leggero *shift* dei segnali [63]. Confrontando gli spettri dei dieci BL depositati sul silicio e del film con venti BL si osserva che, pur presentando entrambi picchi caratteristici sia del CH che de DNA, nello spettro effettuato sul silicio sono più intensi i segnali relativi al DNA e nello spettro del film trattato sono più intensi i segnali relativi al CH. Questo fenomeno dipende dal fatto che l'ordine di deposizione durante i due procedimenti è differente: sul silicio, attivato con BPEI è stato depositato prima il DNA, essendo più affine al substrato attivato, mentre sul film è stato depositato prima il CH, essendo più affine alle funzionalità del *blend*. A causa di ciò, il componente più affine al substrato partecipa maggiormente alla formazione del *coating*, essendo presente in concentrazioni maggiori, modificando lo spettro risultante [65].

5.4 Microscopia elettronica a scansione

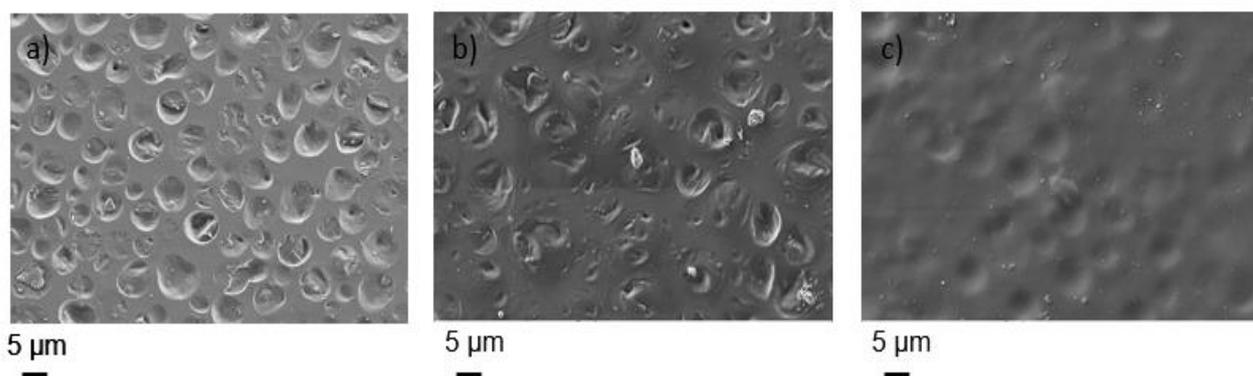


figura 17: immagini SEM: a) PLA/PCL-COOH b) PLA/PCL-COOH_10 c) PLA/PCL-COOH_20

Le analisi SEM sono state usate per studiare la superficie dei film in seguito alla deposizione. In *figura 17* sono riportate le immagini relative ai campioni di PLA/PCL-

COOH, PLA/PCL-COOH_10 e PLA/PCL-COOH_20, dalle quali si può osservare come il *blend* polimerico presenti una morfologia ad isole (*figura 17a*), caratteristica dei sistemi immiscibili. Tuttavia, Damonte e collaboratori [1] hanno dimostrato che l'utilizzo di PCL a stella -COOH terminato garantisca miglior adesione alla matrice di PLA rispetto all'utilizzo di un polimero lineare ad elevato peso molecolare. La deposizione di strati di CH e DNA ha portato comunque alla formazione di un rivestimento continuo sia dei domini di PCL-COOH che della matrice di PLA, come si può osservare in *figura 17c*. Queste analisi hanno inoltre dimostrato come sia possibile con questa tecnica rivestire anche sistemi eterogenei formati da più componenti con un rivestimento omogeneo se si depositano un numero sufficiente di strati.

5.5 Analisi termogravimetrica

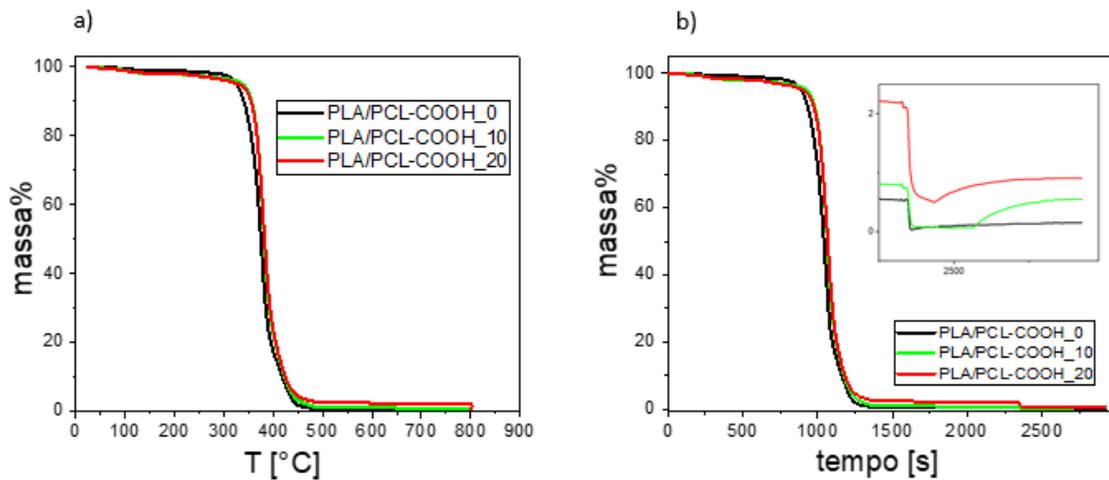


figura 18: a) grafico TGA massa % su temperatura; b) grafico TGA massa % su tempo con esploso sulla massa del residuo finale

tabella 4: risultati analisi TGA

CAMPIONE	T _{onset} [°C]	T _{max} [°C]	Residuo in N ₂ [%]	Residuo in O ₂ [%]
PLA/PCL-COOH	326	376	0.5	0.0
PLA/PCL-COOH_10	338	378	0.7	0.5
PLA/PCL-COOH_20	329	380	2.1	0.9

L'influenza del coating sul comportamento termico dei campioni è stata studiata attraverso misure TGA. In *tabella 4* sono riassunti i risultati delle analisi su tre campioni, PLA/PCL-COOH, PLA/PCL-COOH_10 e PLA/PCL-COOH_20, mentre in *figura 18* vengono riportate le curve termogravimetriche.

Dai risultati ottenuti si è osservato un aumento della T_{onset}, che è passata da 326°C per il film senza rivestimento a 338°C per il film con 10 *bilayer*, e della T_{max}, che è aumentata da 376°C a 380°C per il film con 20 *bilayer*. Si può quindi dedurre che il trattamento di deposizione non va a modificare in modo particolarmente marcato il comportamento termico del *blend* polimerico. Inoltre, all'aumentare dei *bilayer* depositati, aumenta la massa residua, sia in atmosfera di N₂, in cui il film senza *coating* presenta un residuo dello 0.5% mentre il campione PLA/PCL-COOH_20 presenta un residuo del 2.1%, sia in atmosfera di O₂ in cui gli stessi film presentano residui rispettivamente dello 0% e del 0.9%. Questo ci fornisce alcune informazioni riguardo al comportamento di CH e DNA. Osservando le curve della massa in funzione del tempo si può vedere come la presenza dell'ossigeno nella camera comporti una riduzione immediata della massa residua, dovuta al fenomeno di combustione. Nell'ultimo tratto della curva, per i campioni con dieci e venti *bilayer*, si osserva un aumento della massa, probabilmente dovuto a fenomeni ossidativi.

Studiando il comportamento al variare della temperatura dei singoli componenti del rivestimento si possono comprendere meglio i risultati ottenuti.

Il chitosano mostra un comportamento termico che dipende da temperatura e composizione. In letteratura viene riportato come, effettuando un programma termico

analogo a quello usato in questo lavoro, ma solo in atmosfera di azoto, la massa del chitosano rimane stabile fino a circa 250°C, con solamente un 5% di massa persa relativa all'umidità [66]. Da questa temperatura inizia la degradazione, la quale presenta la massima velocità di degradazione a 334°C. Dopodichè l'andamento della curva continua con andamento decrescente, anche se meno marcato, fino ai 750°C. La perdita di massa totale riscontrata è stata del 67% e, da analisi FT-IR, si è osservato che, ad una temperatura compresa tra 250°C e 450°C, le principali componenti gassose risultanti dalla decomposizione sono NH₃, CO, CO₂, H₂O e CH₃COOH. Oltre i 450°C i meccanismi di decomposizione cambiano, vengono emessi metano e composti eteroaromatici, con il chitosano che infine viene ridotto ad una struttura tipo grafite [66].

