



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTA' DI FARMACIA**

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DEL FARMACO

Giuseppe Puzzo

**FERMENTAZIONE BATTERICA E SINTESI CHIMICA
ASSISTITA DALLE MICROONDE PER LA PRODUZIONE
DI POLIMERI BIODEGRADABILI E BIOCOMPATIBILI
UTILIZZABILI IN CAMPO FARMACEUTICO**

Tutor:

Prof. A. Ballistreri

Ciclo XXIV (2008-2011)

Indice

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Caratteristiche chimico-fisiche dei PHA.	6
1.2 Biosintesi dei PHA.	8
1.3 Fattori che favoriscono l'accumolo di PHA	11
1.4 I PHA quali plastiche biologicamente degradabili	13
1.5 Applicazioni dei PHA in campo farmaceutico	16
1.6. Sintesi mediate riscaldamento convenzionale e con microonde	19
2. SCOPO DELLA TESI	26
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	33
3.1 Biosintesi e caratterizzazione strutturale di poli(idrossialcanoati) ottenuti per fermentazione da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
3.2 Transesterificazione acido catalizzata come metodo per ottenere copolimeri P(HB-co-CL) e terpolimeri P(HB-co-HV-co-CL).	68
3.3 P(HB-co-CL) e P(HB-co-HV-co-CL) come nuovi materiali per la produzione di <i>drug delivery system</i> .	86
4. CONCLUSIONI	93
5. PARTE SPERIMENTALE	97

5.1 Terreni e condizioni di crescita	97
5.2 Metodica di estrazione dei PHA	98
5.3 Analisi Gas-cromatografica	98
5.4 Determinazione dei pesi molecolari	99
5.5 Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC)	100
5.6 Spettroscopia NMR	100
5.7 Pirolisi parziale	101
5.8 Analisi ESI-MS dei prodotti di pirolisi parziale	101
5.9 Spettrometria di massa MALDI-TOF	102
5.10 Materiali	103
5.11 Sintesi di P(HB- <i>co</i> -CL) e P(HB- <i>co</i> -HV- <i>co</i> -CL)	103
5.12 Riscaldamento mediante microonde	104
6. BIBLIOGRAFIA	105
7. RINGRAZIAMENTI	111

1. INTRODUZIONE

La *green chemistry* rappresenta una valida e innovativa soluzione al problema dello smaltimento delle plastiche derivate da fonti non rinnovabili. Il polistirene, il polietilene, il cloruro di polivinile, le poliammidi, il polimetilmetacrilato e il polipropilene infatti costituiscono la stragrande maggioranza degli oggetti che ci circondano. Lo sviluppo di questi materiali nell'ultimo secolo è stato esponenziale e il loro impiego ha infatti interessato i settori più svariati quale l'agricoltura, la medicina, l'industria alimentare, automobilistica, bellica, navale e farmaceutica. Se da un lato questo ha portato ad un miglioramento delle nostre condizioni di vita, dall'altro ha portato all'accumulo di enormi quantità di rifiuti non biodegradabili con gravi conseguenze per l'ambiente e la vita del nostro pianeta. I settori che interessano la *green chemistry* sono diversi e particolarmente importante è quello che riguarda lo studio dei polimeri biodegradabili, come alternativa alle plastiche convenzionali, con lo scopo di combattere l'inquinamento ambientale. Oggi infatti l'interesse delle principali industrie chimiche verso lo sviluppo di nuovi materiali, capaci di sostituire in diversi settori applicativi le plastiche convenzionali, è fortemente aumentato. I dati diffusi dall'European Bioplastic (organismo che racchiude i principali produttori di plastiche biodegradabili in Europa) indicano che il settore è in forte crescita: dalle 700.000 tonnellate del 2010, si arriverà quest'anno a oltre un milione di tonnellate annue di bioplastiche per toccare 1,7 milioni di tonnellate nel 2015.

La principale differenziazione tra polimeri biodegradabili e non è data soprattutto dal tempo e quindi dalla possibilità di microorganismi di poter compiere l'azione demolitiva riducendo le macromolecole organiche che lo compongono in molecole più semplici

fino a riportarle ad uno stadio inorganico (acqua e anidride carbonica). Il processo biodegradativo, può essere descritto come il susseguirsi di due stadi, il primo dei quali avviene esternamente alla cellula microbica a causa dell'elevato peso molecolare e della caratteristica idrofoba della maggior parte dei polimeri. In questa fase un'enzima extracellulare è responsabile della frammentazione del materiale polimerico producendo oligomeri solubili in acqua a più basso peso molecolare in grado di diffondersi all'interno della cellula per essere meglio digeriti. Una volta all'interno della cellula, si ha il secondo stadio del processo biodegradativo, definito come "mineralizzazione" in cui i frammenti molecolari vengono metabolizzati producendo energia, acqua, sali minerali, biomassa e gas (CO₂, CH₄, N₂). L'accessibilità nel substrato polimerico di un sistema di enzimi allo stato acquoso è dunque vitale per il processo degradativo. La natura idrorepellente, impermeabile e non porosa delle comuni plastiche rappresenta il maggiore ostacolo alla biodegradazione. In questi materiali la degradazione deve iniziare in superficie e quindi lo stato di erosione del materiale plastico è un fattore importante. Inoltre ad influenzare il processo biodegradativo vi sono anche altri fattori, intrinseci al materiale polimerico come la cristallinità, il peso molecolare e nel caso di copolimeri la composizione.

I polimeri biodegradabili contengono nella loro struttura gruppi esterei, ammidici e carbonati, la cui facile idrolisi porta ad una riduzione del peso molecolare, mediante una scissione random della catena polimerica.⁽¹⁾

I polimeri biodegradabili possono essere suddivisi a seconda della loro origine in:

- *Polimeri di origine naturale.* Appartengono a questa categoria i polisaccaridi strutturali (cellulosa e chitina) e di riserva (amido e glicogeno), le proteine strutturali (collagene, albumina, cheratina elastina) e funzionali (enzimi, ormoni, proteine di trasporto) e gli acidi nucleici, materiali caratterizzati da biocompatibilità

e da assenza di tossicità. All'interno di questa classe vi sono anche *polimeri ottenuti da microrganismi*. A questa classe appartengono i poli(3-idrossialcanoati) (PHA) commercializzati dalla Monsanto come Biopol[®], dalla Biomer come Biomer[®] o dall'azienda emiliana Bio-on attraverso il brand MINERV-PHA[®] che impiega gli scarti della lavorazione di barbabietole e canna da zucchero come substrati per la produzione dei PHA.

- *Polimeri di origine sintetica*. Esempi sono l'acido polilattico (PLA, come il Natureworks[®] della Natureworks LLC) ottenuto dalla polimerizzazione del monomero acido lattico (o dal dilattide) a sua volta derivato dal mais. Ecoflex[®] di BASF, copolimero costituito da 1,4-butandiolo, acido adipico e acido tereftalico monomeri derivati dal petrolio.

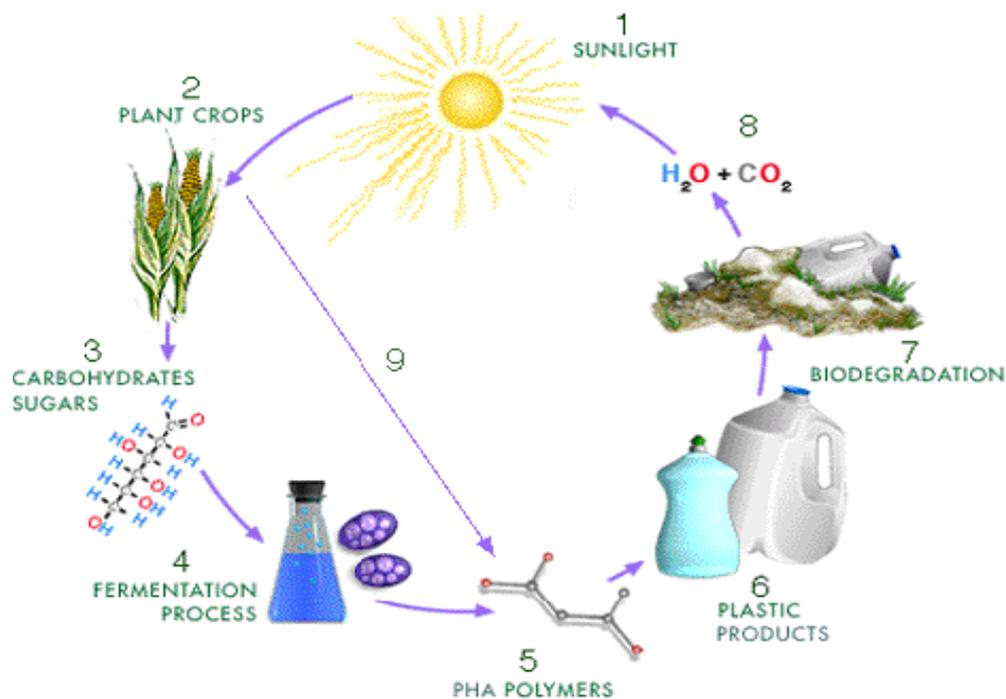


Figura 1: Ciclo di produzione e degradazione di polimeri biodegradabili.

I PHA vengono prodotti dai batteri come riserva enegertica e fonte di carbonio intracellulare,⁽²⁻⁶⁾ in condizioni di limitazione di nutrienti ed in eccesso di sorgente di carbonio. L'accumulo dei PHA avviene sottoforma di granuli fino a raggiungere il 90% del loro peso cellulare secco. In tutti i PHA la configurazione del carbonio β è R e su questo atomo è posizionata la catena laterale la cui lunghezza può andare dal metile all'undecile (Figura 2). La catena non è necessariamente satura, sono stati infatti riportati monomeri con gruppi aromatici, insaturi, alogenati, epossidati e ramificati.⁽⁷⁻¹³⁾ In base alla lunghezza della catena laterale è possibile suddividere i PHA in short-chain-length (scl) PHA e medium-chain-length (mcl) PHA. I primi costituiti da monomeri con un numero di atomi di carbonio da tre a cinque mentre per i secondi l'unità monomerica presenta da sei a quattordici atomi di carbonio.

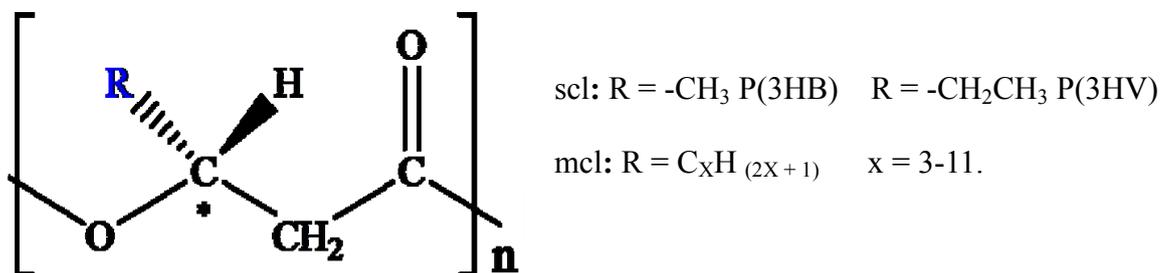


Figura 2: Formula di struttura dei PHA.

Diverse sono le specie batteriche in grado di produrre PHA, e a seconda dei monomeri di partenza che vengono utilizzati, cambia la natura del polimero sintetizzato. I batteri del genere *Ralstonia* producono PHA a catena corta (scl) utilizzando intermedi della via di demolizione degli acidi grassi, mentre dai batteri del genere *Pseudomonas* si originano PHA a catena media (mcl) a partire da intermedi della β -ossidazione.

Il poli(3-idrossibutirrato) (PHB) è il più noto e studiato sia dal punto di vista

biosintetico sia da quello delle proprietà e degli impieghi. Venne individuato per la prima volta nel 1926 da Lemoigne, un microbiologo dell'Istituto Pasteur di Parigi, come costituente del microorganismo *Bacillus Megaterium* in forma di inclusioni sudanofiliche lipido-simili,⁽¹⁴⁾ solubili in cloroformio.⁽¹⁵⁾ Da allora sono stati individuati molti microorganismi procariotici, che all'interno presentavano questi granuli (Figura 3). Da qui l'idea che il PHB avesse funzione di riserva intracellulare di carbonio ed energia. Fino agli anni settanta si pensava che il PHB fosse l'unico PHA utilizzato dai batteri come fonte energetica. All'inizio degli anni ottanta, Witholt e collaboratori, dopo aver coltivato su *n*-ottano *Pseudomonas oleovorans*, ottennero un polimero costituito principalmente da 3-idrossiottanoato (3HO) e piccole quantità di 3-idrossiesanoato (3HHx).

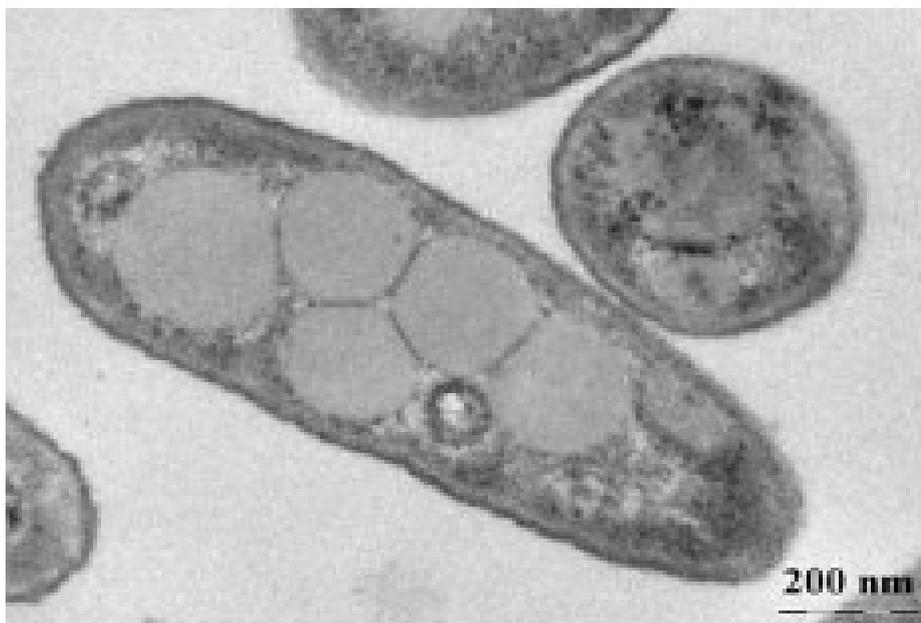


Figura 3: Immagine ottenuta mediante microscopia a transizione elettronica (TEM), di *P. aeruginosa*, in cui sono visibili le inclusioni di PHA.

1.1 Caratteristiche chimico-fisiche

Il PHB è il più comune dei PHA prodotto dai microorganismi. Puro è perfettamente isotattico e presenta sempre configurazione R risultando quindi otticamente attivo. Il PHB estratto dai batteri presenta cristallinità, che va dal 55 all' 88 %. La cristallinità del polimero così come sintetizzato dal batterio è inferiore rispetto a quella misurata dopo l'estrazione, ciò è dovuto al fatto che nelle inclusioni batteriche si trova allo stato amorfo. Il peso molecolare medio è compreso fra 50000 ed 1000000 Da, con indice di polidispersione prossimo a due. La temperatura di transizione vetrosa (T_g) è 4 °C mentre quella di fusione (T_m) è di 180 °C . Le densità del PHB cristallino ed amorfo sono di 1.26 e di 1.18 g/cm³ rispettivamente. Le proprietà meccaniche del PHB sono molto simili a quelle del polipropilene isotattico, ma a differenza di questo ha una temperatura di transizione vetrosa troppo elevata e una resistenza all'urto troppo bassa (vedi Tabella 1). Inoltre, la temperatura di fusione è molto vicina a quella di decomposizione termica, il che rende problematica la lavorazione con le tecniche convenzionali in uso per i polimeri termoplastici. L'inserimento di unità di 3-idrossivalerato (HV) nel PHB produce un copolimero poli (3-idrossibutirrato-*co*-3-idrossivalerato) P(HB-*co*-HV) con proprietà che complessivamente consentono ancora di affiancarlo al polipropilene ma con una minore fragilità e lavorabilità. La cristallinità viene poco influenzata dalla presenza di unità di HV, il copolimero P(HB-*co*-HV) presenta grado di cristallinità pressoché identico al PHB. Altri esempi di copolimeri ⁽¹⁷⁾ con unità differenti dal 3-idrossibutirrato sono: il poli (3-idrossibutirrato-*co*-3-idrossiesanoato) P(3HB-*co*-3HHx), il poli (3-idrossibutirrato-*co*-3-idrossiottanoato) P(3HB-*co*-3HO) e il poli (3-idrossibutirrato-*co*-3-idrossidecanoato) P(3HB-*co*-3HD). Questi copolimeri presentano elevata resistenza e ottima lavorabilità, caratteristiche simili a quelle del polietilene.

Tabella 1: Proprietà dei poli(3-/4- idrossialcanoati) e polipropilene isotattico (PP).

Polimero	T_g(°C)	T_m(°C)	Cristallinità (%)	Estensione alla rottura (%)
P(3HB)	15	175	50-80	5
P(3HV)	-15	115	56	--
P(3HB-co-3HV)	-1	145	--	50
P(3HB-co-HHx)	-1	127	--	--
P(4HB)	-40	53	--	1,000
P(3HB-co-4HB)	--	--	43	444
PP	-15	176	50	400

Dati tratti dalla nota ⁽¹⁶⁾

L'inserimento di queste unità monomeriche determina un marcato decremento della temperatura di fusione, della cristallinità e anche della temperatura di transizione vetrosa, più di quanto determina la presenza dell'unità di HV. La temperatura di fusione passa da 180 °C valore prossimo a quello di decomposizione, a 150 °C circa.

La riduzione della temperatura di transizione vetrosa (T_g) è dovuta ad una maggiore mobilità delle catene polimeriche in presenza di lunghe catene laterali. Tale effetto è tanto più marcato quanto più lunga è la catena laterale nell'unità monomerica.⁽¹⁷⁾

1.2 Biosintesi dei PHA

Per la sintesi dei PHA i diversi tipi di batteri utilizzano monomeri provenienti da percorsi metabolici diversi. I batteri del gruppo *Ralstonia* producono PHA a catena laterale corta (scl), mentre quelli del tipo *Pseudomonas* producono PHA a catena laterale media (mcl). I primi utilizzano come monomeri l'acetil-CoA, l'esenoil-CoA, il crotonil-CoA (dal processo di degradazione degli acidi grassi) e il metilmalonil-CoA. I secondi invece producono PHA a partire, da monomeri derivanti dalla β ossidazione di acidi grassi.

Il percorso indicato è sostanzialmente uguale in tutti i microrganismi studiati; le differenze possono riguardare l'origine delle molecole che entrano a far parte della via metabolica.

Nella maggior parte degli organismi finora studiati, il PHB è sintetizzato a partire dall'acetil-coenzima A (acetil-CoA), attraverso una serie di tre reazioni catalizzate da: una 3-chetotiolasi, una riduttasi e una sintasi (nota anche come polimerasi). Questi tre enzimi che presiedono alla sintesi del PHB sono l'espressione di altrettanti diversi geni, associati nel genoma batterico a costituire un "operone".

La prima di queste reazioni, consiste nella condensazione di due molecole di acetil-coenzima A (acetil-CoA) in acetoacetil-CoA, ad opera di una 3-chetoacil-CoA tiolasi (codificata dal *phbA*). La seconda reazione consiste nella riduzione dell'acetoacetil-CoA in (*R*)-3-idrossibutiril-CoA mediante l'impiego di una acetoacetil-CoA riduttasi, NADPH dipendente (codificata dal *phbB*). Alla fine, i monomeri di (*R*)-3-idrossibutiril-CoA vengono polimerizzati in poli(3-idrossibutirrato) da una PHB polimerasi (codificata da *phbC*) (Figura 4). La stereoselettività della PHB sintasi fa sì

che soltanto gli isomeri (*R*) vengano riconosciuti come substrato per la polimerizzazione.

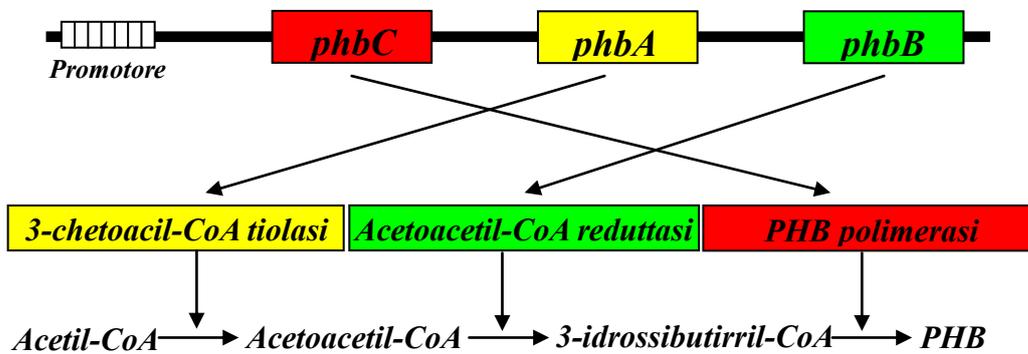


Figura 4: Schema di sintesi del poli(3-idrossibutirrato) nei microorganismi.

Durante la normale crescita batterica la 3-chetotiolasi è inibita dall'acetil-CoA libero proveniente dal ciclo di Krebs, ma quando l'ingresso di acetil-CoA nel ciclo è limitato (in carenza di nutrienti diversi dal carbonio), l'eccesso viene destinato alla sintesi di PHB.⁽¹⁸⁾ E' noto infatti che affinché il batterio sintetizzi e accumuli il polimero sono necessarie condizioni di crescita "stressate" cioè privazione di nutrienti essenziali, in modo che il batterio debba utilizzare vie alternative per l'accumulo di carbonio ed energia.

La PHA sintasi è l'enzima chiave della via biosintetica e determina i vari tipi di PHA che vengono prodotti nelle specie batteriche. Si conoscono almeno 40 geni strutturali, nel genoma di batteri sia Gram-positivi che Gram-negativi, che codificano per questo enzima. Il sito attivo dell'enzima è probabilmente rappresentato dai residui di cisteina che determinano la reazione di polimerizzazione. Questo enzima è altamente specifico nei confronti del substrato, infatti in relazione a questo sono note tre tipologie di PHA sintasi in grado di produrre i diversi PHA.

La 3-chetoacil-CoA tiolasi catalizza il primo stadio della formazione del PHB, cioè la condensazione reversibile dell'acetil-CoA ad acetoacetil-CoA. L'enzima, che è presente in natura sia negli eucarioti che nei più piccoli procarioti, può essere classificato in due gruppi in base alla differente specificità per il substrato. Nel primo vengono raggruppate tiolasi con ampia specificità per i 3-chetoacil-CoA compresi tra C₄ e C₁₆; questa classe di enzimi è coinvolta principalmente nella degradazione di acidi grassi ed è localizzata nel citoplasma dei procarioti e nei mitocondri e perossisomi di mammiferi e piante. La seconda classe di tiolasi possiede uno spettro di attività più ristretta rispetto alla prima, agendo solo su catene carboniose corte, tra C₃ e C₅. L'utilizzo di miscele di idrocarburi o acidi grassi come sorgente di carbonio produce PHA la cui composizione riflette quella della sorgente. A questa conclusione si giunse quando Witholt e collaboratori, negli anni ottanta, scoprirono che *P.oleovorans* cresciuta su un terreno con il 50% di *n*-ottano, produceva un materiale con caratteristiche differenti rispetto ai campioni di PHB da loro utilizzati per studi di miscoscopia elettronica. Utilizzando standard sintetizzati chimicamente, si scoprì che le inclusioni formate dall'*n*-ottano erano costituite da un copoliestere composto dall'89% di (*R*)-3-idrossiottanoato e dall'11% di (*R*)-3-idrossiesanoato. Witholt e collaboratori definirono questi PHA come "medium chain length". Ulteriori studi dimostrarono che la composizione dei PHA prodotti dalle *Pseudomonas* era direttamente correlata alla struttura dell'alcano, alchene o acido grasso utilizzato come sorgente.⁽¹⁹⁾ Infatti le unità monomeriche dei PHA ottenuti sono della stessa lunghezza della sorgente utilizzata o risultano accorciati di 2, 4, 6, 8, 10 atomi di carbonio. La composizione di questi PHA e la loro correlazione con la struttura del substrato di crescita del batterio suggerisce che la via biosintetica dei mcl-PHA è strettamente correlata con il ciclo della β -ossidazione e della scissione tiolitica degli acidi grassi.

1.3 Fattori che favoriscono l'accumulo di PHA

L'osservazione che la quantità di PHA accumulata nella cellula batterica aumenta al diminuire dell'apporto di nutrienti essenziali risale agli anni '60, quando si intuì che i batteri producono e accumulano il polimero quando esauriscono le scorte di nutrienti necessari per la divisione cellulare, ma hanno ancora una fonte di carbonio a disposizione.

Quando si progettano le condizioni di coltura per l'ottimizzazione delle rese è importante quindi, tenere in considerazione le diverse esigenze di crescita dei ceppi batterici impiegati.

Sulla base di questa considerazione è possibile distinguere i batteri in due gruppi:

- batteri che hanno bisogno di una fonte di carbonio in eccesso e di una carenza di nutrienti (P, N, S) in una determinata fase della crescita per avviare la polimerizzazione, ad esempio, *Ralstonia eutropha* e *Pseudomonas oleovorans*.
- batteri che non richiedono carenza di nutrienti essenziali e polimerizzano PHA durante tutto il ciclo di crescita: *Alcaligenes latus* e *Escherichia coli* transgenica.

Lo stadio della crescita in cui si deve attuare la riduzione di un nutriente essenziale ha notevole influenza sulla resa del polimero, che comunque è nettamente superiore rispetto alla resa dei batteri appartenenti al secondo gruppo.

Dal punto di vista biosintetico, le condizioni che favoriscono l'accumulo sono:

- alte concentrazioni di NADPH, poiché l'acetoacetil-CoA reduttasi è un enzima NADPH-dipendente;

- alte concentrazioni di acetyl-CoA, poichè l'eccesso che non intraprende il ciclo degli acidi tricarbossilici è destinato alla sintesi di PHA;
- basse concentrazioni di coenzima A libero (CoASH), poichè è inibitore competitivo della 3-chetotiolasi.⁽²⁰⁾

1.4 I PHA quali plastiche biologicamente degradabili

Il processo degradativo è definito come quel processo che, prevalentemente tramite agenti fisici e chimici, comporta la riduzione di un substrato in pezzi più piccoli senza una significativa perdita di materia. Il substrato rimane sostanzialmente lo stesso ma frazionato in diversi pezzi.

Nel caso in cui l'azione chimica e/o fisica sia facilitata da un attacco batterico si può avere perdita di substrato e quindi una parziale biodegradazione.

Il termine "biodegradabile" indica quindi una caratteristica del substrato dettata dalla presenza nell'ambiente di microrganismi decompositori quali funghi, alghe, batteri in grado di ridurre le macromolecole organiche costituenti il substrato in molecole più semplici fino a riportarle ad uno stadio inorganico (acqua e anidride carbonica). Attraverso la biodegradazione il materiale organico, giunto al suolo, tende progressivamente a decomporsi, fino a sparire. Tale fenomeno è molto importante per l'ambiente che deve liberarsi dai rifiuti e dalle scorie per far posto alla nuova vita. L'anidride carbonica così prodotta è poi utilizzata dagli alberi, piante e alghe mediante fotosintesi per sintetizzare zuccheri e da questi tutte le altre numerose sostanze presenti in natura.

Questo meccanismo si incepperebbe velocemente se non esistesse la possibilità inversa cioè quella che permette di liberare anidride carbonica a partire dalla materia organica. Quindi il processo di biodegradazione ha, nell'equilibrio naturale, pari dignità col processo inverso di fotosintesi, di cui rappresenta l'esito e nello stesso tempo la partenza.

Il processo biodegradativo è influenzato da fattori ambientali (temperatura, ossigeno, acqua, pH) e dalla struttura chimica del polimero stesso (flessibilità conformazionale, disposizione delle catene polimeriche, peso molecolare).

La temperatura da un lato favorisce la crescita del microorganismo, dall'altro determina un incremento della velocità d'idrolisi. Tuttavia una temperatura molto elevata può portare ad un blocco o alla diminuzione dell'attività microbica. *Kai-Lai et al.* hanno condotto studi sull'incremento della velocità di idrolisi dell'acido polilattico (PLA) in funzione della temperatura a 25, 40 e 55 °C, osservando una riduzione del peso molecolare di 4691, 40634 e 91892 Da rispettivamente per una settimana. Da questo si evince che un moderato aumento della temperatura determina un aumento della degradazione del PLA.⁽²¹⁾

La presenza o meno di ossigeno, provoca una variazione dei prodotti di biodegradazione. Microorganismi aerobici utilizzano l'ossigeno e trasformano gli atomi di carbonio in fonte di nutrimento. Il risultato è la produzione di anidride carbonica ed acqua attraverso un meccanismo biologico di ossidazione enzimatica, mentre in condizioni anaerobiche, il microorganismo consuma gli atomi di carbonio del polimero rilasciando metano e anidride carbonica.

L'acqua, fondamentale per la crescita e la riproduzione del microorganismo, penetra fra le catene polimeriche, determinando idrolisi la cui velocità dipende spesso dalle condizioni di pH, essendo acido o base catalizzata.

Tra i fattori polimerici che influenzano la biodegradazione abbiamo: la flessibilità conformazionale che è collegata all'energia necessaria per la rotazione delle molecole attorno al legame. Maggiore è la flessibilità, più saranno i siti accessibili all'acqua per l'idrolisi e più facilmente il polimero raggiungerà il sito catalitico dell'enzima. Questa proprietà dipende dalle catene laterali e dal tipo di legami all'interno del polimero. Le catene laterali incrementano l'energia necessaria per la rotazione del polimero, riducendo la diffusione dell'acqua. I doppi legami nello scheletro aumentano la flessibilità facilitando la rotazione attorno al singolo legame adiacente. Inoltre risulta molto importante la disposizione ordinata delle catene polimeriche, infatti le regioni amorfe sono più accessibili all'acqua rispetto a quelle cristalline.

Grande importanza, riveste il peso molecolare: polimeri aventi massa (M_w) maggiore di 20000 Da sono inaccessibili all'attacco da parte del microorganismo. Ciò è dovuto alle dimensioni delle catene polimeriche che non riescono ad entrare all'interno del microorganismo.⁽²²⁾

L'idrolisi enzimatica è catalizzata da una depolimerasi extracellulare che rompe i legami esterei del polimero. Fra i microorganismi in grado di attuare idrolisi enzimatica i più importanti sono: *Alcaligenes fecalis*, *Pseudomonas lemoignei*, *Pseudomonas delafieldii*, *Penicillium simplicissimum*.

