

**Alma Mater Studiorum - Università degli Studi di Bologna**

---

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

CAMPUS DI CESENA

**MEMBRANE ELETTROFILATE IBRIDE A BASE DI PBS E CHERATINA PER  
IL RILASCIO CONTROLLATO DI FARMACI**

Elaborato in  
Fondamenti di Chimica

Relatore

**Prof.ssa Nadia Lotti**

Correlatori

**Ing. Giulia Guidotti**

**Dott.ssa Annalisa Aluigi**

**Dott.ssa Michelina Soccio**

Candidato

**Enrico Fattori**

---

Sessione I

**Anno Accademico 2018/2019**

# INDICE

<b>1 INTRODUZIONE</b> .....	<b>4</b>
1.1 Introduzione ai Biomateriali .....	4
1.2 Principali classi di biomateriali.....	4
1.3 Proprietà dei biomateriali .....	7
1.4 Biomateriali Tradizionali.....	11
1.5 Biomateriali di nuova generazione .....	14
1.6 Biomateriali polimerici.....	15
1.6.1 Meccanismi di polimerizzazione .....	16
1.6.2 Peso Molecolare .....	18
1.6.3 Cristallinità.....	20
1.6.4 Proprietà Termomeccaniche.....	21
1.6.5 Processi di degradazione .....	23
1.7 Poliesteri alifatici .....	25
1.7.1 Poliesteri alifatici per uso biomedicale .....	25
1.7.1.1 Acido poliglicolico (PGA) .....	25
1.7.1.2 Acido polilattico (PLA) .....	26
1.7.1.3 Acido polilattico-co-glicolico (PLGA).....	27
1.7.1.4 Poli( $\epsilon$ -caprolattone) (PCL) .....	28
1.7.1.5 Poli(butilene succinato) (PBS) .....	29
1.8 Polimeri di origine naturale .....	31
1.8.1 Polisaccaridi .....	32
1.8.2 Polinucleotidi.....	33
1.8.3 Proteine .....	33
1.8.3.1 Cheratina.....	34
1.9 Drug release .....	38

1.9.1 Meccanismi di rilascio convenzionali vs. rilascio controllato ( <i>controlled drug release</i> ) .....	38
1.9.2 Meccanismi di rilascio controllato .....	41
1.9.3 Principali dispositivi utilizzati per il rilascio controllato .....	44
1.9.3.1 <i>Micro- e nanoparticelle</i> .....	44
1.9.3.2 <i>Idrogeli</i> .....	46
1.9.3.3 <i>Patch</i> Transdermiche .....	47
1.9.3.3.1 Elettrofilatura .....	50
<b>2 SCOPO</b> .....	<b>54</b>
<b>3 MATERIALI E METODI</b> .....	<b>56</b>
3.1 Sintesi del poli(butilene succinato) (PBS) ad alto peso molecolare .....	56
3.1.1 Purificazione del PBS .....	58
3.2 Caratterizzazione molecolare.....	59
3.2.1 Risonanza magnetica nucleare (NMR) .....	59
3.2.2 Cromatografia a permeazione su gel (GPC) .....	63
3.3 Realizzazione di <i>scaffold</i> tramite elettrofilatura .....	65
3.4 Caratterizzazione morfologica.....	67
3.4.1 Microscopia elettronica a scansione (SEM).....	67
3.5 Caratterizzazione termica .....	68
3.5.1 Calorimetria a scansione differenziale (DSC).....	68
3.5.2 Analisi termogravimetrica (TGA) .....	71
3.6 Caratterizzazione meccanica .....	72
3.7 Studio di rilascio di farmaco.....	75
<b>4 RISULTATI E DISCUSSIONI</b> .....	<b>77</b>
4.1 Sintesi polimerica e caratterizzazione molecolare .....	77
4.2 Caratterizzazione morfologica degli scaffold .....	79
4.3 Caratterizzazione termica .....	81

4.4 Caratterizzazione meccanica .....	84
4.5 Studi di rilascio .....	85
4.6 Osservazioni sull'adesione di campioni di PBS e PBS50KER50 .....	86
<b>5 CONCLUSIONI .....</b>	<b>88</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>90</b>

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Introduzione ai Biomateriali

Il campo dei biomateriali, a partire dal loro primo utilizzo, ha subito una notevole crescita e sviluppo grazie all'introduzione di nuove idee e di nuovi materiali e alla sperimentazione di questi in nuovi campi applicativi.

Attraverso gli anni, le diverse definizioni di biomateriale che furono fornite si modificarono di pari passo con le numerose scoperte effettuate; infatti, inizialmente un biomateriale era semplicemente definito come un materiale sintetico usato per sostituire una parte o una funzione di un sistema vivente in stretto contatto con tessuti vivi in modo sicuro, affidabile, economico e fisiologicamente accettabile.

Successivamente la *Clemson University Advisory Board for Biomaterials* definì formalmente un biomateriale come “una sostanza sistematicamente e fisiologicamente inerte progettata per un impianto all'interno di un sistema vivente o per essere incorporata in esso”; questa formale definizione subì poi ulteriori modifiche e divenne “materiale di origine sia sintetica sia naturale in contatto con tessuti, sangue e fluidi biologici e progettato per applicazioni protesiche, diagnostiche, terapeutiche e di immagazzinamento di sostanze, senza influenzare in modo negativo l'organismo e i suoi componenti”, la quale poi venne completata come “qualsiasi sostanza (diversa da farmaci) o combinazione di sostanze, di origine sia sintetica sia naturale, che può essere utilizzata per un periodo di tempo, come parte di un sistema o come sistema completo, per trattare, aumentare o sostituire un tessuto, un organo o una funzione del corpo umano”.

Il ruolo dei biomateriali è stato fortemente influenzato da sviluppi e benefici in molte aree della biotecnologia e della scienza [1].

## 1.2 Principali classi di biomateriali

I biomateriali possono essere suddivisi in cinque grandi classi: polimeri, metalli, ceramiche (inclusi i carboni, i vetri ceramici e i vetri), i materiali naturali (sia quelli provenienti dalle piante sia dagli animali) e i materiali compositi, ottenuti dalla composizione di due differenti classi di materiali.

In particolare, i metalli, i polimeri e materiali ceramici possono essere identificati attraverso il tipo di legame interatomico che tiene uniti i vari componenti del biomateriale.

## *Metalli*

I metalli presentano, allo stato solido, legami metallici all'interno della loro struttura. Inoltre, i materiali metallici risultano cristallini e presentano una struttura tridimensionale ordinata, data dalla ripetizione nelle tre dimensioni di una cella elementare, che può essere cubica a corpo centrato (CCC), cubica a facce centrate (CFC) o esagonale compatta (EC).

I materiali metallici trovano larghissimo impiego come biomateriali grazie alle loro proprietà meccaniche, idonee per la realizzazione di dispositivi in grado di sopportare carichi elevati senza grandi deformazioni, alle proprietà termiche ed elettriche, essendo ottimi conduttori sia di elettricità sia di calore, e alla loro elevata resistenza alla fatica meccanica (sono quindi indicati per applicazioni che prevedono cicli di carico, quali protesi ortopediche, dentali e mezzi di osteosintesi) (Figura 1.1).

In generale, i materiali metallici possono essere ottenuti come metalli elementari, quali il ferro, il rame, il cobalto, il titanio o l'oro, oppure sotto forma di miscele o soluzioni, con ampia variabilità di composizione, dette leghe [3].

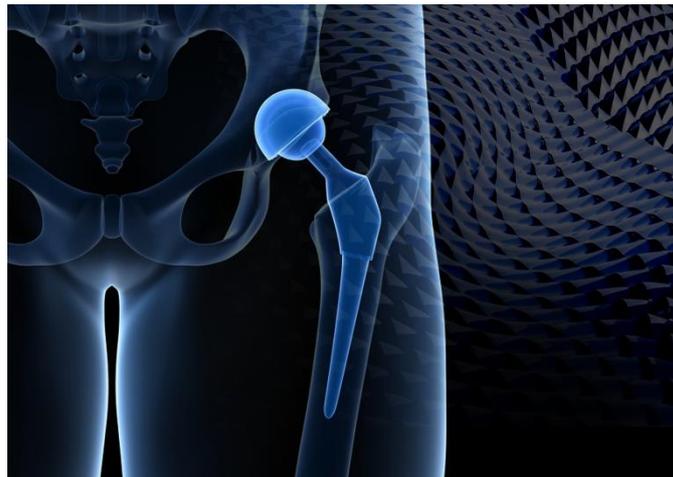


Figura 1.1 Protesi d'anca tra le applicazioni di biomateriali metallici.

## *Ceramiche*

I materiali ceramici sono composti solidi inorganici costituiti da varie combinazioni di legami ionici e covalenti. Questi materiali presentano strutture altamente compatte costituite da elementi che possono essere metallici, come alluminio, magnesio, titanio, sodio, potassio, calcio e ferro, non metallici, come ossigeno, carbonio e azoto oppure semimetallici come silicio e boro.

Le proprietà che caratterizzano questi materiali dipendono in modo significativo dai forti legami chimici che tengono uniti gli atomi al loro interno, dalla presenza di ioni di segno opposto e dalla presenza di difetti nel materiale.

I materiali ceramici hanno ricevuto notevole attenzione grazie a proprietà altamente desiderabili per applicazioni nei settori ortopedico, odontoiatrico, otorinolaringoiatrico e cardiocircolatorio; tra queste vi sono l'elevata stabilità chimica e la presenza di forti legami di natura sia ionica che covalente, che determina l'assenza di elettroni liberi nella struttura interna e rende quindi questi materiali buoni isolanti sia termici sia elettrici. Per quanto riguarda le proprietà meccaniche, è necessario effettuare delle distinzioni in base all'intervallo di temperature di esercizio:

1. Temperature non molto elevate: i materiali ceramici non possono essere lavorati plasticamente, in quanto non possono verificarsi scorrimenti plastici al loro interno; questa caratteristica è responsabile della fragilità che contraddistingue questi materiali.
2. Temperature elevate: i materiali ceramici, in particolare quelli vetrosi e cristallino-vetrosi, possono presentare fenomeni di scorrimento viscoso dovuti ad un rammollimento della fase vetrosa, la quale assume deformabilità plastica.
3. Temperature molto elevate: in questo range di temperature, anche i materiali ceramici cristallini possono presentare fenomeni di scorrimento lungo i giunti dei grani.

I materiali ceramici utilizzati in campo biomedico possono essere suddivisi in due gruppi in base alla loro compatibilità con l'ambiente biologico, i ceramici bioinerti e ceramici bioattivi. I primi sono materiali che, una volta impiantati all'interno del corpo umano, non inducono né subiscono alterazioni chimiche o biologiche dovute al contatto con quest'ultimo. I secondi, invece, sono materiali in grado di indurre nei tessuti circostanti una risposta favorevole all'impianto attivando processi chimici biologici all'interfaccia.

Il materiale bioinerte per eccellenza è l'allumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), che viene impiegata nella sostituzione di tessuti duri in applicazioni ortopediche o odontoiatriche per la sua rigidità e durezza (Figura 1.2), oppure di piccole ossa che non devono sopportare carichi elevati, come quelle dell'orecchio oppure del naso e della gola.

Un altro materiale ceramico impiegato frequentemente in applicazioni ortopediche è l'idrossiapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) in quanto presenta una eccellente biocompatibilità, dovuta alla capacità di formare legami chimici con i tessuti duri, poiché presenta la stessa

composizione chimica della componente minerale dell'osso, e favorisce un ottimo processo di osteointegrazione [2,3].