Nel caso del DNA è riportata la presenza di tre *range* di temperatura utili per descrivere la degradazione del materiale: 150°C-200°C, 200°C-400°C e 400°C-700°C. Durante il primo di questi *step* si verifica la minor variazione di massa e le sostanze volatili trovate sono principalmente CO₂ e H₂O, probabilmente dovute alla decomposizione dell'acido isocianico all'interno della struttura. Tra i 200°C e i 400°C la struttura del DNA si degrada, promuovendo la formazione di strutture a cella aperta e liberando eventuali gas intrappolati all'interno della struttura. Oltre i gas precedentemente citati, dai 200°C si rileva anche la presenza di NH₃. Ulteriore riscaldamento provoca una diminuzione costante della massa fino a lasciare un residuo in massa compreso tra il 28% e il 48%, a seconda della presenza di ossigeno o meno all'interno dell'atmosfera. Questo residuo, inoltre, mostra un'elevata resistenza termica e ossidativa, derivante probabilmente da processi di reticolazione, ciclizzazione e aromatizzazione promossi dal calore, osservati in molte molecole organiche [67].

Si è quindi potuto dedurre che il residuo derivante dalla combustione dei campioni analizzati sia derivante dalle sostanze utilizzate come *coating*. Inoltre, osservando il comportamento termico di tale residuo, si può ipotizzare che questo contribuisca attivamente alla resistenza alla fiamma del film polimerico.

5.6 Degradazione enzimatica

Per lo studio di degradazione enzimatica è stato utilizzato l'*Humicola insolens cutinase* (HiC) come enzima perché, come osservato in letteratura, in grado di idrolizzare un'ampia

gamma di poliesteri, tra cui il poli etilen-tereftalato, il poli etilen-furanoato [68] e l'acido polilattico [69].

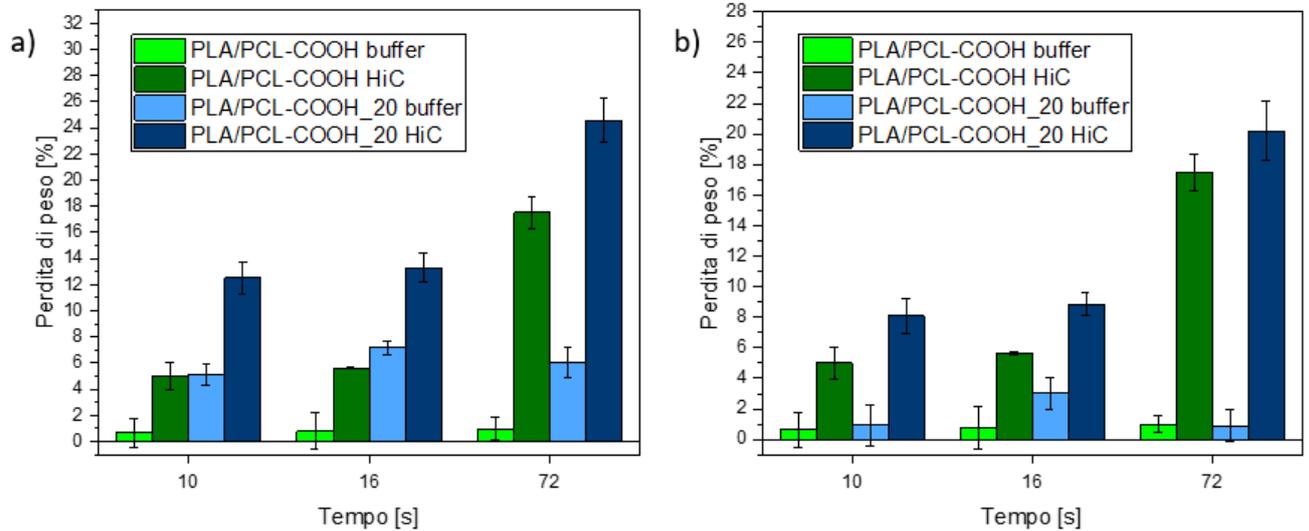


figura 19: istogrammi digestione enzimatica a) con contributo in massa dei bilayer b) senza contributo in massa dei bilayer

In *figura 19* si possono osservare gli istogrammi che descrivono l'andamento della variazione della massa dei campioni PLA/PCL-COOH e PLA/PCL-COOH_20, sia all'interno del *buffer* fosfato a pH 7.4, sia all'interno della soluzione di *buffer* + *HiC*. Dal grafico in *figura 19a* sembrerebbe che il *coating* favorisca la degradazione dei film, dato che le colonne verde scuro e blu mostrano grosse differenze di perdita di peso già dopo poche ore di digestione, fino ad arrivare ad una perdita di peso percentuale del 17.5% per il campione non trattato e del 24.6% per quello trattato. Si sono però riscontrate significative differenze anche nei campioni mantenuti all'interno della soluzione contenente solamente il *buffer* (colonne verde chiaro e azzurre), con perdite di peso rispettivamente dello 1.0% e del 6.1% dopo 72h. Si è però osservato che la percentuale di massa persa tra i film trattati e non trattati corrisponde all'incirca al peso dei *bilayer* depositi. Si è quindi deciso di effettuare nuovamente i calcoli sottraendo ai campioni di PLA/PCL-COOH_20 il contributo in massa del *coating*. In questo modo, come si può osservare in *figura 19b*, i profili di degradazione presentano un andamento molto più simile, con perdite di peso percentuali per i film trattati del 20.2%. Si è quindi dedotto che i *bilayer* di CH e DNA in soluzione acquosa si distaccano dalla superficie esponendo così il *blend* all'azione

dell'enzima. Inoltre, il profilo di degradabilità finale dei campioni è risultato ottimale, garantendo la possibilità di funzionalizzazione senza precludere una depolimerizzazione ecologica, ideale per un'economia circolare del prodotto.

5.7 Prove di permeabilità

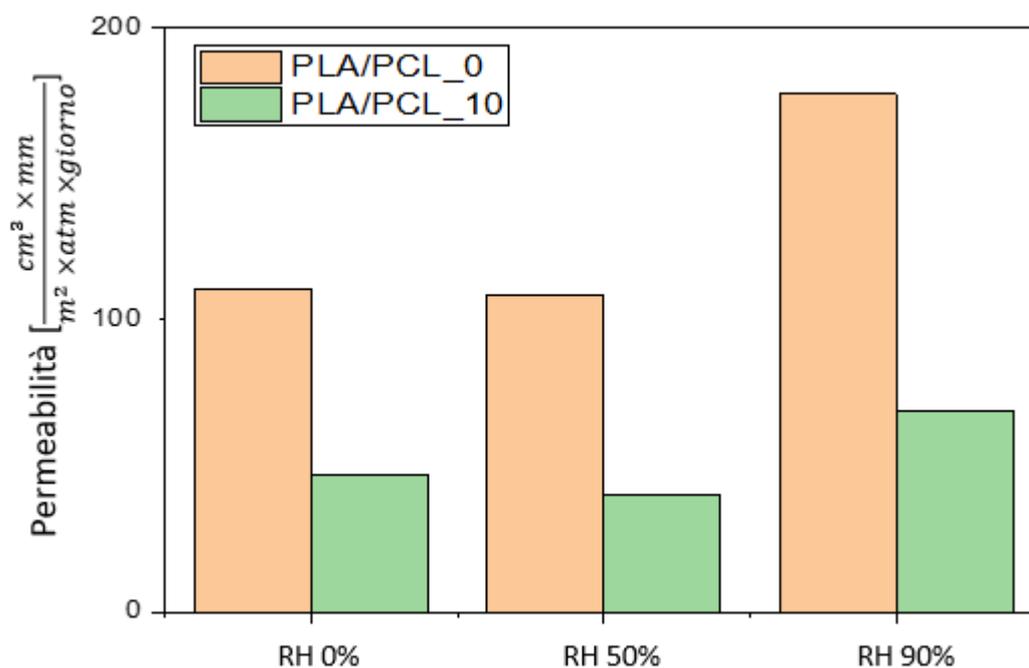


figura 20: istogramma risultati permeabilità all'ossigeno

Test di permeabilità all'ossigeno sono stati condotti sui campioni PLA/PCL-COOH e PLA/PCL-COOH_10 per verificare la variazione di tale parametro in seguito ai trattamenti superficiali effettuati sui campioni. In *figura 20* si può osservare l'istogramma che riporta i risultati delle analisi. Dopo la deposizione di dieci *bilayer* la permeabilità si è ridotta del 63%, 67% e 66% per percentuali di umidità relativa (RH%) rispettivamente dello 0%, del 50% e del 90%.