1.5 Applicazioni dei PHA in campo farmaceutico

I PHA trovano applicazioni nei settori più svariati: come prodotti usa e getta per l'igiene (ad esempio tamponi), nell'imballaggio mediante inserimento di uno strato di PHA ad una struttura o ad un film per alimenti freschi costituita da altri biopolimeri (lo strato di

PHA fornisce una barriera all'umidità e al calore ma al tempo stesso ha il vantaggio di essere stampabile), nell'agricoltura per la produzione di film per pacciamatura come miscela PHA/amido, sostituendo la miscela PE/amido. In commercio sono noti anche copolimeri costituiti da altre unità idrossialcanoiche legate all'unità di 3-idrossibutirrato biosintetizzati con lo scopo di migliorarne le caratteristiche. Fra questi il poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato) (PHBHV) noto come Biopol[®] identificato come un possibile sostituto biodegradabile di polioleofine, impiegate nella produzione di bottiglie soffiate, film per imballaggi, contenitori in plastica, posateria usa e getta, reti e corde per la pesca industriale.

In ambito medico-farmaceutico grazie alle caratteristiche di biocompatibilità e biodegradabilità i PHA possono essere impiegati nei *drug delivery systems*. Studi rivolti all'impiego di PHA nella produzione di micro- e nanosfere da poter impiegare come *carrier* risalgono alla prima metà degli anni ottanta quando *Bissery et al.* riuscirono ad ottenere microsfeere di PHB caricate con lomustina testandone l'attività nel trattamento del carcinoma polmonare di Lewis nel topo.⁽²³⁾ Da allora sino ad oggi diverse molecole dotate di attività farmacologica sono state veicolate impiegando PHA come *carrier*. Di recente *Zawidlak-Wegrzynska et al.* hanno sintetizzato e valutato *in vitro* la citotossicità di unità di oligo(3-idrossibutirrato) coniugate con ibuprofene nel trattamento del cancro colon-rettale. Il risultato di tali studi è stato quello che i coniugati hanno maggiore attività antiproliferativa rispetto al farmaco non legato.⁽²⁴⁾ *Boccaccini et al.* invece hanno valutato *in vitro* la capacità di incapsulazione e la cinetica di rilascio di microsfeere di PHB caricate con gentamicina. Dai dati ottenuti si nota un'elevata percentuale d'incapsulazione del farmaco con una cinetica di rilascio bimodale, caratterizzata da un rapido rilascio iniziale seguito da un rilascio continuo e sostenuto.⁽²⁵⁾ I PHA trovano applicazione anche nella produzione di maglie chirurgiche,

filari per sutura nell'ambito dei sistemi cicatriziali. Possono essere utilizzati in ambito cardiovascolare nella produzione di valvole cardiache o innesti vascolari. Importante impiego è anche nel campo dell'ingegneria dei tessuti dove possono essere impiegati come *scaffold* per la rigenerazione tissutale.

In questo ambito *Bian et al.* hanno impiegato il copolimero poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossiesanoato) (PHBHHx) come *scaffold* nella ricostruzione di fibre nervose periferiche danneggiate, scelto grazie alla non-tossicità, alle proprietà meccaniche e ottime capacità rigenerative ⁽²⁶⁾ *Novikov et al.* hanno invece dimostrato che l'impiego di scaffold a base di PHB posti a stretto contatto con le cellule di Schwann favoriscono la rigenerazione del midollo spinale danneggiato. ⁽²⁷⁾

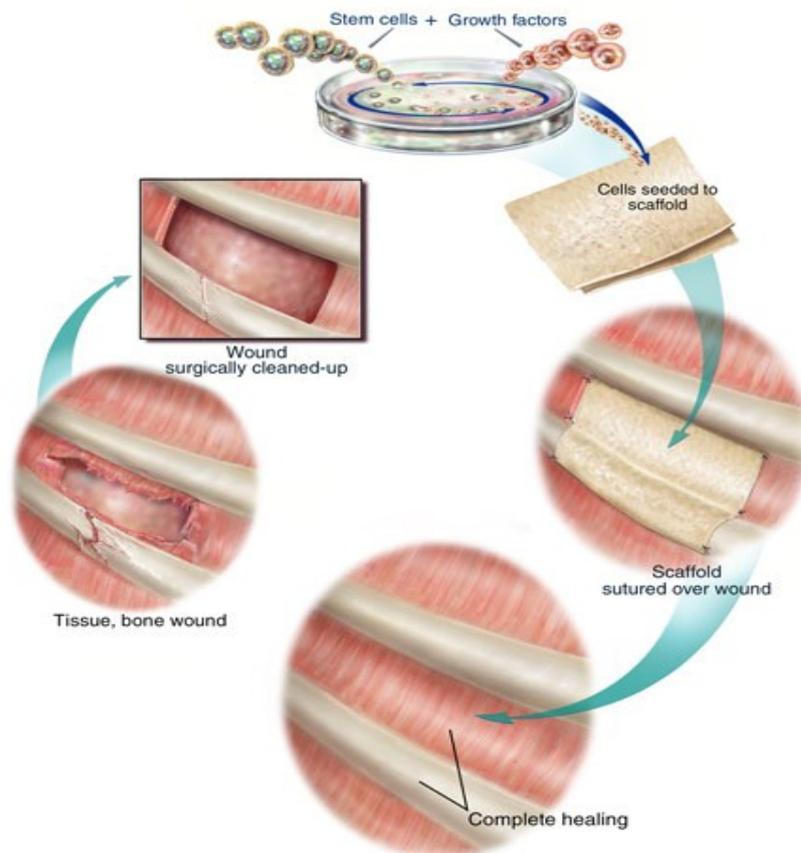


Figura 5: Rappresentazione schematica dell'impiego dei PHA come scaffold nel *tissue engineering*.

La ricerca scientifica è anche rivolta verso i derivati dei PHA e sulle loro possibili applicazioni. X.-Q. Xiao *et al.* di recente hanno condotto uno studio sull'effetto protettivo che l'acido 3-idrossibutirrico (3-HB) e il suo estere metilico (M-3-HB) esercitano sulle cellule della glia. Studi *in vitro* hanno infatti dimostrato un forte aumento della concentrazione di Ca^{2+} citosolico in presenza del 3-HB e in misura maggiore del M-3-HB. Ciò è dovuto alla capacità di questi di immobilizzare il Ca^{2+} a livello extracellulare determinando una forte riduzione della percentuale di apoptosi cellulare.⁽²⁸⁾

Inoltre i PHA, prodotti dai batteri come granuli, sulla loro superficie presentano diverse proteine: o strutturali o regolatrici del batterio ma anche specifiche per la produzione di tali granuli (Figura 6). Questo può permettere di immobilizzare sulla superficie molecole ed altre proteine che possono essere impiegate in diverse applicazioni biomediche, terapeutiche e diagnostiche.⁽²⁹⁾

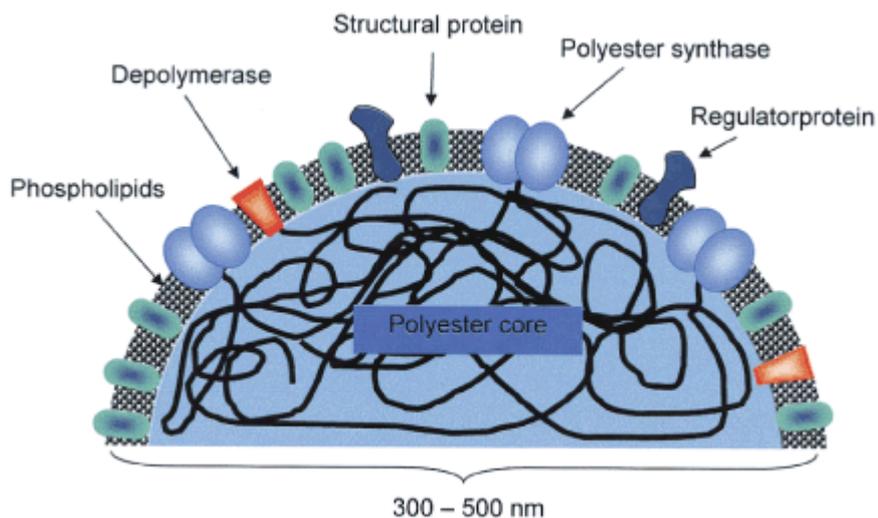


Figura 6: Schema dell'inclusione sferica di PHA all'interno dei batteri.

1.6 Sintesi mediante riscaldamento convenzionale e con microonde

La sostenibilità, per l'industria chimica, implica l'impegno allo studio e alla realizzazione di processi e prodotti che riducono al minimo le conseguenze negative di carattere ambientale, sociale o economico.

La *Green Chemistry* è un nuovo approccio tecnologico nato negli USA nei primi anni '90 che oggi costituisce, anche in Europa, uno strumento fondamentale per conseguire uno sviluppo sostenibile. Applica principi innovativi nella progettazione di processi chimici industriali puntando all'eliminazione o alla riduzione dell'utilizzo e della generazione di sostanze nocive per l'ambiente o per la salute.

I dodici principi fondamentali della Green Chemistry, sviluppati da *Anastas e Warner* (1998) per valutare quanto siano ecocompatibili una sostanza chimica, una reazione o un processo, annoverano in sesta posizione quello dell'**efficienza energetica**, così espresso: *“I fabbisogni di energia dovrebbero essere valutati per il loro impatto ambientale ed economico e minimizzati. Le reazioni di sintesi dovrebbero essere condotte a temperatura e pressione ambiente”*.⁽³⁰⁾

A tal proposito è possibile collocare la tecnologia microonde tra i processi ecologicamente compatibili per lo sviluppo di una “chimica verde”. E' ormai evidente che il corretto utilizzo delle microonde, rispetto alle tecniche convenzionali, presenta indubbi vantaggi derivanti soprattutto dalla rapidità di riscaldamento e trasformazione dei materiali: risparmio energetico, efficienza dei processi, limitazione dell'uso di solventi e reagenti.

Con questa tecnologia è possibile condurre reazioni chimiche in tempi più ristretti ed in condizioni più blande rispetto a quanto si può ottenere secondo le metodiche "classiche"

di riscaldamento della massa di reazione.⁽³¹⁾

La somministrazione di energia mediante l'impiego delle microonde permette di evitare che il calore fornito debba passare attraverso le pareti del recipiente in cui si conduce la reazione prima di raggiungere la massa di reazione.⁽³²⁾ Infatti la diffusione delle microonde non è condizionata dalla conducibilità termica del materiale, in quanto le microonde sono radiazioni elettromagnetiche che attraversano il recipiente e possono portare ad un istantaneo e localizzato riscaldamento.

Le microonde sono radiazioni elettromagnetiche non ionizzanti le cui lunghezze d'onda si collocano nello spettro elettromagnetico tra la banda dell'infrarosso e le onde radio, con frequenze comprese tra 0.3 e 300 GHz. Per evitare interferenze con le telecomunicazioni e le frequenze dei telefoni cellulari, la legislazione internazionale prevede che solo alcune bande possano essere utilizzate per il riscaldamento. La frequenza di 2.45 (± 0.05) GHz, corrispondente nel vuoto ad una lunghezza d'onda (λ) di 12.2 cm, è quella utilizzata per applicazioni in campo domestico, scientifico, medico e per molti processi industriali.

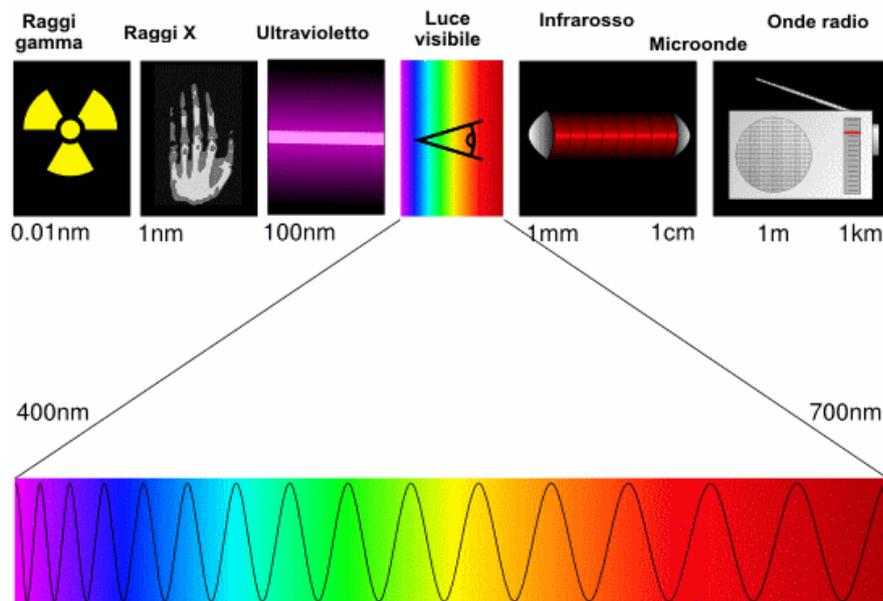


Figura 7: Bande di frequenza dello spettro elettromagnetico.

Come tutte le radiazioni, possiedono alcune caratteristiche proprie: propagazione lineare, riflessione, rifrazione e diffusione. Sono in grado di penetrare in diversi materiali non metallici come le materie plastiche (non polari), il teflon, la porcellana, il vetro (pirex e soprattutto quarzo). Inoltre si propagano sia nel vuoto che sotto pressione e sono in grado di interagire con molecole polari alle quali cedono una parte della loro energia. I materiali metallici (non magnetici) sono riflettori delle microonde: su questo principio si basa il fenomeno delle scariche che si formano nei forni, in presenza di parti metalliche.

Il riscaldamento dovuto alle microonde è il risultato dell'interazione onda/molecole, ma perché si abbia questo fenomeno è necessario che le molecole siano polari. L'effetto termico è una conseguenza dell'interazione dipolo-dipolo tra le molecole ed il campo elettromagnetico: fenomeno della polarizzazione dipolare.⁽³³⁾ In assenza di campo elettrico, le molecole polari sono orientate in modo casuale, senza nessuna direzione precisa. Se però vengono poste sotto l'effetto di un campo elettrico, ogni molecola è sottoposta ad una forza che tende ad orientarla nella direzione del campo stesso. In presenza di un campo elettrico alternato ad alta frequenza (2.45 GHz) si determina un fortissimo aumento delle collisioni fra le molecole con conseguente riscaldamento.

Nel caso dei solidi (semiconduttori o conduttori), il riscaldamento è generato dall'effetto del campo sugli elettroni liberi (elettroni di conduzione) del materiale. Per quanto riguarda liquidi apolari (per esempio esano, benzene, toluene, tetracloruro di carbonio) non sono in grado di interagire direttamente con le microonde e quindi non si riscaldano. L'interazione può avvenire solo indirettamente, grazie ad altri componenti (polari), eventualmente presenti nel sistema. I liquidi polari (per esempio acqua, dimetilformammide, etanolo) assorbono le microonde e si riscaldano rapidamente; in questo contesto possono essere osservati valori più alti dei loro punti d'ebollizione, in

paragone con quelli determinati con i metodi classici di riscaldamento. Quest'effetto è chiamato "surriscaldamento".⁽³⁴⁾ Numerosi sono i campi di applicazione delle microonde: il loro utilizzo va dalla sintesi organica all'ambito biochimico, dal trattamento dei campioni analitici ai processi di polimerizzazione. Nella sintesi organica il loro impiego risale sin dagli anni ottanta, in seguito alla pubblicazione degli studi di *Gedye et al*⁽³⁵⁾ i quali sperimentarono alcune sintesi organiche condotte mediante irraggiamento da microonde e riscontrando una notevole riduzione dei tempi di reazione. L'effetto del riscaldamento da microonde sulle reazioni di sintesi organica è definito con la sigla MORE (Microwave-induced Organic Reaction Enhancement) ed il risultato più importante è l'accelerazione dei processi di sintesi. Altri aspetti positivi sono una netta riduzione della degradazione termica dei reagenti e dei prodotti, un aumento delle rese ed in alcuni casi una migliore selettività della reazione stessa.⁽³⁶⁾ Da allora sino ad oggi diverse sono le reazioni che sono state condotte mediante impiego di microonde e in questo senso, la letteratura offre una vastissima raccolta d'esempi. Reazioni come alchilazioni, acilazioni, reazioni asimmetriche, condensazioni, cicloaddizioni, sintesi d'eterocicli, carbanioni, organometalli, alogenazioni sono alcuni esempi di reazioni e classi di composti che hanno trovato vantaggio nell'uso delle microonde.

Recentemente, anche in campo biochimico si sono trovate interessanti applicazioni. Spesso i substrati biochimici sono termosensibili, l'uso delle microonde permette di condurre reazioni anche a temperature dell'ordine dei 30°–40°C. L'uso delle microonde ha visto soprattutto la diffusione nel campo delle sintesi di peptidi in fase solida (SPPS, solid-phase peptide synthesis).

Anche in ambito analitico l'impiego delle microonde ha avuto un forte sviluppo in quanto la preparazione del campione da sottoporre ad analisi si basa essenzialmente su

due tipi di trattamento: estrazione con solventi e digestione acida. Il processo di estrazione prevede normalmente l'utilizzo di grandi quantità di solventi organici, spesso a riflusso. Il riscaldamento tramite microonde, in sostituzione del riscaldamento classico, porta ad una netta riduzione dei tempi d'estrazione (con risparmio d'energia) e ad una drastica diminuzione della quantità (fino a 200 volte) dei solventi (trattamenti più ecologici).

La digestione acida è un metodo di mineralizzazione ad umido che si basa sull'ossidazione della matrice con acidi forti mediante riscaldamento e, secondo i metodi tradizionali, presenta tempi lunghi di trattamento, possibilità di contaminazioni, necessità di un costante controllo per rischio di reazioni violente, possibile perdita di analiti volatili. Queste problematiche possono essere superate con l'utilizzo di apparecchi microonde specifici per questo tipo di trattamento. I vantaggi ottenibili sono: drastica riduzione dei tempi di dissoluzione, incremento in riproducibilità, efficienza e sicurezza.

Una delle prime applicazioni industriali della tecnologia microonde applicata al campo dei polimeri è stata quella relativa al processo di vulcanizzazione delle gomme. Sin dall'inizio degli anni settanta, i nuovi impianti di vulcanizzazione a riscaldamento microonde si sono estesi a livello mondiale sostituendo i vecchi impianti.

Forni a microonde sono d'impiego corrente nell'industria di articoli finiti e dei semilavorati estrusi, nella lavorazione di gomme sintetiche e naturali, con vantaggi quali: efficienza energetica, aumento della velocità dei processi, ecocompatibilità. Ma la tecnologia microonde ha avuto ampio sviluppo nella chimica dei polimeri. L'interazione microonde-materia ha caratteristiche molto versatili in questo campo, dove si è in presenza di sistemi multipli o di sostanze singole a struttura complessa o macromolecolare e di materiali di partenza polari. ⁽³⁷⁾ Diverse resine (epossidiche,

poliammidiche, poliuretaniche ecc.) sono state le prime ad essere studiate per la loro importanza industriale e da allora sino ad oggi la ricerca continua a trovare nuove applicazioni del riscaldamento microonde da applicare alla chimica dei polimeri (sintesi, modificazioni, ecc.)

Tuttavia, l'impiego delle microonde è applicato per lo più in un ambito ristretto come il laboratorio pertanto la fase successiva è sicuramente uno scale-up di processo, al fine di ottenere un impiego in ambito industriale o semi-industriale. Attualmente, si realizzano applicazioni su scala del grammo ed è facile capire gli inconvenienti e i problemi strumentali per un'applicazione su più vasta scala. Questo è un buon punto di partenza per lo sviluppo di sorgenti e sistemi per l'irraggiamento MW da applicare nelle sintesi di chimica organica.

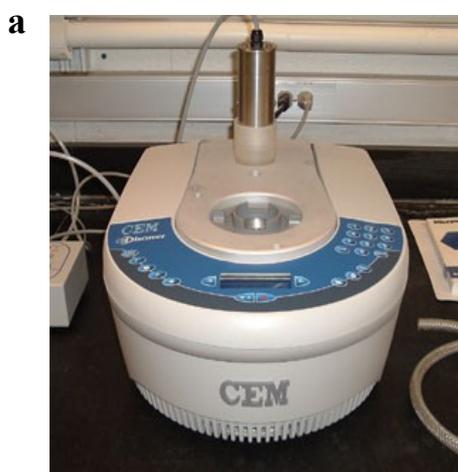


Figura 8: Esempio di forno a MW: da laboratorio (a), industriale (b).

2. SCOPO DELLA TESI

Il poli(3-idrossibutirrato) PHB, il più conosciuto nonché il capostipite dei PHA, è di origine microbica e possiede buone caratteristiche di biodegradabilità. La sua degradazione all'interno di un organismo avviene tramite vie enzimatiche con produzione di acido 3-idrossibutirrico che, al pari dell'acido lattico e glicolico, viene introdotto nei cicli metabolici degli organismi eucarioti. Da ciò ne deriva che il PHB, oltre a possedere caratteristiche di biodegradabilità, è anche compatibile sia nella sua forma polimerica che come prodotto di degradazione. Queste caratteristiche fanno sì che il PHB sia un buon candidato quale poliestere per applicazioni biomediche e farmaceutiche. Sfortunatamente l'elevata durezza e cristallinità, la temperatura di fusione prossima a quella di decomposizione termica ne limitano le applicazioni pratiche. L'inserimento di altre unità monomeriche nella struttura del PHB determina un abbassamento della cristallinità con conseguente abbassamento della temperatura di fusione e di transizione vetrosa, con miglioramento della lavorabilità dell'intero sistema.

Lo scopo del lavoro di tesi è quello di sondare nuove strategie per l'ottenimento di nuovi polimeri che possiedano caratteristiche di biodegradabilità e biocompatibilità con più ampia possibilità d'impiego rispetto al PHB nel settore farmaceutico mediante:

1. Lo sviluppo di nuovi processi di fermentazione, sfruttando la capacità di alcuni ceppi batterici, in cui vengono usati acidi grassi a lunga catena (LCFA) oppure oli vegetali come substrati per produrre PHA, con rese migliori oppure con nuove strutture e nuove proprietà.
2. La sintesi chimica di nuovi copolimeri e terpolimeri partendo dai rispettivi

omopolimeri utilizzando processi di transesterificazione mediante riscaldamento convenzionale o a microonde.

1. La constatazione della diversità dei poliesteri prodotti dalle varie specie batteriche ha indirizzato gli studi più recenti verso l'ottimizzazione delle procedure di produzione, estrazione e caratterizzazione. La possibilità di modificare le caratteristiche dei poliesteri intervenendo sul terreno di coltura, le condizioni di crescita del batterio e la sorgente di atomi di carbonio fornita, ha reso ancor più interessante lo studio dei PHA di origine batterica. La composizione monomerica di mcl-PHA da *Pseudomonas* può essere modulata impiegando sorgenti di carbonio differenti. In letteratura sono presenti pochi lavori che riguardano la produzione di PHA per fermentazione del batterio *P. aeruginosa*. In collaborazione con il gruppo diretto dal Prof. Guglielmino del Dipartimento di Scienze Microbiologiche, Genetiche e Molecolari dell'Università di Messina, si è intrapreso uno studio diretto allo sviluppo di nuovi processi di fermentazione del batterio *P. aeruginosa*, in cui vengono usati acidi grassi a catena lunga (LCFA), molto lunga (VLCFA) oppure da oli vegetali come substrati per produrre PHA con rese migliori oppure con nuove strutture e proprietà. Inoltre poiché gli oli vegetali sono esteri degli acidi grassi con ampia varietà di composizione, i PHA ottenuti da tali fonti hanno struttura complessa da determinare. Per semplificare il lavoro della caratterizzazione strutturale abbiamo intrapreso uno studio sistematico sulle strutture ottenibili quando ciascun acido grasso viene fornito al batterio come unica sorgente di carbonio durante i processi di fermentazione.

E' stato dimostrato ⁽³⁸⁾ che *P. aeruginosa* è in grado di crescere e sintetizzare PHA a partire da acidi grassi a numero pari di atomi di carbonio come sorgente, dall'acido ottanoico all'eicosanoico, sia in medium completo che in condizioni di limitazione di Mg. Non è stata rilevata alcuna formazione di PHA quando sono stati utilizzati acidi con

meno di otto atomi di carbonio e con più di venti atomi; la resa maggiore è stata ottenuta con l'acido eicosanoico.

Per quanto concerne le sorgenti ad atomi dispari, in un lavoro di tesi precedente, utilizzando sorgenti con meno di nove atomi di carbonio non è stato ottenuto alcun polimero. Nessuna limitazione di nutrienti era richiesta per ottenere PHA fornendo sorgenti ad atomi di carbonio dispari comprese tra C₉ e C₁₅, anche se le rese migliori sono state ottenute in assenza di Mg nel medium. La resa maggiore di PHA è stata osservata utilizzando acido tridecanoico, in condizioni di limitazione di Mg. La fermentazione con acido eptadecanoico, sia in medium completo che in assenza di Mg, non aveva prodotto alcun polimero.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di estendere lo studio sulla capacità di *P.aeruginosa* di crescere e sintetizzare PHA a partire da acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio, dall'eptadecanoico all'eneicosanoico, di identificare per ciascuna il monomero a più alto peso molecolare presente ed esplorare sistematicamente le variazioni nelle proprietà fisiche di questi PHA paragonandoli con quelli ottenuti precedentemente.

Inoltre in alcuni paesi del Mediterraneo, tra cui l'Italia e in particolare in Sicilia, è sempre più diffusa la produzione, la raccolta e la spremitura della *Brassica carinata* con l'obiettivo di incentivare la produzione di nuovi biocarburanti (*biodiesel*).⁽³⁹⁾ La coltivazione di *B. carinata*, in fase sperimentale, in rotazione alle colture di grano, si è rivelata una scelta molto interessante, favorendo da un lato le qualità e il contenuto proteico del grano e dall'altro proteggendo la fertilità del terreno. La produzione diffusa e a basso costo dell'olio di *B. carinata*, come biodiesel, specialmente per l'uso nei macchinari agricoli, rappresenta una scelta alternativa ai carburanti tradizionali. Pertanto abbiamo voluto esplorare la possibilità di ottenere PHA da questa nuova

sorgente di carbonio.

La *B. carinata* è una pianta della famiglia delle Brassicacee, pianta originaria dell'altopiano etiopico a cui appartengono varie specie di cavolo, cavolfiore e colza. Per spremitura dei semi si ottiene un olio costituito da una miscela di trigliceridi il cui componente principale è il trigliceride dell'acido erucico, acido grasso monoinsaturo a 22 atomi di carbonio (C_{22:1} omologo superiore dell'acido oleico). Per agevolare la caratterizzazione del PHA ottenuto da olio di *B. carinata* sono state condotte anche delle fermentazioni utilizzando l'acido grasso libero che lo costituisce principalmente, un omologo inferiore e quello superiore. Si tratta di acidi n-alcanoici insaturi a numero pari di atomi di carbonio a catena molto lunga (VLCFA) quali appunto l'acido erucico (C_{22:1}) e l'acido nervonico (C_{24:1}). Quest'ultimo in particolare è un componente essenziale per la biosintesi della guaina mielinica e recentemente si è visto che il suo impiego può alleviare alcuni dei sintomi di malattie neurodegenerative quali l'Alzheimer, la sclerosi multipla o la demenza senile.

2. Nella classe dei PHA, il capostipite è il poli(3-idrossibutirrato) PHB, di origine batterica. Mediante delle vie enzimatiche viene degradato ad acido butirrico il quale viene utilizzato, tanto quanto l'acido glicolico e lattico, come precursore di molecole essenziali per gli organismi eucarioti. Nonostante ciò, l'elevata cristallinità, la temperatura di fusione prossima a quella di decomposizione termica ne precludono alcune delle sue applicazioni in campo biomedico e farmaceutico. Fortunatamente ciò può essere parzialmente risolto con l'introduzione di altre unità monomeriche nella struttura del PHB, con il conseguente abbassamento della temperatura di fusione e di transizione vetrosa, con un miglioramento della lavorabilità del prodotto finale. Alcuni esempi di tale manipolazione possono essere analizzati nel lavoro di *Reeves et al.*,⁽⁴⁰⁾ i

quali hanno ottenuto un copolimero a due blocchi, di tipo A-B, tra il PHB e il PCL; oppure nel lavoro di *Doi et al.*⁽⁴¹⁾ che ottennero copolimeri a blocchi del tipo (P[(R,S)-3HB-b-CL]) come compatibilizzanti per blends immiscibili di P[(R)-3HB] microbico e PCL; o ancora *Yalpany et al.*⁽⁴²⁾ che hanno utilizzato PHB microbico, per la sintesi di coniugati di PHB con diversi polisaccaridi.

In funzione di ciò, presso il laboratorio in cui ho svolto la tesi, sono stati recentemente ottenuti nuovi esempi di copolimeri e terpolimeri biodegradabili, utilizzando una sintesi chimica al fine di ottenere nuovi materiali che presentino le caratteristiche generali del PHB, di origine batterica, ma con minore cristallinità. In particolare sono stati sintetizzati copolimeri P(HB-co-CL) e terpolimeri P(HB-co-HV-co-CL) mediante reazioni di transesterificazione condotta in soluzione tra i due omopolimeri PHB e PCL o tra il copolimero P(HB-co-24%mol HV) e l'omopolimero PCL. Tale procedura non fornisce PHA ad elevatissimi pesi molecolari, ma rappresenta un metodo semplice ed economico per ottenere polimeri biodegradabili con un grado di transesterificazione e blockness differenti rispetto a quelli ottenuti precedentemente da altri autori.

Tuttavia con il catalizzatore impiegato (5% di PTSA) e il riscaldamento convenzionale si ottengono copolimeri che presentano tale catalizzatore legato ai gruppi delle estremità terminali, mentre i tempi di reazione risultano mediamente lunghi, fino ad un massimo di 26 ore, per avere un grado di transesterificazione del 100% (copolimero random).

L'obiettivo del mio lavoro di tesi è stato quello di sondare le possibilità di ottimizzazione dei parametri che influenzano la reazione di transesterificazione: quantità impiegate di catalizzatore, tempi di reazione, pesi molecolari dei polimeri di partenza, composizione co-monomerica della miscela di reazione, quantità di acqua presente nella miscela di reazione. In particolare abbiamo scelto di studiare l'influenza della quantità di catalizzatore e dell'utilizzazione del riscaldamento mediante microonde

in alternativa al riscaldamento convenzionale, con l'obiettivo principale di diminuire i tempi di reazione.

I polimeri ottenuti sia da fermentazione batterica o per sintesi chimica sono stati caratterizzati mediante Gel Permeation Chromatography (GPC) per la determinazione dei pesi molecolari, mediante spettroscopia ^1H - e ^{13}C -NMR per l'analisi strutturale, gascromatografia (GC) per la composizione comonomerica e la Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC) per la determinazione delle proprietà termiche.

Infine, per determinare la distribuzione delle sequenze delle unità ripetitive e per stabilire se si sia ottenuto un copolimero o una miscela di omopolimeri o di copolimeri da ciascuna fermentazione è stata impiegata la tecnica della spettrometria di massa elettrospray (ESI-MS) sugli oligomeri ottenuti dai PHA per parziale decomposizione termica.

La spettrometria di massa MALDI-TOF è stata invece utilizzata per lo studio delle deigruppi terminali nei copolimeri e terpolimeri sintetizzati.