Figura 1.2 Capsule dentarie in materiale ceramico.

### *Polimeri*

I materiali polimerici sono composti organici derivanti dall'unione di due o più unità semplici, dette monomeri, mediante una reazione di polimerizzazione.

Gli atomi costituenti dei polimeri sono uniti tra loro da legami covalenti in strutture che possono essere lineari, ramificate e reticolate in base al tipo di polimerizzazione effettuata.

### *Materiali compositi*

I materiali compositi sono costituiti da due o più fasi distinte, che di conseguenza presentano due diverse interfacce separate tra loro a livello microscopico. Tali fasi prendono il nome di rinforzo, il quale si trova immerso in una fase continua, che viene detta matrice.

Dal punto di vista del design ingegneristico, le proprietà di questi materiali sono fortemente influenzate dalle proprietà dei rispettivi costituenti, dalla loro distribuzione e reciproca interazione.

La maggior parte dei materiali compositi sono fabbricati con il preciso scopo di ottenere materiali con precise caratteristiche in funzione dell'utilizzo previsto, come forza, rigidità, durezza e resistenza alla fatica. Inoltre, il meccanismo di rinforzo della matrice dipende fortemente dalla geometria del materiale utilizzato per questo obiettivo [2].

## **1.3 Proprietà dei biomateriali**

La selezione, progettazione e realizzazione di un biomateriale dipendono dalla sua specifica applicazione. Nel caso particolare di applicazioni biomedicali, ad esempio, esso deve garantire la sua funzionalità e mantenere le sue proprietà all'interno del sito di impianto per l'intera durata dell'applicazione, senza rigetto o complicanze.

Un biomateriale, per essere considerato tale, deve dunque essere biocompatibile, biofunzionale, bioattivo (o bioinerte) e sterilizzabile (Figura 1.3).

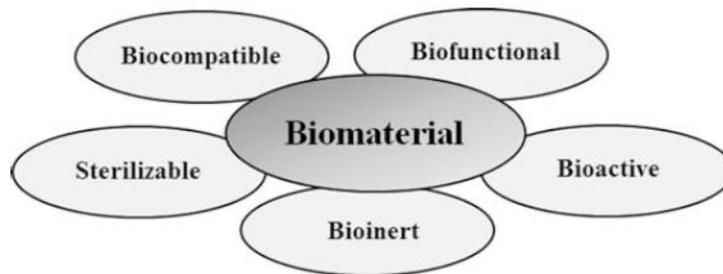


Figura 1.3 Caratteristiche tipiche di un biomateriale.

Oltre a queste fondamentali caratteristiche, un'ulteriore specifica che deve essere necessariamente soddisfatta prevede che i processi di igienizzazione e di sterilizzazione non alterino in alcun modo le proprietà del materiale stesso [4].

### *Biocompatibilità*

Negli ultimi anni, il concetto di biocompatibilità è stato più volte ridefinito. Inizialmente, infatti, un materiale veniva definito biocompatibile solo se completamente inerte nei confronti dell'organismo ospite, cioè in assenza di una qualsiasi risposta anche da parte dell'ambiente biologico. Questa idea venne presto abbandonata quando si osservò che la presenza di un materiale determina sempre una certa risposta da parte dell'organismo, la quale può variare in funzione del tipo di applicazione e delle caratteristiche del paziente, come età e sesso. In definitiva, il termine "biocompatibilità" comprende diverse proprietà del materiale, come atossicità, compatibilità tissutale, ed emocompatibilità (capacità del materiale di non innescare fenomeni di coagulazione ed emolisi all'interfaccia).

In questa ottica, nella scelta del biomateriale per una precisa applicazione, è fondamentale considerare le sue proprietà morfologiche, fisiche e biologiche, in modo tale che queste possano essere adattate per promuovere l'interazione tessuto – biomateriale.

### *Biofunzionalità*

Il concetto di biofunzionalità prevede che il biomateriale impiantato svolga la funzione per cui è stato realizzato, per il periodo di tempo richiesto ed in modo efficace; ad esempio, nel caso di impianti duraturi, il materiale non dovrebbe degradarsi quando viene a contatto con l'ambiente biologico ma resistere ad esso, mantenendo la sua stabilità chimica e meccanica.

Qualora infatti si dovesse verificare un fenomeno di degradazione precoce (come ad esempio la corrosione nel caso dei metalli), l'impianto potrebbe andare incontro ad una perdita di funzionalità e creare danni ai tessuti circostanti a causa del rilascio di prodotti di degradazione a volte tossici.

### *Bioinerzia*

Bioinerti sono tutti i materiali che sono tollerati dal corpo ospitante ma che non innescano reazioni chimiche con i tessuti circostanti.

### *Bioattività*

Bioattivi sono tutti quei materiali che sono in grado di creare legami chimici con i tessuti, che hanno la funzione di stabilizzare l'impianto integrandolo nel sito di inserimento. Ad esempio, nel caso di tessuti ossei, materiali bioattivi possono favorire il processo di osteointegrazione, attraverso il quale il tessuto osseo si connette al materiale impiantato rivestendo quest'ultimo di cellule ossee.

### *Sterilizzabilità*

Al fine di evitare infezioni in seguito ad un impianto, si rende necessario un processo di sterilizzazione del materiale, finalizzato all'inattivazione dei microrganismi potenzialmente patogeni presenti sulla superficie ed attuato con modalità diverse in funzione del materiale coinvolto. La tecnica più dispendiosa dal punto di vista economico, ma che minimizza i rischi di degradazione, in particolare nel caso dei materiali polimerici, prevede l'impiego di agenti chimici, quali gas o soluzioni a basse temperature. Vengono però utilizzate anche tecniche alternative quali la sterilizzazione a secco, in cui le temperature variano tra 160°C e 190°C, oppure vapore ad alta pressione (autoclave), metodologia che prevede temperature più basse, comprese tra 120°C e 135°C.

Il successo dell'impiego di un biomateriale è legato, oltre alle necessarie caratteristiche sopra citate, alle proprietà fisiche, chimiche e meccaniche che devono essere soddisfatte in base all'applicazione prevista.

### *Proprietà fisiche*

Le proprietà fisiche comprendono:

- bagnabilità (idrofobicità/idrofilicità): descrive l'equilibrio delle interazioni intermolecolari fra la superficie solida ed un liquido. In ambito biomedicale tale proprietà influenza l'assorbimento delle proteine, l'attivazione o l'assorbimento delle piastrine, la coagulazione del sangue e l'adesione cellulare e batterica: ad esempio, superfici idrofobiche risultano più proteine-assorbenti rispetto a quelle idrofiliche;
- carica della superficie: da numerose ricerche è emerso come la biocompatibilità, l'affinità ed il differenziamento cellulare sulle superfici dei biomateriali impiantati siano maggiori su superfici in cui sono presenti sia ioni negativi che positivi;
- rugosità: gioca un ruolo molto importante nell'adesione e nel comportamento cellulare. Superfici lisce e superficie rugose presentano infatti differenti aree di contatto, che influenzano notevolmente l'adesione cellulare, favorendo o meno la creazione di legami tra materiale e cellule. Nella maggior parte dei casi, le cellule preferiscono superfici rugose, su cui risulta più facile l'adesione.

#### *Proprietà chimiche*

Le proprietà chimiche, insieme a quelle fisiche sopra elencate, influenzano il tipo di legame cellulare e determinano la stabilità chimica e la reattività del biomateriale. Tra queste proprietà assume particolare importanza la stabilità chimica, legata a quanto un biomateriale risulti stabile chimicamente quando entra in contatto con l'ambiente biologico.

I fluidi che costituiscono l'ambiente biologico sono costituiti da ioni in equilibrio in normali condizioni fisiologiche; quando però un biomateriale viene impiantato, la concentrazione di ioni aumenta significativamente intorno al sito di applicazione e potrebbe causare rigonfiamento e sofferenza cellulare. Ad esempio, per materiali soggetti a corrosione, i prodotti che si originano in seguito a questo tipo di reazioni possono migrare da una parte all'altra del corpo attraverso la circolazione sanguigna e causare effetti indesiderati sia sui tessuti (a livello locale o sistemico) sia sull'impianto. In questo caso inoltre, non solo la stabilità chimica del dispositivo risulta alterata, ma anche quella meccanica, con rischi di un possibile fallimento prematuro dell'impianto [4].

#### *Proprietà meccaniche*

Date le numerose applicazioni dei biomateriali, ciascuna necessita di un materiale con precise caratteristiche in grado di garantire una tenuta dell'impianto ottimale nel tempo e soprattutto

una buona interfaccia con i tessuti, tenendo presente che questi ultimi presentano caratteristiche specifiche e molto diverse a seconda del sito di impianto.

In questo contesto, i parametri più importanti da considerare sono: modulo elastico (o modulo di Young), duttilità, resistenza alla trazione e alla compressione, resistenza a snervamento, fatica e usura.

- Modulo di Young: è necessario scegliere biomateriali che presentino modulo di Young simile a quello del tessuto limitrofo, in quanto questo assicura una distribuzione uniforme dei carichi, evitando il fenomeno dello *stress shielding* una volta che l'impianto è stato posizionato. Tale aspetto è particolarmente importante ad esempio nel caso di protesi ortopediche, le quali devono sostenere carichi particolarmente elevati;
- Resistenza alla compressione e allo snervamento: valori sufficientemente elevati di tali parametri evitano il rischio di fratture e migliorano la stabilità funzionale;
- Duttilità: aspetto molto importante quando è necessario modellare il biomateriale, come nel caso dei biomateriali utilizzati in campo dentale;
- Durezza e tenacia: materiali più duri risultano meno soggetti ad usura, mentre un aumento della tenacia, ovvero dell'energia necessaria a rompere il materiale, riduce la probabilità che si verifichino rotture;
- Fatica: aspetto molto importante da prendere in considerazione quando si utilizzano biomateriali per realizzare protesi d'anca, protesi articolari o protesi valvolari cardiache poiché queste devono essere in grado di sopportare carichi ciclici per un lungo periodo di tempo senza andare incontro a rotture;
- Usura: processo che si verifica quando si ha lo scorrimento relativo tra due superfici a contatto e che causa la perdita di materiale in superficie. Tali frammenti possono provocare infezioni e causare, nel tempo, il cedimento dell'impianto.

#### **1.4 Biomateriali Tradizionali**

Sebbene alcuni materiali comunemente impiegati per la realizzazione di impianti medicali vengano usati da almeno 2000 anni, altri, anche più recenti, furono condannati a fallire a causa di gravi problematiche relative a infezioni e a reazioni biologiche avverse, che non erano state preventivamente considerate.

L'inizio della nuova era dei biomateriali per applicazioni biomedicali può essere stabilito a partire da un'osservazione effettuata nel 1940 da un oculista inglese, Harold Ridley, il quale,

mentre stava esaminando alcuni piloti dei caccia Spitfire che avevano frammenti di calotte di plastica, provenienti da aereo-mitragliatrici nemiche, non intenzionalmente impiantate nei loro occhi, notò che le ferite provocate da questi frammenti sembravano guarire senza alcuna reazione immunitaria avversa. Al termine della sua analisi, Ridley concluse che le calotte realizzate con quel materiale, nello specifico polimetilmetacrilato, potevano risultare appropriate per realizzare quelle che sarebbero diventate, poco più tardi, le antenate delle moderne lenti a contatto. Infatti, l'osservazione effettuata da Ridley permise lo sviluppo e la realizzazione delle moderne lenti intraoculari (IOLs), che ad oggi vengono impiantate in oltre 10 milioni di pazienti ogni anno.