tabella 5: variazione percentuale della permeabilità all'ossigeno rispetto al substrato tale quale dei nostri materiali in confronto con altri sistemi LbL applicati al PLA

Riferimento	Composizione del <i>coating</i>	Numero di <i>bilayer</i>	Umidità relativa [%]	Variazione permeabilità all'O ₂ comparata col substrato [%]
PLA/PCL-COOH_10	CH/DNA	10	0	63
			50	67
			90	66
. [70]	CH/MMT	30	0	99
. [71]	CH/MMT	70	20	99
			50	96
[60]	PEI/NFC	20	50	67
		50		94
	PEI/CMC	20	50	66
		50		93
[72]	(BPEI/nafion) ₂ /BPEI/MMT	30	0	98
			75	97
[63]	BPEI/GO	10	0	77
			75	81
	CH/GO	10	0	53
			75	30

PEI = polietilenimmina NFC = cellulosa nanofibrillata CMC = carbossimetil cellulosa

BPEI = polietilenimmina ramificata MMT = montmorillonite GO = ossido di grafite

In *tabella 5* è stato riportato il confronto tra le variazioni percentuali di permeabilità all'ossigeno, rispetto al substrato senza *coating*, dei nostri materiali con altri sistemi LbL presenti in letteratura, applicati sempre all'acido polilattico.

Laufer e collaboratori [70], hanno utilizzato la tecnica LbL per migliorare la permeabilità ai gas di film di PLA attraverso la deposizione di 30 BL di CH e montmorillonite (MMT), riscontrando un miglioramento di due ordini di grandezza. Approccio molto simile a quello usato da Svagan e collaboratori [71], i quali hanno applicato lo stesso rivestimento ottenendo un miglioramento del 96%, applicando però un numero elevato di *bilayer*. Anche Carosio e collaboratori [72] hanno lavorato utilizzando la MMT, combinandola però con nafion e BPEI, ottenendo anche in questo caso ottimi risultati, con una diminuzione della permeabilità del 98%. Rispetto ai materiali utilizzati in questo studio, questi sistemi mostrano una variazione di permeabilità all'ossigeno maggiore, applicando però, nella maggior parte dei casi, un numero di *bilayer* più elevato e quindi coating più spessi. Tali procedimenti risultano però più laboriosi e possono risultare difficili da applicare a livello di produzioni industriali. Si può comunque affermare che un maggior numero di deposizioni garantirebbe anche una maggior diminuzione della permeabilità all'ossigeno. Inoltre, l'utilizzo di montmorillonite, essendo un *filler* inorganico, garantisce ottime prestazioni, in termini di variazione di permeabilità, andando a formare una struttura tipo *brick wall* che rappresenta un'ottima barriera per le molecole di ossigeno o altri gas, a discapito però di una riduzione della trasparenza del film [70]. Anche il binomio BPEI/ossido di grafite, testato da Li e collaboratori, permette di ottenere ottimi risultati, con una riduzione della permeabilità all'ossigeno di circa l'80% dopo solo 10 strati, senza garantire però le proprietà di resistenza alla fiamma ricercate in questo studio.

Considerando le variazioni di permeabilità ottenute negli studi sopra elencati, i risultati riscontrati applicando 10 *bilayer* di chitosano e DNA si possono considerare ottimi. Bisogna infatti considerare il ridotto numero di deposizioni effettuate e il fatto che non sono stati depositi *filler* inorganici, i quali, pur garantendo ottimi risultati in termini di riduzioni di permeabilità, influenzano le proprietà di trasparenza e possono formare aggregati, risultando quindi difficili da applicare.

5.8 Prove di ritardo alla fiamma

Per verificare il comportamento dei campioni durante la combustione sono state effettuate prove specifiche sui campioni PLA/PCL-COOH, PLA/PCL-COOH_10 e PLA/PCL-COOH_20. Come mostrato in *figura 21*, i campioni senza coating e con 10 *bilayer*

depositati hanno mostrato entrambi gocciolamento, incendiando il cotone posto al di sotto dei film. Comportamento differente si è osservato nel campione PLA/PCL-COOH_20, il quale non ha mostrato gocciolamento. Inoltre, in nessuno dei due campioni trattati si è osservato un rallentamento di propagazione della fiamma.

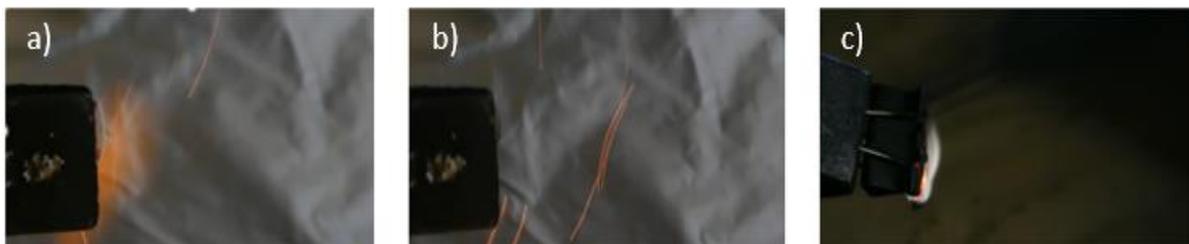


figura 21: risultati analisi resistenza alla fiamma: a) PLA/PCL-COOH b) PLA/PCL-COOH_10 c) PLA/PCL-COOH_20

Questo risultato può essere spiegato analizzando le proprietà specifiche dei due componenti del *coating*, CH e DNA. In particolare, si è osservato in altri studi che il DNA risulta essere un buon ritardante di fiamma in altri sistemi polimerici [67-73], in quanto riduce drasticamente le cinetiche di combustione e, se utilizzato come rivestimento, ha proprietà di barriera. Questo comportamento deriva dalle tre componenti essenziali per un ritardante di fiamma che ritroviamo nel DNA, ovvero la presenza di una fonte acida, che agisce come promotore di carbonizzazione (fosfati di ammonio e polifosfati), una fonte di carbonizzazione (pentaeritrolo, saccaridi e polisaccaridi) e un agente espandente che sotto riscaldamento libera una grande quantità di gas (urea, melammina, guanidina). Il chitosano non presenta proprietà intrinseche da ritardante di fiamma ma, durante la combustione, forma un residuo carbonioso in grado di proteggere la superficie del polimero, rendendolo molto adatto ad essere accoppiato con altri ritardanti [74].

6 Risultati progetto 2

6.1 Ottimizzazione della reazione di amminolisi

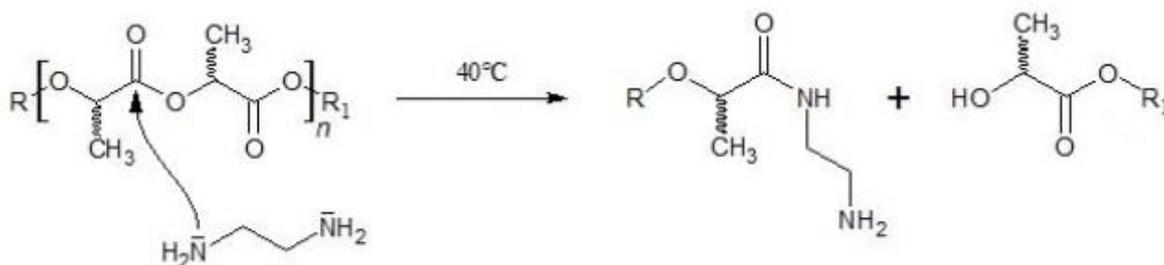


figura 22: reazione di amminolisi del PLA con etilendiammina [31]

Al fine di ottimizzare la reazione di amminolisi si è preliminarmente analizzata l'influenza del tempo di reazione sui campioni. Si è osservato che all'aumentare del tempo di contatto dei film con la soluzione contenente la diammina i campioni diventavano sempre più fragili. Questo fenomeno si è sviluppato a tal punto che dopo 4h di reazione i film hanno cominciato a degradarsi all'interno della soluzione (*figura 23*). Questo comportamento è dovuto al fatto che la reazione di amminolisi rompe le catene del polimero, come si può osservare in *figura 22* abbassando così la massa molecolare e, di conseguenza, si osserva un deterioramento delle proprietà meccaniche del film. La rottura delle catene polimeriche porta alla produzione di catene a bassa massa molecolare sulla superficie del film, le quali, essendo solubili, producono inoltre un effetto di erosione che aumenta la rugosità del film [31]. Le analisi di caratterizzazione sono state quindi condotte solamente sui campioni amminolizzati per un massimo di 3h.