Per alcuni copolimeri e terpolimeri utilizzati, il gruppo di ricerca diretto dai professori Puglisi e Pignatello, dell'università di Catania, ha inoltre valutato la capacità di produrre nano- e micro-particelle da impiegare come Drug Delivery System.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Biosintesi e caratterizzazione strutturale di poli(idrossialcanoati) ottenuti per fermentazione da *Pseudomonas aeruginosa* con le seguenti fonti di carbonio:

- a) acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio.
- b) olio di *Brassica carinata* ad alto contenuto di acido erucico.

a) Le fermentazioni di *P. aeruginosa* ATCC 27853, eseguite fornendo come fonte di carbonio acidi n-alcanoici ad atomi di carbonio dispari, dall'eptadecanoico all'eneicosanoico, hanno permesso di ottenere diversi PHA. Tutte le biosintesi sono state condotte in condizioni di limitazione di N per ciascuna delle sorgenti utilizzate. In Tabella 2 sono riportate le rese in quantità di biomassa e di polimero isolato, della serie di PHA ottenuti con diverse sorgenti ad atomi di carbonio dispari.

Tabella 2: Peso cellulare secco, rese e quantità di polimero isolato da *P. aeruginosa* ATCC 27853 utilizzando sorgenti ad atomi dispari di carbonio.

Sorgente di carbonio	Peso cellulare secco (mg/L)	Resa PHA (% peso cellulare secco)	Resa PHA (mg/L)
Acido Eptadecanoico –N	1600	9.8	157
Acido Nonadecanoico –N	2370	5.3	127
Acido Eneicosanoico –N	2737	0.25	7

Per gli acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio la resa maggiore di PHA (157 mg/L) è stata osservata utilizzando acido eptadecanoico.

Le unità monomeriche costituenti i polimeri sono state identificate mediante gas cromatografia (GC), paragonando i tempi di ritenzione degli esteri metilici di 3-idrossialcanoati standard disponibili commercialmente con gli esteri metilici di 3-idrossialcanoati ottenuti mediante metanolisi completa dei PHA.

Nella Figura 9 è riportato il tracciato gas-cromatografico dei prodotti di metanolisi totale dei PHA ottenuti da acido eptadecanoico, nonadecanoico ed eneicosanoico, rispettivamente.

Come si vede in Figura 9, la gas cromatografia permette di osservare la separazione delle unità monomeriche fino al 3-idrossipentadecanoato.

La composizione monomerica dei PHA ottenuti da sorgenti a numero dispari di atomi di carbonio, calcolata mediante GC è riportata in Tabella 3.

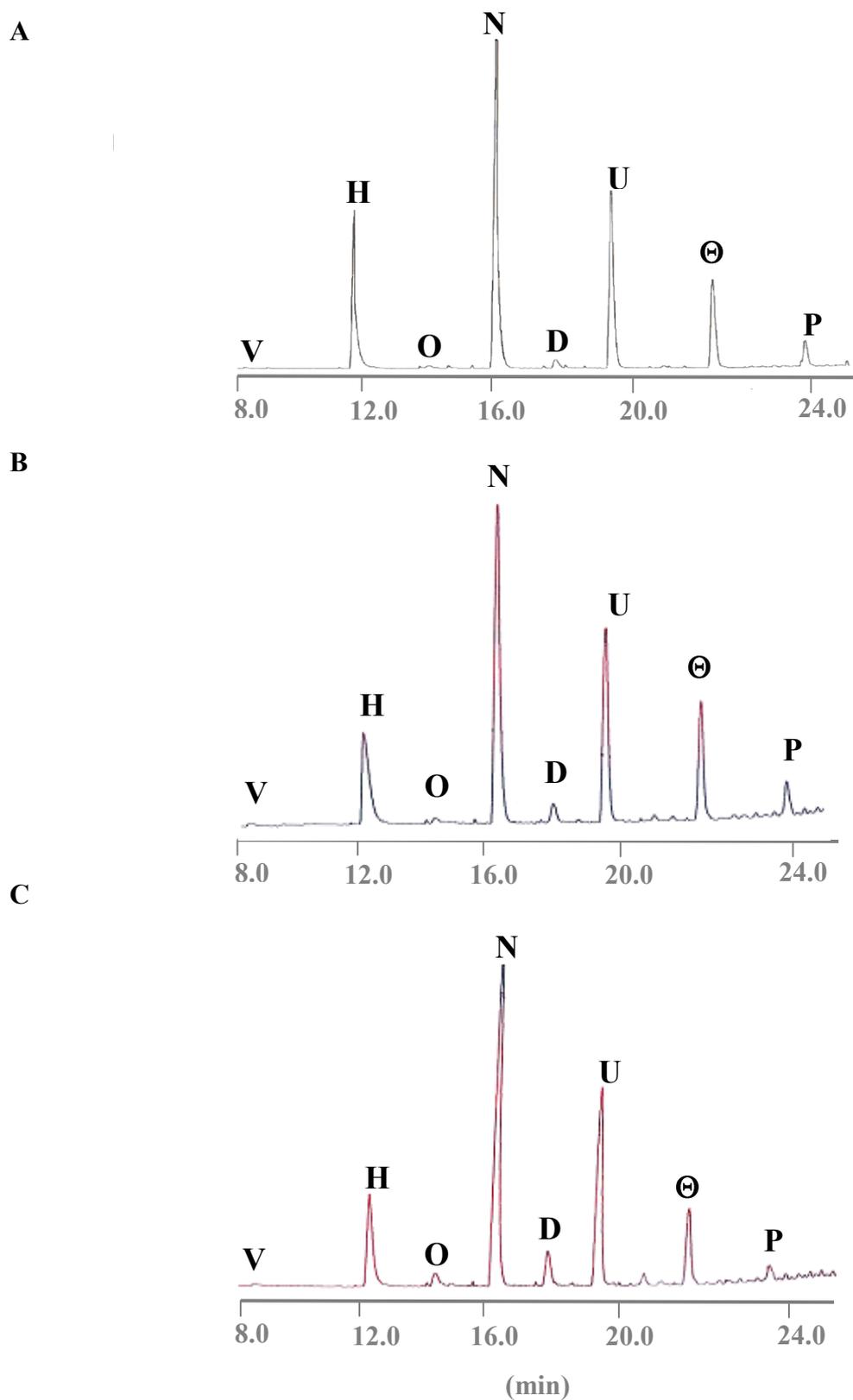


Figura 9: Tracciato gas-cromatografico dei prodotti di metanolisi totale dei PHA ottenuti per fermentazione di *P. aeruginosa* con acido: eptadecanoico (A), nonadecanoico (B) ed eneicosanoico (C).

Tabella 3: Composizione monomerica (mol%) di PHA ottenuti da vari acidi grassi ad atomi dispari di carbonio, determinata mediante GC.

Acido grasso	V	C	H	O	N	D	U	Δ	Θ	T	P
Eptadecanoico	2	-	19	1	45	1	21	-	9	-	2
Nonadecanoico	1	-	19	1	44	2	19	1	10	-	3
Eneicosanoico	1	-	16	3	45	5	22	1	6	-	1

V= 3-idrossivalerato; C= 3-idrossiesanoato; H= 3-idrossieptanoato; O= 3-idrossiottanoato; N= 3-idrossinonanoato; D= 3-idrossidecanoato; U= 3-idrossiundecanoato; Δ= 3-idrossidodecanoato; Θ= 3-idrossitridecanoato; T= 3-idrossitetradecanoato e P = 3-idrossipentadecanoato.

I PHA ottenuti con acidi dall'eptadecanoico all'eneicosanoico sono costituiti da sei unità ripetitive a numero dispari di atomi di carbonio, ma sono state trovate anche unità ripetitive a numero pari di atomi di carbonio, in percentuali variabili dall'1 al 5%. In uno studio precedente i PHA ottenuti con acidi dal nonanoico al pentadecanoico in medium privati di Mg mostravano un incremento delle unità ripetitive dispari all'aumentare della lunghezza della catena della sorgente: tre unità ripetitive per i poliesteri ottenuti con acido nonanoico, quattro unità con acido undecanoico, cinque con acido tridecanoico. Nei PHA ottenuti da acido tridecanoico comparivano le unità ripetitive a numero pari, andamento che si mantiene nei poliesteri ottenuti con sorgenti ad atomi di carbonio dispari comprese tra C₁₅ e C₂₁.

Tra le unità monomeriche più abbondanti ci sono il 3-idrossieptanoato e il 3-idrossinonanoato, risultati che, in accordo con dati riportati in letteratura, avvalorano l'ipotesi che il sistema enzimatico della polimerizzazione dei PHA mostra una preferenza per i monomeri con catena di lunghezza compresa tra gli otto e i dieci atomi di carbonio.⁽⁴³⁾ La stessa osservazione può essere compiuta nella serie dei PHA ottenuti da sorgenti pari, in cui i monomeri più abbondanti sono il 3 idrossiottanoato e il 3-

idrossidecanoato.

La composizione dei poliesteri è risultata dipendente dalla lunghezza della catena degli acidi carbossilici: unità ripetitive con gruppi alchilici pendenti più lunghi sono più abbondanti quando vengono usate sorgenti di carbonio a catena più lunga. Dalla Tabella 3 si nota però che tale andamento si mantiene fino all'acido nonadecanoico, poiché utilizzando l'acido eneicosanoico le unità di 3-idrossitridecanoato e 3-idrossipentadecanoato del polimero tendono a diminuire.

La struttura chimica proposta dei PHA ottenuti da *P. aeruginosa* cresciuta su sorgenti di carbonio dispari a partire dall'acido pentadecanoico, è riportata sotto in Figura 10; per brevità non sono state riportate le unità ripetitive contenenti un numero pari di atomi di carbonio.

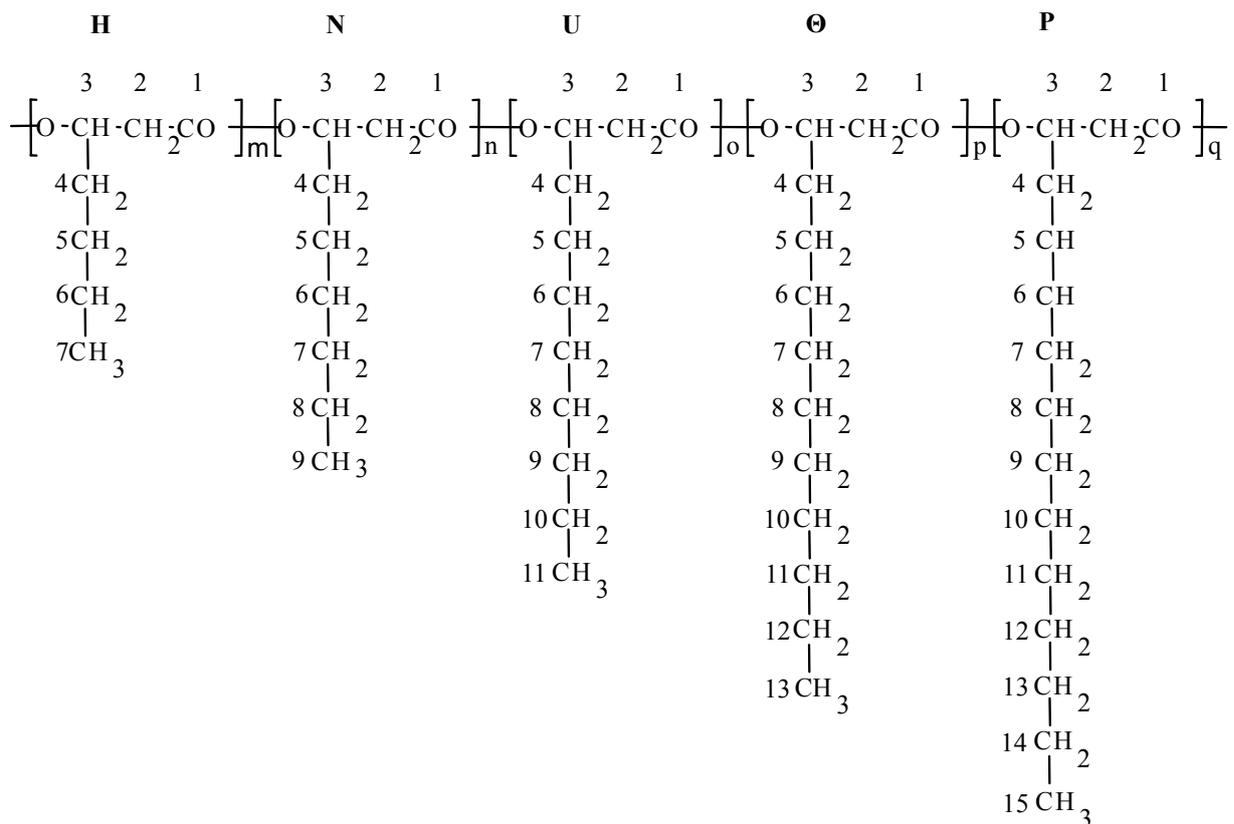


Figura 10: Struttura chimica dei PHA isolati da *P. aeruginosa* utilizzando acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio dal C₁₅ al C₂₁.

In Figura 11 sono riportati gli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei PHA ottenuti dagli acidi eptadecanoico (A), nonadecanoico (B) ed eneicosanoico (C), rispettivamente. Dall'esame degli spettri dopo l'attribuzione dei protoni **a-e** si ha la conferma della presenza del polimero. Tuttavia le diverse unità ripetitive non possono essere differenziate. Dall'esame comparativo dei tre spettri si nota solo che l'area del picco **d** relativo ai gruppi $-(\text{CH}_2)_x-$ aumenta passando dall'acido eptadecanoico al nonadecanoico, mentre è minore con l'acido eneicosanoico in accordo con quanto detto sopra, ovvero che le unità a catena più lunga con questa sorgente sono meno abbondanti.

Nella Figura 12 sono riportati gli spettri $^{13}\text{C-NMR}$ di PHA isolati da *P. aeruginosa* fatta crescere sugli acidi nonanoico (A), eptadecanoico (B), ed eneicosanoico (C), rispettivamente.

Le assegnazioni sono state fatte in accordo con *Gross et al.* ⁽⁴⁴⁾ per i carboni delle unità di 3-idrossivalerato (V), di 3-idrossieptanoato (H) o 3-idrossinonanoato (N); per i carboni che appartengono alle unità di 3-idrossiundecanoato (U), 3-idrossitridecanoato (θ) e di 3-idrossipentadecanoato (P), le risonanze sono state assegnate usando i parametri di shift additivi per gli idrocarburi.⁽⁴⁵⁾

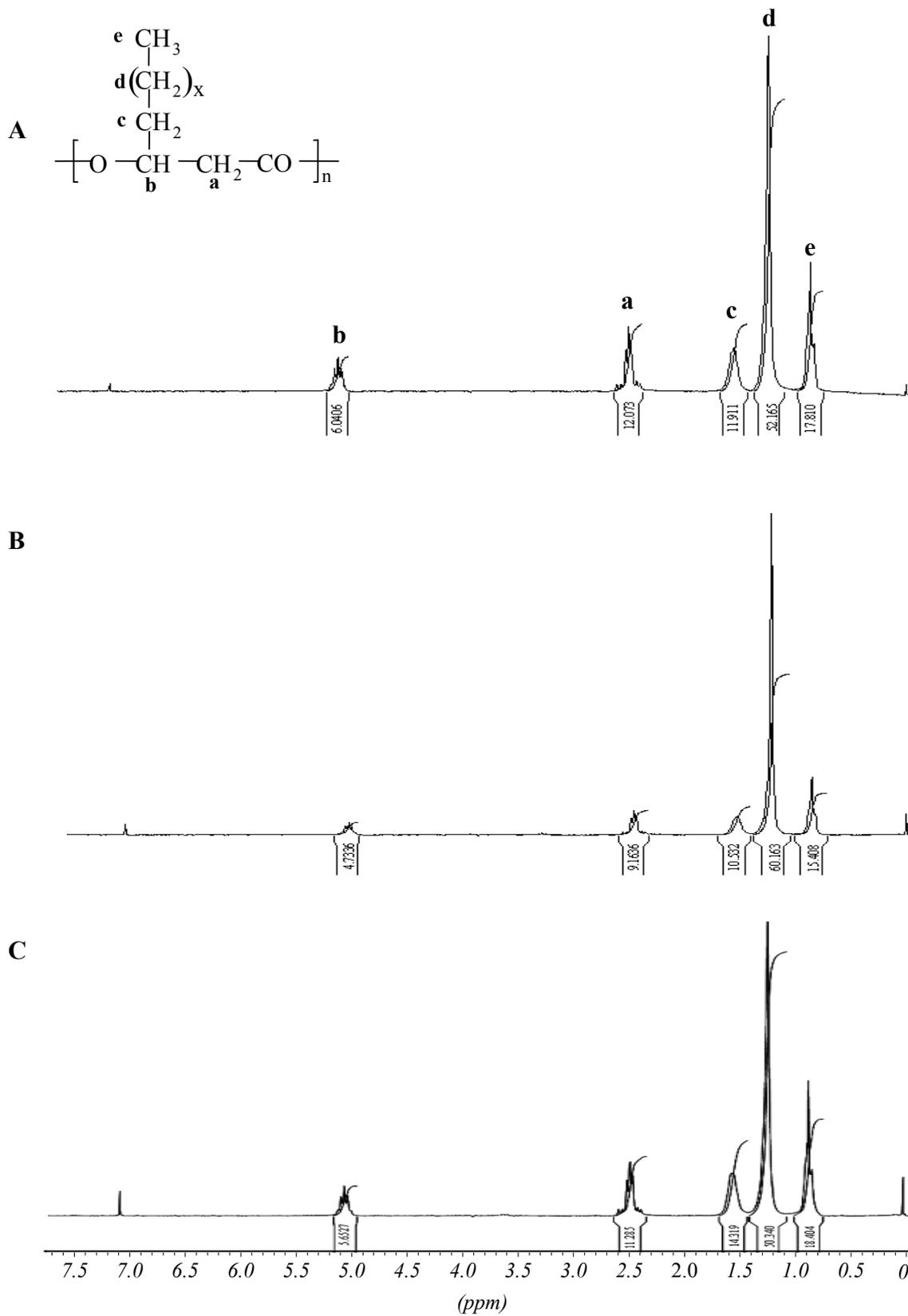


Figura 11: Spettro $^1\text{H-NMR}$ a 200 MHz dei PHA ottenuti da *P. aeruginosa* utilizzando gli acidi eptadecanoico (A), nonadecanoico (B) ed eicosanoico (C).

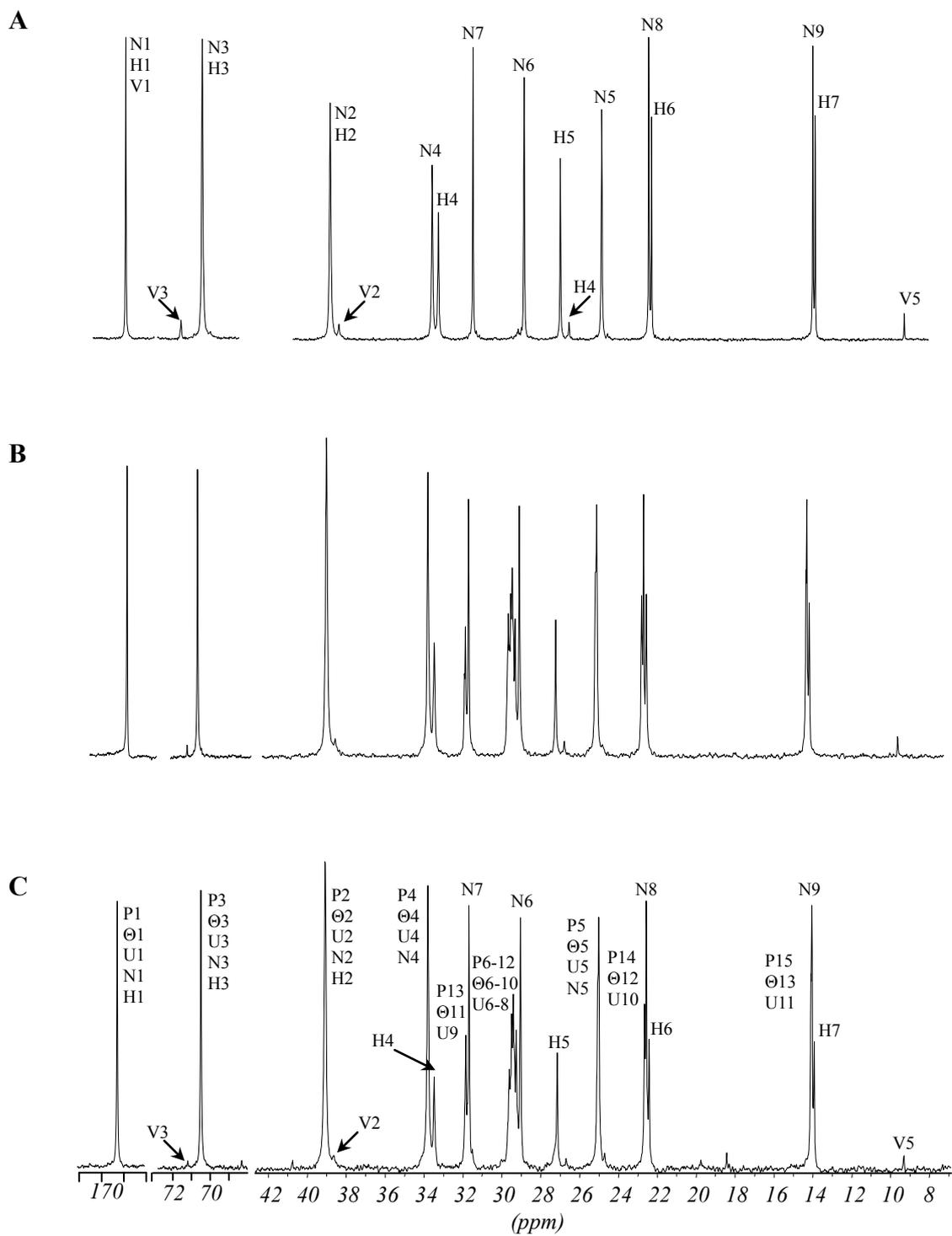


Figura 12: Spettro ^{13}C -NMR a 50 MHz dei PHA ottenuti da *P. aeruginosa* utilizzando gli acidi nonanoico (A), eptadecanoico (B) ed eneicosanoico (C).

La Tabella 4 mostra le proprietà fisiche della serie dei PHA ottenuti quando *P.aeruginosa* è stata fatta crescere con vari acidi grassi a catena dispari, da C₉ a C₂₁.

Nelle fermentazioni condotte con gli acidi nonanoico, undecanoico, tridecanoico e pentadecanoico il mezzo di coltura è stato privato di Mg, mentre con gli acidi eptadecanoico, nonadecanoico ed eneicosanoico, privato di N. I pesi molecolari medi ponderali vanno da 187.000 per il PHA ottenuto dall'acido pentadecanoico a 596.000 per il PHA ottenuto da acido nonanoico, cioè dalla fonte di carbonio con catena più corta. Il peso molecolare tende poi ad aumentare nuovamente andando dal PHA ottenuto da acido eptadecanoico a quello ottenuto da acido eneicosanoico.

Tabella 4. Caratteristiche dei PHA ottenuti per fermentazione da *P. aeruginosa* utilizzando sorgenti ad atomi dispari di carbonio.

Substrato	Tg (°C)	Tm (°C)	ΔH_m (J/g)	Mw x 10 ⁻³	Mw/Mn
Ac. Nonanoico	-38	49	9.6	596	2.0
Ac. Undecanoico	-48	47	10.2	224	1.7
Ac. Tridecanoico	-42	43	9.5	285	1.7
Ac. Pentadecanoico	-50	45	5.9	187	1.4
Ac. Eptadecanoico	-41	50	7.9	77	1.6
Ac. Nonadecanoico	-43	58	12	97	2
Ac. Eneicosanoico	-39	49	5.7	188	1.7

I valori di T_g , T_m e ΔH_m sono diminuiti da -38°C, 49°C e 9.6 J/g, a -50°C, 45°C e 5.9 J/g rispettivamente, all'aumentare della lunghezza media della catena laterale fino all'acido pentadecanoico. Per quanto concerne i PHA della serie pari, la T_g è variata da -37 a -46°C, La T_m da 50 a 58°C ed i valori ΔH_m da 11,6 a 24,8 J/g. In entrambe le serie i valori di T_g sono diminuiti all'aumentare della lunghezza media di catena,

mentre l'andamento per T_m e ΔH_m è stato più complesso. Infatti, i loro valori sono risultati più bassi per i PHA ottenuti dagli acidi a numero di atomi di carbonio dispari rispetto a quelli ottenuti da fonti a numero pari. Un comportamento simile di T_m è stato osservato negli n-alcani con atomi di carbonio pari una volta confrontati con la serie con carboni dispari fino al pentadecano ⁽⁴⁶⁾, attribuendolo ad un differente impaccamento cristallino. Ciò può essere considerato come conferma che i mcl-PHA cristallizzano sia con la partecipazione della struttura base che delle catene laterali in maniera del tutto simile ad altri polimeri con catena laterale lunga.^(47, 43) In uno studio precedente, i cui dati sono stati inclusi in Tabella 4, si è constatato una diminuzione della cristallinità all'aumentare della lunghezza della catena laterale nei PHA ottenuti da sorgenti di carbonio dispari compresi tra C₉ e C₁₅. L'andamento si modifica con l'ulteriore aumento della catena laterale, passando dall'acido pentadecanoico al nonadecanoico, che presenta il più alto valore di T_m (58°C). Un nuovo decremento si ha passando all'acido eneicosanoico. Ciò può essere spiegato dal fatto che la cristallinità è anche influenzata dalla regolarità strutturale delle unità ripetitive che in questi ultimi PHA è ridotta, poichè il numero di differenti unità monomeriche aumenta quando si usano acidi grassi a catena più lunga (vedi Tabella 3). In conclusione, i valori misurati di T_m e di ΔH_m derivano dalla combinazione dei due effetti opposti. Questi polimeri sono materiali flessibili e le loro caratteristiche fisiche non cambiano sensibilmente in funzione della lunghezza media delle catene laterali, anche se la presenza di catene laterali più lunghe favorisce il processo di ricristallizzazione, come suggerito dalla seconda scansione di riscaldamento alla DSC. Questo comportamento interessante sarà esaminato mediante ulteriori studi di cinetica di cristallizzazione.

Mediante DSC o analisi ¹³C-NMR di PHA non è possibile stabilire se è stato ottenuto un singolo copolimero oppure una miscela di copolimeri o omopolimeri,⁽⁴⁹⁾ per cui si

sono analizzati i poliesteri ottenuti mediante spettrometria di massa ESI studiando la struttura degli oligomeri generati dalla loro pirolisi parziale.

E' noto che la decomposizione termica dei PHA avviene mediante una reazione di eliminazione di idrogeno dalla posizione β con la conseguente formazione di oligomeri con gruppi terminali olefinici e carbossilici ⁽⁴⁹⁻⁵⁰⁾ (Figura 13).

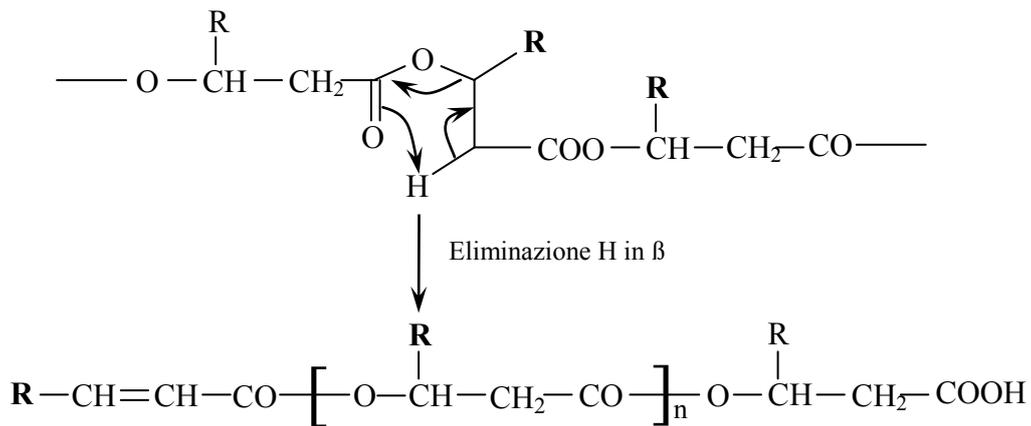


Figura 13: Reazione di degradazione termica dei PHA.

La diminuzione del peso molecolare durante la degradazione termica segue il modello della scissione random del gruppo estereo. In questo modello, la velocità di scissione non dipende né dal sostituente R, né dalla composizione del poliesteri.

Assumendo che le unità del polimero seguano una distribuzione di tipo Bernoulliano, ossia casuale, la probabilità ($P_x, y... z$) di individuare una data sequenza $A_x, B_y... N_z$ ⁽⁵⁰⁾ può essere calcolata mediante la seguente formula di Leibnitz:

$$P_{x,y,\dots,z} = \frac{(x+y+\dots+z)!}{x!y!\dots z!} P_A^x P_B^y \dots P_N^z$$

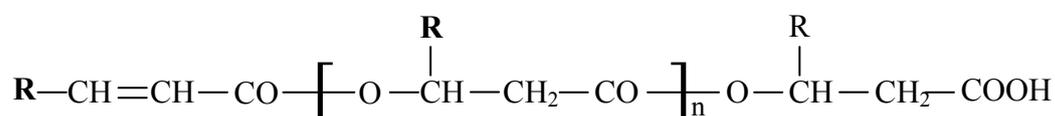
In questa equazione, $P_A, P_B...P_N$ sono frazioni molari delle unità A, B... N nel copolimero.

Le intensità sperimentali dei picchi ESI MS dei campioni parzialmente pirolizzati vengono comparate con quelle computazionali ottenute dall'abbondanza di un set arbitrario di monomeri, ipotizzando una sequenza ed un meccanismo di scissione casuale, come la degradazione termica. Una misura del fit delle intensità calcolate degli oligomeri con quelle sperimentali è data dall'*agreement factor* (AF); ⁽⁴⁹⁾ più basso è questo valore, tanto più sovrapponibili sono i dati sperimentali e quelli calcolati.

$$AF = \sqrt{\frac{\sum_i (I_{\text{exp}.i} + I_{\text{calc}.i})^2}{\sum_i I_{\text{exp}.i}^2}}$$

Quando si ottiene la composizione che genera l'AF più basso, questa composizione viene confrontata con quella misurata mediante GC. Se i due insiemi di dati sono molto simili, il modello statistico usato per generare le intensità teoriche degli oligomeri è convalidato.

La Figura 14 mostra lo spettro ESI MS in negativo del pirolizzato parziale del PHA ottenuto da acido eneicosanoico, scelto come esempio della serie dispari di PHA studiata. Lo spettro si estende da m/z 250 a m/z 1000. Consiste essenzialmente degli ioni pseudomolecolari $(M-H)^-$ corrispondenti agli oligomeri generati dalla pirolisi di seguente struttura: ⁽⁴⁹⁾



dove R può essere un gruppo n-etile, n-butile, n-esile, n-otile, n-decile e n-dodecile.

Gli oligomeri, dai dimeri fino agli esameri identificati nella Figura 14, sono elencati in Tabella 5 insieme alle loro intensità sperimentali e calcolate. Nello spettro si

distinguono due serie di picchi entrambe separate da 28 amu: la prima a m/z 255, 283, 311 ecc., e la seconda, spostata di 14 amu a m/z 269, 297, 325 ecc., con intensità più bassa. Questa seconda distribuzione è attribuibile alle unità pari inserite nella struttura del polimero ottenuto utilizzando sorgenti di carbonio dispari.