Contemporaneamente a Ridley, anche altre importanti figure fecero scoperte che rivoluzionarono il campo dei biomateriali: ad esempio, il chirurgo britannico John Charnley sviluppò la protesi d'anca, il chirurgo americano Arthur Voorhees inventò il *graft* vascolare, il medico olandese Willem Johan Kolff rivoluzionò la tecnologia della dialisi renale e il chirurgo americano Charles A. Hufnagel inventò la valvola cardiaca a palla e a gabbia.

Questi pionieri, in un'epoca in cui non erano stati ancora stabiliti i principi e le linee guida per l'utilizzo e la realizzazione di materiali per impianti biomedicali, gettarono le fondamenta su cui ancora oggi continua a basarsi e ad evolversi continuamente la scienza dei biomateriali.

Fu solo verso la fine degli anni '60 che un gruppo di ingegneri, chimici, biologi e fisici formalizzò i principi per realizzazione dei biomateriali da utilizzare in ambito biomedico; in particolare, sottolinearono l'importanza della risposta dell'organismo ospite in seguito all'impianto di un materiale estraneo, durante il cosiddetto processo di guarigione, fondamentale per capire se un materiale, anche di recente scoperta, può essere potenzialmente impiegato per applicazioni a contatto con i tessuti corporei [5].

### *Risposta del corpo all'introduzione di biomateriali*

Quando un generico materiale viene impiantato all'interno del corpo induce una risposta, definita come reazione da corpo estraneo. Più in dettaglio il biomateriale, non appena viene inserito, provoca l'assorbimento di proteine non-specifiche dalle diverse conformazioni, da proteine native a proteine denaturate; questo assorbimento, che non si verifica durante un normale processo fisiologico di guarigione di una ferita, può essere utilizzato per investigare la reazione da corpo estraneo. Una grande quantità di cellule differenti, quali monociti, leucociti e piastrine, aderiscono alla superficie del biomateriale e possono determinare una iper-regolazione di citochine, cioè un aumento dei recettori di membrana delle citochine, e di

successivi processi che promuovono l'inflammatione. In aggiunta, l'impianto solitamente è significativamente più grande dei macrofagi che si depositano sulla superficie e questo impedisce ai suddetti macrofagi di fagocitare il corpo estraneo.

Conseguentemente, il processo di inflammatione cronica all'interfaccia con il biomateriale prosegue e i macrofagi fondono insieme per formare grandi cellule multinucleate estranee al corpo che spesso rimangono in loco per l'intera durata dell'impianto. Infine, come ultima fase della reazione da corpo estraneo, si verifica la formazione di un tessuto non vascolarizzato composto da fibre di collagene, che tipicamente presenta uno spessore compreso fra 50-200  $\mu\text{m}$ , il quale va ad incapsulare l'impianto (Figura 1.4).

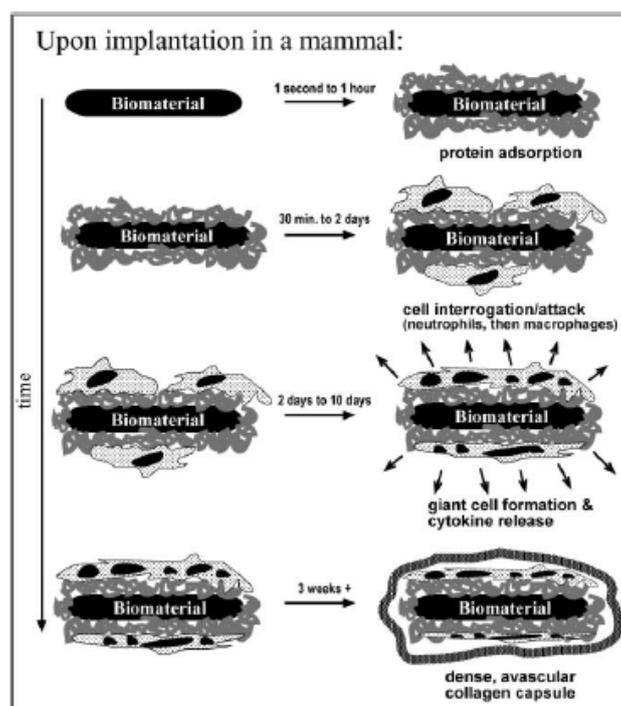


Figura 1.4 Tipico processo di reazione da corpo estraneo.

Sebbene un ingente numero di dispositivi biomedicali venga impiantato ogni anno migliorando se non addirittura salvando le vite dei pazienti trattati, sono presenti sostanziali margini di miglioramento per quanto riguarda la risposta immunitaria innescata. In particolare, la capsula di tessuto fibroso che si forma intorno all'impianto può portare a complicazioni che non favoriscono il normale processo di guarigione come, ad esempio, nel caso della contrazione capsulare delle protesi mammarie, delle barriere isolanti che si creano attorno ad elettrodi, delle cicatrici in prossimità degli anelli di sutura di protesi valvolari cardiache e degli strati fibrosi circostante le protesi vascolari.

In generale, i biomateriali fino ad ora utilizzati non permettono di controllare la risposta biologica che inducono una volta che vengono impiantati all'interno del corpo umano; per questo motivo si parla di una risposta biologica probabilistica e non programmabile.

Nell'ottica di poter risolvere questi problemi, un approccio ingegneristico applicato alla scienza dei materiali potrebbe essere una valida strategia per sintetizzare biomateriali dei quali sia possibile controllare con precisione la risposta all'interfaccia; i biomateriali che rientreranno in questa categoria appartengono ai cosiddetti biomateriali di nuova generazione [5].

### **1.5 Biomateriali di nuova generazione**

L'obiettivo principale dello studio dei biomateriali di nuova generazione è focalizzato sulla conoscenza della risposta biologica durante il processo di guarigione e di infiammazione, al fine di permettere un preciso controllo della risposta, da parte dell'organismo, all'impianto di questi nuovi biomateriali.

Per poter conseguire questo obiettivo, sono stati sviluppati due diversi approcci: il primo prevede di modificare le superficie dei biomateriali per minimizzare la reazione da corpo estraneo e per promuovere il processo di guarigione della ferita, mentre il secondo, che risulta essere quello di maggiore successo, prevede invece il rilascio di farmaci o cellule all'interno dell'organismo ospite. In quest'ultimo caso, è necessario l'impiego di un *carrier* per trasportare e rilasciare le molecole di interesse in un particolare sito in modo efficiente.

#### *Biomateriali con superficie modificata*

La superficie chimica e la topografia dei biomateriali sono due importanti parametri che influenzano l'assorbimento di proteine, l'interazione del biomateriale con le cellule circostanti e la risposta dell'organismo ospite. Per esempio, materiali di natura differente, quali polimeri, metalli o ceramiche, presentano caratteristiche superficiali diverse in termini ad esempio di idrofilicità o durezza, le quali a loro volta sono responsabili di una diversa risposta *in vivo*.

In questo contesto, la modifica superficiale dei biomateriali può essere considerata una tecnica vincente, al fine di minimizzare il rischio di eventuali risposte avverse, migliorando l'interazione tessuto – biomateriale e promuovendo nello stesso tempo una migliore biocompatibilità e biofunzionalità senza alterare le proprietà del materiale stesso [5].

I due metodi principali utilizzati per modificare la superficie di un biomateriale sono:

- 1) Modifiche fisico-chimiche: modifiche che coinvolgono la sostituzione di atomi, di costituenti o di molecole di superficie, e che possono essere ottenute tramite reazioni chimiche (ossidazioni, riduzioni, utilizzo di organosilani o acetilazione), *etching*, processi meccanici di irruvidimento, lucidatura o modellamenti.
- 2) Rivestimento della superficie: consiste nel ricoprire la superficie del materiale con un sottile strato di rivestimento ottenuto tramite *grafting*, rivestimento covalente e non-covalente, oppure deposizione di un film sottile.

Naturalmente, in base alla specifica applicazione richiesta, risulterà necessario scegliere la tecnica di modifica della superficie più opportuna [4,5].

### *Biomateriali per la realizzazione di carrier*

Data la grande richiesta ed il crescente interesse per i dispositivi di trasporto e di rilascio modulato di molecole quali ad esempio farmaci di varia natura, gli sforzi della ricerca di nuovi materiali, soprattutto polimeri (di cui si parlerà più ampiamente in seguito) si sono notevolmente intensificati negli ultimi anni. I polimeri, di origine sia naturale che sintetica, rappresentano una classe di materiali vincente per questo tipo di applicazioni, in quanto presentano un ampio range di proprietà modulabili in funzione della specifica destinazione d'uso.

Tra i principali dispositivi utilizzati come *carrier* figurano idrogeli, micro- e nanoparticelle, nanovettori e patch transdermici (si veda paragrafo 1.9).

## **1.6 Biomateriali polimerici**

I polimeri rappresentano una delle classi di biomateriali di maggior interesse per la realizzazione di dispositivi biomedicali quali impianti ortopedici, dentali e cardiovascolari e protesi per tessuti molli, suture, placche, viti, chiodi e tutte le strutture bioassorbibili, strumenti per il controllo dei fluidi corporei, organi bioartificiali, rivestimenti per sensori, per dispositivi elettronici impiantabili e per lenti a contatto ed intraoculari, oltre che per applicazioni nell'ambito della rigenerazione tissutale. Tutto questo grazie ad alcune peculiarità, quali estesa variabilità in composizione, tale da decretare proprietà fisicomeccaniche idonee alla destinazione d'uso prevista, bassi coefficienti d'attrito (quindi buona resistenza all'usura), facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture

complesse, e la possibilità di apportare modifiche superficiali di natura chimico-fisica senza alterare la porzione interna [6].

Più in dettaglio, con il termine polimeri si intendono tutti i composti organici le cui molecole derivano dall'unione, mediante legame chimico omopolare, di due o più unità strutturali a basso peso molecolare, i monomeri. Mediante un processo di polimerizzazione, attraverso cui i vari monomeri vengono legati tra loro, si ottengono nuove molecole, il cui appellativo può rispecchiare il grado di polimerizzazione raggiunto: si può quindi parlare di dimeri, trimeri, tetrameri, ecc. a seconda che il polimero sia costituito rispettivamente da due, tre, quattro o più monomeri. Nel caso in cui esso raggiunga un peso molecolare maggiore di 5000 Dalton si parla di macromolecola.

Struttura, peso molecolare, processo di polimerizzazione, degradazione, proprietà termiche, grado di cristallinità e procedure di lavorazione sono le caratteristiche che contribuiscono a determinare le proprietà di un generico polimero.

### 1.6.1 Meccanismi di polimerizzazione

I principali meccanismi di polimerizzazione utilizzati per la sintesi dei materiali polimerici sono tre:

1. *Poliaddizione*: meccanismo a più fasi che è possibile quando la molecola di monomero contiene legami doppi o tripli fra gli atomi di carbonio. Affinché la reazione possa iniziare, è necessario l'utilizzo di un iniziatore che può essere il calore, la luce o una sostanza chimica, che rompa il doppio o triplo legame del monomero utilizzato. Infatti, rompendo il doppio legame, è possibile rendere attivo il monomero il quale a sua volta addiziona a sé altri monomeri fino a quando, disattivandosi, la macromolecola diventa stabile.