Figura 23: foto dei film di PLA tal quale a) PLA amminolizzato b) PLA tal quale c) PLA amminolizzato 0.5h d) PLA amminolizzato 1h e) PLA amminolizzato 2h f) PLA amminolizzato 3h

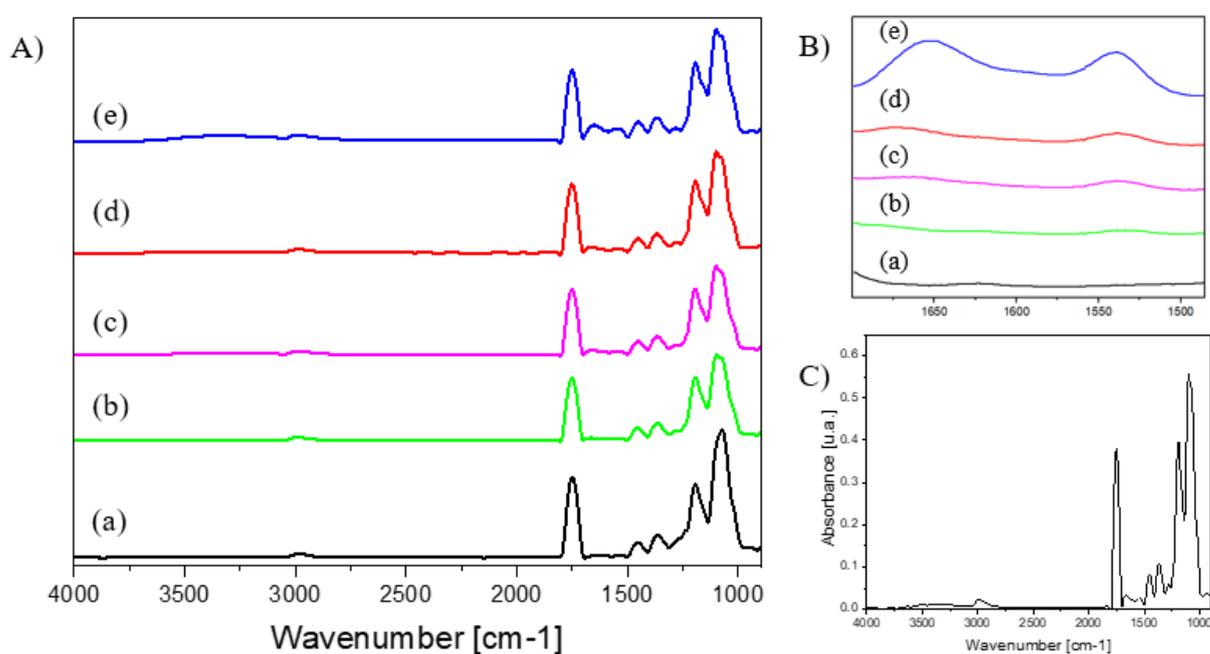


figura 24: A) sovrapposto spettri IR (a) PLA (b) PLA amminolizzato per 0.5h (c) PLA amminolizzato per 1h (d) PLA amminolizzato per 2h (e) PLA amminolizzato per 3h B) esploso sulla crescita dei picchi a 1652 cm^{-1} e 1544 cm^{-1} (a) PLA (b) PLA amminolizzato per 0.5h (c) PLA amminolizzato per 1h (d) PLA amminolizzato per 2h (e) PLA amminolizzato per 3h C) PLA amminolizzato per 2h

Le analisi di spettroscopia FT-IR sono state condotte per monitorare la funzionalizzazione del film in funzione del tempo di contatto con una soluzione contenente il 5% V/V di etilendiammina. In *figura 24A* si possono osservare gli spettri sovrapposti di un campione di PLA non trattato e di campioni amminolizzati per diversi tempi, nello specifico 0.5h, 1h,

2h e 3h. Si può osservare a 2980 cm^{-1} un segnale relativo degli *stretching* C-H e un segnale relativo al doppio legame C=O a 1747 cm^{-1} caratteristici del PLA [75]. In seguito alla sostituzione nucleofila, promossa dalla reazione di amminolisi, che comprende l'attacco da parte dell'etilendiammina al carbonio carbonilico, con la conseguente rottura del legame estereo e la formazione del legame ammidico (*figura 22*), gli spettri IR dei film presentano, in aggiunta ai picchi caratteristici del polimero, la comparsa di un segnale slargato intorno a 3330 cm^{-1} derivante dallo *stretching* del legame N-H e due picchi rispettivamente a 1652 e 1544 cm^{-1} caratteristici dei *bending* dei gruppi N-H e C-N-H delle ammidi. Questi picchi aumentano di intensità all'aumentare del tempo di reazione, come si osserva in *figura 24B*. Tali risultati evidenziano, inoltre, come la funzionalizzazione della superficie avvenga già a bassi tempi di reazione [75].

tabella 6: risultati analisi TGA su campioni di PLA [76] e PLA amminolizzato per 2h

CAMPIONE	T _{onset} [°C]	T _{max} [°C]
PLA	324	357
PLA_2h_A	292	364

Al fine di verificare l'influenza del trattamento di amminolisi sulle proprietà termiche del film, si sono effettuate analisi TGA. Confrontando i risultati del campione di PLA amminolizzato con quelli di PLA tal quale studiato nelle stesse condizioni (*tabella 6*), si osserva che, mentre la T_{max} varia leggermente, passando da 357°C per il PLA non trattato a 364°C per quello amminolizzato, la T_{onset} passa da 324°C a 292°C . Questo fenomeno deriva dalla diminuzione della massa molecolare del polimero in seguito alla reazione di amminolisi, la quale favorisce l'inizio di decomposizione del polimero a temperature inferiori rispetto al polimero non trattato. Questa variazione conferma ulteriormente l'efficacia della reazione di funzionalizzazione del film, senza però rappresentare un decremento eccessivo delle proprietà termiche del polimero.

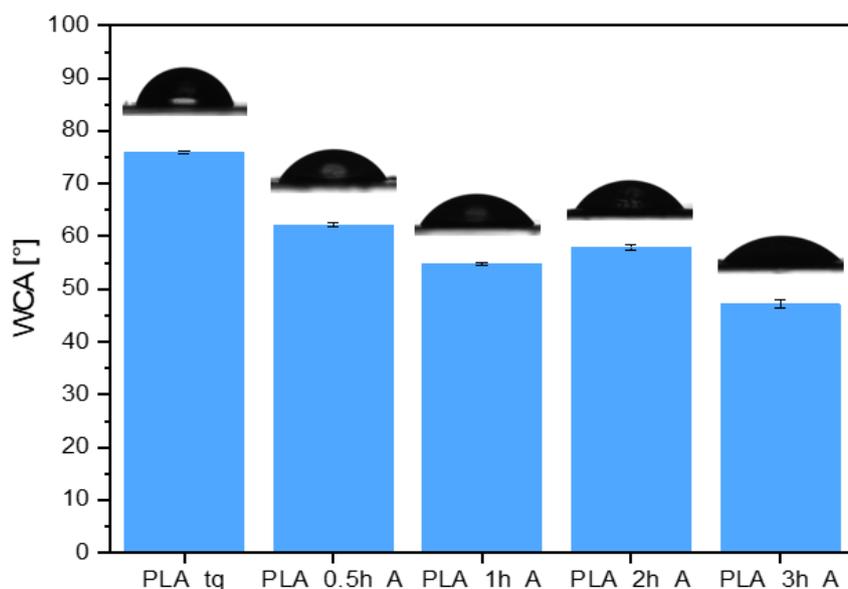


figura 25: istogramma WCA del film di PLA non trattato e dei film amminolizzati con foto della goccia d'acqua depositata sopra al film