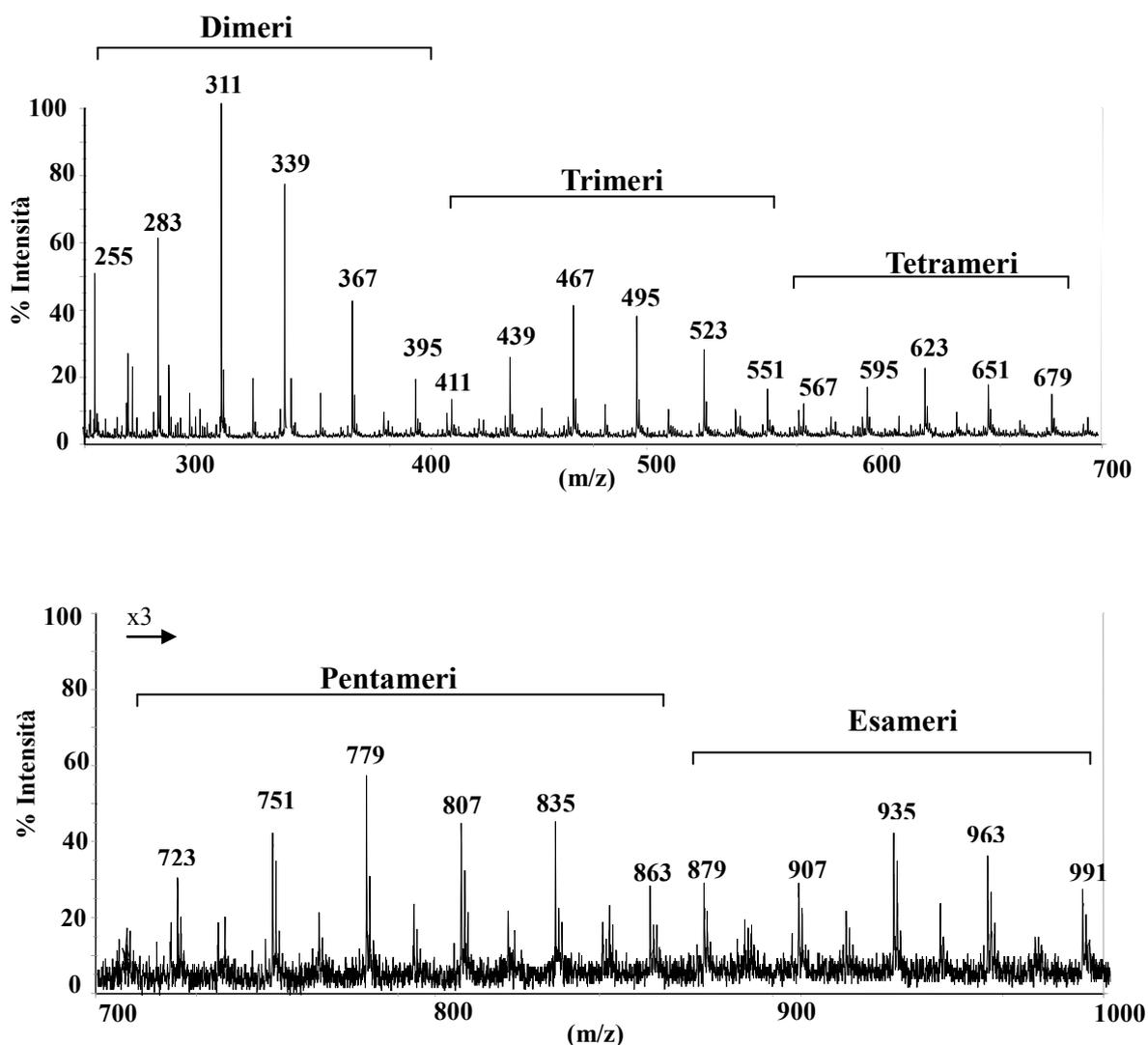


Figura 14: Spettro ESI-MS in negativo dei prodotti di pirolisi parziale del PHA ottenuto da acido eneicosanoico.

Il più basso valore di AF è stato ottenuto per la composizione V/H/N/U/ θ /P calcolata di 7/21/35/33/3/1; le intensità degli oligomeri calcolate, dai dimeri ai pentameri sono in buon accordo con i valori calcolati mediante GC. Gli esameri e gli eptameri, seppur

individuati, non sono stati inclusi nei calcoli a causa del basso rapporto segnale rumore.

Tabella 5: Quantità sperimentali^a e calcolate^{b,c} dei prodotti di pirolisi parziale del PHA prodotto per fermentazione di *P. aeruginosa* utilizzando l'acido eneicosanoico.

V/H/N/U/θ/P (7/21/35/33/3/1)^d				
	<i>m/z</i>	ESI^a	GC^b	Cal.^c
Dimeri^c				
V-H	227	4	4	4
V-N; H ₂	255	1	4	15
V-U; H-N	283	18	17	18
V-θ; H-U; N ₂	311	26	32	26
V-P; N-U; H-θ	339	20	26	20
H-P; U ₂ ; N-θ	367	12	13	13
U-θ; N-P	395	5	4	5
Trimeri^e				
C ₂₃	411	8	5	9
C ₂₅	439	14	16	16
C ₂₇	467	23	26	22
C ₂₉	495	21	25	24
C ₃₁	523	15	16	18
C ₃₃	551	10	8	10
C ₃₅	579	3	3	0
Tetrameri^c				
C ₃₂	567	15	6	12
C ₃₄	595	19	15	20
C ₃₆	623	24	23	25
C ₃₈	651	21	25	22
C ₄₀	679	15	19	14
C ₄₂	707	6	11	6

^a Intensità relative di ioni (M-H)⁻ dei prodotti di pirolisi dello spettro ESI-MS.

^{b,c} Intensità relative dei prodotti di pirolisi, calcolate mediante la formula di Leibnitz.

^d Composizione media relativa al più basso AF.

^e Tutti i possibili oligomeri isobari contenenti *n* atomi di carbonio sono indicati con *C_n*.

Possiamo quindi concludere che la sequenza delle unità ripetitive in questo PHA è random e che una miscela di omopolimeri o di copolimeri può essere esclusa.

In Figura 15 sono riportati gli spettri di massa ESI in negativo dei pirolizzati parziali dei PHA ottenuti da acido nonanoico, eptadecanoico ed eneicosanoico. Per ragioni di chiarezza e brevità è riportata soltanto la regione degli oligomeri dai dimeri ai tetrametri (m/z 250-700). I dimeri, trimeri e tetrametri identificati per l'acido eptadecanoico sono riportati nella Tabella 6. Anche per questo polimero, e per quello ottenuto da acido nonadecanoico non riportato in tabella, vi è buon accordo tra i dati calcolati e quelli sperimentali.

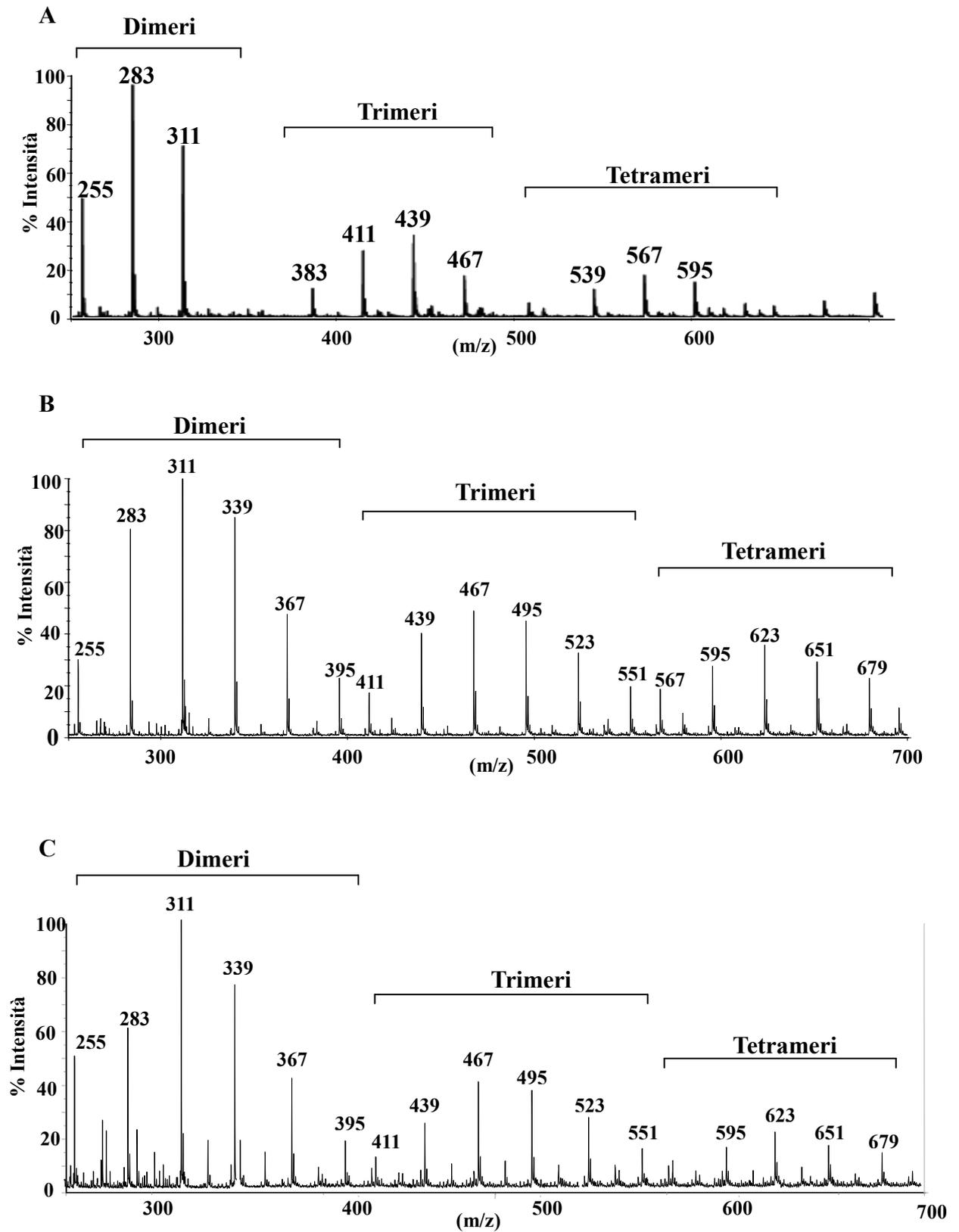


Figura 15: Spettri ESI-MS in negativo dei prodotti di pirolisi parziale dei PHA ottenuti da acido nonanoico (A), eptadecanoico (B) ed eneicosanoico (C).

Tabella 6: Quantità sperimentali^a e calcolate^{b,c} dei prodotti di pirolisi parziale del PHA prodotto per fermentazione di *P. aeruginosa* utilizzando l'acido eptadecanoico.

V/H/N/U/θ/P (4/24/40/23/7/2)^d				
	<i>m/z</i>	ESI^a	GC^b	Cal.^c
<i>Dimeri^c</i>				
V-H	227	2	3	3
V-N; H ₂	255	10	6	10
V-U; H-N	283	19	19	19
V-θ; H-U; N ₂	311	26	29	25
V-P; N-U; H-θ	339	22	22	21
H-P; U ₂ ; N-θ	367	13	13	13
U-θ; N-P	395	6	5	6
U-P; θ ₂	423	2	2	2
<i>Trimeri^e</i>				
C ₂₁	383	2	2	2
C ₂₃	411	8	7	8
C ₂₅	439	17	17	17
C ₂₇	467	22	23	22
C ₂₉	495	20	22	20
C ₃₁	523	15	15	15
C ₃₃	551	8	8	9
C ₃₅	579	5	4	4
C ₃₇	607	2	1	2
<i>Tetrameri^c</i>				
C ₂₈	511	2	1	1
C ₃₀	539	5	3	5
C ₃₂	567	10	8	10
C ₃₄	595	16	15	16
C ₃₆	623	20	20	20
C ₄₀	651	18	20	19

^a Intensità relative di ioni (M-H)⁺ dei prodotti di pirolisi dello spettro ESI-MS.

^{b,c} Intensità relative dei prodotti di pirolisi, calcolate mediante la formula di Leibnitz.

^d Composizione media relativa al più basso AF.

^e Tutti i possibili oligomeri isobari contenenti *n* atomi di carbonio sono indicati con *C_n*

b) Anche le fermentazioni di *P. aeruginosa* ATCC 27853, eseguite fornendo come fonte di carbonio olio di *Brassica carinata* ad alto contenuto di acido erucico, sono state condotte in condizioni di limitazione di N. In questo caso, prevedendo che la struttura del PHA sarebbe stata complessa, sono state eseguite anche le fermentazioni utilizzando singolarmente gli acidi oleico, erucico e nervonico per facilitare lo studio della caratterizzazione strutturale.

In Tabella 7 sono riportate le rese in quantità di biomassa e di polimero isolato, della serie di PHA ottenuti.

Tabella 7: Peso cellulare secco, rese e quantità di polimero isolato da *P. aeruginosa* ATCC 27853 con differenti sorgenti di carbonio.

Sorgente di carbonio	Peso cellulare secco (mg/L)	Resa PHA (% peso cellulare secco)	Resa PHA (mg/L)
Olio di <i>B. carinata</i> -N	1000	5.0	50
Acido Oleico -N	380	15.0	57
Acido Erucico -N	866	9.3	81
Acido Nervonico -N	416	10.0	42

I dati sperimentali confermano che l'olio di *B. carinata*, l'acido oleico, erucico e nervonico sono buoni substrati per la crescita cellulare e che la resa maggiore di PHA (81 mg/L) è stata osservata utilizzando acido erucico in assenza di azoto nel medium. In altre fermentazioni (non riportate in tabella) utilizzando le stesse sorgenti ma in assenza di magnesio nel medium, non hanno prodotto PHA.

Le unità monomeriche costituenti i polimeri sono state identificate mediante gas cromatografia (GC), paragonando i tempi di ritenzione degli esteri metilici di 3-

idrossialcanoati standard disponibili commercialmente con gli esteri metilici di 3-idrossialcanoati ottenuti mediante metanolisi completa dei PHA. La composizione monomerica dei PHA calcolata mediante GC è riportata in Tabella 8.

Tabella 8. Composizione monomerica (mol%) di PHA ottenuti da olio di *B. carinata* e acidi grassi a catena molto lunga determinata mediante GC.

Substrato	C	O	O _{:1}	D	D _{:1}	Δ	Δ _{:1}	T _{:1}	T _{:2}	T _{:3}
Olio di <i>B. carinata</i>	3	34	3	32	3	10	1	9	2	3
Acido Oleico	4	55	-	27	-	8	-	6	-	-
Acido Erucico	3	43	-	36	-	10	-	8	-	-
Acido Nervonico	4	28	-	43	-	14	-	11	-	-

C = 3-idrossiesanoato; O = 3-idrossiottanoato; O_{:1} = 3-idrossi-5-ottanoato; D = 3-idrossidecanoato; D_{:1} = 3-idrossi-7-decanoato; Δ = 3-idrossidodecanoato; Δ_{:1} = 3-idrossi-6-dodecanoato; T_{:1} = 3-idrossi-5-tetradecanoato; T_{:2} = 3-idrossi-5,8-tetradecadienoato; T_{:3} = 3-idrossi-5,8,11-tetradecatrienoato.

I PHA ottenuti dall'acido oleico, erucico e nervonico sono costituiti da cinque unità ripetitive con prevalenza di 3-idrossiottanoato, 3-idrossidecanoato e 3-idrossidodecanoato. Mentre i PHA ottenuti a partire dall'olio di *B. carinata* hanno cinque unità monomeriche in più: 3-idrossi-5-ottanoato (O_{:1}), 3-idrossi-7-decanoato (D_{:1}), 3-idrossi-6-dodecanoato (Δ_{:1}), 3-idrossi-5,8-tetradecadienoato (T_{:2}) e 3-idrossi-5,8,11-tetradecatrienoato (T_{:3}). Ciò è dovuto probabilmente alla presenza di trigliceridi dell'acido linoleico e linolenico contenuti nell'olio di *B. carinata*.

La struttura chimica proposta dei PHA ottenuti da *P. aeruginosa* cresciuta su acido oleico, erucico o nervonico è riportata sotto in Figura 16.

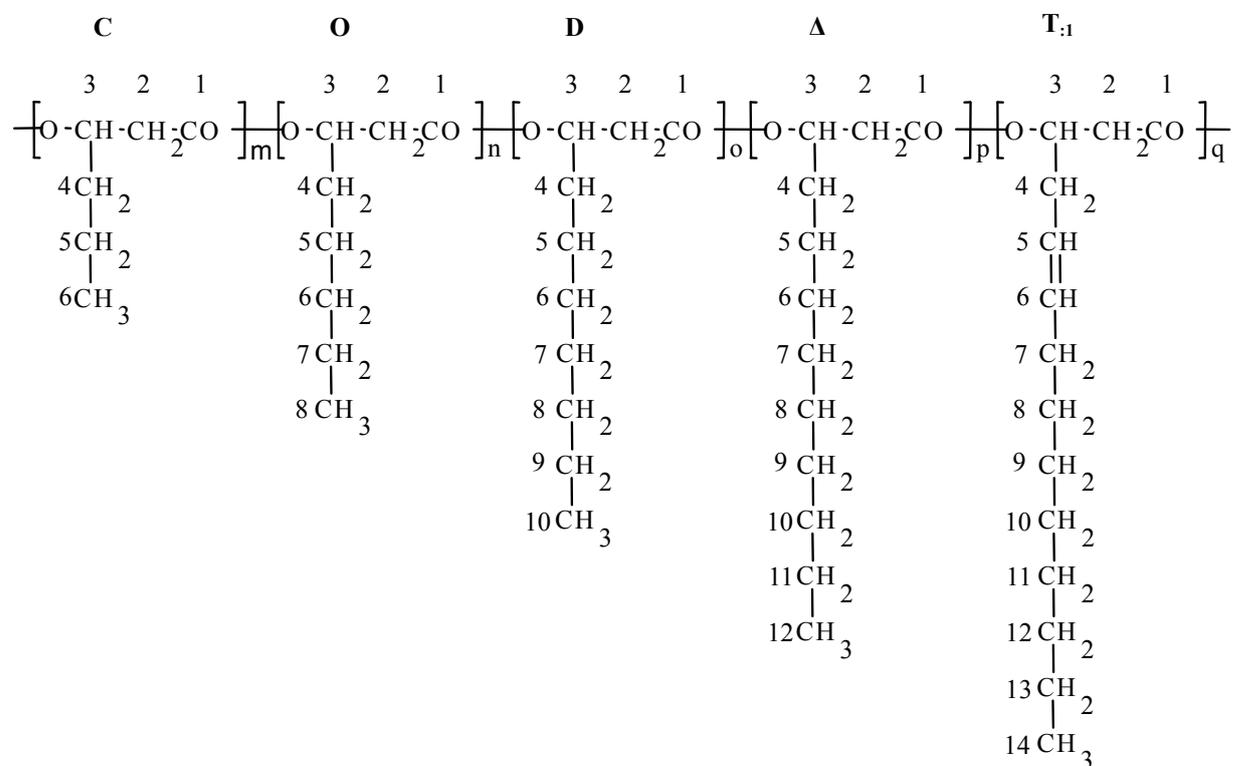


Figura 16: Struttura chimica dei PHA isolati da *P. aeruginosa* utilizzando acido oleico, erucico o nervonico.

In Figura 17 e 18 sono riportati rispettivamente gli spettri ^1H - e ^{13}C -NMR del PHA ottenuto per fermentazione su acido erucico.

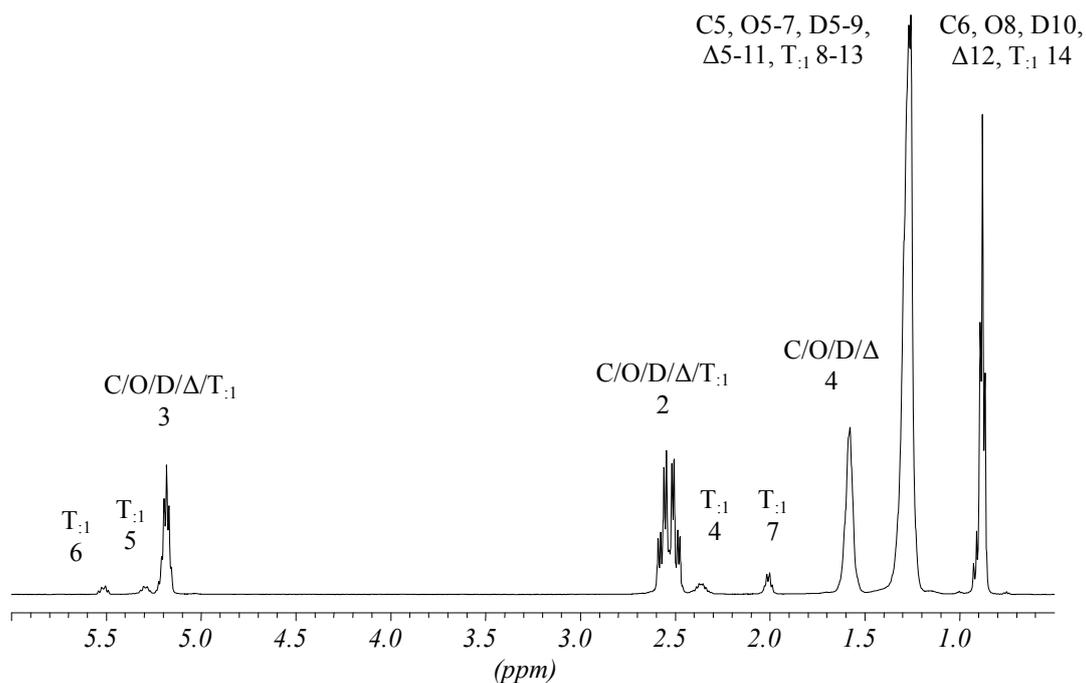


Figura 17: Spettro $^1\text{H-NMR}$ a 500 MHz del PHA ottenuto da *P. aeruginosa* utilizzando l'acido erucico.

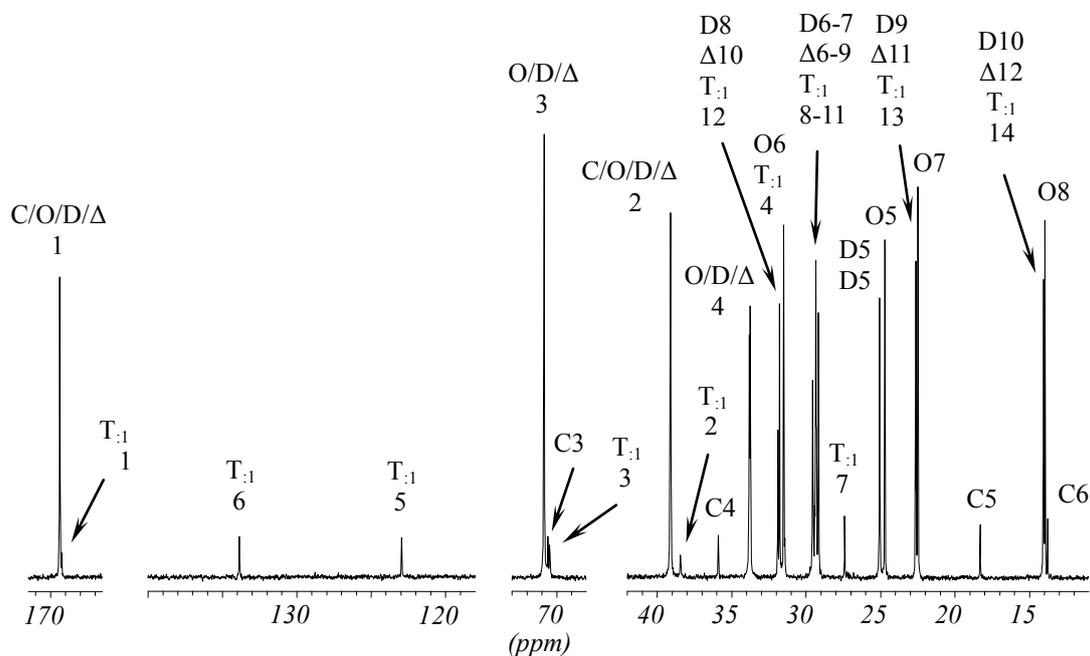


Figura 18: Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ a 125 MHz del PHA ottenuto da *P. aeruginosa* utilizzando l'acido erucico.

Nello spettro $^1\text{H-NMR}$ sono presenti dei segnali a 5.3 e 5.5 ppm che possono essere attribuiti ai protoni olefinici indicativi delle insaturazioni in catena laterale. La presenza delle insaturazioni nel PHA ottenuto da acido erucico è confermata anche dall'analisi $^{13}\text{C-NMR}$ dove a 123 e 134 ppm sono presenti i segnali dei carboni olefinici. Gli spettri dei PHA ottenuti per fermentazione su acido oleico e nervonico sono simili al precedente e non sono stati riportati per brevità. Come per gli spettri $^{13}\text{C-NMR}$ precedenti, le assegnazioni sono state fatte in accordo con *Gross et al.* ⁽⁴⁴⁾ con *Ballistreri et al.* ⁽³⁸⁾ e con i dati del PHA prodotto da *P. putida* ^(44, 51) e *P. resinovorans* ⁽⁵²⁾ utilizzando acido oleico come substrato.

Per il PHA ottenuto per fermentazione di *P. aeruginosa* su olio di *B. carinata*, sotto, in Figura 19 è riportata la struttura proposta.

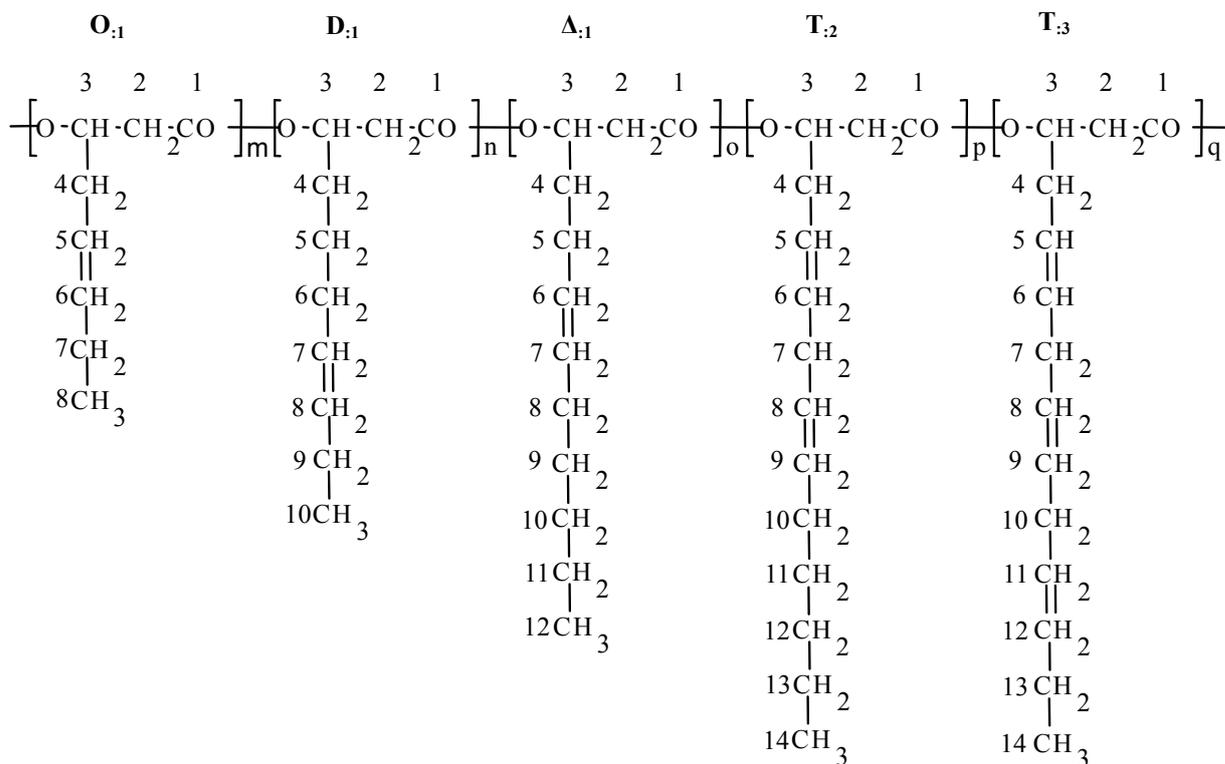


Figura 19: Struttura chimica del PHA ottenuto da *P. aeruginosa* utilizzando olio di *B. carinata*. La struttura è composta da tutte le unità monomeriche che costituiscono il PHA ottenuto da acido erucico più quelle insature riportate sopra.

In Figura 20 e 21 sono riportati rispettivamente gli spettri ^1H - e ^{13}C -NMR del PHA ottenuto per fermentazione su olio di *B. carinata*.

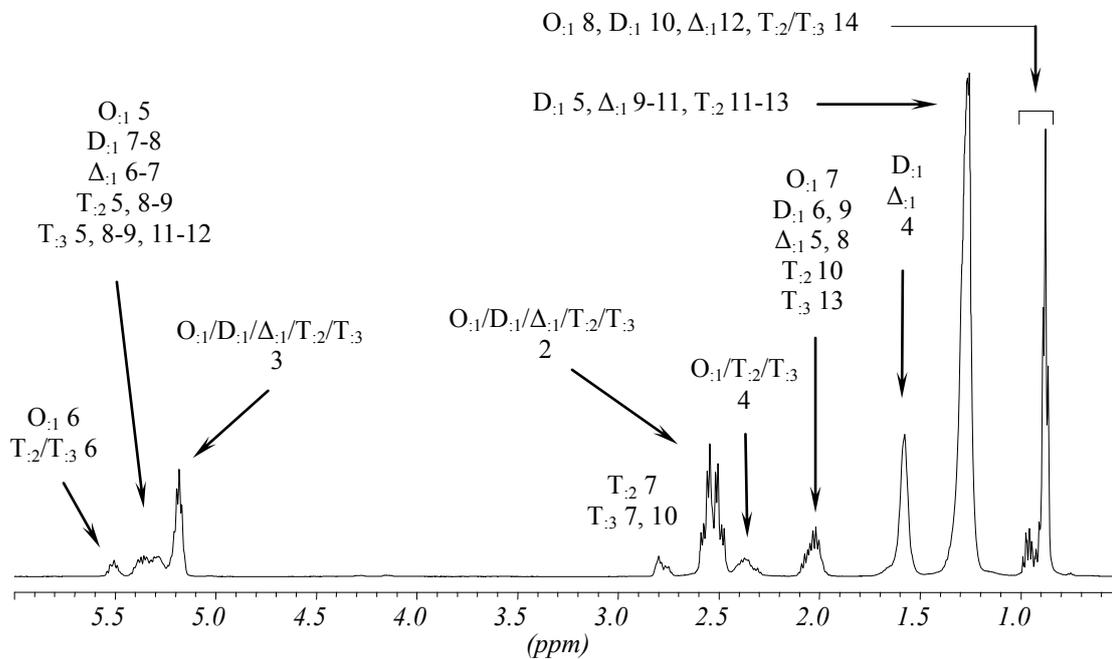


Figura 20: Spettro ^1H -NMR a 500 MHz del PHA ottenuto da *P. aeruginosa* utilizzando olio di *B. carinata*.