Le sostanze chimiche più utilizzate sono i radicali liberi (polimerizzazione radicalica) (Figura 1.5), gli anioni (polimerizzazione anionica) e i cationi (polimerizzazione cationica).

Più in dettaglio, di seguito sono riportate le principali fasi di cui si compone il processo di poliaddizione:

Fase 1 = fase di inizio: le molecole di iniziatore vengono attivate dando origine a radicali liberi, i quali, a loro volta, attivano le molecole di monomero;

Fase 2 = fase di accrescimento: durante questa fase si ha la crescita delle molecole di monomero;

Fase 3 = fase di terminazione: questa fase corrisponde alla chiusura della molecola polimerica che può avvenire in tre modi principali:

1. Chiusura con radicale libero;
2. Diretto accoppiamento di due molecole in crescita;
3. Scambio di un atomo di idrogeno;

Fase 4 = fase di trasferimento di catena: fase durante la quale una molecola in crescita può disattivarsi ed arrestare il suo accrescimento attivando un altro monomero o una catena che era già stata chiusa in precedenza, la quale riprende la sua fase di accrescimento.

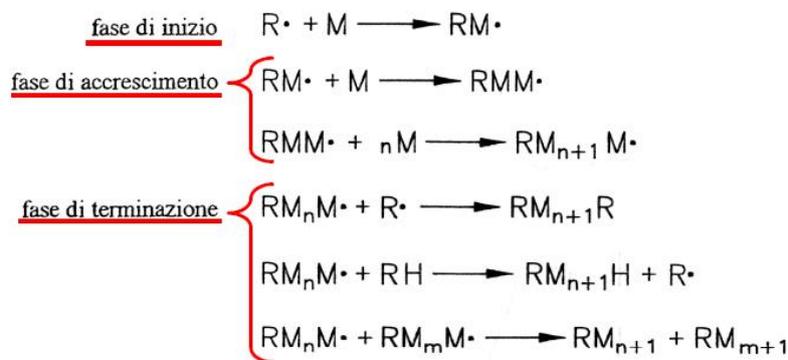


Figura 1.5 Fasi del processo di poliaddizione radicalica.

Questo tipo di meccanismo è caratterizzato da assenza di altri prodotti di reazione e da una crescita veloce del peso molecolare delle catene in accrescimento [3].

2. *Policondensazione*: meccanismo di reazione che avviene a step fra una subunità acida, estere o acido, e una subunità glicolica, entrambe bifunzionali, le quali reagiscono dando origine a prodotti a peso molecolare via via più alto, e la cui struttura chimica è differente da quella dei reagenti di partenza, insieme a prodotti secondari quali, ad esempio, acqua (H<sub>2</sub>O), metanolo (CH<sub>3</sub>OH), cloruro di sodio (NaCl) oppure acido cloridrico (HCl).

Occorre tenere presente che materiali policondensati acquisiscono le loro proprietà d'impiego al raggiungimento di un peso molecolare dell'ordine di 10000-20000 e che tale processo di polimerizzazione, oltre ad attuarsi con relativa lentezza, tende a limitare il grado di polimerizzazione del polimero finale [2,3].

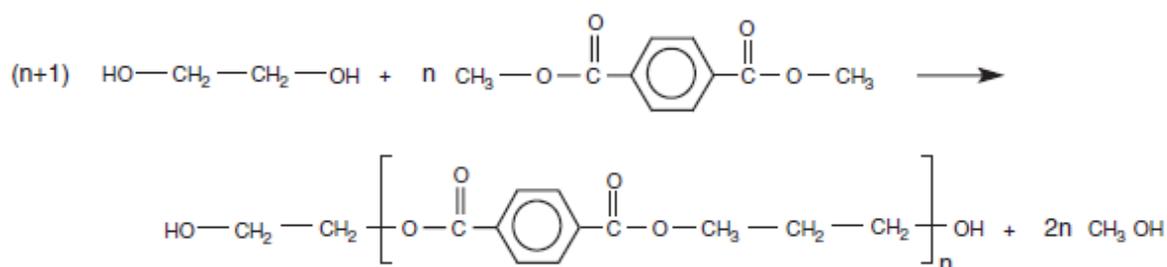


Figura 1.6 Esempio di policondensazione: sintesi del Polietilentereftalato o PET.

3. Polimerizzazione per apertura d'anello o *Ring-Opening Polymerization (ROP)*: la *Ring-Opening Polymerization* è una poliaddizione che, potendo essere condotta in presenza di limitate reazioni secondarie, agevola il controllo di proprietà, quali il peso molecolare e la sua distribuzione, o la presenza di opportuni gruppi funzionali terminali. I tipici monomeri ciclici che possono essere polimerizzati attraverso questo tipo di meccanismo sono monomeri bi-funzionali che presentano gruppi reattivi, come ad esempio lattoni, lattidi, diesteri ciclici ed acetali chetonici ciclici (Figura 1.7). Inoltre, affinché la reazione possa avere luogo, è necessario che l'anello venga aperto attraverso un iniziatore, ad esempio un reagente nucleofilo, un reagente elettrofilo oppure un radicale libero [7].

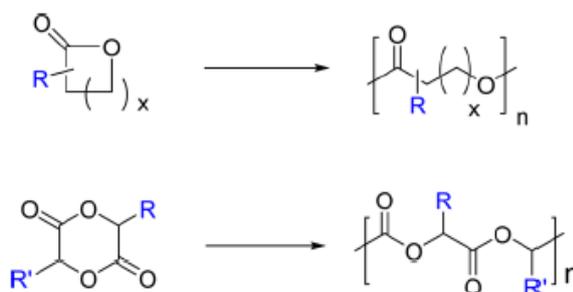


Figura 1.7 Esempio di *Ring-Opening Polymerization*.

### 1.6.2 Peso Molecolare

Secondo la definizione, il peso molecolare è inteso come la somma dei pesi atomici dei singoli elementi che costituiscono una molecola.

Nel caso specifico dei polimeri il peso molecolare di una molecola (M) è uguale al peso molecolare del monomero moltiplicato per il grado di polimerizzazione (n), a sua volta definito come il numero di unità monomeriche che costituiscono la macromolecola. A seguito della complessità dei meccanismi coinvolti in una reazione di polimerizzazione, la massa di

un polimero di solito non contiene una sola macromolecola, ma molte, e il grado di polimerizzazione (e di conseguenza il peso molecolare) non è uguale per tutte. Quindi, un polimero è di solito caratterizzato da una distribuzione di pesi molecolari, e non da un valore univoco. Per questo motivo, è utile definire un peso molecolare medio, le cui due possibili definizioni sono (Figura 1.8):

- i- peso molecolare medio numerale ( $M_n$ ): corrisponde alla media numerica dei pesi molecolari, e viene definito come il rapporto tra il peso di una quantità nota di polimero ed il numero di macromolecole contenute in esso;

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^n N_i M_i}{\sum_{i=1}^n N_i}$$

- ii- peso molecolare medio ponderale ( $M_w$ ): indica la media pesata sulla massa delle macromolecole.

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^n N_i M_i^2}{\sum_{i=1}^n N_i M_i}$$

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

Il rapporto  $M_w / M_n$  è chiamato indice di polidispersità (PDI) e rappresenta una misura della larghezza della distribuzione dei pesi molecolari.

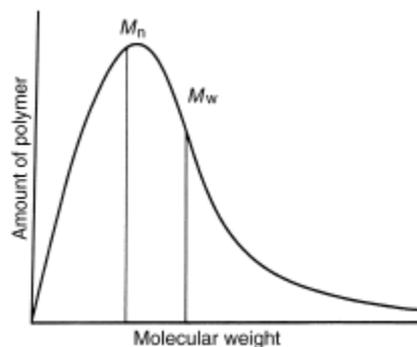


Figura 1.8 Distribuzione del peso molecolare di un polimero.

Sebbene il limite teorico inferiore per tale valore sia 1, gli esiti sperimentali nell'ambito dei polimeri sintetici mostrano che solo la polimerizzazione anionica consente di ottenere valori inferiori a 1.1, mentre nella maggioranza dei casi il PDI vale 2. Valori del grado di polidispersità inferiori e superiori a 2 identificano, rispettivamente, distribuzione dei pesi molecolari strette e larghe. Nel caso di applicazioni biomedicali, un peso molecolare elevato ed una distribuzione relativamente stretta, indice di buone proprietà meccaniche e bassa dispersione della distribuzione dei pesi molecolari, costituiscono, unitamente all'assenza di monomero residuo potenzialmente tossico, requisiti particolarmente importanti [2,3].

### 1.6.3 Cristallinità

I polimeri sono macromolecole che presentano solitamente una struttura a due fasi, una amorfa, sempre presente, seppure in percentuali variabili (più elevate in corrispondenza di strutture ramificate e reticolate), ed una cristallina, dove per stato cristallino si intende la disposizione geometricamente ordinata nelle tre direzioni dello spazio delle catene macromolecolari. La componente cristallina, di solito maggiore in presenza di catene lineari e regolari, è caratterizzata da piccola estensione e coinvolgimento di un numero ridotto di catene, in grado di ordinarsi e cristallizzare grazie all'elevato peso molecolare. Lo stato amorfo, invece, è indicativo del mantenimento, da parte del polimero allo stato solido, di una struttura disordinata caratteristica dello stato fuso, simile ad un gomitolo a più fili (Figura 1.9). È proprio questa conformazione spaziale che determina le proprietà viscoelastiche dei materiali polimerici, rendendo possibili sia distensioni elastiche delle singole macromolecole sia scorrimenti viscosi di alcune macromolecole rispetto ad altre.

Si definisce grado di cristallinità il rapporto percentuale in peso di sostanza in forma cristallina rispetto al peso totale. Esso può essere misurato per mezzo di misure di densità, ai raggi X, all'infrarosso, e risulta dipendente dalla storia termica e meccanica della sostanza in esame. Il grado di cristallinità varia da zero a poche unità in polimeri prevalentemente amorfi oppure fortemente ramificati, mentre può raggiungere valori anche molto elevati nel caso di polimeri a struttura lineare non ramificata.

Generalmente, un maggiore grado di cristallinità si traduce in una maggiore densità, data dal migliore impacchettamento delle macromolecole. Inoltre, la presenza di cristalliti all'interno del polimero porta ad un aumento della rigidità meccanica, soprattutto ad alte temperature, e determina un minor coefficiente di attrito e quindi una migliore resistenza all'usura, maggiore durezza, maggiore resistenza all'aggressione ambientale e maggiore resistenza al *creep* [2,3].

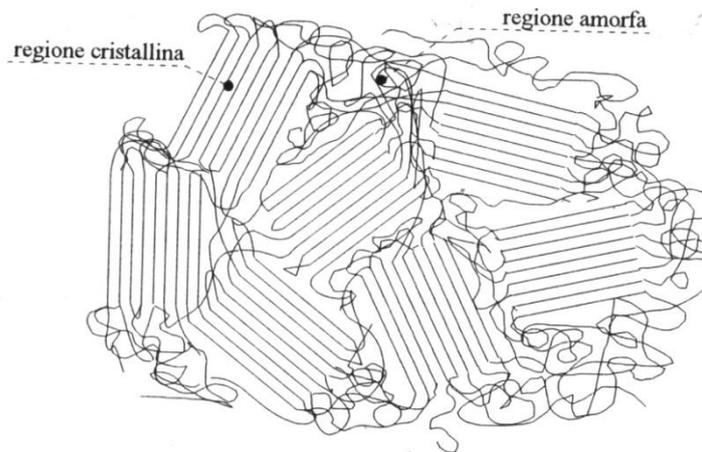


Figura 1.9 Regioni amorphe e cristalline in un materiale polimerico.