Le misure di bagnabilità sono state effettuate confrontando l'angolo di contatto formato sulla superficie di un campione di PLA tal quale e quello formato sui campioni amminolizzati applicando diversi tempi di reazione. In *figura 25* si può osservare l'istogramma che riporta gli angoli di contatto formati sulla superficie dei vari campioni e le relative foto delle gocce d'acqua depositate sui film. I risultati sono inoltre riportati in *tabella 7*. Il campione di PLA tal quale presenta un angolo di contatto pari a 75.9° , coerente con i risultati trovati in letteratura [1]. In seguito alla reazione di amminolisi si osserva una diminuzione dell'angolo di contatto, che si fa sempre più marcata all'aumentare del tempo di reazione, fino a raggiungere valori di 47.1° dopo 3h. Questi risultati sono coerenti con quelli riportati in letteratura, dove viene riportato un aumento della bagnabilità superficiale all'aumentare del numero di funzionalità azotate presenti sulla superficie del film [77].

tabella 7: risultati analisi angolo di contatto dei campioni amminolizzati con diverse tempistiche di reazione

Campione	WCA [°]
PLA_tq	75.9 ± 0.2
PLA_0.5h_A	62.2 ± 0.3
PLA_1h_A	54.8 ± 0.3
PLA_2h_A	57.9 ± 0.5
PLA_3h_A	47.1 ± 0.8

In seguito ai risultati ottenuti dalle analisi di caratterizzazione si è quindi deciso di procedere con il trattamento LbL con i campioni amminolizzati per 2h (*figura 24C*), in quanto presentavano un sufficiente grado di funzionalizzazione senza però risultare troppo fragili.

6.2 Microscopia elettronica a scansione

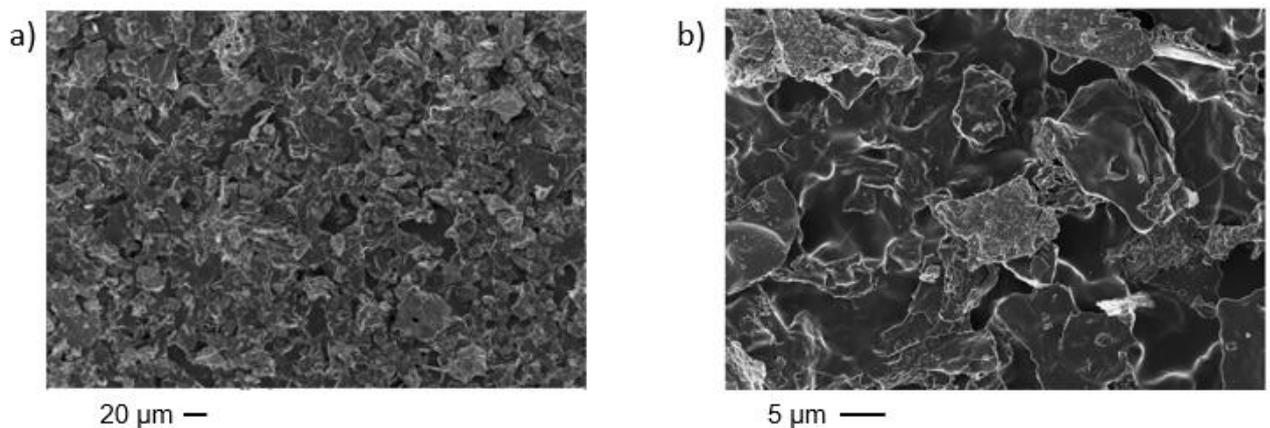


Figura 26: micrografie FE-SEM di film con 20 bilayer

In *figura 26* sono riportate le micrografie FE-SEM dei campioni su cui sono stati depositati 20 *bilayer* attraverso la deposizione in soluzioni di DNA e CH contenenti particelle magnetiche di cobalto ferrite in dispersione, le quali si depositano sotto forma di aggregati di dimensioni medie comprese tra i 10 e i 20 μm (*figura 26*). In *figura 26b* si osserva che

gli aggregati di particelle magnetiche rendono la superficie del film irregolare. Inoltre, una parte, rimasta sulla superficie del rivestimento, presenta rugosità superficiali, ma la maggior parte di esse è ricoperta da un *coating* di DNA e CH, aumentando così il numero di funzionalità sulla superficie. Si è comunque osservata una deposizione omogenea del rivestimento già dopo 20 deposizioni (*figura 26a*), a prova che la funzionalizzazione superficiale è stata sufficiente per permettere al film di interagire con il *coating* e che la tecnica LbL può essere utilizzata anche per depositare soluzioni eterogenee con buoni risultati.

6.3 Analisi di bagnabilità

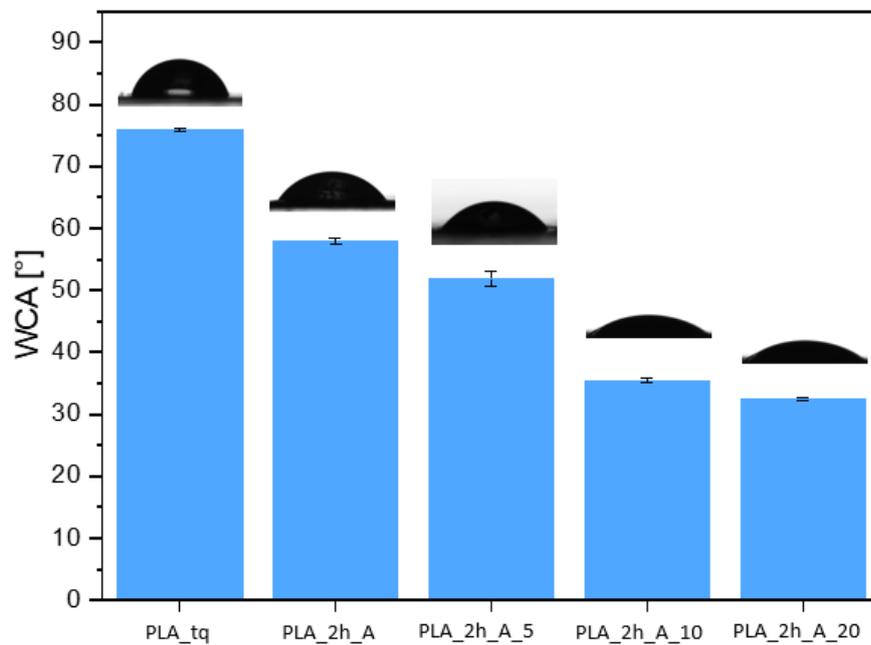


figura 27: istogramma WCA del film di PLA non trattato, del film amminolizzato e dei film in seguito alla deposizione del coating con particelle magnetiche, con foto delle gocce d'acqua depositate sopra al film

Come si può osservare nell'istogramma in *figura 27* e in *tabella 8*, sono state effettuate analisi di bagnabilità anche sui film contenenti 5, 10 e 20 *bilayer* di CH, DNA e particelle magnetiche, confrontandoli con quelli del film tal quale e del film amminolizzato per 2h. Si osserva che la presenza delle particelle magnetiche all'interno del rivestimento aumenta ulteriormente l'angolo di contatto, arrivando a valori di 32.4° per il campione ricoperto con

20 *bilayer*. Si è ipotizzato che questo fenomeno derivi dal fatto che le particelle magnetiche, rendendo la superficie irregolare ed essendo ricoperte da uno strato di CH e DNA, aumentino la concentrazione di funzionalità sulla superficie del film, permettendo così un aumento più marcato della bagnabilità.