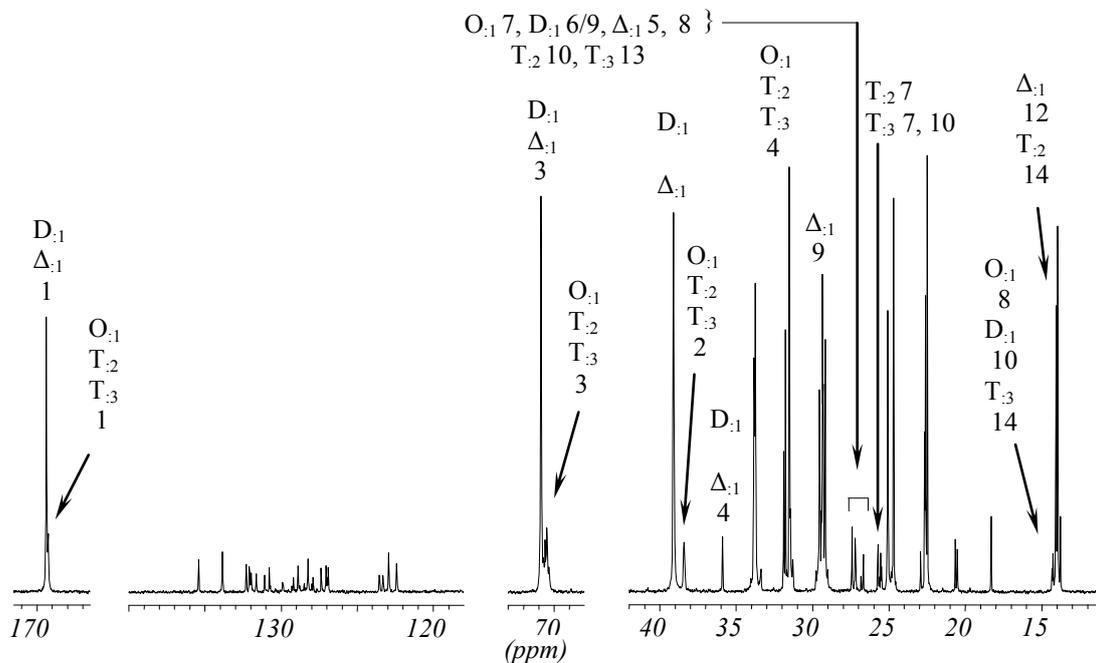


Figura 21: Spettro ^{13}C -NMR a 125 MHz del PHA ottenuto da *P. aeruginosa* utilizzando l'olio di *B. carinata*.

Nello spettro $^1\text{H-NMR}$ oltre ai segnali comuni allo spettro in Figura 17 sono presenti altri picchi tra 5.2 e 5.5 ppm, a 2.8 ppm e a 0.96 ppm. I primi due sono attribuiti ai protoni olefinici, il picco a 2.8 ppm è attribuito ai protoni metilenici del gruppo diallilico e il picco a 0.98 ppm è attribuito ai protoni metilici in posizione β rispetto al doppio legame.

Nello spettro $^{13}\text{C-NMR}$ del PHA ottenuto da olio di *B. carinata* sono evidenti nuovi picchi rispetto allo spettro del PHA ottenuto da acido erucico. A 27 ppm cade il segnale del picco relativo ai carboni 7 $\text{O}_{:1}$, 6-9 $\text{D}_{:1}$, 5-8 $\Delta_{:1}$, 10 $\text{T}_{:2}$ e 13 $\text{T}_{:3}$. A 25.5 ppm quello relativo ai carboni 7 $\text{T}_{:2}$ e 7-10 $\text{T}_{:3}$. Infine è presente un terzo picco a 14.3 ppm, dovuto ai carboni 8 $\text{O}_{:1}$, 10 $\text{D}_{:1}$ e 14 $\text{T}_{:3}$. Particolarmente importante è la regione compresa tra 120 e 140 ppm in cui cadono i segnali dei carboni insaturi (Figura 22). In questa regione sono presenti i picchi dei carboni olefinici presenti nelle unità monomeriche contenenti un doppio legame (carboni 5-6 $\text{O}_{:1}$, 7-8 $\text{D}_{:1}$, 6-7 $\Delta_{:1}$), due doppi legami (carboni 5-6 e 8-9 $\text{T}_{:2}$) e tre doppi legami (carboni 5-6, 8-9, 11-12 $\text{T}_{:3}$). Le assegnazioni di questi picchi sono state fatte in accordo con *De Waard et al.* ⁽⁵¹⁾ per i PHA ottenuti dall'acido linoleico o dall'olio di semi di lino.

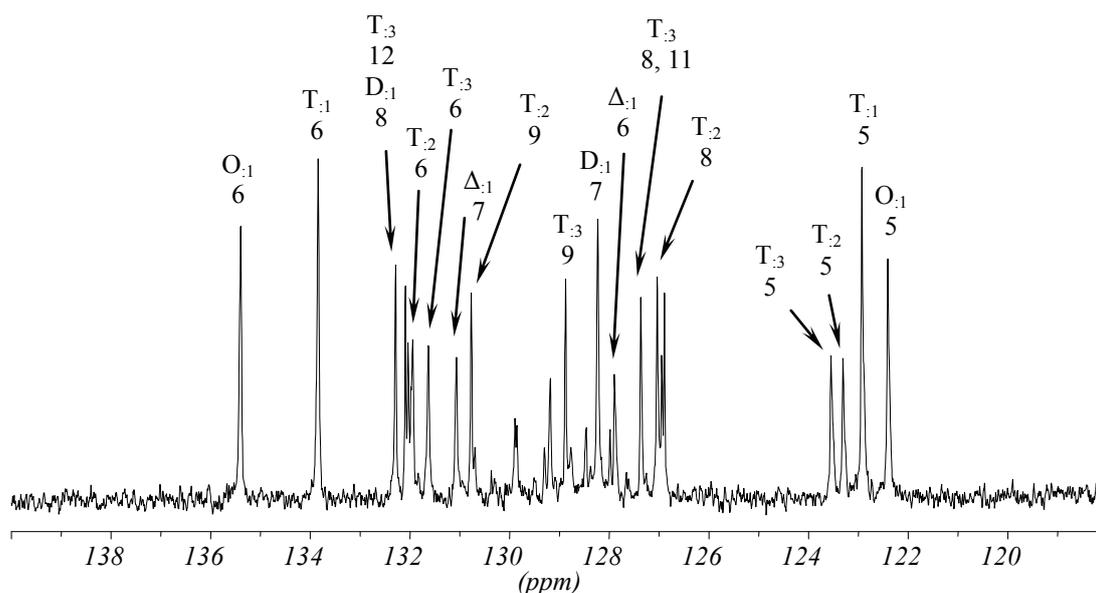


Figura 22: Espansione dello spettro $^{13}\text{C-NMR}$ della regione dei carboni insaturi per il PHA ottenuto da *P. aeruginosa* utilizzando l'olio di *B. carinata*.

La Tabella 9 mostra le proprietà fisiche della serie dei PHA ottenuti quando *P.aeruginosa* è stata fatta crescere con olio di *B. carinata* e con acidi grassi a catena molto lunga.

Tabella 9. Caratteristiche dei PHA ottenuti per fermentazione da *P. aeruginosa* utilizzando olio di *B. carinata* e da acidi grassi a catena molto lunga.

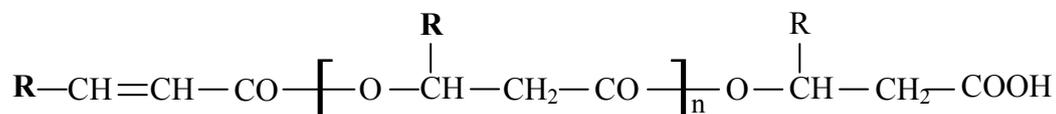
Sustrato	Tg (°C)	Tm (°C)	ΔH_m (J/g)	Mw x 10 ⁻³	Mw/Mn
Olio di <i>B.carinata</i>	-47	-	-	56	1.8
Acido Oleico	-52	-	-	57	2.2
Acido Erucico	-46	50	16.1	122	1.9
Acido Nervonico	-43	50	15.5	114	2

Per i PHA ottenuti da olio di *B. carinata*, acido oleico, erucico e nervonico i pesi molecolari medi ponderali vanno da 56.000 per il PHA da olio di *B. carinata* a 120.000 circa per il PHA da acido erucico o nervonico. I valori di *Tg* vanno da -43°C a -52°C. Solo i PHA ottenuti da acido erucico e da acido nervonico, mostrano una *Tm* di 50°C e ΔH_m di 16 J/g circa. I PHA, ottenuti da acido oleico e olio di *B. carinata*, sono completamente amorfi a differenza di quelli ottenuti da acido erucico e nervonico che sono parzialmente cristallini con caratteristiche simili alla gomma. Tale comportamento è dovuto sia alla struttura base che alle catene laterali in modo del tutto analogo ad altre classi di polimeri a lunga catena.^(44, 47)

Anche in questo caso mediante DSC o analisi ¹³C-NMR non è possibile stabilire se è stato ottenuto un singolo copolimero oppure una miscela di copolimeri o omopolimeri,⁽⁴⁹⁾ per cui si sono analizzati i PHA ottenuti studiando la struttura degli oligomeri generati dalla pirolisi parziale mediante spettrometria di massa ESI.

La Figura 23 mostra lo spettro ESI MS in negativo del pirolizzato parziale del PHA

ottenuto da acido erucico, nella regione che si estende da m/z 250 a m/z 1200. Consiste essenzialmente degli ioni pseudomolecolari $(M-H)^-$ corrispondenti agli oligomeri generati dalla pirolisi, di seguente struttura: ⁽⁴⁹⁾



dove R può essere un gruppo n-propile, n-pentile, n-eptile, n-nonile o n-undecile.

Gli oligomeri, dai dimeri fino ai pentameri identificati nella Figura 23 sono elencati in Tabella 10 insieme alle loro intensità sperimentali e calcolate.

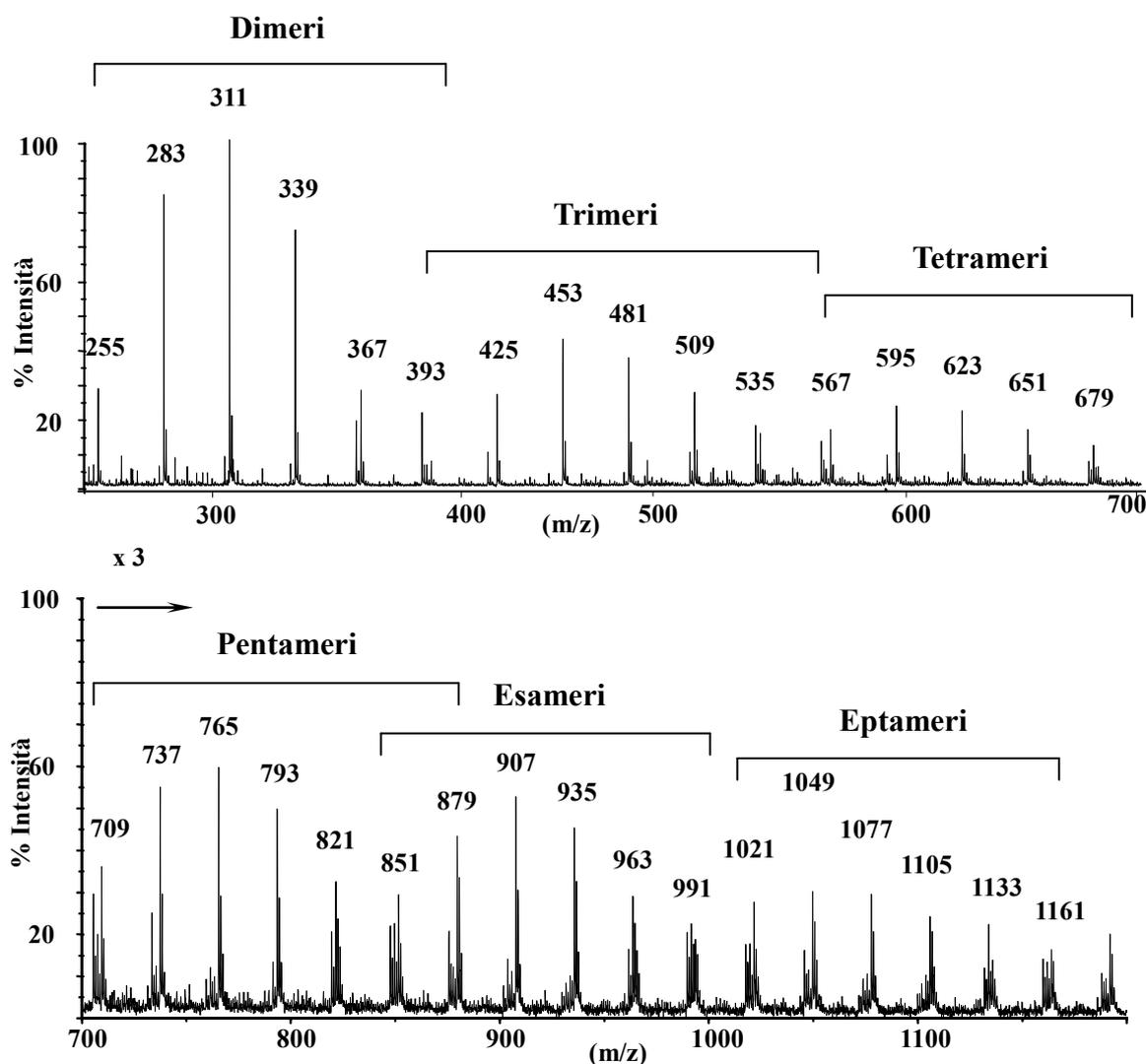


Figura 23: Spettro ESI-MS in negativo dei prodotti di pirolisi parziale del PHA ottenuto da acido erucico.

Il più basso valore di AF è stato ottenuto per la composizione C/O/D/ Δ /T_{:1} calcolata di 8/44/32/10/6 molto vicina a 3/43/36/10/8 ottenuta mediante GC. Gli esameri e oligomeri superiori, seppur individuati, non sono stati inclusi nei calcoli a causa del basso rapporto segnale rumore.

Come per i PHA ottenuti da acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio, anche per questo PHA è possibile concludere che la sequenza delle unità ripetitive è random e che una miscela di omopolimeri o di copolimeri può essere esclusa.

Tabella 10: Quantità sperimentali^a e calcolate^{b,c} dei prodotti di pirolisi parziale del PHA prodotto per fermentazione di *P. aeruginosa* utilizzando l'acido erucico.

C/O/D/Δ/T_{:1} (8/44/32/10/6)^d				
	<i>m/z</i>	ESI^a	GC^b	Cal.^c
<i>Dimeri^e</i>				
C-O	255	10	9	9
C-D; O ₂	283	24	20	24
C- Δ ; O-D	311	26	30	26
O- Δ ; D ₂	339	18	21	19
O-T _{:1}	365	6	7	7
D- Δ	367	8	7	7
D-T _{:1}	393	6	6	4
Δ -T _{:1}	421	2	2	2
<i>Trimeri^e</i>				
C ₂₂	397	4	2	4
C ₂₄	425	12	11	12
C ₂₆	453	20	22	19
C ₂₈	481	18	23	20
C _{30:1}	507	5	5	7
C ₃₀	509	13	14	13
C _{32:1}	535	10	8	9
C ₃₂	537	6	5	5
C _{34:1}	563	8	5	6

Continua nella pagina successiva.

*Segue**Tetrameri^e*

C ₃₂	567	12	7	12
C ₃₄	595	21	17	21
C ₃₆	623	22	23	25
C ₃₈	651	15	20	17
C _{40:1}	677	8	8	6
C ₄₀	679	8	11	8
C _{42:1}	705	8	9	5
C ₄₂	707	5	4	3

Pentameri

C ₃₈	681	5	1	4
C ₄₀	709	11	4	13
C ₄₂	737	16	11	18
C ₄₄	765	20	18	21
C ₄₆	793	14	20	17
C ₄₈	821	9	15	12
C _{50:1}	847	8	10	5
C ₅₀	849	6	8	6
C _{52:1}	875	6	8	3
C _{54:1}	903	5	5	2

^a Intensità relative di ioni (M-H)⁺ dei prodotti di pirolisi dello spettro ESI-MS.

^{b,c} Intensità relative dei prodotti di pirolisi, calcolate mediante la formula di Leibnitz.

^d Composizione media relativa al più basso AF.

^e Tutti i possibili oligomeri isobari contenenti *n* atomi di carbonio sono indicati con C_{*n*}.

In Figura 24 è riportato lo spettro di massa ESI in negativo del pirolizzato parziale del PHA ottenuto dall'olio di *B. carinata*. In questi oligomeri R in catena laterale può essere rappresentato da un gruppo n-pentenile, n-eptenile, n-nonenile, n-undecenile o n-undecatrienile.

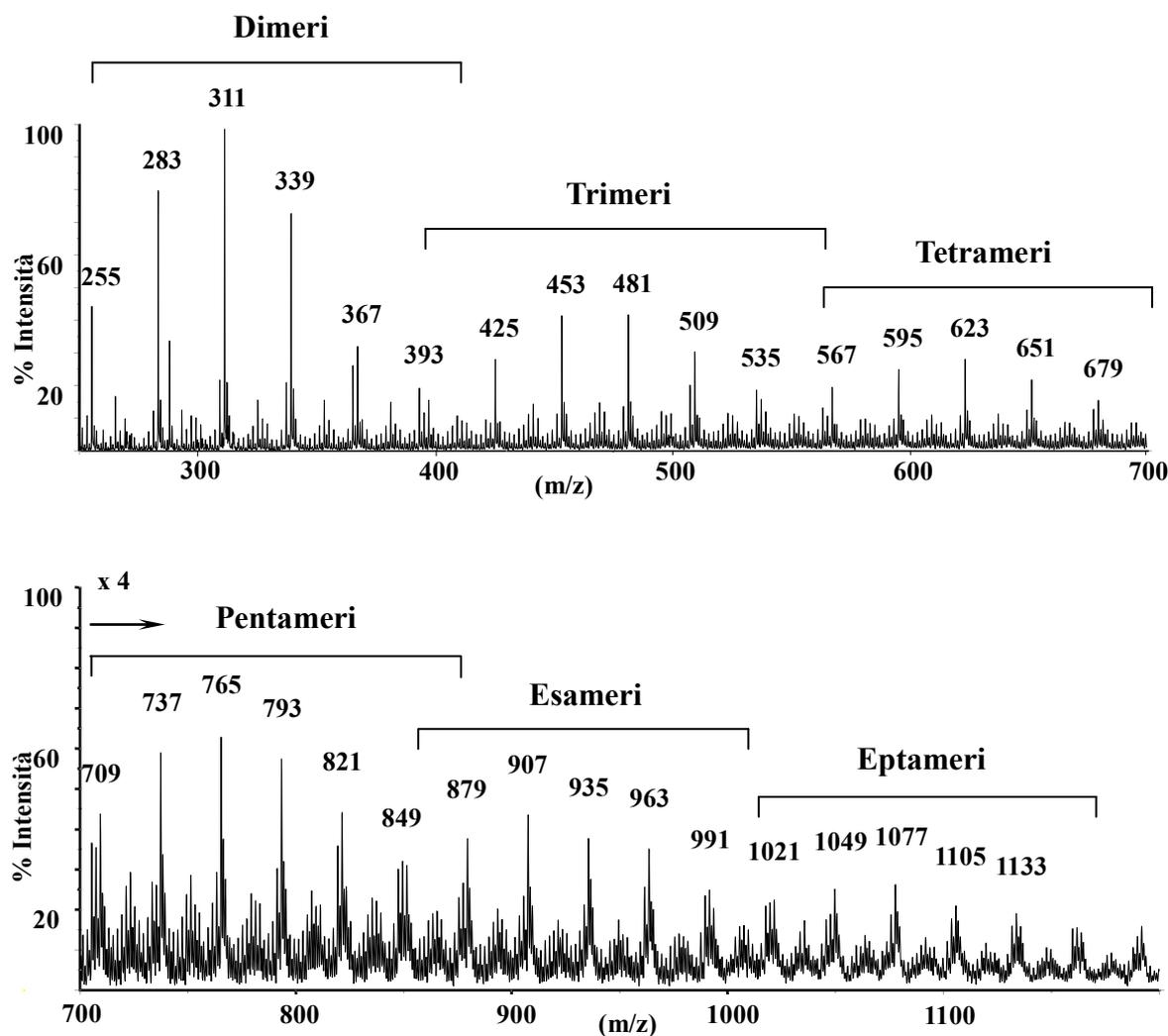


Figura 24: Spettro ESI-MS in negativo dei prodotti di pirolisi parziale del PHA ottenuto da olio di *B. carinata*.

Nello spettro (molto complesso) oltre a i segnali principali riportati in Tabella 11, sono presenti numerosi picchi a bassa intensità. Alcuni di questi sono dovuti ad oligomeri contenenti uno o più doppi legami la cui struttura non è riconducibile a quella indicata precedentemente. Per questi oligomeri non è stato possibile trovare una composizione

comonomerica che permettesse di generare l'AF più basso. Questo può essere spiegato dal fatto che o il campione è costituito da più di un copolimero oppure che durante la pirolisi del PHA si abbiano reazioni secondarie che portano alla formazione di serie di masse differenti per ciascun oligomero.

Tabella 11: Assegnazione dei picchi sperimentali dei prodotti di pirolisi parziale del PHA prodotto per fermentazione di *P. aeruginosa* utilizzando l'olio di *B. carinata*.

<i>m/z</i>	<i>Dimeri</i> ^a	<i>m/z</i>	<i>Trimeri</i> ^b	<i>m/z</i>	<i>Tetrameri</i> ^b	<i>m/z</i>	<i>Pentameri</i> ^b
255	C-O	397	C ₂₂	567	C ₃₂	709	C ₄₀
283	C-D; O ₂	425	C ₂₄	595	C ₃₄	735	C _{42:1}
309	C-Δ ₁ ; O-D ₁	451	C _{26:1}	621	C _{36:1}	737	C ₄₂
311	C-Δ; O-D	453	C ₂₆	623	C ₃₆	763	C _{44:1}
337	C-T ₁ ; O-Δ ₁ ; D-D ₁	479	C _{28:1}	649	C _{38:1}	765	C ₄₄
339	O-Δ; D ₂	481	C ₂₈	651	C ₃₈	791	C _{46:1}
365	O-T ₁ ; D-Δ ₁	507	C _{30:1}	677	C _{40:1}	793	C ₄₆
367	D-Δ	509	C ₃₀	679	C ₄₀	819	C _{48:1}
393	D-T ₁	535	C _{32:1}	705	C _{42:1}	821	C ₄₈
395	Δ ₂	537	C ₃₂	707	C ₄₂	847	C _{50:1}
		563	C _{34:1}			849	C ₅₀
		565	C ₃₄				

^a C = 3-idrossiesanoato; O = 3-idrossiottanoato; O₁ = 3-idrossi-5-ottenoato; D = 3-idrossidecanoato; D₁ = 3-idrossi-7-decenoato; Δ = 3-idrossidodecanoato; Δ₁ = 3-idrossi-6-dodecenoato; T₁ = 3-idrossi-5-tetradecenoato; T₂ = 3-idrossi-5,8-tetradecadienoato; T₃ = 3-idrossi-5,8,11-tetradecatrienoato.

^b Tutti i possibili oligomeri isobari contenenti *n* atomi di carbonio sono indicati con C_{*n*}.

3.2 Transesterificazione acido catalizzata come metodo per ottenere copolimeri P(HB-co-CL) e terpolimeri P(HB-co-HV-co-CL)

Diversi copolimeri P(HB-co-CL) sono stati sintetizzati mediante reazioni di transesterificazione tra i corrispondenti omopolimeri PHB e PCL in presenza di acido *p*-toluensolfonico monoidrato (PTSA) variando alcuni parametri rispetto a quelli precedentemente utilizzati.⁽⁵³⁾

La sintesi viene condotta in due differenti stadi: nel primo, una soluzione di PHB e PCL in cloroformio/toluene viene portata a riflusso, in presenza di PTSA. In queste condizioni prevale la reazione di idrolisi rispetto alla transesterificazione. Nel secondo stadio della reazione, l'acqua viene allontanata azeotropicamente mediante una trappola Dean-Stark, in modo da favorire la reazione di transesterificazione. La soluzione viene concentrata in rotavapor, ripresa nel minimo volume di cloroformio e precipitata in etanolo (1:10 V/V). La soluzione etanolica viene centrifugata, il precipitato viene lavato nuovamente con etanolo e essiccato in stufa da vuoto. Durante esperimenti condotti omettendo il primo stadio e conducendo la reazione in condizioni anidre, all'inizio non è stata osservata alcuna reazione di interscambio a tempi di reazione fino a 24 ore. Da questa evidenza si può concludere che la reazione avviene via attacco nucleofilo acido catalizzato del gruppo alcolico terminale sul carbonile estereo.

Senza la preventiva idrolisi, la concentrazione dei gruppi idrossilici è troppo bassa affinché la reazione di transesterificazione possa procedere. La quantità di acqua nel sistema gioca un ruolo cruciale: durante il primo stadio determina il grado di depolimerizzazione del PCL e del PHB i quali, a turno, sono responsabili della concentrazione dei gruppi idrossilici nell'ambiente di reazione. Durante il secondo stadio, la sua rimozione determina uno spostamento dell'equilibrio a favore del legame estereo.

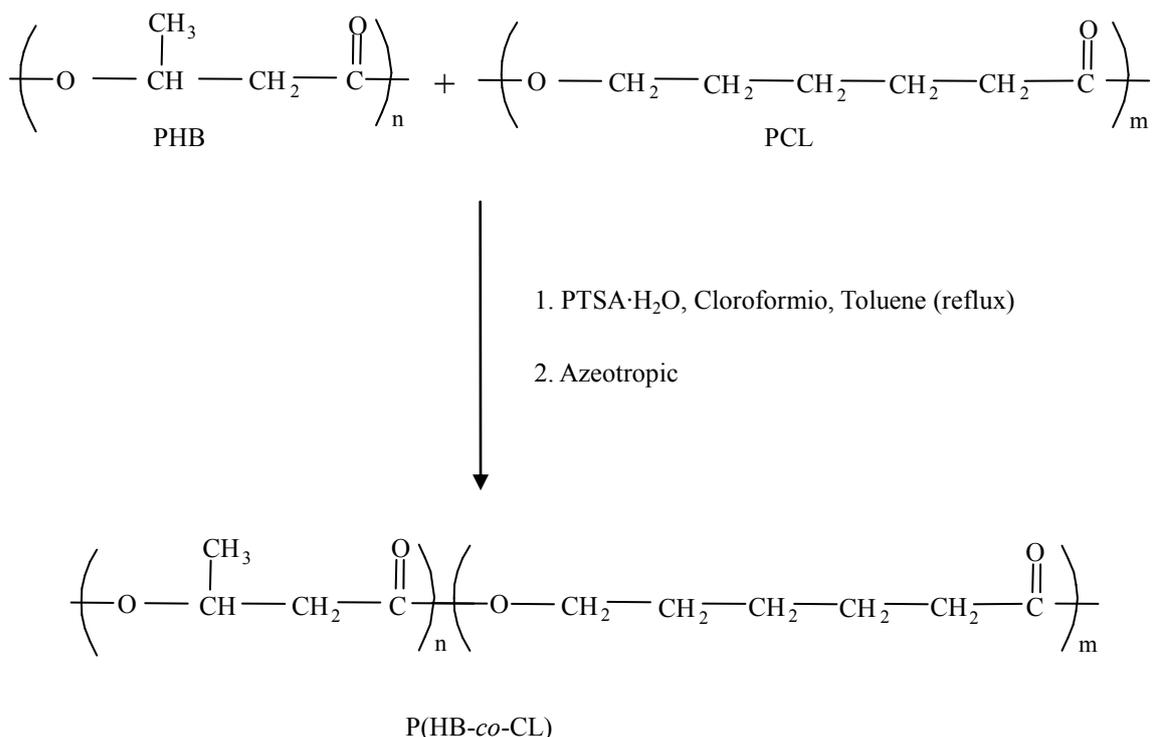


Figura 25: Schema di sintesi dei copolimeri P(HB-co-CL).

Tutti i copolimeri P(HB-co-CL) sintetizzati precedentemente sono stati ottenuti utilizzando il 5% di catalizzatore. Tale quantità ha reso necessario l'impiego di tempi di reazione molto lunghi per ottenere un grado di transesterificazione alto. L'analisi degli spettri $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ inoltre ha mostrato segnali attribuibili al catalizzatore legato al polimero.

Utilizzando la stessa procedura sintetica, ma raddoppiando le quantità di catalizzatore (10%) e impiegando le microonde come alternativa al riscaldamento convenzionale ho cercato di ridurre i tempi di reazione e di ottenere nuovi copolimeri con vario grado di transesterificazione e di randomness in cui risultati bassissima o assente la presenza di PTSA. Infatti è possibile che la presenza del catalizzatore possa ridurre la biocompatibilità del materiale polimerico rendendone problematico l'impiego in campo medico farmaceutico.

In Tabella 12 sono messi a confronto i dati di otto copolimeri P(HB-*co*-CL) ottenuti utilizzando il 10% di catalizzatore e con identiche condizioni di reazione ma differente metodica di riscaldamento: convenzionale per i primi quattro, microonde per gli altri.

La Tabella 12 mostra per i differenti copolimeri, i rapporti molari HB/CL dei copolimeri ottenuti, le rese, i loro pesi molecolari medi (M_w), gli indici di polidispersione (M_w/M_n), il grado di transesterificazione (DT) e di randomness (DR) alla fine della reazione.

Tabella 12: Condizioni di transesterificazione, rese, peso molecolare, grado di transesterificazione e randomness dei copolimeri P(HB-*co*-CL).

Campione	HB/CL ^a	Resa (%)	$M_w \cdot 10^{-3}$ ^b	M_w/M_n ^c	DT ^d	DR ^e	RT(h) ^f
<i>Riscaldamento</i>							
<i>convenzionale</i>							
A	54/46	15	7.8	1.41	0.16	0.3	3
B	45/55	23	n.c.	n.c.	0.21	0.52	4
C	75/25	19	n.c.	n.c.	0.42	0.92	5
D	55/45	10	7.9	1.3	0.37	0.74	7
<i>Riscaldamento</i>							
<i>microonde</i>							
E	55/45	52	5.2	1.3	0.1	0.21	3
F	48/52	49	6.4	1.27	0.12	0.25	4
G	55/45	30	9	1.2	0.17	0.36	5
H	46/54	26	12	1.24	0.31	0.63	7

^a Frazione molare del copolimero ottenuto. ^b Peso molecolare medio ponderale.

^c Distribuzione del peso molecolare, ^d Grado di transesterificazione, ^e Grado di randomness, ^f Tempo di reazione.