### 1.6.4 Proprietà Termomeccaniche

In base alle proprietà termomeccaniche, i materiali polimerici possono essere classificati in termoplastici e termoindurenti.

I polimeri termoplastici, a catena lineare o ramificata, sono modellabili plasticamente un numero praticamente illimitato di volte, purché ciò avvenga in un certo range di temperature, mentre invece i polimeri termoindurenti, a catena reticolata, oltre un certo stadio del processo di ottenimento non sono più modellabili e per di più è proprio il calore che determina l'indurimento del polimero.

A seconda delle proprietà meccaniche richieste, è necessario conoscere lo stato del materiale alla temperatura d'esercizio [3]. Se si analizza l'andamento del modulo elastico di un polimero in funzione della temperatura, è possibile individuare alcune temperature caratteristiche, in corrispondenza delle quali il materiale assume comportamenti diversi:

- Temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ): in corrispondenza di tale valore il materiale passa da uno stato vetroso a uno gommoso. Più in dettaglio, se la  $T_g$  è molto inferiore rispetto alla temperatura ambiente si è in presenza di materiali gommosi, caratterizzati da bassa rigidità ma altamente tenaci e deformabili. Se invece la  $T_g$  risulta superiore alla temperatura ambiente il materiale avrà caratteristiche vetrose, ossia fragile e scarsamente deformabile. Il valore di questa temperatura risulta inferiore per le materie termoplastiche rispetto a quelle termoindurenti.
- Temperatura di rammollimento ( $T_r$ ): per i polimeri amorfi segna il passaggio dallo stato gommoso, comunque solido, allo stato liquido.

- Temperatura di fusione ( $T_m$ ): identifica il punto di fusione termodinamico della fase cristallina. Dal momento che a tale temperatura si verifica il cedimento del reticolo, il suo superamento implica una variazione significativa delle proprietà meccaniche.
- Temperatura limite di stabilità chimica ( $T_L$ ): temperatura oltre la quale il materiale si degrada a causa della rottura dei suoi legami chimici. Oltre questo valore il polimero è a tutti gli effetti un materiale diverso, con struttura, caratteristiche meccaniche differenti rispetto al materiale di partenza.

In Figura 1.10, è mostrato il tipico andamento del modulo elastico di diversi materiali polimerici in funzione della temperatura. Come si può notare, nel caso di un materiale amorfo, all'aumentare della temperatura si osservano due transizioni in corrispondenza di due successivi intervalli di temperatura: la prima transizione, nell'intorno della temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ), prevede la modifica delle proprietà del materiale che da vetroso diventa gommoso mentre la seconda, nell'intorno della temperatura di rammollimento ( $T_r$ ), è responsabile della divisione del campo di proprietà di un polimero gommoso da quello di un polimero liquido. Oltre la temperatura limite di stabilità chimica ( $T_L$ ), il polimero si degrada in quanto si rompono i legami chimici e quindi si è in presenza, a tutti gli effetti, di un altro materiale.

Nel caso di un materiale polimerico parzialmente cristallino, la prima transizione, detta transizione vetrosa, modifica solo leggermente le proprietà meccaniche, che invece mostrano una brusca caduta durante la seconda transizione, nell'intorno della temperatura di fusione ( $T_m$ ).

Infine, nel caso di un polimero reticolato termoindurente non si verificano significative variazioni di proprietà all'aumentare della temperatura, fino al limite di stabilità chimica.

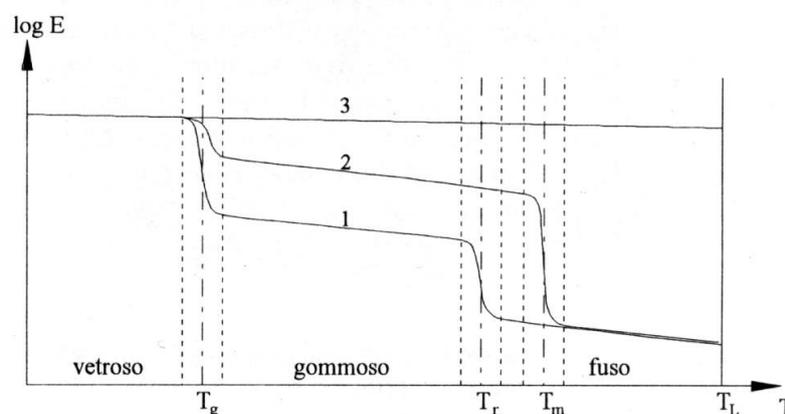


Figura 1.10 Andamento del modulo di elasticità in funzione della temperatura per un polimero lineare amorfo (1), parzialmente cristallino (2) e reticolato (3).

### 1.6.5 Processi di degradazione

In un ambito come quello biomedicale, in cui specifiche come biocompatibilità e biorisorbibilità sono necessarie, i polimeri sintetici biodegradabili stanno ricevendo una sempre maggiore attenzione sia da parte delle comunità accademiche sia da parte delle realtà industriali.

Con il termine “degradazione” si intende il processo chimico durante il quale si verifica la rottura dei legami presenti all’interno del materiale, sia nella catena principale sia a livello dei gruppi laterali. Uno dei principali effetti della degradazione è la diminuzione del peso molecolare del materiale, con conseguente diminuzione delle proprietà meccaniche. Inoltre, un potenziale problema relativo all’utilizzo di questi tipi di materiali è la tossicità dei prodotti di degradazione rilasciati dall’impianto. Tuttavia, l’utilizzo di impianti biodegradabili permette di superare il bisogno di un secondo intervento chirurgico per la rimozione del dispositivo al termine del suo utilizzo, soluzione che riduce notevolmente i rischi per il paziente. Il processo di degradazione può essere innescato e favorito da effetti chimici, effetti di processi di sterilizzazione e da sollecitazioni di tipo meccanico [2].

In ambiente biologico, la degradazione avviene per opera dei liquidi e dei fluidi corporei, in particolare a causa dell’azione degli ioni  $\text{OH}^-$  e dell’ossigeno disciolto. I principali meccanismi di degradazione dell’impianto che si verificano per effetto dell’ambiente biologico sono quello idrolitico (erosione di *bulk*) e quello enzimatico (erosione superficiale). Spesso tali meccanismi sono concomitanti, ed uno risulterà prevalente rispetto all’altro a seconda che la velocità di penetrazione dell’acqua sia maggiore o minore rispetto alla velocità di attacco superficiale da parte dell’enzima [8]. Il primo e principale effetto della degradazione idrolitica è la drastica diminuzione del peso molecolare del materiale, dovuta alla rottura dei legami idrolizzabili (ad esempio quelli esterei di cui sono ricchi i poliesteri), mentre la forma del dispositivo rimane inizialmente invariata. Parallelamente si osserva un aumento del grado di cristallinità, in quanto la porzione amorfa è solitamente la prima ad essere degradata. Solo a stadi successivi del processo, frammenti di catene molto corti possono passare in soluzione, dando luogo anche ad una perdita di peso gravimetrico.

Viceversa, nel caso della degradazione enzimatica, si assisterà ad una graduale diminuzione del volume del materiale (tanto maggiore quanto più alto è il rapporto superficie/volume), e quindi del suo peso, mentre la perdita di peso molecolare risulterà molto più limitata, in quanto l’enzima riesce ad attaccare il materiale solo a livello della superficie, lasciando inalterata la porzione più interna (Figura 1.11).



Figura 1.11 Meccanismi di degradazione; erosione superficiale vs. degradazione in *bulk*.

### 1.6.5.1 Fattori che influenzano la velocità del processo di degradazione

Una volta descritti i principali meccanismi di degradazione che possono verificarsi quando un dispositivo realizzato con biomateriali polimerici viene impiantato all'interno del corpo umano, è importante analizzare anche i fattori che influenzano maggiormente la velocità di degradazione. Tra questi, i principali sono:

- Proprietà chimico-fisiche: tipo di monomero, composizione e lunghezza della catena macromolecolare, peso molecolare, geometria e superficie esposta;
- Viscosità: tipicamente, polimeri con una elevata viscosità presentano un meccanismo di degradazione meccanica più elevato quando viene applicato uno sforzo di taglio appropriato; questo aspetto è una conseguenza della ridotta mobilità del polimero che permette alle catene polimeriche di risentire dell'intero sforzo applicato. Al contrario, polimeri con una bassa viscosità sono in grado di dissipare lo sforzo di taglio che gli viene applicato grazie alla loro maggiore mobilità e traslazione multilaterale;
- Temperatura di fusione  $T_m$ : maggiore è la differenza tra la temperatura di esercizio, che nel corpo umano tipicamente è 37 °C, e quella di fusione del materiale, minore è la biodegradabilità poiché minore risulta la mobilità delle catene polimeriche;
- Temperatura di transizione vetrosa  $T_g$ : le stesse considerazioni effettuate per la temperatura di fusione, possono essere traslate anche per la temperatura di transizione vetrosa poiché anche in questo caso lavorando al di sopra di tale temperatura le catene polimeriche risultano più mobili e la velocità di biodegradazione aumenta;
- Grado di cristallinità: come già accennato, dal momento che la fase amorfa risulta essere la prima ad essere biodegradata, un aumento della cristallinità del polimero

determina una diminuzione della sua velocità di degradazione. Infatti, l'elevato grado di impacchettamento delle catene delle porzioni cristalline le rende meno accessibili;

- Grado di perfezione dei cristalli: a parità di grado di cristallinità, cristalliti piccoli e contenenti difetti vengono degradati più facilmente rispetto a strutture di dimensioni maggiori, con un maggiore grado di impacchettamento e più pure;
- Idrofilicità: maggiore è la bagnabilità della superficie polimerica, maggiore è la velocità di degradazione.

Oltre a questi aspetti principali, occorre inoltre tenere presente fattori non direttamente legati al materiale stesso, quali la posizione dell'impianto all'interno dell'organismo, il tipo di tessuto con cui viene a contatto, la risposta immunitaria e le condizioni generali dell'organismo ospite (età, stato di salute, farmaci assunti).

## **1.7 Poliesteri alifatici**

I poliesteri sono polimeri caratterizzati dalla presenza di legami esterei all'interno della catena macromolecolare. Si dividono in aromatici e alifatici in base alla presenza o meno di anelli aromatici in catena, e vengono ottenuti principalmente mediante policondensazione di uno o più acidi carbossilici polifunzionali con uno o più alcoli polifunzionali. I poliesteri alifatici rappresentano la classe di polimeri biodegradabili di maggior successo, importanza e diffusione commerciale in riferimento all'applicazione in campo biomedico, soprattutto per quelle applicazioni che richiedono l'utilizzo di materiali biodegradabili (ad esempio rilascio controllato di farmaci, terapia genica, medicina rigenerativa). Inoltre, tale classe è la più intensamente studiata in termini di meccanismi di degradazione e relazioni struttura-proprietà.

### **1.7.1 Poliesteri alifatici per uso biomedicale**

#### ***1.7.1.1 Acido poliglicolico (PGA)***

L'acido poliglicolico (PGA) è il più semplice dei poliesteri alifatici, ottenuto mediante ROP del glicolide, un diestere ciclico composto da due unità di acido glicolico (Figura 1.12).