Tabella 8: risultati analisi angolo di contatto del film di PLA non trattato, del film amminolizzato e dei film in seguito alla deposizione del coating con particelle magnetiche

Campione	WCA [°]
PLA_tq	75.9 ± 0.2
PLA_2h_A	57.9 ± 0.5
PLA_2h_A_5	51.9 ± 1.2
PLA_2h_A_10	35.5 ± 0.3
PLA_2h_A_20	32.4 ± 0.3

Inoltre, si osserva una rilevante differenza tra i valori trovati per il film con 5 *bilayer* rispetto a quello con 10, i quali presentano angoli di contatto rispettivamente di 51.9° e 35.5°. Questo comportamento può essere dovuto al fatto che è necessario un numero più elevato di *bilayer* per formare un film omogeneo che possa contribuire attivamente all'aumento della bagnabilità superficiale.

6.4 Analisi termogravimetrica

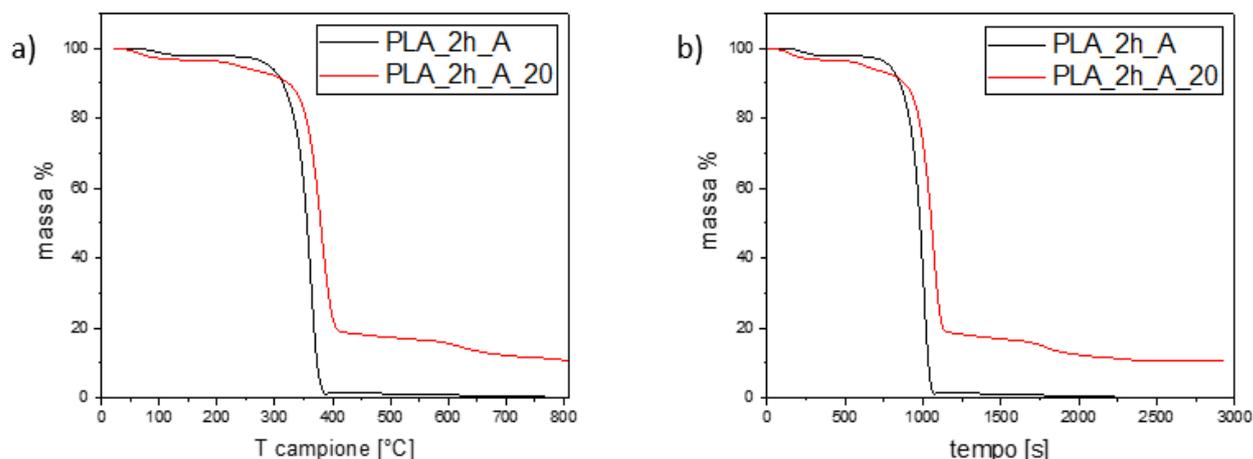


figura 28: a) grafico TGA massa % su Temperatura; b) grafico TGA massa % su tempo

tabella 9: risultati analisi TGA

CAMPIONE	T_{onset} [°C]	T_{max} [°C]	Residuo in N ₂ [%]	Residuo in O ₂ [%]
PLA_2h_A	292	364	0.1	0.0
PLA_2h_A_20	297	382	11.0	10.8

Sono state effettuate analisi TGA per verificare l'influenza dei trattamenti effettuati sui campioni. In *tabella 9* sono riassunti i risultati delle analisi sui campioni PLA_2h_A e PLA_2h_A_20, mentre in *figura 28* si possono osservare le curve termogravimetriche.

Dai risultati ottenuti si osserva una leggera variazione nella T_{onset} , che è passata da 292°C, per il film senza *coating*, a 297°C per il film su cui sono stati depositi 20 *bilayer*. Si è osservata una variazione più marcata della T_{max} , passata da 364°C a 382°C. Questa variazione può essere attribuita all'effetto del rivestimento sul film, il quale limita la diffusione dei gas e del calore all'interno del sistema. Si è inoltre osservato una percentuale di massa residua elevata, pari a circa l'11%, che va a dimostrare l'elevata quantità di particelle magnetiche che hanno preso parte alla formazione del rivestimento.

6.5 Prove di elettrostaticità

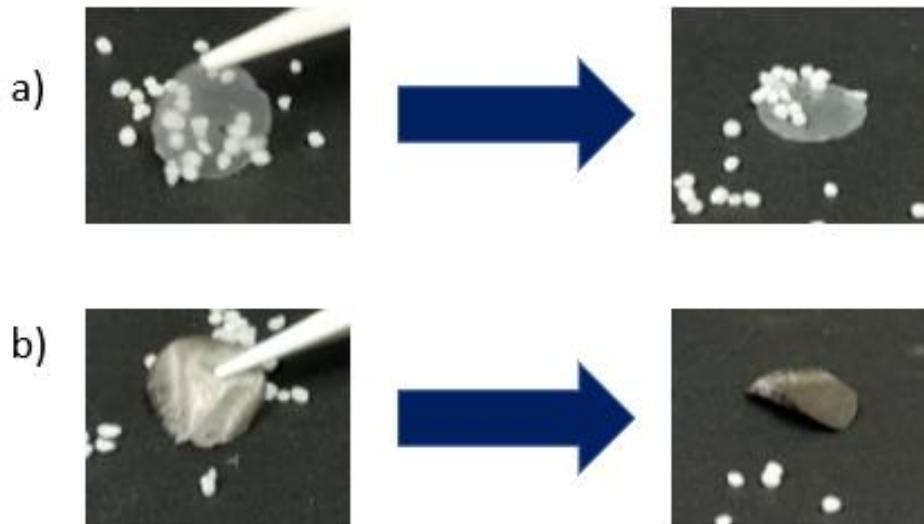


figura 29: immagini prove di elettrostaticità a) PLA b) PLA amminolizzato con 20 bilayer di DNA, CH e particelle magnetiche

Dalle prove preliminari di elettrostaticità è emerso che, a seguito dello strofinamento con della lana, i campioni di PLA amminolizzato senza *coating* attirano piccoli pezzi di plastica tramite elettrostaticità, dimostrando così l'accumulo di elettroni sulla superficie del film. Strofinando allo stesso modo campioni trattati con 20 *bilayer* invece, non si verificano fenomeni elettrostatici, come si può osservare in *figura 29*. Depositando infatti sui film particelle magnetiche, aventi anche caratteristiche di conduttori, si impedisce l'accumulo di cariche sulla superficie dei campioni [78]. Li e collaboratori [63] hanno ottenuto risultati analoghi a quelli ottenuti in questo studio effettuando le stesse prove fenomenologiche sui film di PLA su cui erano stati depositi 10 *bilayer* di GO e CH o BPEI, evidenziando come, per osservare la scomparsa di fenomeni elettrostatici, tramite l'utilizzo di *coating* contenenti materiali conduttori, sia necessario ottenere un'elevata dispersione del *filler*. Risulta quindi necessario effettuare un numero sufficiente di deposizioni al fine di ottenere strati sufficientemente omogenei.

6.6 Prove di attivazione magnetica



figura 30: immagini prove di attivazione magnetica

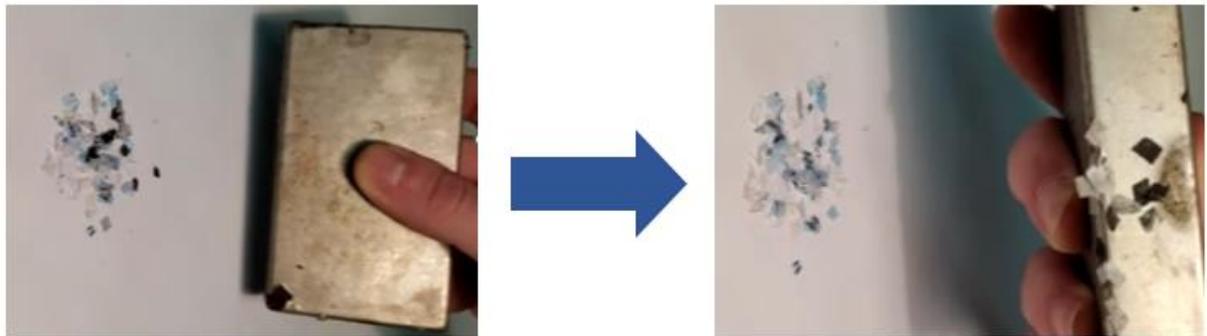


figura 31: immagini prove di separazione

Ponendo i campioni in prossimità di un magnete di NdFeB, si è osservato che il campione contenente 5 *bilayer* reagisce al campo magnetico solo se messo direttamente a contatto con il magnete. Aumentando il numero di *bilayer*, aumenta la distanza da cui il film viene attratto, raggiungendo un valore massimo di circa 4 cm per il film contenente 20 *bilayer* (*figura 30*).