Di seguito vengono riportati gli spettri ¹H-NMR e ¹³C-NMR dei copolimeri D e H ottenuti con il 10% di catalizzatore, rispettivamente, mediante riscaldamento convenzionale e microonde, con le corrispondenti attribuzioni.

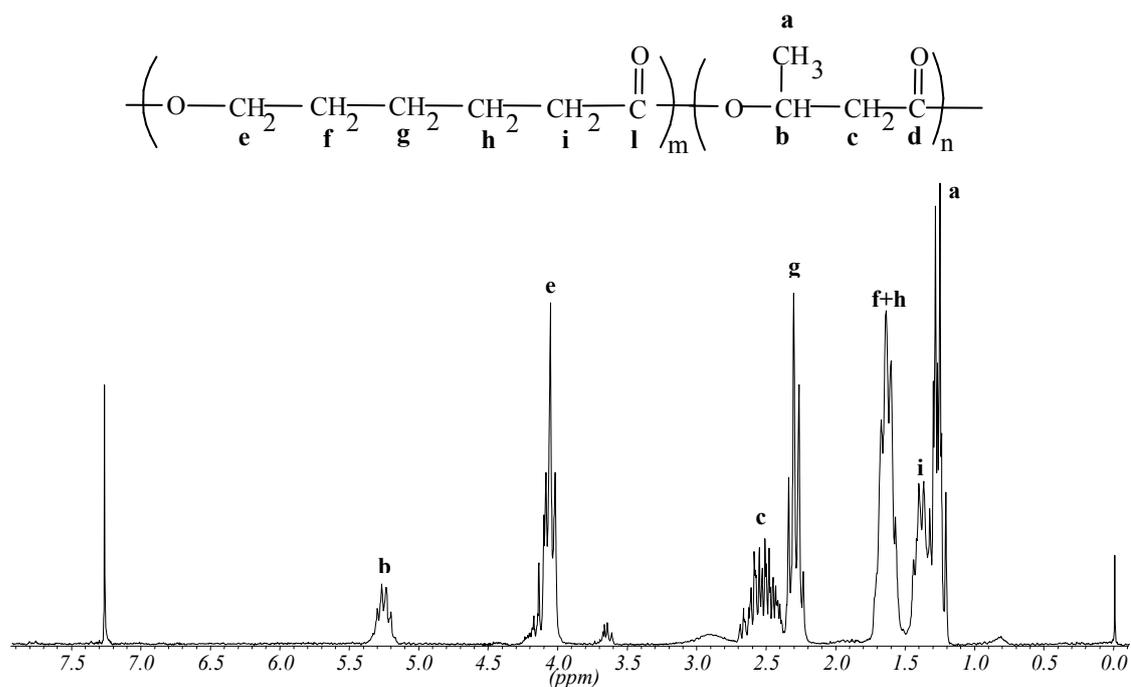


Figura 26: Spettro $^1\text{H-NMR}$ a 200 MHz del copolimero P(HB-co-45%mol CL) (campione D) ottenuto mediante riscaldamento convenzionale.

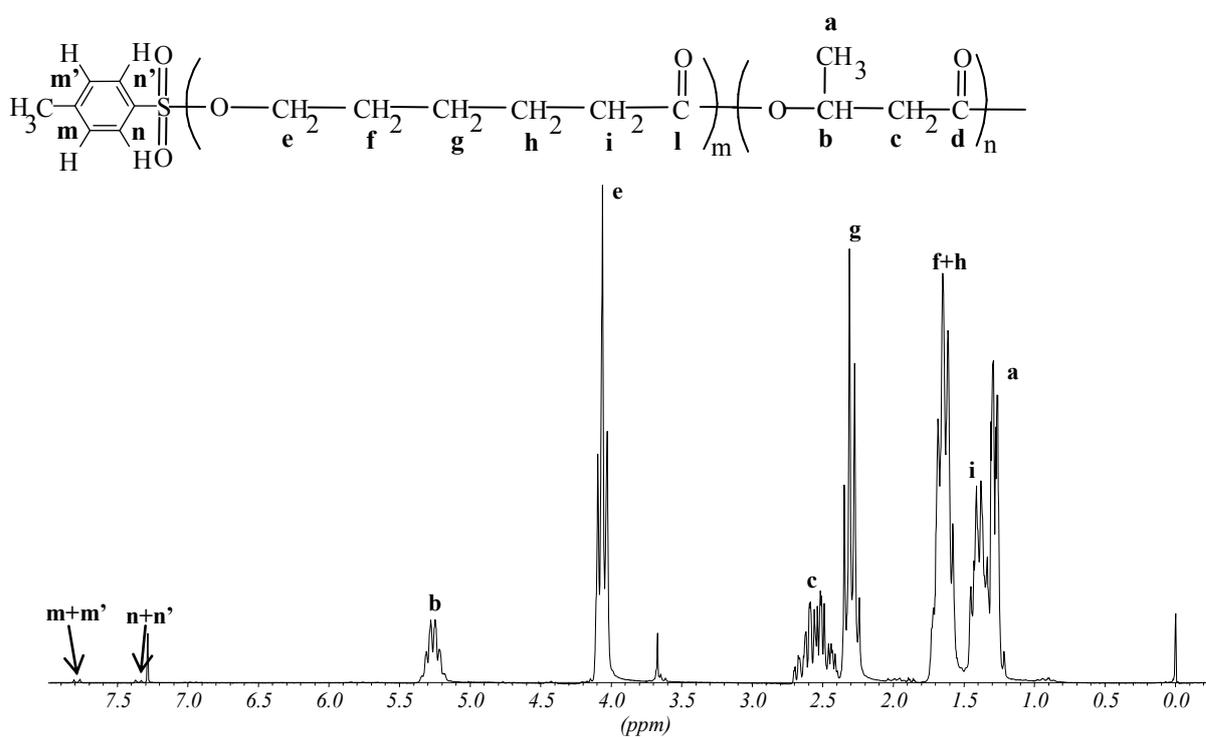


Figura 27: Spettro $^1\text{H-NMR}$ a 200 MHz del copolimero P(HB-co-54%mol CL) (campione H) ottenuto mediante riscaldamento microonde.

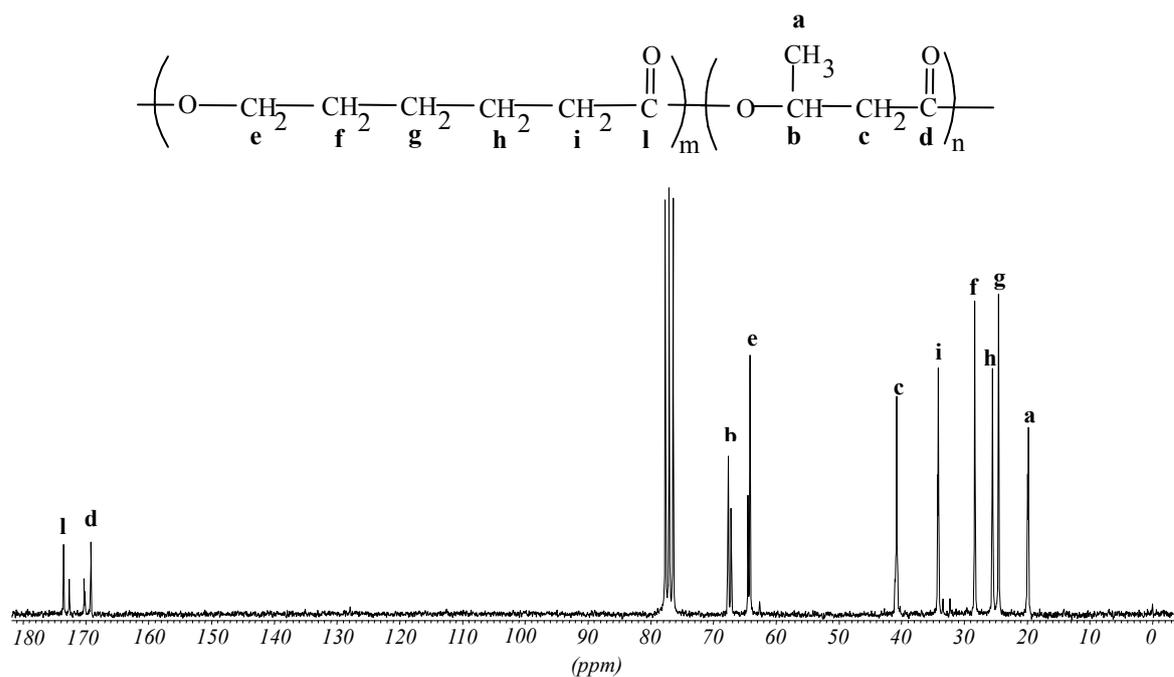


Figura 28: Spettro ¹³C-NMR a 50 MHz del copolimero P(HB-co-45%mol CL) (campione D) ottenuto mediante riscaldamento convenzionale.

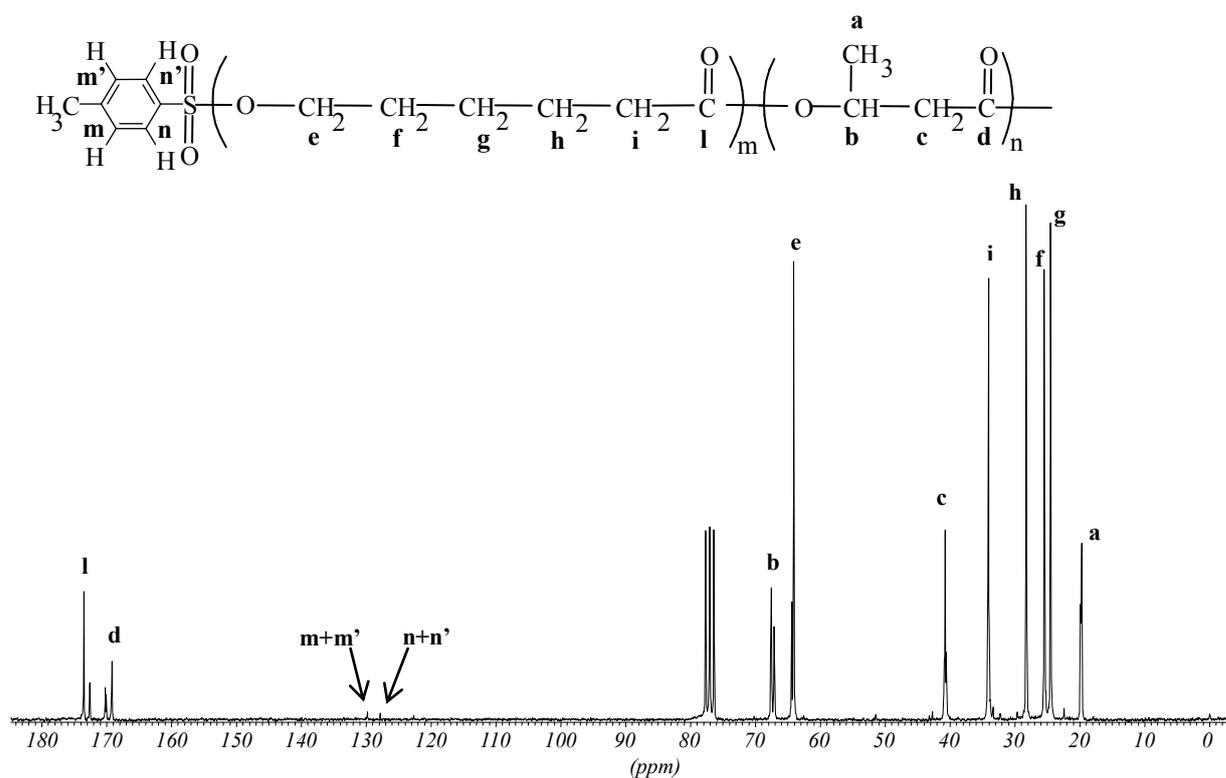


Figura 29: Spettro ¹³C-NMR a 50 MHz del copolimero P(HB-co-54%mol CL) (campione H) ottenuto mediante riscaldamento microonde.

Nello spettro $^1\text{H-NMR}$ del campione H oltre i segnali relativi all' HB e al CL, sono presenti due doppietti a 7.35 e 7.79 ppm con la stessa costante di accoppiamento (8.2 Hz). Questi segnali rimangono inalterati anche dopo ripetuti cicli di dissoluzione in cloroformio e precipitazione in alcol etilico e possono essere attribuiti al gruppo tostile come gruppo terminale. Il singoletto relativo al metile dell'estere del PTSA è stato trovato a 2.45 ppm, sovrapposto ai segnali dei metileni dell' HB. La presenza di catalizzatore legato è ulteriormente confermata dalla presenza nello spettro $^{13}\text{C-NMR}$ di segnali a bassa intensità centrati a 127.8 e 129.8 ppm appartenenti ai carboni metinici del gruppo PTSA terminale; i loro valori di chemical shift sono quasi simili a quelli dell'estere etilico del PTSA, preso come composto modello. Il carbonio metilico risuona a 21.58 ppm.

Nel campione D non si notano i segnali del gruppo *p*-toluensolfonico, mancano infatti i due doppietti relativi ai protoni del gruppo tostile nello spettro $^1\text{H-NMR}$ e i segnali a bassa intensità dei carboni metinici del gruppo *p*-toluensolfonico terminale nello spettro $^{13}\text{C-NMR}$.

La sequenza e l'evidenza della transesterificazione sono state ottenute mediante $^{13}\text{C-NMR}$. La Figura 31 mostra l'espansione della regione dei carbonili relativi al copolimero H in cui sono riportate le assegnazioni delle triadi, in accordo con dati riportati in letteratura.⁽⁵⁴⁾

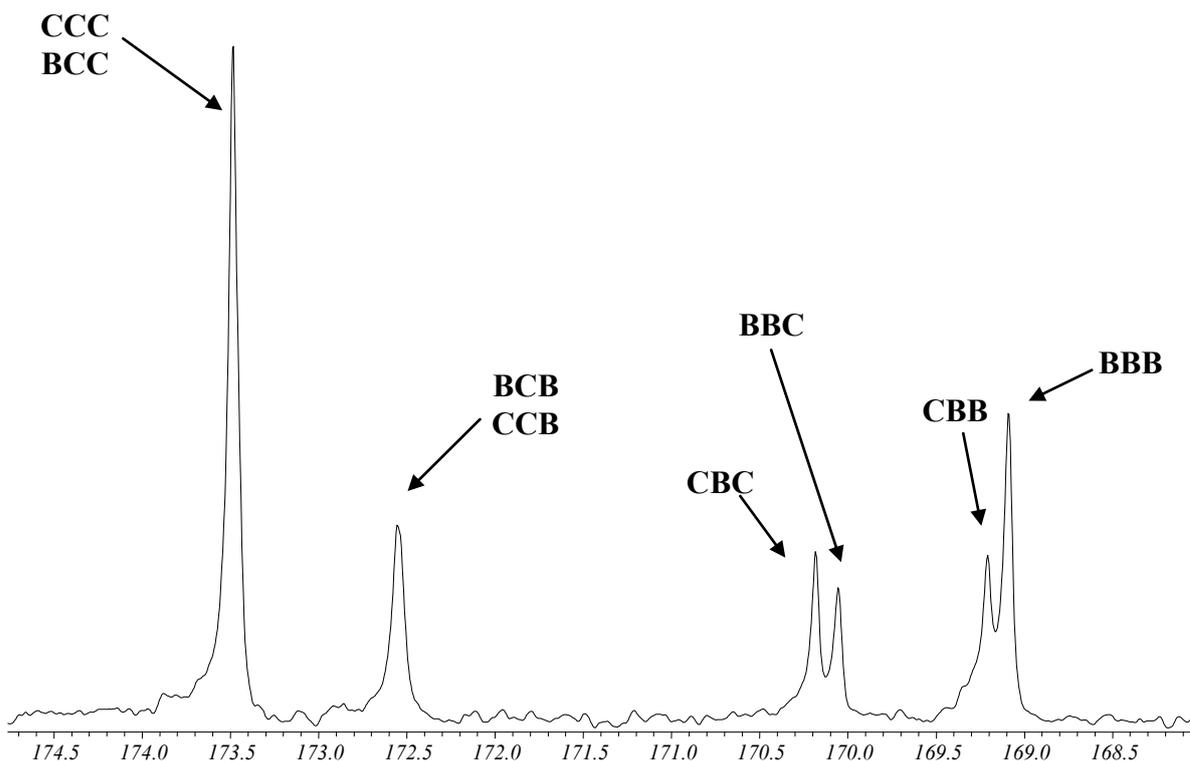


Figura 30: Espansione dello spettro ^{13}C -NMR della regione dei carbonili per il copolimero H.

Poiché i segnali relativi alle triadi sono solo parzialmente risolti, l'analisi delle sequenze è stata basata solo sull'intensità delle diadi. Indicando con I_{BB} , I_{BC} , I_{CB} ed I_{CC} le intensità normalizzate delle sequenze relative alle diadi HB-HB, HB-CL, CL-HB e CL-CL, abbiamo utilizzato le definizioni adottate da Yamadera & Murano ⁽⁵⁴⁾ di lunghezza media dei blocchi omologhi delle unità di HB ed CL (L_B ed L_C), di grado di transesterificazione (DT) e grado di randomness (DR):

$$\bar{L}_B = \frac{2X_B}{(I_{BC} + I_{CB})} \quad \bar{L}_C = \frac{2X_C}{(I_{BC} + I_{CB})}$$

dove X_B e X_C rappresentano la frazione molare delle diadi di HB ed CL, calcolabili

mediante le equazioni:

$$X_B = r_{BB} + \frac{1}{2}(I_{BC} + r_{CB}) \quad X_C = r_{CC} + \frac{1}{2}(I_{BC} + r_{CB})$$

$$DT = r_{BC} + r_{CB} \quad DR = \frac{1}{L_B} + \frac{1}{L_C}$$

Da queste relazioni possono essere calcolati rispettivamente i valori del grado di transesterificazione e del grado di randomness. Per un copolimero random con composizione 1:1, questi parametri dovrebbero assumere valori di $L_B = L_C = 2$, $DT = 0.5$ e $DR = 1$.

Per il copolimero D un'ulteriore conferma della completa eliminazione del catalizzatore, accanto all'analisi $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ ci è stata data dalla spettrometria di massa MALDI- TOF. Questa tecnica è stata impiegata nell'analisi dei gruppi terminali dei copolimeri sintetizzati. Analizzando campioni a basso indice di polidispersione, i dati ottenuti mediante spettrometria di massa MALDI corrispondono ai risultati ottenuti mediante tecniche convenzionali. Al contrario, con polimeri aventi alto indice di polidispersione la spettrometria di massa MALDI si è dimostrata incapace di stimare correttamente il peso molecolare, inoltre la qualità degli spettri ottenuti è risultata molto bassa. Questa difficoltà può essere superata frazionando il materiale polidisperso mediante Gel Permeation Chromatography (GPC). Le frazioni del polimero analizzate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF hanno fornito buoni spettri. In Figura 31 è riportato lo spettro MALDI-TOF della frazione eluita dopo il massimo del tracciato GPC del copolimero P(HB-co- 45 mol%CL) (campione D).

Lo spettro in Figura 31 è centrato a circa m/z 6000 e l'espansione da m/z 5750 a m/z 5950 mostra picchi intensi che corrispondono agli oligomeri sodio-cationizzati di tipo:

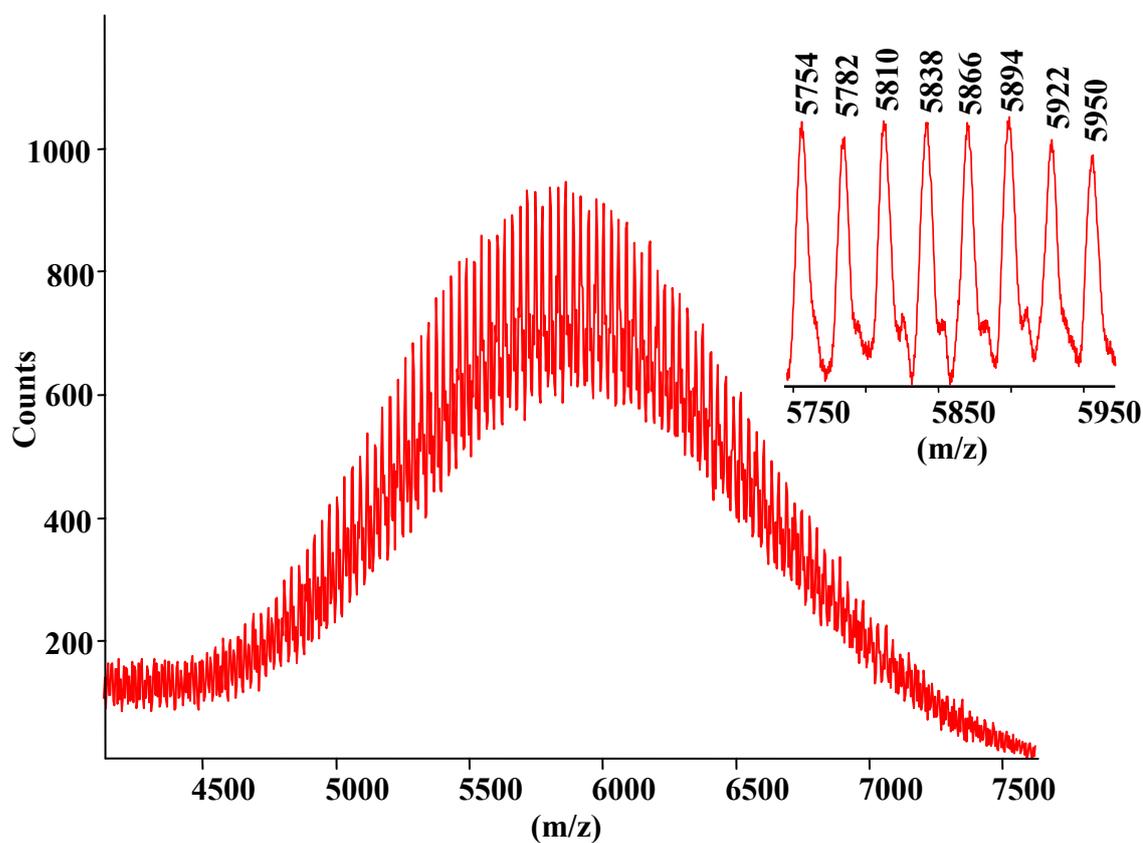
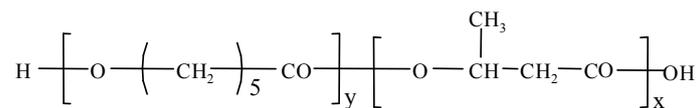


Figura 31: Spettro MALDI-TOF della frazione eluita dopo il massimo del tracciato GPC del copolimero P(HB-*co*- 45 mol%CL) (campione D).

La Tabella 13 riporta le assegnazioni di massa per ciascun picco delle regioni espanse di Figura 31, corrispondenti agli ioni che contribuiscono maggiormente all'intensità del segnale. Significativamente, i segnali sono separati di 28 amu che sono la differenza tra i pesi molecolari delle due unità ripetitive.

Tabella 13: Assegnazioni di massa MALDI-TOF degli oligomeri presenti nelle frazioni eluenti dal tracciato GPC del copolimero P(HB-*co*- 45 mol%CL) (campione D).

<i>Struttura degli oligomeri</i>	[MNa] ⁺ m/z (x,y) ^a
$\text{H} \left[\text{O} \left(\text{CH}_2 \right)_5 \text{CO} \right]_y \left[\text{O} \overset{\text{CH}_3}{\text{CH}} \text{CH}_2 \text{CO} \right]_x \text{OH}$	5670 (23,32); 5698 (22,33); 5726 (21,34); 5754 (20,35); 5782 (19,36); 5810 (18,37); 5838 (17,38); 5866 (16,39); 5894 (15,40); 5922 (14,41); 5950 (13,42); 5978 (12,43); 6006 (11,44); 6034 (10,45)

^a I numeri in parentesi corrispondono al numero di unità ripetitive contenute in ciascuna struttura.

La composizione (HB)_x(CL)_y, che contribuisce principalmente, va da 20 a 25 per HB e da 32 a 35 per CL.

Va evidenziato inoltre che i copolimeri ottenuti mediante riscaldamento convenzionale presentano rese molto più basse a parità di ore di reazione rispetto a quelli ottenuti mediante microonde. Questo risultato potrebbe giustificare l'impiego di tale metodica al posto della convenzionale anche a discapito di piccole quantità di acido legate.

Sono stati ottenuti inoltre diversi terpolimeri mediante reazione di transesterificazione tra il copolimero P(HB-co-24%mol HV), e PCL utilizzando il 10% di catalizzatore e la stessa procedura sintetica impiegata per i copolimeri P(HB-co-CL). In Tabella 14 sono riportati i dati di 6 terpolimeri P(HB-co-HV-co-CL) ottenuti sia attraverso riscaldamento convenzionale che mediante l'uso delle microonde. In Figura 32 viene riportato lo schema di sintesi dei terpolimeri P(HB-co-HV-co-CL).

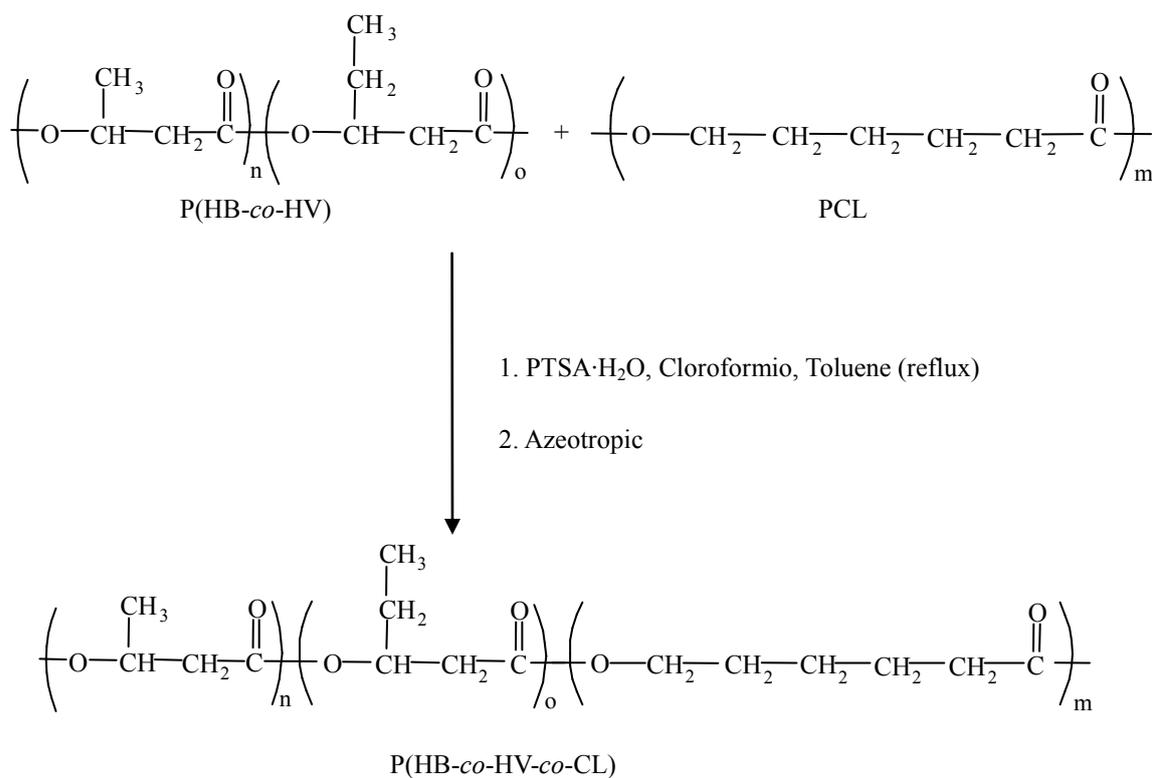


Figura 32: Schema di sintesi dei terpolimeri P(HB-co-HV-co-CL).

La Tabella 14 mostra per i differenti terpolimeri, i rapporti molari HB/HV/CL dei terpolimeri ottenuti, le rese, i loro pesi molecolari medi (M_w), gli indici di polidispersione (M_w/M_n), il grado di transesterificazione (DT) e di randomness (DR) alla fine della reazione.

Tabella 14: Condizioni di transesterificazione, rese, peso molecolare, grado di transesterificazione e randomness dei terpoliesteri P(HB-co-HV-co-CL).

Campione	HB/HV/CL ^a	Resa(%)	Mw·10 ^{-3b}	Mw/Mn ^c	DT ^d	DR ^e	RT(h) ^f
<i>Riscaldamento convenzionale</i>							
L	51/15/34	30	6.7	1.36	0.61	1.41	3
M	47/12/41	20	11.3	1.16	0.71	1.05	4
N	48/13/39	20	8.1	1.12	0.81	1.54	5
<i>Riscaldamento microonde</i>							
P	62/14/24	51	8.1	1.3	0.58	0.64	3
Q	58/15/27	37.5	9.1	1.19	0.7	1.27	4
R	68/13/19	35	6.7	1.20	0.75	1.47	5

^a Frazione molare del terpolimero ottenuto. ^b Peso molecolare medio ponderale.

^c Distribuzione del peso molecolare, ^d Grado di transesterificazione, ^e Grado di randomness, ^f Tempo di reazione.

Come per i copolimeri, anche in questo caso si osserva un forte aumento delle rese utilizzando le microonde a parità di grado di transesterificazione e randomness.

Nelle Figure 33, 34, 35, 36 sono messi a confronto gli spettri ¹H-NMR e ¹³C-NMR dei terpolimeri M e Q ottenuti rispettivamente utilizzando le stesse condizioni di reazione ma differente metodica di riscaldamento: convenzionale per il primo, microonde per il secondo.