Il PGA presenta le seguenti caratteristiche:

- Elevato grado di cristallinità;
- Temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) nell'intervallo 35-40 °C;
- Temperatura di fusione ( $T_m$ ) nell'intervallo 225-230 °C;
- Elevato modulo elastico ( $E \approx 12.8$  GPa);
- Elevata velocità di biodegradazione;

- Bassa solubilità nella maggior parte dei solventi organici.

Come conseguenza di queste proprietà, il PGA è stato largamente impiegato, già a partire dagli anni '70, per la realizzazione di suture bioriassorbibili, ed è stato ampiamente studiato come materiale per *scaffold* per la rigenerazione di ossa, cartilagine, tendini, denti, e di tessuti molli come intestino, tessuto spinale e linfatico.

La combinazione di tutte le caratteristiche sopra elencate limita le applicazioni degli omopolimeri del PGA per impianti di tessuti molli [6].

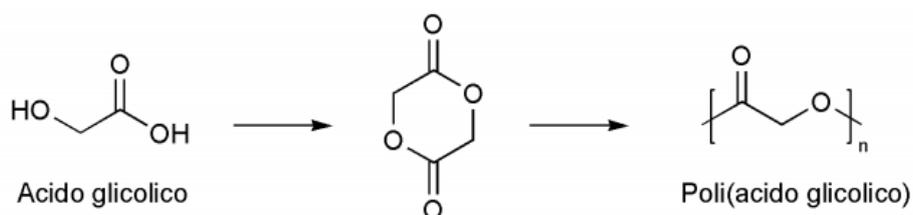


Figura 1.12 Schema di sintesi dell'acido poliglicolico (PGA).

### 1.7.1.2 Acido polilattico (PLA)

L'acido polilattico (PLA) è un poliesteri alifatico ottenuto sia mediante condensazione dell'acido lattico sia mediante ROP del dimero dell'acido lattico (Figura 1.13).

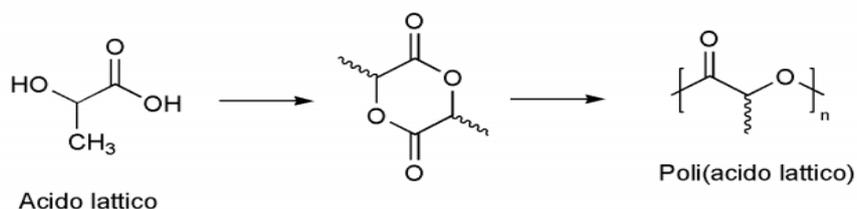


Figura 1.13 Schema di sintesi dell'acido polilattico (PLA).

L'acido lattico è una molecola chirale che esiste in natura sotto forma di due isomeri ottici, acido-L-lattico e acido-D-lattico, che si differenziano per il loro effetto sulla luce polarizzata. Il termine "acido poli-lattico" fa dunque riferimento ad una famiglia di polimeri: acido poli-L-lattico puro (PLLA), acido poli-D-lattico puro (PDLA) e acido poli-D,L-lattico (PDLLA).

La polimerizzazione del lattide verso polimeri ricchi di L-isomero permette di ottenere polimeri semicristallini, mentre risultano amorfi quelli contenenti più del 15% di D-isomero. Le proprietà variano a seconda dell'isomeria (Figura 1.14): il PDLLA 50:50, caratterizzato da una distribuzione random di unità L e D, è amorfo, con basso carico a rottura, elevata deformabilità e tempi di degradazione relativamente brevi, mentre il PLLA, semicristallino (le cui  $T_m$  e  $T_g$  sono comprese tra 175-178°C e 60-65°C), è caratterizzato da buona resistenza a

trazione e compressione, bassa deformazione a rottura e modulo elastico tale da renderlo idoneo per applicazioni che richiedono buona resistenza ai carichi [9].

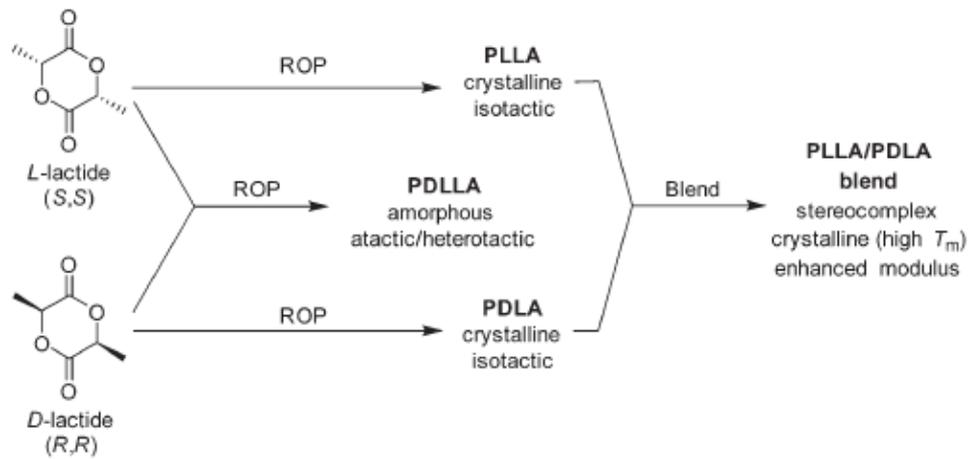


Figura 1.14 Proprietà dei polimeri derivanti dalle due diverse forme isomeriche del PLA.

Il PLA venne studiato per la prima volta come possibile materiale per il rilascio controllato di farmaci nel 1971, anche grazie alle sue eccellenti proprietà di biodegradabilità e biocompatibilità. Tali proprietà ne hanno permesso lo sviluppo come materiale anche per applicazioni in ingegneria tissutale, per suture, fissaggi ortopedici e per la fabbricazione di *scaffold* per la rigenerazione di ossa, cartilagini, tendini, nervi e vasi sanguigni. Rigidità, stabilità termica non troppo elevata e costi di produzione ancora piuttosto alti limitano il suo sviluppo quale generica plastica, nonostante ad oggi venga già impiegato in sostituzione dei tradizionali materiali a base di fonti non rinnovabili in applicazioni ambientali e nell'ambito degli imballaggi.

Il gruppo metile in catena laterale rende il polimero molto più idrofobico e idroliticamente stabile rispetto al PGA. Per esempio, il PLLA ad alto peso molecolare impiega più di 5 anni per essere completamente riassorbito. Proprio a causa della sua lenta velocità di degradazione, sistemi unicamente a base di PLLA non possono essere impiegati, ad esempio, in ambito del rilascio controllato di farmaci. Una possibile soluzione consiste nel copolimerizzare il PLLA con altri polimeri maggiormente degradabili o nell'utilizzo di tecniche di sintesi diverse che, ad esempio, prevedano l'impiego di radiazioni.

### 1.7.1.3 Acido polilattico-co-glicolico (PLGA)

Allo scopo di espandere il range di applicazioni biomedicali di materiali a base unicamente di PLA e PGA, la ricerca ha portato allo sviluppo, e alla sintesi, di copolimeri a base di acido

glicolico (GA) e di acido lattico (LA), sia in forma L-lattico che DL-lattico. L'acido polilattico-co-glicolico è infatti un copolimero statistico ottenuto mediante copolimerizzazione dei dimeri ciclici dell'acido glicolico e lattico (Figura 1.15).

Come precedentemente descritto, in seguito alla differente velocità di degradazione idrolitica dei due omopolimeri costituenti, il processo di degradazione del PLGA può essere modulato sulla base della sua composizione: ad esempio, il copolimero statistico PLGA costituito da quantità equimolari di acido lattico e acido glicolico presentano la più alta suscettibilità alla degradazione idrolitica (~ 1-2 mesi).

Grazie a questa variabilità di proprietà, il PLGA ha trovato applicazioni in ambito biomedicale come materiale per fili di sutura biodegradabili multi-filamento e fili di sutura rinforzanti, *scaffold* biodegradabili per ingegneria tissutale e per il rilascio controllato di farmaci (*drug delivery*) [8].

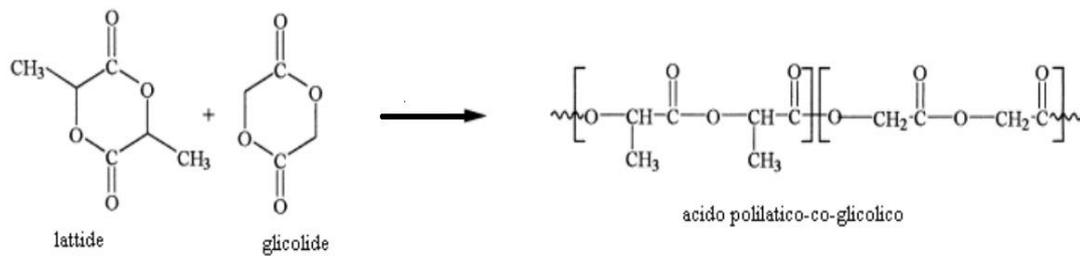


Figura 1.15 Schema di sintesi dell'acido polilattico-co-glicolico.

#### 1.7.1.4 Poli( $\epsilon$ -caprolattone) (PCL)

Il poli( $\epsilon$ -caprolattone) è un poliesteri alifatico semicristallino lineare ottenuto mediante ROP dell'estere ciclico  $\epsilon$ -caprolattone (Figura 1.16).

Grazie al suo elevato allungamento a rottura, permeabilità a molteplici sostanze, un elevato potenziale osteoinduttivo, e basso rilascio di prodotti dannosi per l'organismo, il PCL è stato oggetto di studio per lo sviluppo di sistemi a rilascio controllato impiantabili e a lungo termine. Il lento tempo di degradazione (~ 2 anni), rispetto a quelli del PGA e del PDLLA, ha spinto la ricerca verso la sintesi di copolimeri a base di PCL caratterizzati da un minore grado di cristallinità, al fine di aumentare la biodegradabilità dell'omopolimero.

Diversi copolimeri, materiali compositi e miscele a base di PCL sono stati investigati come dispositivi per suture a lunga durata, per il rilascio prolungato di farmaco (>1 anno), per la rigenerazione di nervi, come rinforzi tissutali, nella chirurgia orale, come materiali anti-adesioni per la medicazione di ferite [8].

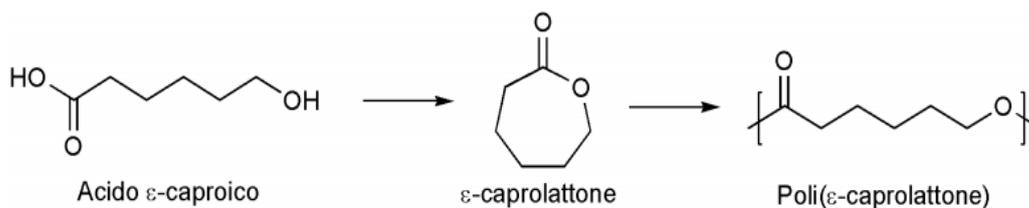


Figura 1.16 Schema di sintesi del poli( $\epsilon$ -caprolattone).

### 1.7.1.5 Poli(butilene succinato) (PBS)

Negli ultimi anni, un nuovo membro all'interno dell'ampia classe dei poliesteri alifatici ha riscosso una sempre maggiore attenzione come possibile materiale per applicazione in biomedicina: si tratta del poli(butilene succinato), o PBS. Il PBS è disponibile in commercio dal 1993, e viene prodotto sotto il nome commerciale di Bionolle™ da Showa-Denko oppure sotto il nome commerciale di GS PLA™ da Mitsubishi Chemical Corporation.