Inoltre, le proprietà magnetiche derivanti dal trattamento applicato sono risultate sufficienti a separare, sempre utilizzando un magnete di NdFeB, i campioni trattati da un gruppo eterogeneo di materie plastiche (*figura 31*).

Queste analisi hanno dimostrato la presenza di una risposta magnetica dei campioni, ma sarà necessario condurre analisi *ad-hoc* per quantificare il comportamento magnetico dei film.

7 Conclusioni

In questo lavoro di tesi si sono studiati due differenti approcci per migliorare le proprietà e conferire nuove caratteristiche a film a base di acido polilattico. Entrambi i progetti sono stati basati sull'utilizzo della tecnica di deposizione *Layer by Layer* e sull'utilizzo di reagenti a basso impatto ambientale, ovvero chitosano e DNA, nel tentativo di sviluppare una metodica sostenibile.

Durante lo sviluppo del progetto 1 le analisi di caratterizzazione hanno evidenziato come sia CH che DNA prendano parte alla formazione del rivestimento e come la tecnica LbL permetta di ricoprire efficacemente, con *coating* omogenei, anche superfici eterogenee come quelle studiate, caratterizzate da domini di PCL-COOH all'interno di una matrice di PLA. Le analisi FT-IR hanno permesso di osservare la crescita lineare del *coating* formato, il quale ha consentito una diminuzione della permeabilità di circa il 66% con 10 *bilayer* depositati, un ottimo risultato considerando il numero ridotto di deposizioni effettuate. È necessario, tuttavia, aumentare il numero di deposizioni al fine di ottenere un rivestimento più spesso e, di conseguenza, prestazioni migliori, come confermato dal confronto con altri lavori trovati in letteratura. Inoltre, si è osservato che, tale rivestimento, grazie alla semplice interazione ionica instaurata tra CH e DNA e tra i *bilayer* e il film, non influisce sui processi di depolimerizzazione del film, distaccandosi dalla superficie se posto in soluzione acquosa, esponendo così la superficie all'attacco degli enzimi, garantendo così la possibilità di funzionalizzare senza precludere la degradabilità del film. Dalle analisi di resistenza alla fiamma non si è riscontrato nessuna diminuzione nella velocità di combustione, ma i campioni che presentavano 20 *bilayer* hanno mostrato la scomparsa di gocciolamento. Questo risultato è molto importante, in quanto il gocciolamento di materiale polimerico fuso e incandescente è uno degli effetti più pericolosi derivanti dalla combustione di materie plastiche dato che favorisce il propagarsi delle fiamme.

In conclusione, si può affermare che, durante lo sviluppo del progetto 1, sono stati raggiunti gli obiettivi finali, in quanto sono state migliorate sia le proprietà di resistenza alla fiamma che di permeabilità ai gas, il tutto senza andare a modificare la degradabilità del polimero.

Durante lo studio del progetto 2 è stata ottimizzata la reazione di amminolisi osservando, dopo 2h di reazione, una buona funzionalizzazione della superficie, adatta a favorire l'adesione del *coating*, ma senza provocare un eccessivo decremento delle proprietà meccaniche e termiche del film. La tecnica LbL è risultata efficace nel depositare sui film soluzioni eterogenee di CH e DNA contenenti particelle magnetiche di cobalto ferrite semplicemente aggiungendole in dispersione senza dover apportare modifiche alla metodica di deposizione. La deposizione di particelle magnetiche, inoltre, forma un *coating* omogeneo caratterizzato dalla presenza di aggregati, i quali aumentano di dimensioni all'aumentare delle deposizioni, contribuendo a ridurre la diffusione del calore all'interno del sistema e ad aumentare la bagnabilità superficiale del film. L'effetto delle particelle magnetiche sui film trattati è stato valutato solamente attraverso analisi fenomenologiche, ma ha permesso di constatare che i campioni rispondono alla presenza di un campo magnetico se ricoperti da un numero sufficiente di *bilayer* e che questo tipo di *coating* non permette l'accumulo di elettroni sulla superficie dei campioni.

In conclusione, si può affermare che, riguardo allo studio del progetto 2, le analisi condotte hanno dimostrato l'efficienza della deposizione di particelle magnetiche attraverso la tecnica LbL. I risultati ottenuti rappresentano quindi un primo passo per uno studio più approfondito sulla riciclabilità di tali sistemi, sulle proprietà di conduzione, per la produzione di film antistatici o conduttori, e sulle proprietà magnetiche al fine di rendere il materiale plastico separabile in sede di riciclo.

8 Bibliografia

- [1] G. Damonte, B. Barsanti, A. Pellis, G. M. Guebitz, O. Monticelli, *European Polymer Journal* 2022, 176, 111402
- [2] M. Jamshidian, E. A. Tehrany, M. Imran, M. Jacquot, S. Desobry, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2010, 9, 552-571
- [3] R. Datta, M. Henry, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2006, 81, 1119-1129
- [4] V. Siracusa, P. Rocculi, S. Romani, M. Dalla Rosa, *Trend in Food Science and Technology* 2008, 19, 634-643
- [5] Z. Zhao, J. Wang, H. Q. Mao, K. Leong, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003, 55, 483-499
- [6] J.R. Dorgan, H. Lehermeier, M. Mang, *Journal of Polymer and the Environment* 2000, 8, 1566-2534
- [7] J. R. Sarasua, R. E. Prud'homme, M. Wisniewski, A. Le Borgne, N. Spassky, *Macromolecules* 1988, 31, 3895-3905
- [8] A. Södegård, M. Stolt, *Progress in Polymer Science* 2002, 27, 1123-1163
- [9] T. Ohkita, S. H. Lee, *Wiley Interscience* 2006, 100, 3009-3017
- [10] Y. Oda, A. Yonetsu, T. Urakami, K. Tonomura, *Journal of Polymers and the Environment* 2000, 8, 29-32
- [11] S. Vainionpää, P. Rokkanen, P. Törmälä, *Progress in Polymer Science Journal* 1989, 14, 679-716
- [12] R. Mehta, V. Kumar, H. Bhumia, S. N. Upadhyay, *Journal of Macromolecular Science* 2005, 45, 325-349
- [13] M.H. Hartmann, *Biopolymers from Renewable Resource*, Berlin, Springer 1998
- [14] M. Ajioka, K. Enomoto, K. Suzuki, A. Yamaguchi, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1995, 68, 2125-2131

- [15] F. E. Kohn, J. W. A. Van Den Berg, G. Van De Ridder, J. Feijen, *Journal of Applied Polymer Science* 1984, 4265-4277
- [16] H. R. Kricheldorf, M. Sumbél, *European Polymer Journal* 1989, 25, 585-591
- [17] H. R. Kricheldorf, I. Kreiser-Saunders, *Macromolecular Chemistry* 1990, 191, 1057-1066
- [18] H. R. Kricheldorf, C. Boettcher, *Macromolecular Chemistry* 1993, 73, 47-64
- [19] H. R. Kricheldorf, C. Boettcher, *Macromolecular Chemistry* 1993, 194, 1665-1669
- [20] H. R. Kricheldorf, A. Serra, *Polymer Bulletin* 1985, 14, 497-502
- [21] Y. J. Du, P. J. Lemstra, A. J. Nijenhuis, H. A. M. Van Aert, C. Bastiaansen, *Macromolecules* 1995, 28, 2124-2132
- [22] L. Trofimoff, T. Aida, S. Inoue, *Chemistry Letters*, 16, 991-994
- [23] P. Dubois, R. Jérôme, P. Teyssié, *Macromolecular Chemistry* 1991, 42, 103-116
- [24] H. J. Lehermeier, J. R. Dorgan, J. D. Way, *Journal of Membrane Science* 2001, 190, 243-251
- [25] G. R. Guillen, Y. Pan, M. Li, E. M. V. Hoek, *Industrial and Engineering Chemistry Research* 2011, 50, 3798-3817
- [26] H. Y. Zhang, H. B. Jiang, J. H. Ryu, H. Kang, K. M. Kim, J. J. Kwan, *Materials* 2019, 12, 1718
- [27] F. E. Ahmed, B. S. Lalia, R. Hashidakeh, *Desalination* 2015, 356, 15-30
- [28] Y. Byun, S. Whiteside, R. Thomas, M. Dharman, J. Hughes, Y. T. Kim, *Journal of Polymer Science* 2012, 124, 3577-3582
- [29] B. Mallet, K. Lamnawar, A. Maazouz, *Polymer Engineering and Science* 2014, 54, 840-857
- [30] L. Yu, H. Liu, F. Xie, L. Chen, X. Li, *Polymer Engineering and Science* 2008, 48, 634-641
- [31] Y. Zhu, Z. Mao, C. Gao, *Royal Society of Chemistry* 2013, 3, 2509-2519