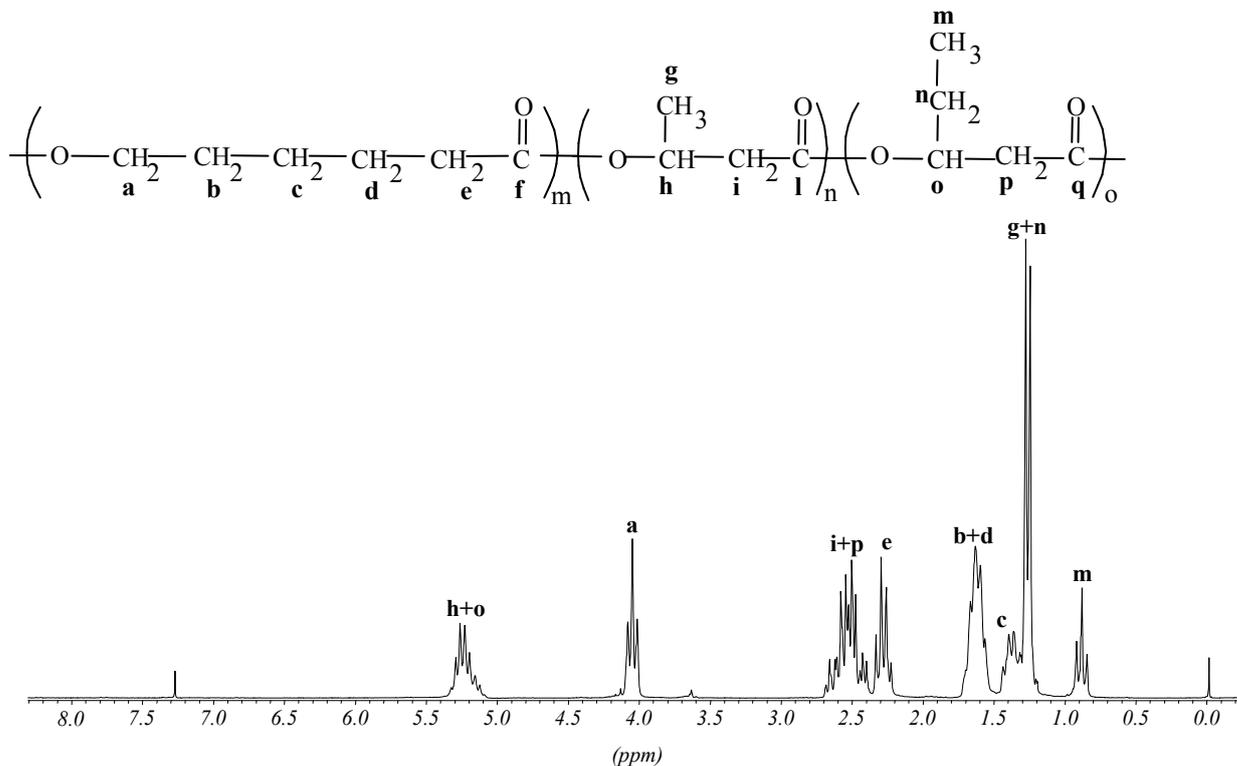


Figura 33: Spettro ¹H-NMR a 200 MHz del terpolimero P(HB-co-12%mol HV-co-41%mol CL) (campione M).

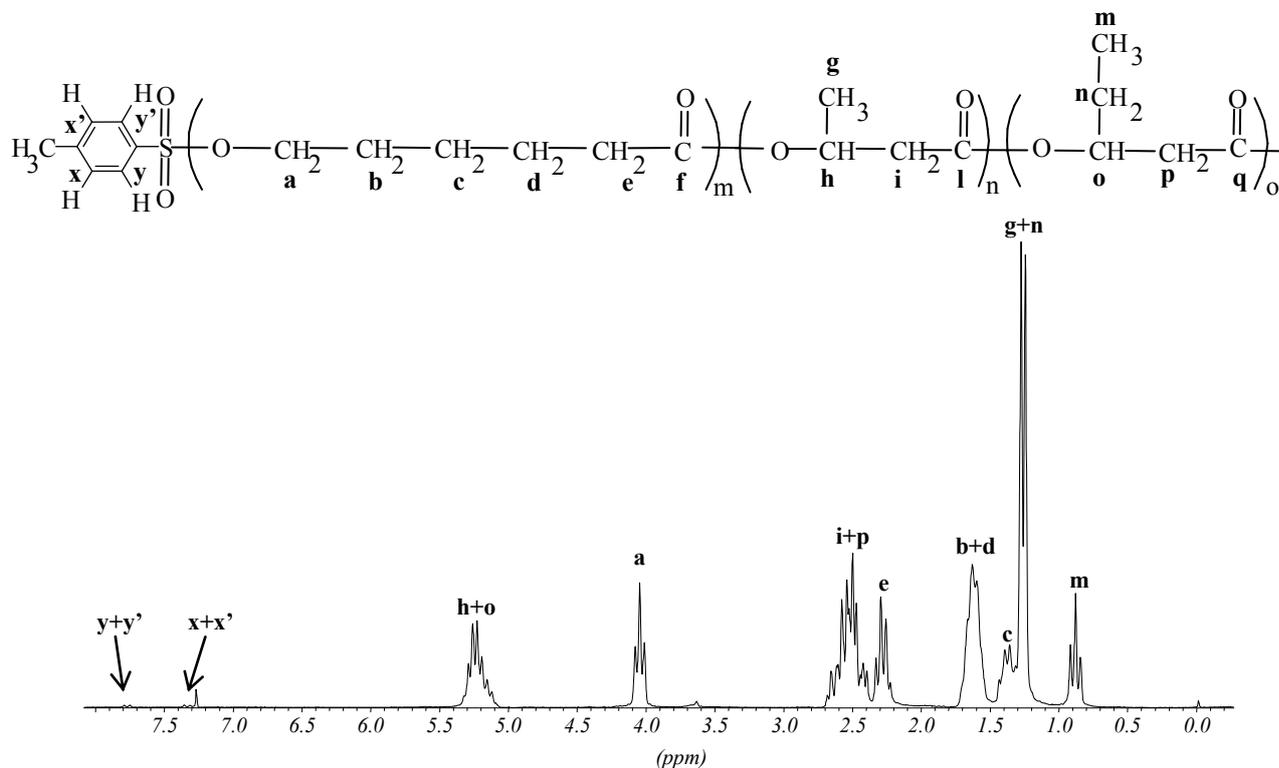


Figura 34: Spettro ¹H-NMR a 200 MHz del terpolimero P(HB-co-15%mol 3HV-co-27%mol CL) (campione Q).

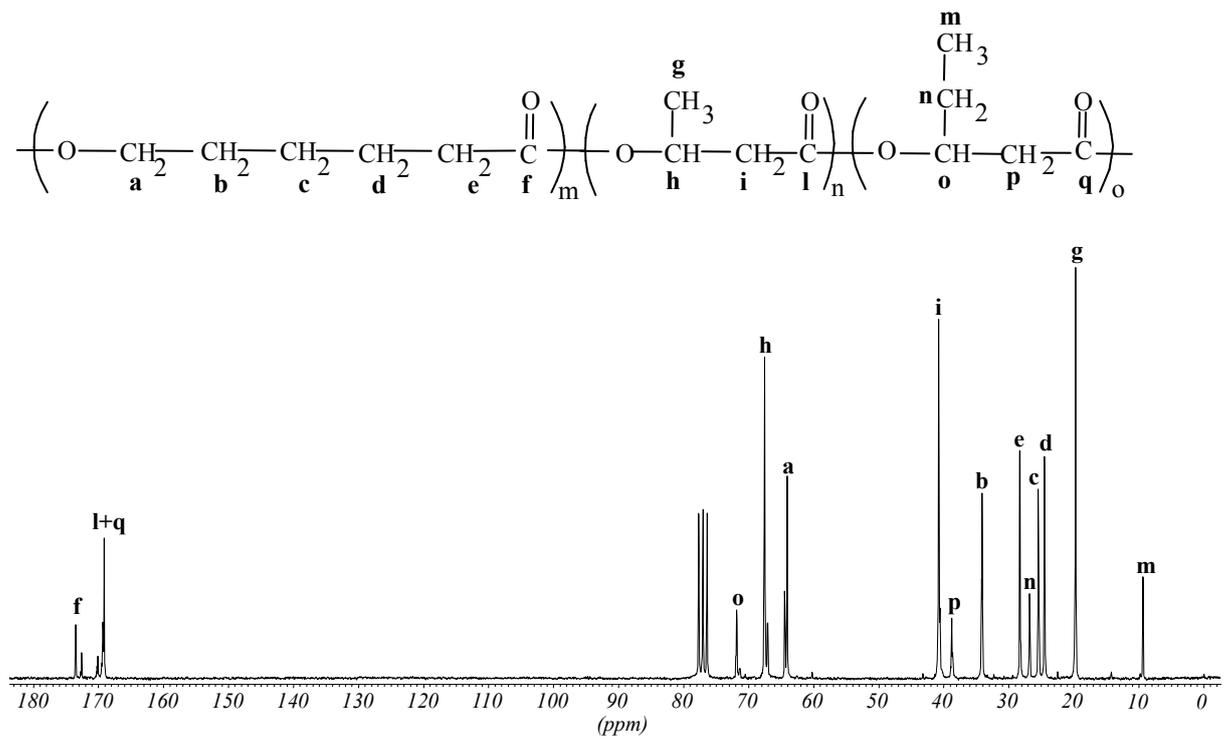


Figura 35: Spettro ¹³C-NMR a 50 MHz del terpolimero P(3HB-co-12%mol 3HV-co-41%mol CL) (campione M).

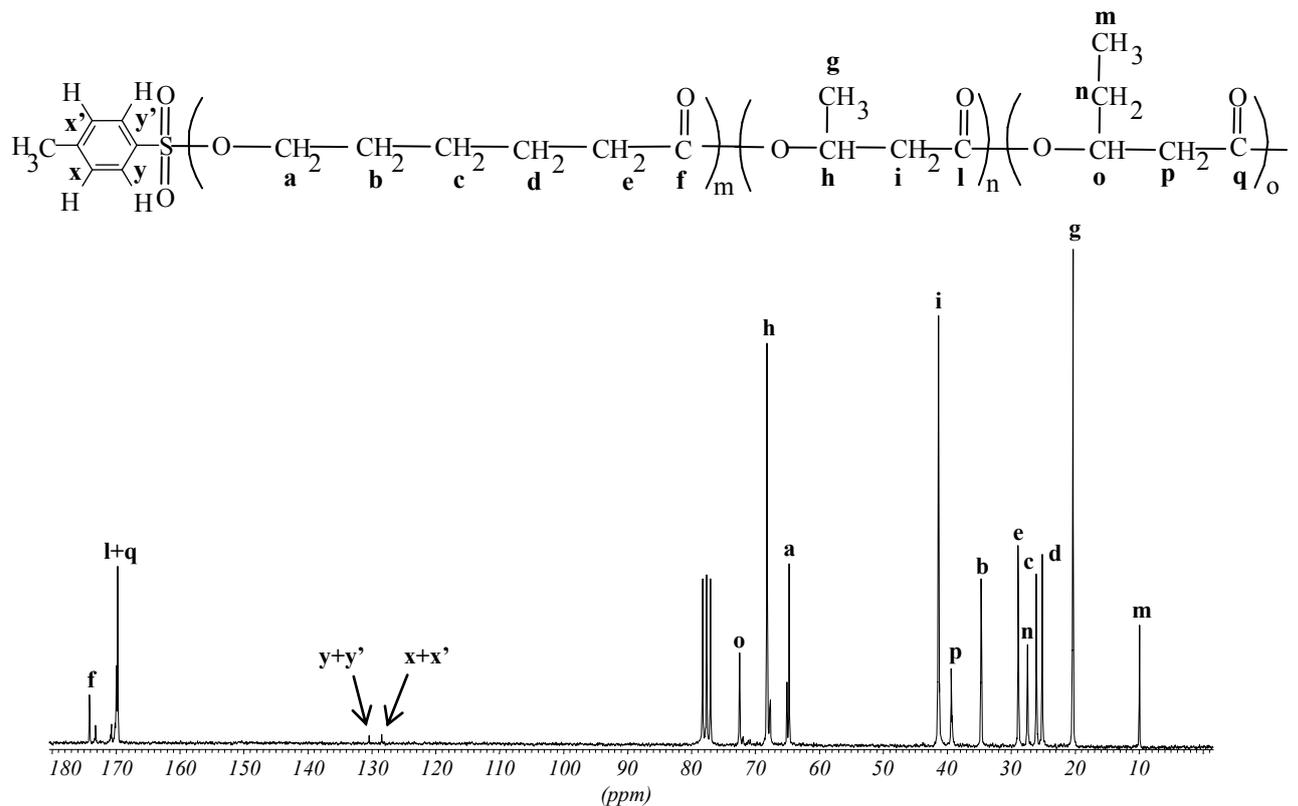


Figura 36: Spettro ¹³C-NMR a 50 MHz del terpolimero P(HB-co-15%mol HV-co-27%mol CL) (campione Q).

Nello spettro ^1H -NMR del campione Q sono presenti i due doppietti a 7.53 e 7.79 ppm attribuiti al gruppo tosile, evidenza confermata dall'analisi dello spettro ^{13}C -NMR in cui sono presenti segnali a bassa intensità centrati a 127.8 e 129.8 ppm che appartengono ai carboni metinici del gruppo PTSA terminale, segnali assenti negli spettri corrispondenti del terpolimero M.

La sequenza e l'evidenza della transesterificazione sono state ottenute mediante ^{13}C -NMR. In Figura 37 è riportata l'espansione della regione dei carbonili relativa al terpolimero M in cui sono riportate le assegnazioni delle diadi.

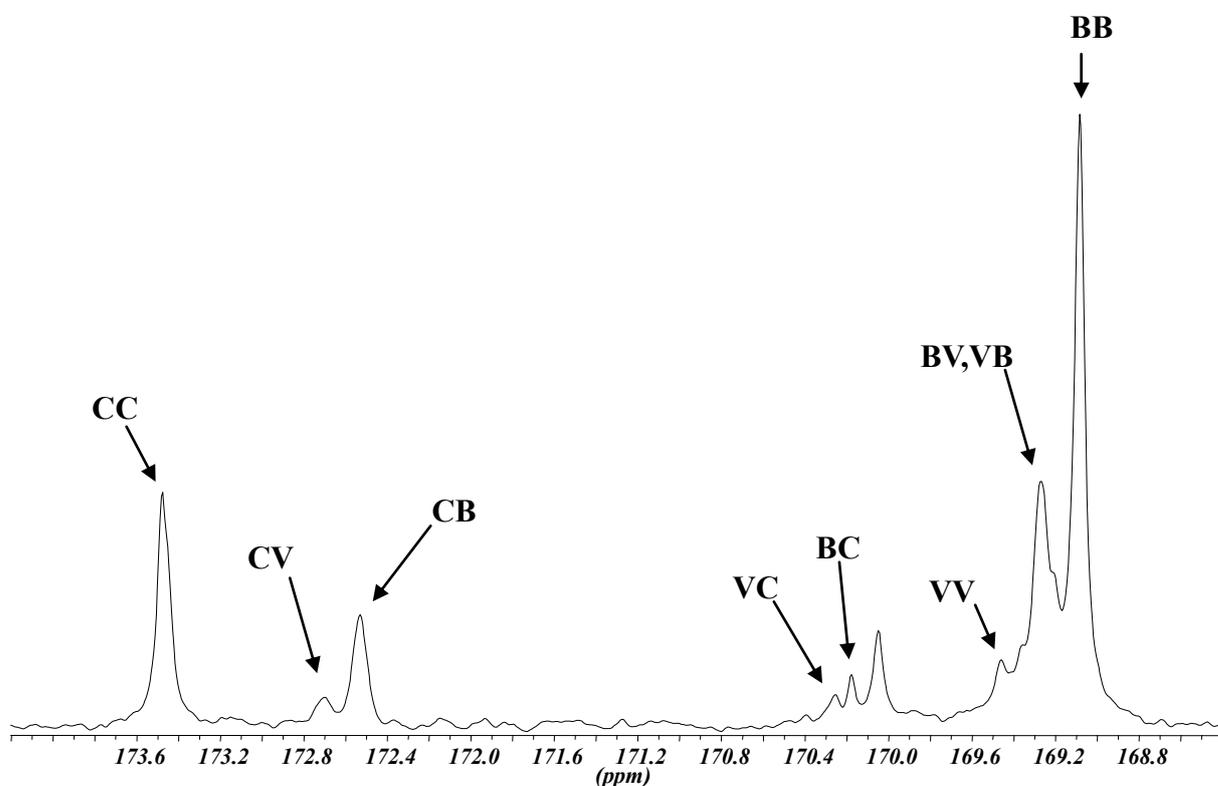


Figura 37: Espansione dello spettro ^{13}C NMR della regione dei carbonili del terpolimero M.

L'analisi delle sequenze si è basata solo sull'intensità delle diadi, essendo i segnali relativi alle triadi solo parzialmente risolti. Indicando con I_{BB} , I_{BC} , I_{CB} , I_{CC} , I_{VV} , I_{VC} , I_{CV} , I_{BV} , I_{VB} le intensità normalizzate dei segnali dovuti alle sequenze HB-HB, HB-CL, CL-HB e CL-CL, HV-HV, HV-CL, CL-HV, HB-HV, HV-HB abbiamo utilizzato le

definizioni adottate da Yamadera & Murano, ⁽⁵⁴⁾ opportunamente modificate, di lunghezza media dei blocchi omologhi delle unità di HB, HV e CL (L_B , L_V e L_C), di grado di transesterificazione (DT) e grado di randomness (DR):

$$\bar{L}_B = \frac{2X_B}{(I_{CB} + r_{BC} + r_{CV} + r_{BV} + r_{VB})} \quad \bar{L}_V = \frac{2X_V}{(I_{CB} + r_{BC} + r_{CV} + r_{BV} + r_{VB})}$$

$$\bar{L}_C = \frac{2X_C}{(I_{CB} + r_{BC} + r_{CV} + r_{BV} + r_{VB})}$$

dove X_B , X_V e X_C rappresentano la frazione molare delle diadi di HB HV e CL, calcolabili mediante le equazioni:

$$X_B = r_{BB} + \frac{1}{2}(I_{CB} + r_{BC} + r_{CV} + r_{BV} + r_{VB})$$

$$X_V = r_{VV} + \frac{1}{2}(I_{CB} + r_{BC} + r_{CV} + r_{BV} + r_{VB})$$

$$X_C = r_{CC} + \frac{1}{2}(I_{CB} + r_{BC} + r_{CV} + r_{BV} + r_{VB})$$

Da queste relazioni possono essere calcolati rispettivamente i valori del grado di transesterificazione e del grado di randomness:

$$DR = \frac{1}{L_B} + \frac{1}{L_C} + \frac{1}{L_V}$$

$$DT = \frac{I_{CB} + I_{BC} + I_{CV} + I_{VC} + I_{BV} + I_{VB}}{2X_B X_C + 2X_C X_V + 2X_B X_V}$$

3.3 P(HB-co-CL) e P(HB-co-HV-co-CL) come nuovi materiali per la produzione di *drug delivery system*

L'interesse della ricerca scientifica di tipo farmaceutico oggi non è più incentrato sulla sintesi di nuovi composti farmacologicamente attivi, bensì si sta sempre più spostando verso la scoperta di nuovi metodi di somministrazione e di veicolazione dei principi attivi. A tal proposito modifiche delle caratteristiche chimico-fisiche di principi attivi già conosciuti ha permesso di diminuire il numero di somministrazioni e di ridurre gli effetti collaterali.⁽⁵⁵⁻⁵⁸⁾ Numerosi polimeri naturali, artificiali e sintetici vengono studiati per la produzione di sistemi capaci di veicolare il farmaco. Questi materiali si prestano ottimamente alla produzione di sistemi colloidali come le nanoparticelle, le cui interazioni con i fluidi biologici e i tessuti possono essere modulate opportunamente per il rilascio del farmaco.⁽⁵⁹⁾

La biodegradabilità e la biocompatibilità sono caratteristiche essenziali per un loro potenziale impiego in campo medico-farmaceutico. Diversi prodotti, in questo ultimo campo, si ottengono dalla lavorazione di svariati polimeri, dai fili per suture alle viti per ossa, dalle protesi al *drug delivery*. Da un'attenta analisi della letteratura si evince che i polimeri più utilizzati per la realizzazione di *carrier* colloidali sono i polilattidi, i poliglicolidi e i loro copolimeri (PLGA), materiali che sono stati approvati dalla FDA per il loro impiego in medicina nella produzione di nano particelle per il rilascio di farmaci.⁽⁶⁰⁾ Sono esteri facilmente idrolizzabili nell'ambiente fisiologico e i loro prodotti di degradazione rientrano nei normali cicli cellulari portando, come step finale, alla produzione di acqua e anidride carbonica. Pur considerando gli enormi vantaggi, essi presentano dei limiti, che possono essere superati impiegando altri poliesteri per la realizzazione dei carriers.

Il poli(ϵ -caprolattone) PCL, che appartiene al gruppo dei poliesteri alifatici è ampiamente studiato per applicazioni biomediche e farmaceutiche specialmente quando i farmaci o le proteine che debbono essere somministrate sono incompatibili con i prodotti di degradazione dei PLGA.⁽⁶¹⁻⁶⁴⁾ Il PCL ha la temperatura di transizione vetrosa (T_g) intorno a -60 °C e la temperatura di fusione (T_m) fra 58-60 °C, caratteristiche che lo rendono idoneo all'impiego in campo biomedico.⁽⁶³⁻⁶⁴⁾ È altamente idrofobico, cristallino e, in assenza di enzimi, viene lentamente degradato *in vivo* e *in vitro*.^(62, 65-66) Vista l'assenza di chiralità, il PCL non offre caratteristiche di versatilità tipiche dei polimeri appartenenti alla famiglia dei PLA.⁽⁶⁷⁾ Per modificare le proprietà del PCL, una strategia è rappresentata dalla copolimerizzazione con lattidi, glicolidi, etilene ossido e altri materiali che ne migliorano le caratteristiche. Tuttavia la sintesi di questi copolimeri per mezzo della polimerizzazione ring-opening è difficile e richiede alte temperature ed inoltre le proprietà dei materiali finali non sempre risultano quelle attese.⁽⁶⁸⁻⁷⁴⁾ Recentemente il PHB e suoi copolimeri P(HB-*co*-HV) si sono dimostrati ottimi candidati per la produzione di sistemi a rilascio controllato di farmaco mediante erosione superficiale. La preparazione di *Drug Delivery System* (DDS) a base di PHB risulta limitata, a causa della sua insolubilità in numerosi solventi, ad un certo numero di tecniche, come lo spray-drying e l'omogenizzazione ad alte pressione in cui l'evaporazione del solvente non permette di ottenere micro e nano particelle.

Il P(HB-*co*-HV) presenta cristallinità intermedia, sebbene la bassa velocità di cristallizzazione permetta di ottenere matrici con metodiche differenti.⁽⁷⁵⁾

La cinetica di rilascio dei sistemi a base di PCL, PHB, P(HB-*co*-HV) è ritardata rispetto ai sistemi a base di PLGA, rendendo più difficile il controllo in funzione delle proprietà chimico-fisiche del principio attivo da trasportare.⁽⁷⁶⁾ Per superare queste limitazioni, generalmente l'omopolimero di partenza viene miscelato con altri polimeri oppure

vengono sintetizzati copolimeri per introduzione di appropriati *co*-monomeri.

Negli ultimi anni gli sforzi non sono stati incentrati sulla sintesi di nuovi biopolimeri, ma sulle modifiche chimiche di polimeri ampiamente conosciuti e studiati. In particolare l'impiego di miscele di polimeri o copolimeri ha riscosso particolare interesse. Attraverso questo metodo, è possibile combinare le caratteristiche chimico-fisiche e le proprietà tecnologiche di differenti biomateriali per superare le limitazioni d'impiego dei singoli sia in campo biologico che nell'efficacia come drug delivery.

Come visto in precedenza, la sintesi di P(HB-*co*-CL) attraverso reazione di transesterificazione dei due omopolimeri in soluzione, permette di ottenere nuovi polimeri biodegradabili e biocompatibili con potenziale impiego nella progettazione del DDS.

I sistemi ottenuti sono stati caratterizzati in termini di dimensione media delle particelle, indice di polidispersione (PDI) e di carica superficiale. Calceina e Red Oil O sono stati utilizzati e incapsulati come modelli di riferimento di molecole idrofile e lipofile di principio attivo. La capacità di caricamento e le prove *in vitro* di rilascio sono state effettuate per valutare l'effetto delle proprietà del copolimero, quali peso molecolare, cristallinità e composizione, sul loro comportamento nel rilascio controllato.

La Tabella 15 riassume i risultati ottenuti per sette copolimeri P(HB-*co*-CL) e due terpolimeri P(HB-*co*-24% mol HV-*co*-PCL), a diversa composizione, riportando anche il peso molecolare medio ponderale e grado di randomness (*DR*) dopo differenti tempi di reazione.

Tabella 15: Condizioni di transesterificazione, peso molecolare medio, grado di randomness e classificazione dimensionale delle particelle dei copolimeri e terpolimeri.

Campione	HB/CL ^a	HB/HV/CL ^a	Mw·10 ^{-3b}	Mw/Mn ^c	DR ^d	RT ^e	Solvente organico	Sistema Ottenuto ^f
A1	81/19		10.6	1.63	0.33	6	CHCl ₃	MP
A2	79/21		25.9	1.31	0.49	16	CHCl ₃	- ^g
A3	68/32		13.9	1.68	0.31	6	CH ₃ CN	MP
A4	53/47		19.5	1.60	0.29	6	CH ₃ CN	MP
A5	45/55		17.7	1.47	0.23	6	CH ₃ CN	NP
A6	43/57		4.6	1.45	0.97	26	CH ₃ CN	NP
A7	28/72		14.7	1.72	0.09	6	CH ₃ CN	NP
I		36/12/52	17.3	1.56	1.24	4	CH ₃ CN	NP
H		33/13/54	13.6	1.35	1.50	16	CH ₃ CN	NP

^a Composizione molare, ^b Peso molecolare medio ponderale, ^c Indice di polidispersione, ^d Grado di randomness, ^e Tempo di reazione, ^f NP= nanoparticelle, MP= microparticelle, ^g Nessun sistema colloidale ottenuto.

I copolimeri ed i terpolimeri sintetizzati hanno mostrato proprietà chimiche e fisiche differenti, in relazione a parametri quali il peso molecolare o la solubilità. Entrambi i parametri hanno importanza nella produzione di carrier colloidali, influenzando ad esempio la dimensione media delle particelle ottenute.⁽⁷⁷⁾

Per valutare le potenziali applicazioni di questi materiali polimerici nella progettazione di drug delivery system (DDS), è stata studiata la produzione di sospensioni di particelle colloidali. In particolare, è stato impiegato il metodo della deposizione di solvente come tecnica per la nanoprecipitazione e la produzione di nanoparticelle dai polimeri in esame.⁽⁷⁸⁻⁷⁹⁾

Da studi effettuati sulla solubilità è emerso che la percentuale di HB presente nel copolimero influenza notevolmente la solubilità del copolimero, più di quanto influenzi

il peso molecolare. Infatti, i copolimeri che presentano elevate percentuali di HB sono risultati solubili in cloroformio.

L'analisi dimensionale delle particelle ottenute è essenziale per valutare le potenziali applicazioni dei polimeri nel drug delivery. La tabella mostra come i copolimeri e terpolimeri producano nanoparticelle, tranne i copolimeri A1, A3 e A4 che formano microparticelle. Soltanto dal copolimero A2 non è stata prodotta alcuna sospensione colloidale a causa dell' elevato peso molecolare e dalla ridotta solubilità nel solvente. Similmente al PHB, infatti, il copolimero A2 si solubilizza in cloroformio a temperature elevate e dopo 24 ore. Per tale motivo è stato escluso dalla preparazione di micro- e nano particelle. Le dimensioni delle nanoparticelle ottenute dalle sospensioni di copolimeri è inferiore a 500 nm, mentre dalle sospensioni dei terpolimeri I e H si sono ottenute nanoparticelle aventi dimensioni comprese tra i 200 e i 300 nm.

Nel caso delle microparticelle ottenute dai copolimeri A1, A3 e A4, le dimensioni variano da 10 ad un massimo 30 di μm . Tuttavia, questi sistemi mostrano tendenza maggiore ad aggregare durante la formazione di inclusioni a temperatura ambiente. Dai dati presenti in Tabella 15, è possibile stabilire una correlazione fra il genere di particelle prodotte e le proprietà dei copolimeri A1-A7. Lo scopo di questa selezione preliminare è quello di evidenziare le particolari proprietà di copolimeri e terpolimeri, al fine di ottenere materiali adatti all'impiego nel drug delivery con caratteristiche terapeutiche o farmaceutiche definite. Nello studio dei terpolimeri I e H la presenza di unità di HV rappresenta un'ulteriore variabile. In particolare, la composizione molare, la cristallinità, il peso molecolare, il grado di randomness e la natura dell'estremità della catena polimerica (libera o tosile-terminata) sono i parametri che maggiormente interessano il comportamento di questi materiali nella preparazione di sistemi colloidali.

Da studi in letteratura, si evince che il peso molecolare è uno dei principali fattori che interessa le dimensioni delle particelle ottenute. Inaspettatamente nello studio condotto si è visto però che il peso molecolare non è un parametro che esercita notevole influenza sulle dimensioni particellari, poiché dal copolimero A1, avente ridotto peso molecolare, sono state ottenute microparticelle nelle circostanze sperimentali usate. Similmente, dai copolimeri A4 e A5, che hanno peso molecolare e grado di randomness (*DR*) simile sono stati ottenuti sistemi molto differenti.

Anche il grado di randomness (*DR*) sembra influenzare le proprietà dei sistemi nanoparticellari ottenuti. Però anche in questo caso i dati sperimentali sono in contrasto con quanto detto precedentemente. Confrontando infatti i copolimeri A6 e A7, di cui il primo completamente random e il secondo non-random, sono stati ottenuti sistemi nanoparticellari simili in termini di dimensioni e stabilità fisica. Ed ancora, dai copolimeri A1, A3 e A4, che presentano grado di randomness (*DR*) simile a quello del copolimero A5, sono stati ottenuti sistemi particellari fra loro molto differenti. Da queste considerazioni si può dedurre che il grado di randomness (*DR*) non è un parametro critico nella determinazione delle proprietà fisiche dei sistemi colloidali ottenuti.

La percentuale di HB contenuta nei copolimeri sintetizzati può essere facilmente correlata alle dimensioni delle particelle ottenute. Dai copolimeri A1, A3 e A4, aventi un più alto rapporto del HB/CL, sono stati ottenuti sistemi microparticellari, mentre sistemi nanoparticellari sono stati ottenuti da copolimeri aventi un rapporto ridotto. Quindi anche se in misura limitata, le dimensioni delle nanoparticelle si riducono con la riduzione della quantità di HB presente nel polimero.

La percentuale dell'HB nei copolimeri è legata alla cristallinità di questi, infatti il PHB è un poliestere altamente cristallino. Quindi, i copolimeri A1-A4 dall'analisi DSC hanno

mostrato un profilo più cristallino ⁽⁸⁰⁾ mentre A5 e A7 presentano ridotta cristallinità e A6 invece completamente amorfo. Sulla base dei risultati sperimentali, questa considerazione suggerisce che un alto grado di cristallinità conduce alla produzione delle microparticelle, probabilmente a causa di un fattore di solubilità nelle fasi organiche ed acquose. Per contro, più amorfi sono i copolimeri ottenuti, minori saranno le dimensioni delle particelle che costituiscono i sistemi colloidali. Questa ipotesi è stata confermata dai terpolimeri I e H amorfi da cui sono state ottenute nanoparticelle di dimensioni inferiori a quelle prodotte dai copolimeri.

4. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stata valutata la capacità di *P. aeruginosa* ATCC 27853 di produrre PHA a partire da acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio, dall'eptadecanoico all'eneicosanoico e da olio di *B. carinata* ad alto contenuto di acido erucico. Le fermentazioni sono state tutte condotte in medium privo di azoto sulla base di risultati ottenuti in studi precedenti che hanno dimostrato che le fermentazioni condotte con acido eptadecanoico, sia in medium completo che in assenza di Mg, non rivelavano la produzione di polimero.

Dai dati in nostro possesso è possibile concludere che la capacità della serie degli acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio di sostenere la produzione di PHA è paragonabile a quella della serie pari studiata in precedenza, in grado di produrli dall'acido ottanoico fino all'eicosanoico.