Il poli(butilene succinato) viene sintetizzato a partire da acido succinico (SA), oppure dal suo estere dimetilico, il dimetilsuccinato (DMS), e 1,4-butandiolo (BD), mediante policondensazione in massa a due stadi (Figura 1.17): durante il primo stadio hanno luogo le reazioni di esterificazione (o transesterificazione nel caso si utilizzi DMS) con formazione di oligomeri a basso peso molecolare e rimozione di acqua (o metanolo), mentre il secondo, condotto a temperatura più elevata e in condizioni di pressione ridotta, ha lo scopo di rimuovere il BD in eccesso (generalmente si usa un eccesso di glicole del 10-20% circa) e di favorire ulteriormente le reazioni di transesterificazione, così da ottenere PBS ad alto peso molecolare. La reazione viene condotta in presenza di un catalizzatore, solitamente a base di titanio, come ad esempio il titanio (IV) butossido (TBT), i quali sono comunemente ottenuti da risorse fossili e sono facilmente reperibili sul mercato.

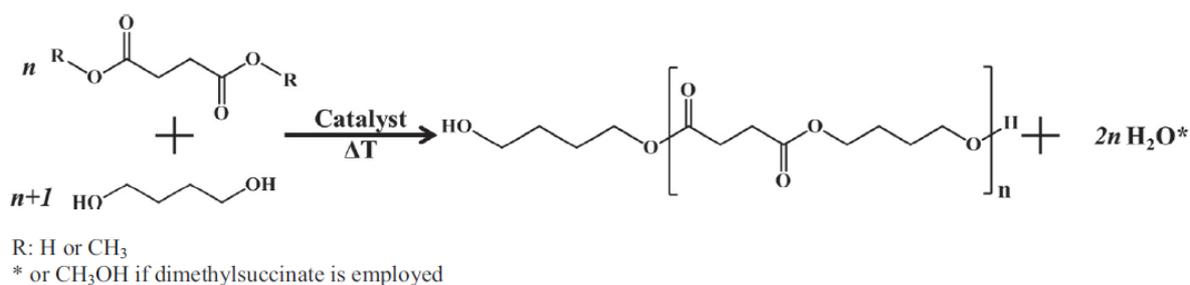


Figura 1.17 Schema di sintesi del PBS.

Il successo del PBS come materiale termoplastico è strettamente collegato alle sue ottime proprietà, alcune delle quali riassunte in Tabella 1.1, insieme al moderato costo di produzione, alla semplice procedura di sintesi, già impiegata a livello industriale, e alla possibilità di ottenerlo a partire da fonti 100% rinnovabili.

Tabella 1.1: proprietà del PBS sintetizzato in laboratorio confrontate con quelle del Bionolle™.

PBS	$M_n$ (g/mol)	PDI	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\chi_c$ (%)	$E$ (MPa)	$\sigma_y$ (%)	$\sigma_b$ (%)	$\epsilon_b$ (%)
Lab scale without chain extender [31]	51,200	2.1	-34	115	41 ± 4	337 ± 27	/	31 ± 2	24 ± 4
Lab scale without chain extender [38]	64,400 <sup>a</sup>	n.r.	-18	112	40	n.r.	35 ± 1	29 ± 2	275 ± 35
Lab scale with chain extender [41]	81,200	2.5	-30	112	44 ± 4	366 ± 5	/	27 ± 2	303 ± 20
Lab scale with chain extender [42]	$[\eta] = 2.72 \text{ dL g}^{-1}$		-37	111	n.r.	372 ± 30	/	45 ± 1	530 ± 10
Bionolle™ [27,43]	66,600	2.2	-32	114	35-45	470-540	31	59-62	660-710
LDPE [44,45]	n.r.	n.r.	-120	108	39-42	200-300	12	36	400
PP [46]	n.r.	n.r.	5	162	51	855	25	31	500

<sup>a</sup>  $M_w$  (g/mol).

Il PBS è un polimero semicristallino con un elevato grado di cristallinità ( $X_c = 35-45\%$ ), con temperatura di fusione di circa 110-115°C. È inoltre caratterizzato da una temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) al di sotto della temperatura ambiente (intorno a -30°C); pertanto questo materiale possiede uno tra i più ampi intervalli di lavorabilità tra i poliesteri alifatici, e può essere lavorato attraverso estrusione, stampaggio a iniezione e termoformatura. Dal punto di vista meccanico, il PBS mostra un comportamento fragile (allungamenti a rottura inferiori al 5%), ed un'elevata rigidità (modulo elastico intorno ai 300-500 MPa), le quali possono essere notevolmente migliorate inserendo in fase di sintesi piccole quantità di diisocianati, tipicamente esametilene diisocianato, usate come estensori di catena.

Infine, il poli(butilene succinato) è caratterizzato da una comprovata biodegradabilità e biocompatibilità. Per quanto riguarda la biocompatibilità del PBS, sono stati effettuati esperimenti sia *in vivo* sia *in vitro*, utilizzando, in quest'ultimo caso, differenti tipi di cellule sia di origine animale sia umane.

Per quanto riguarda gli studi effettuati *in vitro* sono state utilizzate cellule staminali, fibroblasti, cioè cellule che sintetizzano matrice extracellulare e collagene, osteoblasti, cioè cellule responsabili nella sintesi dell'osso, e condrociti, cioè cellule presenti nella cartilagine sana sia di origine animale sia di origine umana, mentre gli esperimenti *in vivo* sono stati condotti attraverso impianti sottocutanei in ratti, topi e conigli, con tempi di valutazione variabili dalle 4 alle 36 settimane. Tutti i risultati ottenuti hanno dimostrato che il PBS è un materiale altamente biocompatibile [10].

Tra i principali svantaggi del PBS è doveroso menzionare una velocità di idrolisi piuttosto bassa ed una ridotta flessibilità, che potrebbero ostacolare l'utilizzo in determinate applicazioni, quali ad esempio la realizzazione di *patch* adesivi per il rilascio controllato di farmaci. Per migliorare questi aspetti, si può procedere con tecniche di miscelazione fisica o copolimerizzazione, attraverso cui è possibile modulare e migliorare proprietà come la bagnabilità, il grado di cristallinità, le proprietà meccaniche e la velocità biodegradazione, agendo sull'architettura molecolare e sulla natura della co-unità o dell'altro componente la blend. Una delle applicazioni biomediche più studiata dei copolimeri e delle blend a base di PBS è il rilascio controllato di farmaci, come materiali per la realizzazione di micro e nanosfere [11]. Un'altra applicazione è nell'ambito dell'ingegneria tissutale, in cui questi materiali sono impiegati sia sotto forma di film sia come scaffold, ottenuti mediante elettrofilatura o estrusione [11, 12].

### 1.8 Polimeri di origine naturale

I polimeri di origine naturale sono, a differenza dei polimeri ottenuti per via sintetica, macromolecole prodotte da organismi viventi, sia animali che vegetali, a partire da materie prime di origine biologica. Essi possono essere suddivisi in tre classi a seconda delle unità monomeriche costituenti (Tabella 1.2):

- polinucleotidi: macromolecole costituite da monomeri nucleotidici;
- polipeptidi e proteine: polimeri costituiti da unità amminoacidiche;
- polisaccaridi: strutture formate da sequenze di carboidrati legate tra loro in catene prevalentemente lineari.

Tabella 1.2: proprietà delle tre classi di polimeri di origine naturale.

	Polymer	Incidence	Physiological function
A. Proteins	Silk	Synthesized by arthropods	Protective cocoon
	Keratin	Hair	Thermal insulation
	Collagen	Connective tissues (tendon, skin, etc.)	Mechanical support
	Gelatin	Partly amorphous collagen	(Industrial product)
	Fibrinogen	Blood	Blood clotting
	Elastin	Neck ligament	Mechanical support
	Actin	Muscle	Contraction, motility
B. Polysaccharides	Myosin	Muscle	Contraction, motility
	Cellulose (cotton)	Plants	Mechanical support
	Amylose	Plants	Energy reservoir
	Dextran	Synthesized by bacteria	Matrix for growth of organism
	Chitin	Insects, crustaceans	Provides shape and form
C. Polynucleotides	Glycosaminoglycans	Connective tissues	Contributes to mechanical support
	Deoxyribonucleic acids (DNA)	Cell nucleus	Direct protein biosynthesis
	Ribonucleic acids (RNA)	Cell nucleus	Direct protein biosynthesis

I polimeri naturali, rispetto a quelli sintetici, offrono il vantaggio di essere molto simili alle macromolecole presenti nell'ambiente biologico, in quanto contengono opportune sequenze che favoriscono il riconoscimento e l'adesione cellulare. In funzione di tale caratteristica, i polimeri naturali sono caratterizzati da elevata biocompatibilità, in quanto non innescano risposte infiammatorie e non alterano la bioattività delle molecole con cui entrano in contatto, caratteristica particolarmente rilevante nel caso in cui tali materiali vengano utilizzati per realizzare dispositivi per il rilascio di farmaci o altre sostanze.

Una ulteriore interessante caratteristica dei polimeri naturali è la possibilità di controllarne la velocità di degradazione, mediante opportuni processi di reticolazione.

Di contro, questi polimeri possono mostrare alcuni svantaggi in termini di proprietà non omogenee e strettamente dipendenti non solo dalla specie, ma anche dallo specifico tessuto di provenienza [2]. Inoltre, i polimeri di origine animale sono facilmente soggetti a contaminazione batterica e richiedono diversi processi di purificazione e decellularizzazione prima del loro impiego, al fine di eliminare agenti patogeni e cellule che potrebbero innescare risposte immunitarie avverse nell'organismo ospite. Tali processi sono particolarmente aggressivi, e per questo motivo potrebbero alterare e persino denaturare le caratteristiche del materiale.

La maggior parte dei polimeri naturali utilizzati in biomedicina trova applicazione nell'ambito del rilascio controllato di farmaci, per la realizzazione di biosensori, di fibre per la cura delle ferite, di *scaffold* per l'ingegneria tissutale, agenti gelificanti o emulsionanti.

### **1.8.1 Polisaccaridi**

I polisaccaridi sono macromolecole formate dall'unione per condensazione di numerose unità ripetitive, legate insieme da legami covalenti.

I polisaccaridi sono diffusissimi in natura in forma libera o combinata, con le proteine nelle glicoproteine o con i grassi nei glicolipidi, e possono essere classificati in più modi a seconda della loro origine, animale o vegetale, dei vari zuccheri costituenti, e della composizione/struttura chimica. Risultano materiali molto interessanti in campo biomedico in quanto biodegradabili e caratterizzati da facile lavorabilità.

Uno dei più importanti polisaccaridi di origine vegetale, nonché quello presente in maggiore quantità in natura, è la cellulosa. Essa è una delle maggiori componenti dei tessuti vegetali (la cellulosa, ad esempio, rappresenta la principale componente del tessuto fibroso delle pareti cellulari vegetali), è insolubile in acqua e non è digeribile dal corpo umano. Inoltre, molte

molecole di cellulosa possono disporsi in modo parallelo per formare strutture cristalline, le microfibrille di cellulosa, caratterizzate da elevata resistenza meccanica e agli attacchi enzimatici, oppure formare strutture amorfe, dette emicellulose, caratterizzate invece da scarsa resistenza allo stress meccanico.