- [32] J. Yang, G. Shi, J. Bei, S. Wang, T. Cao, Q. Shang, G. Yong, W. Wang, *Journal of Biomedical Materials Research* 2002, 62, 315-347
- [33] A. Jordá -Vilaplana, V. Fombuena, D. Garcia-Garcia, L. Sánchez-Nácher, *European Polymer Journal* 2014, 58, 23-33
- [34] P. Rytlewski, W. Mróz, M. Zenkiewicz, S. Czawartos, B. Budner, *Journal of Materials Processing Technology* 2012, 212, 1700-1704
- [35] J. R. Rocca-Smith, T. Karbowski, E. Marcuzzo, A. Sensidoni, F. Piasente, D. Champion, O. Heinz, P. Vitry, E. Bourillot, E. Lesniewska, F. Debeaufort, *Polymer Degradation and Stability* 2016, 132, 109-116
- [36] F. X. Xiao, M. Pagliaro, Y. J. Xu, B. Liu, *Chemical Society Review* 2016, 45, 3088-3121
- [37] J. Hong, J. Y. Han, H. Yoon, P. Joo, T. Lee, E. Seo, K. Char, B. S. Kim, *Nanoscale* 2011, 3, 4515-4531
- [38] X. Zhang, Y. Xu, X. Zhang, H. Wu, J. Shen, R. Chen, Y. Xiong, J. Li, S. Guo, *Progress in Polymer Science* 2019, 89, 76-107
- [39] J. Choi, M. F. Rubner, *Macromolecules* 2005, 38, 116-124
- [40] S. E. Burke, C. J. Barrett, *Biomacromolecules* 2003, 4, 1773-1783
- [41] M. Salomäki, I. A. Vinokurov, J. Kankare, *Langmuir* 2005, 21, 11232-11240
- [42] E. Poptoshev, B. Schoeler, F. Caruso, *Langmuir* 2004, 20, 829-834
- [43] M. Koetse, A. Laschewski, A. M. Jonas, W. Wagenknecht, *Langmuir* 2002, 18, 1655-1660
- [44] P. Kujawa, P. Moraille, J. Sanchez, A. Badia, F. M. Winnik, *Journal of the American Chemical Society* 2005, 127, 9224-9234
- [45] K. Büscher, K. Graf, H. Ahrens, C. A. Helm, *Langmuir* 2002, 18, 3585-3591
- [46] S. A. Sukhishvili, *Macromolecules* 2002, 35, 301-310

- [47] C. J. Ochs, G. K. Such. Y. Yan, M. P. Van Koeverden, F. Caruso, *ACS Nano* 2010, 4, 1653-1663
- [48] Y. Shimazaki, M. Mitsuishi, S. Ito, M. Yamamoto, *Langmuir* 1997, 13, 1385-1387
- [49] Y. Zhang, W. Cao, *Langmuir* 2001, 17, 5021-5024
- [50] T. Cassier, K. Lowack, G. Decher, *Supramolecular Science* 1998, 5, 309-315
- [51] A. U. Czaja, N. Trukhan, U. Muller, *Chemical Society Review* 2009, 38, 1284-1293
- [52] J. Cho, K. Char, J. D. Hong, K. B. Lee, *Advanced Materials* 2001, 13, 1076-1078
- [53] J. B. Schlenoff, S. T. Dubas, T. Farhat, *Langmuir* 2000, 16, 9968-9969
- [54] K. Halasz, G. Grozdits, L. Csóka, *Anti-Abrasive Nanocoating* 2015, 249-281
- [55] A. Yu, G. Q. M. Lu, J. Drennan, I. R. Gentle, *Advanced Functional Materials* 2007, 17, 2600-2605
- [56] V. Kozlovskaya, S. Harbaugh, I. Drachuk, O. Shchepelina, N. Kelley-Loughnane, M. Stone, V. V. Tsukruk, *Soft Matter* 2011, 7, 2364-2372
- [57] S. T. Dubas, P. Kumlangdudsana, P. Potiyaraj, *Colloids and Surfaces A* 2006, 289, 105-109
- [58] V. Guduric, C. Metz, R. Siadous, R. Bareille, R. Levato, E. Engel, J. C. Fricain, R. Devillard, O. Luzanin, S. Catros, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2017, 28, 78
- [59] Y. H. Jiao, Y. Li, S. Wang, K. Zhang, Y. G. Sia, Y. Fu, *Langmuir* 2010, 26, 8270-8273
- [60] C. Aulin, E. Karabulut, A. Tran, L. Wågberg, T. Lindström, *Applied Materials and Interfaces* 2013, 5, 7352-7359
- [61] S. Ferraris, L. Introzzi, P. Biagioni, T. Holz, A. Schiraldi, L. Piergiovanni, *Langmuir* 2011, 27, 7563-7574
- [62] G.B. Demirel, T. Çaykara, *Applied Surface Science* 2009, 255, 6571-6576

- [63] K. Li, A. Fina, D. Marrè, F. Carosio, O. Monticelli, *Applied Surface Science* 2020, 522, 146471
- [64] A. Irie, J. Ohno, T. Hayakawa, H. Kido, T. Fukushima, *Journal of Hard Tissue Biology* 2013, 22, 105-114
- [65] F. Carosio, A. Di Blasio, J. Alongi, G. Malucelli, *Polymer* 2013, 54, 5148-5153
- [66] I. Corazzari, R. Nisticò, F. Turci, M. G. Faga, F. Franzoso, S. Tabasso, G. Magnacca, *Polymer Degradation and Stability* 2015, 112, 1-9
- [67] J. Alongi, A. Di Blasio, J. Milnes, G. Malucelli, S. Bourbigot, B. Kandola, G. Camino, *Polimer Degradation and Stability* 2015, 113, 110-118
- [68] S. Weinberger, K. Haernvall, D. Scaini, G. Ghazaryan, M. T. Zumstein, M. Sander, A. Pellis, G. M. Guebitz, *Green Chemistry* 2017, 19, 5381-5384
- [69] H. L. Nguyen, T. Bechtold, F. Fabbri, A. Pellis, G. M. Guebitz, T. Pham, *Materials and Design* 2022, 219, 110810
- [70] G. Laufer, C. Kirkland, A. A. Cain, J. C. Grunlan, *Applied Materials and Interfaces* 2012, 4, 1643-1649
- [71] A. J. Svagan, A. Åkesson, M. Cárdenas, S. Bulut, J. C. Knusden, J. Risbo, D. Plackett, *Biomacromolecules* 2012, 13, 397-405
- [72] F. Carosio, S. Colonna, A. Fina, G. Rydzek, J. Hemmerlé, L. Jierry, P. Schaaf, F. Buolmedais, *Chemistry of Materials* 2014, 26, 5459-5466
- [73] J. Alongi, A. Di Blasio, F. Cuttica, F. Carosio, G. Malucelli, *European Polymer Journal* 2014, 51, 112-119
- [74] G. Malucelli, *Molecules* 2020, 25, 4046
- [75] G. Damonte, R. Spotorno, D. Di Fonzo, O. Monticelli, *Applied Polymers Materials* 2022, 4, 6521-6530
- [76] M. A. Abdelwahab, A. Flynn, B. S. Chiou, S. Imam, W. Orts, E. Chiellini, *Polymer Degradation and Stability* 2012, 97, 1822-1828

[77] T. Sharkawi, V. Darcos, M. Vert, *Journal of Biomedical Materials Research* 2011, 98, 80-87

[78] P. Fabbri, M. Messori, *Modification of Polymer Properties* 2017, 109-130