L'analisi gas-cromatografica dei prodotti di metanolisi totale ci ha permesso di identificare le unità monomeriche costituenti i polimeri e di effettuare un'analisi quantitativa di tali monomeri. Per i PHA prodotti per fermentazione con acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio tra le unità monomeriche più abbondanti ci sono il 3-idrossieptanoato e il 3-idrossinonanoato; unità ripetitive con gruppi alchilici pendenti più lunghi sono più abbondanti quando vengono usate sorgenti di carbonio a catena più lunga; tale andamento si mantiene fino all'acido nonadecanoico.

P. aeruginosa ha prodotto PHA con pesi molecolari medi che vanno da 77000 a 187000 utilizzando rispettivamente acido eptadecanoico e acido eneicosanoico come sorgenti. I PHA ottenuti da sorgenti ad atomi di carbonio dispari mostrano valori di T_m e ΔH_m più bassi di quelli ottenuti da sorgenti ad atomi di carbonio pari, parallelamente a quanto è stato dimostrato per gli n-alcani ad atomi di carbonio pari e dispari fino a quindici. I

PHA ottenuti sono materiali flessibili e si può osservare che le loro caratteristiche fisiche non variano sensibilmente in funzione della catena laterale, benché gruppi pendenti più lunghi conferiscano una maggiore velocità di ricristallizzazione, evidenziata dalla seconda scansione di riscaldamento alla DSC. Questo comportamento sarà esaminato con ulteriori studi di cinetica di cristallizzazione.

E' stato possibile poi accertare la capacità di *P.aeruginosa* di produrre PHA utilizzando olio di *B. carinata*, acido oleico, erucico e nervonico come substrati fermentativi sempre in medium privi di azoto. Per questi PHA la resa migliore è stata ottenuta con acido erucico (81 mg/L). La spettrometria di massa ESI dei prodotti di pirolisi parziale, accoppiata all'analisi statistica, ci ha permesso di determinare le sequenze degli oligomeri generati, per stabilire se è stato ottenuto un singolo copolimero oppure una miscela di copolimeri o omopolimeri. E' stato possibile così concludere che la sequenza delle unità ripetitive in questi PHA, ad eccezione di quello ottenuto da *B. carinata*, è random e che una miscela di omopolimeri o di copolimeri può essere esclusa.

L'ottenimento di tali PHA è un risultato molto importante in quanto è la prima volta che da batteri del genere delle Pseudomonadaceae si ottengono PHA utilizzando acidi grassi a catena più lunga di venti atomi di carbonio. Il PHA ottenuto utilizzando l'olio di *B. carinata* è un materiale trasparente completamente amorfo con una di Tg di -47 °C, che reticola molto velocemente all'aria ed alla luce. La presenza dei doppi legami nel PHA consente la derivatizzazione e la funzionalizzazione. I PHA ottenuti da acido erucico e nervonico sono anch'essi trasparenti, parzialmente cristallini con caratteristiche simili alla gomma. Pertanto sono utilizzabili come scaffold nell'ingegneria dei tessuti o per la produzione di *drug delivery system*.

Per quanto riguarda la sintesi chimica sono stati ottenuti copolimeri P(HB-co-CL), utilizzando PHB e PCL come reagenti, oppure terpolimeri P(HB-co-HV-co-CL),

utilizzando il copolimero P(HB-co-24%mol-HV) e PCL, mediante la reazione di transesterificazione catalizzata dall'acido *p*-toluenosolfonico. I copolimeri e terpolimeri ottenuti sono random o a microblocchi a seconda della durata della reazione o della quantità di catalizzatore impiegato e al tipo di riscaldamento utilizzato. L'aumento della quantità di acido impiegata nel caso del riscaldamento tradizionale ha consentito di ottenere co- e terpolimeri senza catalizzatore legato ai gruppi ossidrilici terminali, molto probabilmente perché si riducono i tempi di reazione. Gli spettri MALDI-TOF di copolimeri ottenuti con il riscaldamento convenzionale, e con quantità doppia di catalizzatore rispetto alla sintesi precedente, rivelano strutture -H, -OH terminate, cioè prive di catalizzatore legato.

Per quanto concerne l'utilizzo delle microonde, come valida alternativa al riscaldamento convenzionale, paragonando le due tecniche, risulta che a parità di tempi di reazione, grado di transesterificazione e catalizzatore impiegato, sono state ottenute rese più elevate sia per i copolimeri che per i terpolimeri. L'unico inconveniente è che, con quest'ultimo metodo, si notano nuovamente tracce di catalizzatore legato. L'ipotesi più plausibile è che il riscaldamento tramite microonde sia più efficace rispetto al tradizionale, sia per la reazione di transesterificazione estere-estere che per quella di esterificazione PTSA -OH terminali liberi del polimero. Ciò è stato verificato sia con basse che con alte concentrazioni di PTSA. L'ottenimento di più alte rese è sicuramente un risultato incoraggiante che va preso in considerazione in una ipotesi di richiesta di maggiore produzione.

I copolimeri ottenuti con questa metodica possono essere utilizzati in svariate applicazioni, dalle plastiche biodegradabili e biocompatibili ai sistemi farmaceutici per il *Drug Delivery System* (DDS). Per quanto concerne quest'ultima applicazione, il gruppo di ricerca diretto dai professori Puglisi e Pignatello del Dipartimento di Scienze

del Farmaco dell'Università di Catania ha ottenuto micro- e nanosospensioni colloidali. Dalla maggior parte dei polimeri sono state ottenute nanoparticelle con dimensioni prossime o inferiore a 500 nm e un PDI inferiore a 0.5. Nelle stesse circostanze sperimentali tre copolimeri hanno prodotto microparticelle. Le micro- e nanoparticelle ottenute hanno permesso d'incapsulare meglio molecole idrofile che molecole lipofile. Tuttavia, dalle prove di rilascio effettuate *in vitro* sembra che vengono incapsulate quantità maggiori di riferimento idrofilo, a causa del fatto che si ha una parziale adsorbimento della calceina in prossimità della superficie particellare.

I profili del rilascio di Red Oil O, composto di riferimento lipofilo, hanno mostrato tempi di rilascio significativamente ritardati, seguiti da un rilascio lento e prolungato. Questi sistemi possono essere proposti come sistemi carrier per il rilascio prolungato di molecole lipofile. I sistemi nanoparticellari ottenuti dai terpolimeri P(HB-*co*-HV-*co*-CL) sono risultati particolarmente interessanti, mostrando una cinetica di rilascio di ordine zero, caratteristica molto importante dal punto di vista di produzione dei DDS. Gli studi di citotossicità e di emo-compatibilità su questi copolimeri sono attualmente in corso.

5. PARTE SPERIMENTALE

5.1 Terreni e condizioni di crescita

Durante la fermentazione è stata usata *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 coltivata in brodo Luria Bertani (LB) a 37°C. Per la produzione di PHA le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione, trattate con una soluzione di tampone fosfato (PBS) e trasferite in un terreno di tipo E* ⁽⁸¹⁾ contenente: 1,1 g/l (NH₄)₂HPO₄, 5,8 g/l K₂HPO₄, 3,7 g/l di KH₂PO₄, 10 ml/l MgSO₄ 0,1M e 1,00 ml di soluzione di microelementi di tipo MT stock ⁽⁸²⁾ contenente: 2,78 g/l FeSO₄·7H₂O, 1,98 g/l MnCl₂·4H₂O, 2,81 g/l CoSO₄·7H₂O, 1,67 g/l CaCl₂·2H₂O, 0,17 g/l CuCl₂·2H₂O, 0,29 g ZnSO₄·7H₂O, in condizioni di limitazione di N.

Come sorgenti di carbonio per gli acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio sono stati impiegati gli acidi eptadecanoico, nonadecanoico ed eicosanoico, uno alla volta, fino a raggiungere una concentrazione finale di 10 mM. Olio di *B. carinata* contenente dal 35-48% di acido erucio è stato impiegato allo 0,4%. Per gli acidi grassi insaturi a numero pari di atomi di carbonio sono stati impiegati gli acido erucico, oleico e nervonico uno alla volta, fino a raggiungere una concentrazione finale di 5 mM. Il valore di pH nella coltura è stato aggiustato a 7,00 ed infine il terreno è stato autoclavato per evitare la contemporanea presenza di altri microrganismi. Cellule in fase esponenziale, precoltivate in LB, sono state inoculate in 2 l di terreno di tipo E*. Le fermentazioni sono state condotte in condizioni aerobiche in un agitatore termostato a 37°C e impostato a 250 rpm. Le cellule sono state raccolte per centrifugazione dopo 72 h, lavate e liofilizzate.

5.2 Metodica di estrazione dei PHA

I PHA sono stati estratti dalle cellule liofilizzate in CHCl_3 mediante l'impiego di un estrattore di tipo Soxhlet. Dopo un periodo di 6 h di riflusso, la soluzione cloroformica è stata concentrata in evaporatore rotante. Il polimero grezzo così ottenuto è stato solubilizzato in CHCl_3 e subito precipitato in 10 volumi di etanolo. Dopo un periodo di 30 minuti di continua agitazione, la soluzione è stata lasciata decantare in frigo tutta la notte. Il precipitato ottenuto è stato separato per centrifugazione a 3000 g per 15 minuti, lavato due volte con etanolo e portato a secco sotto vuoto (1.00 mmHg). Il prodotto è stato precipitato per due volte e pesato.

5.3 Analisi Gas-cromatografica

Per la determinazione della composizione dei copolimeri, quantità di 2-5 mg di PHA sono state sottoposte a metanolisi mediante riscaldamento a 100°C per 140 min in una miscela composta da 1,00 ml CHCl_3 , 1,00 ml di CH_3OH contenente il 15% di H_2SO_4 .⁽⁴⁴⁾ La miscela di reazione è stata lavata con 1,00 ml di H_2O e la frazione cloroformica analizzata mediante gas cromatografia (GC) utilizzando un sistema cromatografico Perkin-Elmer 8420, equipaggiato con una colonna capillare AT-50 Alltech (30 m x 0.25 mm). Come gas di trasporto è stato utilizzato He con un flusso di 1,00 ml/min e per la rilevazione dei picchi cromatografici è stato utilizzato un detector a ionizzazione di fiamma (FID). Il gradiente termico è stato: 80°C per 5 min, poi la temperatura è stata portata a 280° con gradiente di $8^\circ/\text{min}$ e mantenuta per 10 min. La quantità iniettata è stata 0,2 μl con uno split 10:1. Gli esteri metilici sono stati identificati mediante comparazione dei tempi di ritenzione con quelli di standard metil-3-idrossialcanoati.

5.4 Determinazione dei pesi molecolari

I pesi molecolari medi dei composti ottenuti sono stati determinati mediante cromatografia di gel permeazione (GPC), utilizzando un sistema di pompe Waters, un set di quattro colonne Styragel HR connesse in serie tra di loro (nell'ordine: HR4, HR3, HR2, HR1) e un detector Waters 401 ad indice di rifrazione. Come eluente è stato utilizzato CHCl_3 ad un flusso di 1,00 ml/min; 200 μl di soluzione sono stati iniettati per ogni campione avente una concentrazione di 5,00 mg/ml. La curva di calibrazione dei pesi molecolari è stata effettuata utilizzando standard di polistirene a basso indice di polidispersione, utilizzando un software per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati (Polymer laboratories).

5.5 Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC)

L'analisi di calorimetria a scansione differenziale (DSC) è stata effettuata con una TA Instrument Q100 DSC, fornita di un sistema di raffreddamento con un flusso di N_2 di 50 mL/min. Campioni di 4-6 mg sono stati incapsulati in crogioli di alluminio e riscaldati da 0 a 200 °C con una velocità di riscaldamento di 20 °C/min (prima scansione). Per misurare la temperatura di transizione vetrosa (T_g), i campioni sono stati mantenuti ad una temperatura di 200 °C per un minuto e poi immersi in N_2 liquido a -80°C (quench). Questi vengono poi riscaldati nuovamente sempre con una velocità di 20 °C/min fino a 200 °C. (seconda scansione). La scala delle temperature è stata calibrata mediante l'utilizzo di standard ad elevato grado di purezza. La temperatura di fusione (T_m) è stata registrata sul picco dell'endoterma di fusione, mentre la T_g , sul punto di flesso del termogramma.

5.6 Spettroscopia NMR

Gli spettri ^1H -NMR dei PHA ottenuti per fermentazione batterica utilizzando olio di *B. carinata*, acido oleico, erucico e nervonico sono stati registrati in CDCl_3 a 27 °C, con uno spettrometro Varian *INOVA* 500 MHz con una frequenza di impulsi di 6.3 s, un'ampiezza di 5230 Hz, 64 K data points ed effettuando una media di 64 scansioni.

Gli spettri ^{13}C -NMR disaccoppiati dal ^1H sono stati registrati a 125 MHz con tempo di acquisizione di 1.2 s, un'ampiezza di 29,070 Hz, 64 K data points ed effettuando 40.000 accumuli.

Gli spettri ^1H -NMR dei PHA ottenuti con le altre fermentazioni e i poliesteri ottenuti mediante reazione di transesterificazione sono stati registrati in CDCl_3 a temperatura ambiente, con uno spettrometro Bruker AC200 MHz con una frequenza di impulsi di 4 s, un'ampiezza di 2.000 Hz, 16 K data points ed effettuando una media di 256 scansioni.

Gli spettri ^{13}C -NMR disaccoppiati dal ^1H sono stati registrati a 50 MHz con tempo di acquisizione di 1.6 s, un'ampiezza di 10.000 Hz, 32 K data points ed effettuando 30.000 accumuli.

5.7 Pirolisi parziale

La pirolisi parziale dei poliesteri ottenuti è stata effettuata utilizzando un apparato termogravimetrico (TG) Perkin-Elmer TGS/2 in atmosfera di N_2 (60 ml/min) con un gradiente di riscaldamento di 10°C/min. La temperatura è stata innalzata fino al punto in cui si è ottenuta una perdita in peso del 20%. Dopo rapido raffreddamento (100°C/min), si è provveduto a pesare il campione e a solubilizzarlo in cloroformio.

5.8 Analisi ESI-MS dei prodotti di pirolisi parziale

Gli esperimenti ESI-MS sono stati condotti mediante uno spettrometro di massa Mariner (PerSpective Biosystem) fornito di sorgente API. I prodotti di pirolisi parziale sono stati solubilizzati in una miscela di CH₃CN e H₂O (7:3) contenente l'1% di acido acetico con una concentrazione finale di 0.1 mg/ml. La soluzione è stata introdotta nella sorgente elettrospray con un flusso di 5 µl/min. Il potenziale del capillare è stato mantenuto a 4.0 KV, mentre il potenziale del nozzle a 120V. Sia il nozzle che il quadrupolo sono stati mantenuti ad una temperatura di 140°C. Gli spettri sono stati acquisiti in negativo ed accumulati per 6 secondi nell'intervallo di masse *m/z* compreso tra 100 e 2000.

L'analisi dei prodotti di pirolisi parziale è stata effettuata utilizzando un programma di elaborazione dei dati di massa Mariner (DataExplorer, PerSpective).

5.9 Spettrometria di massa MALDI-TOF

Gli spettri di massa MALDI-TOF dei copoliesteri sono stati acquisiti utilizzando uno strumento Perseptive Voyager DE-STR, equipaggiato con un laser ad N₂ con emissione a 337 nm con un'ampiezza di impulso di 3 ns ed acquisizione in modalità "positiva". Gli spettri sono stati acquisiti in modalità lineare con accumuli di 128 shots del laser, 25 KV di potenziale di accelerazione e irradiazione del laser leggermente sopra il valore di threshold. Gli spettri sono stati calibrati utilizzando polimetilmetacrilato (PMMA), uno standard per GPC.

I campioni sono stati solubilizzati in THF/CHCl₃ (1:1) con una concentrazione di 10 mg/ml, come matrice è stato utilizzato acido 2- (4- idrossifenil)- azobenzoico (HABA)

avente concentrazione 0.2M in THF/CHCl₃ (1:1). 10 µl della soluzione del campione sono stati addizionati a 30 µl della soluzione della matrice e 1 µl della miscela risultante è stata depositata sulla piastra d'analisi e lasciata cristallizzare a temperatura ambiente.

Nel caso di campioni provenienti dal frazionamento GPC, la preparazione è stata effettuata miscelando 5 µl della soluzione della matrice con 10 µl di ogni frazione raccolta ed 1 µl della miscela risultante è stato depositato sulla piastra e lasciato cristallizzare a temperatura ambiente.

5.10 Materiali

Il P(HB-co-24%mol HV) ($M_w = 177000$, $M_w/M_n = 1,7$) è stato ottenuto dalla Marlborough Biopolymers Ltd. (Billingham, U.K.), il PHB ($M_w = 400.000$, $M_w/M_n = 2.1$), il PCL ($M_w = 120.000$, $M_w/M_n = 1.7$), l'acido *p*-toluensolfonico monoidrato, il cloroformio, il toluene, il tetraidrofurano, il cloroformio, il metanolo e l'acido 2- (4-idrossifenil)- azobenzoico (HABA) della più alta purezza commerciale disponibile sono stati ottenuti dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Per le sorgenti di carbonio impiegate nelle fermentazioni, gli acidi grassi eptadecanoico, nonadecanoico, eneicosanoico, erucico e oleico, sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). L'olio di *B. carinata* è stato fornito dal Consorzio di Ricerca Gian Pietro Ballatore, Zona Industriale Dittaino (Enna, Italia) e l'acido nervonico dalla Polichimica (Sondrio, Italia).

5.11 Sintesi di P(HB-co-CL) e P(HB-co-HV-co-CL)

La sintesi per i copolimeri P(HB-co-CL) è stata condotta in due differenti stadi: nel primo, una miscela di PHB/PCL (50:50) è stata solubilizzata in 12.5 ml di cloroformio e

33 ml di toluene, che sono stati portati a riflusso per tempi variabili a seconda del campione in presenza del 5% o del 10% di PTSA in base alla metodica utilizzata. In questo stadio prevale la reazione di idrolisi. Nel secondo stadio della reazione, l'acqua è stata allontanata azeotropicamente mediante una trappola di Dean-Stark in modo da favorire la reazione di transesterificazione. La soluzione è stata concentrata in Rotavapor, ripresa nel minimo volume di cloroformio e fatta precipitare in etanolo (1:10 v/v). La soluzione etanolica è stata centrifugata a 3.000 g, il precipitato lavato per 3 volte con 40 ml di etanolo e essiccato in stufa da vuoto per 24 ore a 50 °C. La sintesi dei terpolimeri P(HB-*co*-HV-*co*-CL) è analoga a quella dei copolimeri.

5.12 Riscaldamento mediante microonde

Il microonde modello Discover è stato fornito dalla CEM Corporation, si tratta di un modello monomodale la cui frequenza di lavoro è di 2.455 GHz e con una potenza di 300 W. L'apparecchio è dotato di un sistema di controllo della temperatura ad infrarossi con range da 15 a 430 °C limitato a 250°C. Il sensore di temperatura è indipendente dal volume della vessel. E' presente anche un sensore di pressione in grado di sopportare 300 psi (20 bar).

6. BIBLIOGRAFIA

1. Ulery, B. D.; Nair, L. S.; Laurencin C. T., *J. Polym. Sci. Pt. B-Polym. Phys.*, **2011**, 49, p. 832-864.
2. Mohantya, A. K., Misraa, M.; Hinrichsen G, *Macromol. Mater. Eng.*, **2000**, 277, p. 1-24.
3. Anderson, A. J.; Dawes E. A., *Microbial Rev.*, **1990**, 54, 450.
4. Doi Y., *Microbial Polyesters, New York: VCH*, **1990**.
5. Steinbuchel, A.; Valentin H. E., *Fems Microbial Lett.*, **1995**, p. 128-219.
6. Abe, C., *Polym. Commun.*, **1990**, 31, p. 404-406.
7. Choi, M. H.; Yoon, S., *Appl. Environ. Microbiol.*, **1994**, 60, p. 3245-3254.
8. Curley, J. M., *Macromolecules*, **1996**, 29, p. 1762-1766.
9. Doi, Y.; Abe, A., *Macromolecules*, **1990**, 23, p. 3705-3707.
10. Fritzsche, K.; Lenz, W.; Fuller R. C., *Int. J. Biol. Macromol.*, **1990**, 12, p. 92-101.
11. Hazer, B.; Lenz, R.W.; Fuller R. C., *Macromolecules*, **1994**, 27, p. 45-49.
12. Kim, Y. B.; Lenz, R. W.; Fuller R.C., *Macromolecules*, **1991**, 24, p. 5256-5360.
13. Kim, Y. B.; Lenz, R. W.; Fuller R.C., *Macromolecules*, **1992**, 25, p.1852-1857.
14. Lemoigne M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **1926**, 8, p. 770-82.
15. Lemoigne M., *Ann. Inst. Pasteur.*, **1927**, 41, p. 148-65.
16. Hazer, B.; Steinbüchel, A., *Appl Microbiol Biotechnol*, **2007**, 74, p. 1-12.
17. Noda, I.; Green, P. R.; Satkowski, M. M.; Schechtman, L. A. *Biomacromolecules* **2005**, 6, p. 580-586.
18. Ratledge, C.; Kristiansen, B; *Basic Biotechnology 2nd edn*, **2001**.
19. Brandl, H., *Appl. Environ. Microbiol.*, **1988**, 54, p. 1977-1982.
20. Choi, J.; Lee S. Y., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1999**, 51, p. 13-21.

21. Kai-Lai, G. H.; Pometto, A. L.; Hinz, P. N. III., *J. Environ. Polym Degrad.* **1999**, 7, p. 83.
22. Kale, G.; Kijchavengkul, T.; Auras, R.; Rubino, M.; Selke, S.; Singh, S. P., *Macromr Bioe.*, **2007**, 7, p. 255-277.
23. Bissery, M. C.; Valeriote, F.; Thies, C.; *Microspheres Drug Ther.: Pharm., Immunol., Med. Aspects*, [Pap. Meet.] (1984), Meeting Date, **1983**, p. 217-227.
24. Zawidlak-Wegrzynska, B.; Kawalec, M.; Bosek, I.; Luczyk-Juzwa, M.; Adamus, G.; Rusin, A.; Filipczak, P.; Glowala-Kosinska, M.; Wolanska, K.; Krawczyk, Z.; Kurcok P., *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, 45, p. 1833–1842.
25. Francis, L.; Meng, D.; Knowles, J.; Keshavarz, T.; Boccaccini, A. R.; Roy I., *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, 12, p. 4294-4314.
26. Bian, Y. Z.; Wang, Y.; Aibaidoula, G.; Chen, G. Q.; Wu Q., *Biomaterials*, **2009**, 30, p. 217–225.
27. Novikov, L. N.; Mosahebi, A.; Wiberg, M.; Terenghi, G.; Kellerth, J. O., *Biomaterials*, **2002**, 23, p. 3369–3376.
28. Xiao, X.-Q.; Zhao, Y.; Chen G.-Q., *Biomaterials*, **2007**, 28 p. 3608–3616.
29. Grage, K.; Jahns, A. C.;Parlane, N.; Palanisamy, R.; Rasiah, I. A.; Atwood, J. A.; Rehm B. H. A., *Biomacromolecules*, **2009**, 10, p. 660–669.
30. Anastas, P. T.; Warner J. C.; Oxford University Press, New York, **1998**.
31. Hayes, B.L., *CEM Publishing*: Matthews, NC, **2002**.
32. Kingston H. M., S. J., *ACS Professional Reference Book*, **1997**.
33. Perreux, L.; Loupy A., *Tetrahedron*, **2001**, 57, p. 9199-9223.
34. Bond, G.; Moyes, . RB.; Pollington, J. D.;.Whand. A., *Chem and Ind.* **1991**, p. 686-687.
35. Gedye, R. N.; Smith, F. E.; Westaway, K. C.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.;

- Roussel J., *Tetrahedron Letters*, **1986**, 27, p. 279-281.
36. Loupy, A.; Petit, A.; Hamelin, J.; Texeier-Boullet, F.; Jaquaul, P.; Mathè D., *Synthesis*, **1998**, 9, p. 1213-1234.
37. Parodi F., *La Chimica e l'Industria*, **1998**, 80, p. 55-61.
38. Ballistreri, A.; Giuffrida, M.; Guglielmino, S.P.P.; Carnazza, S.; Ferreri, A.; Impallomeni, G., *Int. J. Biol. Macromol.* **2001**, 29, p. 107-114.
39. Cardone, M.; Marroncini, M.; Menini, S.; Rocco, V.; Senatore, A.; Reggiani, M.; Vitolo, S., *Biomassa e bioenergia*, **2003**, p. 623-636.
40. Reeve, M. S.; McCarthy, S. P.; Gross, R. A., *Macromolecules*, **1993**, 26, 5, p. 888-894.
41. Abe, H.; Doi, Y.; Kumagei, Y., *Macromolecules*, **1994**, 27, 21, p. 6012-6017.
42. Yalpani, M.; Marchessault, R. H.; Morin, F. U.; Monasterios, C. J. *Macromolecules*, **1991**, 24, 22, p. 6046-6049.
43. Preusting, H.; Nijenhuis, A.; Witholt, B. *Macromolecules* **1990**, 23, 19, p. 4220-4224.
44. Gross, R.H.; De Mello, C.; Lenz, R.W. Brandl, H.; Fuller, R.C. *Macromolecules* **1989**, 22, 3, p. 1106-1115.
45. Silverstein, R.M.; Bassler, G.C.; Morrill, T.C., Wiley Ed. in *Spectrometric Identification of Organic Compounds* 5th ed., New York, **1991**, p 234.
46. Wade, L. G. Jr., Prentice-Hall International Ed. in *Organic Chemistry*, **1991**, chap. 3, p. 81 Englewood Cliffs, N.I.
47. Marchessault, R.H.; Monasterios, C.J.; Morin, F.G.; Sundarajan, P.R. *Int. J. Biol. Macromol.* **1990**, 12, p. 158-165
48. Preusting, H., Nijenhuis, A. Witholt, B. *Macromolecules* **1990**, 23, p. 4220-4224.
49. Ballistreri, A.; Giuffrida, M.; Impallomeni, G.; Lenz, R. W.; Fuller, R. C., *Int. J.*

- Biol. Macromol.* **1999**, 26, p. 201-211.
50. Montaudo, M. S.; Ballistreri, A.; Montaudo, G. *Macromolecules*, **1991**, 24, 18, p. 5051-5057.
51. De Waard, P.; van der Wal, H.; Huijberts, G. N. M.; Eggink, G., *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, p. 315-319.
52. Ashby, R. D.; Foglia, T. A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, 46, p. 464-469.
53. Pignatello, R.; Musumeci, T.; Impallomeni, G.; Carnemolla, G. M.; Puglisi, G.; Ballistreri A., *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, 37, p. 451-462.
54. Yamadera, R.; Murano, M. *J. Polimer Science*, **1967**, A-1, 5, p. 2259.
55. Alexander, C., *Expert Opin Emerging Drugs* , **2001**, 6, p. 341-343.
56. Eliyanhu, H.; Barenholz, Y.; Domb, A. J., *Molecules*, **2005**, 10, p. 34-64.
57. Galindo-Rodriguez, S. A.; Allemann, E.; Fessi, H.; Doelker, E., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, **2005**, 22, p. 419-464.
58. Uchegbu, I. F.; Schatzlein A. G., *Polymer in Drug Delivery*. Boca Raton: CRC Press, **2006**.
59. Chiellini, F.; Piras, A. M.; Errico, C., *Nanomed*, **2008**, 3, p. 367-393.
60. Mohamed, F.; Van der Valle, C. F., *J. Pharm. Sci.*, **2008**, 97, p. 71-87.
61. Calvo, P.; Alonso, M. J.; Vila-Jato, J. L.; Robinson, J. R., *J. Pharm. Pharmacol*, **1996**, 48, p. 1147-1152.
62. Lemmouchi, Y.; Schacht, E.; Kageruka, P.; De Deken, R.; Diarra, B.; Dially, O. Geerts S., *Biomaterials*, **1998**, 19, p. 1827-1837.
63. Sinha, V. R.; Bansal, K.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Trehan, A., *Int. J. Pharm.*, **2004**, 278, p. 1-23.
64. Shi, Y.; Li, L. C., *Expert Opin Drug Deliv.*, **2005**, p. 1039-1058.
65. Pitt, C. G.; Schindler, A.; Capronor, A., *Long-acting contraceptive delivery system*,

1984, p. 48-63

66. Wu, C.; Gan, Z. H., *Polymer*, **1998**, 39, p. 4429-4431.
67. Chabot, F.; Vert, M., *Polymer*, **1983**, 24, p. 53-59.
68. Sawhney, A. S.; Hubbel, J. A., *J. Biomed. Mater. Res.*, **1990**, 24, p. 1397-1411.
69. Zhang, X.; Wyss, U. P.; Pichora, D.; Goosen, M. F., *J. Pharm. Pharmacol.*, **1994**, 46, p. 718-724.
70. Cerrai, P.; Guerra, G. D.; Tricoli, M.; Krajewski, A.; Guicciardi, S.; Ravaglioli, A.; Maltinti, S.; Masetti, G., *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **1999**, 10, p. 283-289.
71. Li, S.; Liu, L.; Garreau, H.; Vert, M., *Biomacromolecules*, **2003**, 4, p. 372-377.
72. Jang, J. S.; Kim, S. Y.; Lee, S. B.; Kim, K. O.; Han, J. S.; Lee, Y. M. *J. Control Release*, **2006**, 113, p. 173-182.
73. Bougard, F.; Giacomelli, C.; Mespouille, L.; Borsali, R.; Dubois, P.; Lazzaroni, R., *Langmuir*, **2008**, 24, p. 8272-8279.
74. Wang, F.; Bronich, T. K.; Kabanov, A.V.; Rauh, R. D.; Roovers, J. *Bioconjug. Chem.*, **2008**, 19, p. 1423-1429.
75. Pouton, C. W.; Akhtar, S. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **1996**, 18, p. 133-162.
76. Oda, Y.; Asari, H.; Urakami, T.; Tonomura, K., *J. Ferment. Bioeng.*, **1995**, 80, p. 265-269.
77. Mundargi, R. C.; Babu, V. R.; Rangaswamy, V.; Patel, P.; Aminabhavi, T. M., *J. Control. Release*, **2008**, 125, p. 193-209.
78. Lince, F.; Marchisio, D. L.; Barresi, A. A., *J. Colloid. Interface Sci.*, **2008**, 322, p. 505-515.
79. Musumeci, T.; Ventura, C. A.; Giannone, I.; Ruozi, B.; Montenegro, L.; Pignatello, R.; Puglisi, G., *Int. J. Pharm.*, **2006**, 325, p. 172-179.
80. Impallomeni, G.; Giuffrida, M.; Musumarra, G.; Ballistreri, A., *Biomacromolecules*,

2002, 3, p. 835-840.

81. Volgen, H. J.; Bonner, D. M., *J. Biol. Chem.*, **1956**, 218, 97-106.

82. Lageveen, R.G. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **1988**, 54, 2924-2932.

7. RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare a conclusione del mio lavoro di tesi:

La mia famiglia per avermi sostenuto ed incoraggiato in questi anni.

Il prof. Ballistreri per avermi permesso di svolgere il dottorato sotto la sua supervisione.

Gian Marco per questi anni di lavoro passati assieme in laboratorio.

Amici e in particolare Vale, per aver condiviso con affetto sincero la mia esperienza di dottorato.