Per quanto riguarda i polisaccaridi di origine umana, tra i più importanti figura l'acido ialuronico (HA), appartenente alla famiglia dei glicosaminoglicani che si trova nel fluido sinoviale, nell'umor vitreo, nella pelle e nelle cartilagini articolari, alle quali conferisce viscoelasticità. Esso è idrosolubile, ed è stato dimostrato come giochi un ruolo fondamentale nella riparazione dei tessuti. Tuttavia, l'omopolimero allo stato fluido non presenta caratteristiche meccaniche sufficienti per essere efficace come supporto. Per superare questo limite, l'HA viene complessato con esteri per formare idrogel, versatili e facilmente lavorabili, con cui vengono fabbricati scaffold per la ricostruzione di cartilagini articolari, di tessuto tracheale, vascolare e nervoso. In forma liquida inoltre l'HA può essere iniettato nell'articolazione del ginocchio al fine di alleviare il dolore dovuto alle artriti e migliorare la mobilità dell'articolazione stessa. Infine, in forma di nanoparticelle, l'acido ialuronico viene impiegato come veicolo per il rilascio controllato di farmaci chemioterapici, antibiotici, analgesici, RNA e proteine.

### **1.8.2 Polinucleotidi**

I nucleotidi sono formati dalla reazione di condensazione di tre componenti: una base azotata, purinica o pirimidinica, uno zucchero pentoso, come ribosio e desossiribosio, ed un gruppo fosfato. Tra i nucleotidi più comuni vi sono l'acido ribonucleico (RNA), l'acido desossiribonucleico (DNA) e l'adenosina trifosfato (ATP). Tramite la polimerizzazione per condensazione, catalizzata da enzimi appartenenti alla classe delle polimerasi, di due o più nucleotidi, si ottengono i polinucleotidi.

I polinucleotidi ottenuti dalla polimerizzazione di nucleotidi si trovano in tutti gli organismi viventi e presentano uno scheletro costituito da una sequenza di residui fosforici e zucchero, da cui si diramano le basi azotate (adenina, citosina, guanina e timina nel DNA e adenina, citosina, guanina e uracile nell'RNA).

### **1.8.3 Proteine**

Le proteine sono macromolecole biologiche costituite da catene di amminoacidi legati l'uno all'altro da un legame peptidico, cioè un legame tra il gruppo amminico di un amminoacido e

il gruppo carbossilico dell'altro amminoacido, creato attraverso una reazione di condensazione con perdita di una molecola di acqua. Esse svolgono una vasta gamma di funzioni all'interno degli organismi viventi come ad esempio la catalisi delle reazioni metaboliche, la risposta a stimoli, ed il trasporto di molecole da un luogo all'altro all'interno e all'esterno della cellula.

Le proteine differiscono l'una dall'altra soprattutto nella loro sequenza di amminoacidi, che di solito si traduce in una struttura tridimensionale specifica che determina la sua attività.

Tra le proteine più importanti utilizzate in applicazioni biomedicali occorre menzionare, il collagene, l'elastina e la cheratina.

Il collagene è la proteina più abbondante all'interno del corpo umano, ed è la maggior costituente di legamenti, cartilagini, tendini, ossa e pelle, e forma la struttura di tessuti come i vasi sanguigni. Esso è stato ampiamente studiato per la sua biocompatibilità, resistenza meccanica e degradabilità in ambiente enzimatico. Inizialmente impiegato come materiale per suture, applicazione oggi in disuso a causa dell'insorgenza di risposte infiammatorie e di infezioni nell'organismo ospite, veniva inoltre impiegato per realizzare dispositivi a rilascio locale di antibiotici, DNA, RNA e proteine. Recenti applicazioni come sigillante emostatico ne sfruttano invece l'elevata trombogenicità. L'integrità strutturale di questo materiale, data dalla sua natura fibrosa, lo ha reso un potenziale candidato per le applicazioni in ingegneria tissutale che richiedono elevata resistenza ai carichi, come ad esempio la ricostruzione di ossa, tendini, legamenti e cartilagini, ma anche della pelle.

L'elastina è un polimero insolubile ed altamente elastico composto da molecole di tropoelastina, il principale costituente del tessuto vascolare e polmonare, ed anche il responsabile della loro contrazione. Dal momento che l'elastina non attiva le piastrine, essa potrebbe essere un ottimo materiale per *graft* vascolari. Tuttavia, la sua insolubilità e la capacità di innescare una risposta immunitaria, ne riducono fortemente l'uso.

### ***1.8.3.1 Cheratina***

La cheratina è la più abbondante proteina fibrosa presente in natura, essendo il principale costituente di capelli, lana, corna, unghie e piume. Essa può essere inoltre estratta dai sottoprodotti di scarto dell'industria casearia e della carne, e dell'industria tessile (da lana grezza di tosa o di concia, di bassa qualità, non filabile a causa delle sue inadeguate proprietà fisiche).

La possibilità di valorizzare questo tipo di sottoprodotti costituisce un aspetto molto importante dal punto di vista ambientale, considerato il loro ingente quantitativo e la difficoltà nel loro smaltimento. Infatti, la lana è inefficace come combustibile, in quanto possiede un *Limiting Oxygen Index* (LOI) pari a 25, ed il processo di incenerimento è inquinante a causa dell'elevato contenuto di zolfo (3-4% in peso) [13].

A tale proposito, occorre sottolineare che l'Unione Europea è il secondo produttore, dopo l'Asia, di lana non tessile, con una produzione stimata di 30.000 tonnellate/anno, di cui 20.000 sono prodotte esclusivamente dall'Italia.

A livello molecolare, la cheratina presenta una struttura primaria composta da una catena polipeptidica elicoidale costituita dalla ripetizione di 18 tipi di amminoacidi diversi, tra cui cistina e cisteina, serina, glutammina, glicina, arginina, asparagina, prolina, valina, leucina e isoleucina, e lunga circa 450 Å. Per quanto riguarda, invece, la struttura secondaria, si possono avere tre diverse configurazioni:

- $\alpha$ -cheratina: costituita da  $\alpha$ -eliche intrecciate fra loro (Figura 1.18) e ricca di amminoacidi solforati, tra cui la cisteina, di natura neutra o lievemente basica. Le  $\alpha$ -eliche si assemblano fra loro per formare strutture complesse, dette protofilamenti, i quali, a loro volta, si associano per formare la protofibrilla. Le varie catene polipeptidiche sono legate tra loro prevalentemente attraverso ponti disolfuro;

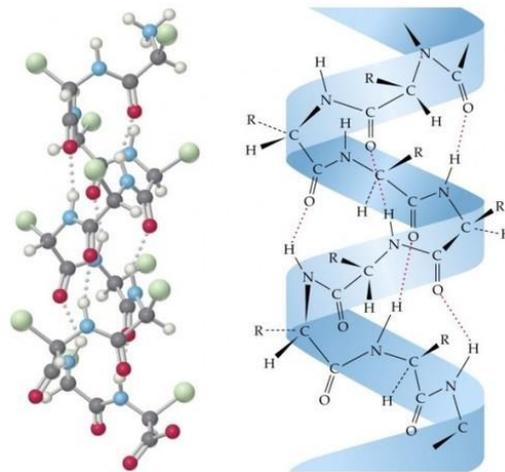


Figura 1.18 Struttura ad  $\alpha$ -elica della cheratina.

- $\beta$ -cheratina: presenta una struttura a foglietto  $\beta$  piatto e leggermente pieghettato in cui sono presenti diverse sub-unità tenute insieme e stabilizzate da ponti disolfuro (Figura 1.19). Questa configurazione risulta lievemente acida;

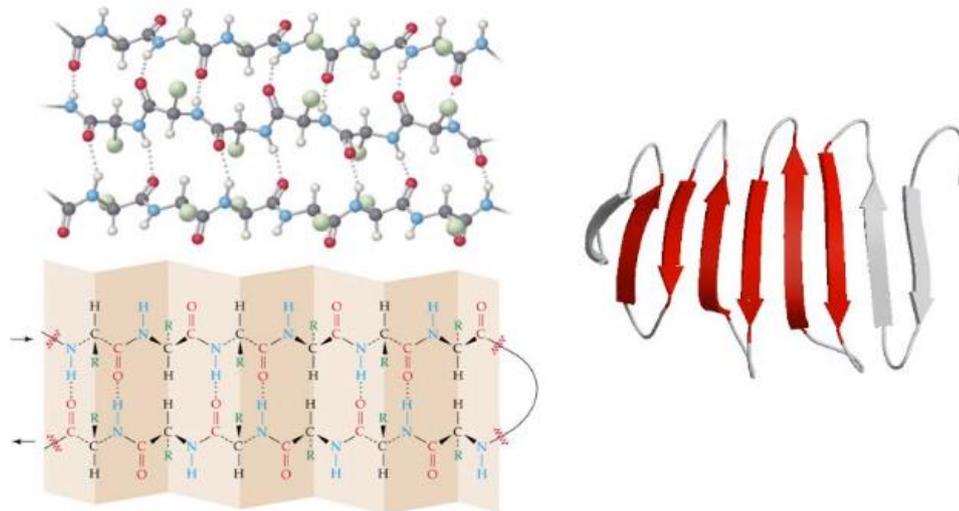


Figura 1.19 Struttura a  $\beta$ -foglietto della cheratina.

- Random coil: configurazione disordinata, nella quale sono presenti sia strutture  $\alpha$ -elica sia strutture  $\beta$ -foglietto (Figura 1.20).



Figura 1.20 Struttura random coil, contenente strutture  $\alpha$ -elica (filamenti rossi) e strutture  $\beta$ -foglietto (filamenti gialli).

Tutte e tre le configurazioni sono caratterizzate dalla presenza di un elevato numero di ponti disolfuro (Figura 1.21), che danno origine ad una struttura tridimensionale compatta, responsabile della grande stabilità chimica e della scarsa solubilità di questa proteina, nonché di altre proprietà meccaniche, chimiche e termiche che la distinguono da altre proteine, come il collagene.

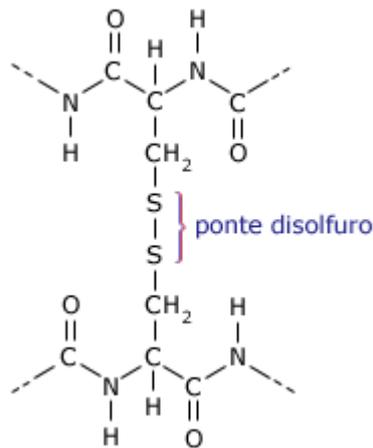


Figura 1.21. Struttura chimica della cheratina in cui viene evidenziato il ponte disolfuro

I primi utilizzi della cheratina in ambito medico risalgono al XVI secolo, quando in Cina, una cenere ottenuta da capelli pirolizzati venne utilizzata per accelerare il processo di guarigione di ferite e per la coagulazione del sangue [14]. Il crescente interesse nei confronti di questa proteina portò nei secoli successivi a notevoli sviluppi nei processi di estrazione (da corna di animali, lana e capelli), sia di tipo ossidativo che riduttivo, fino a quando, nei primi anni del '900, la cheratina trovò impiego come polvere per la realizzazione di cosmetici, materiali compositi e rivestimenti di farmaci. Ulteriori sviluppi nei processi di estrazione, separazione e caratterizzazione portarono, per tutta la durata del '900, ad una crescita esponenziale dell'utilizzo di questa proteina e dei suoi derivati, in forma di polveri, gel, film, *coating*, fibre e schiume anche per applicazioni biomedicali grazie, come già detto, alla loro capacità di autoassemblarsi in strutture tridimensionali porose e fibrose, ed alle ottime proprietà emostatiche e di supporto alla proliferazione cellulare: in particolare, la cheratina proveniente dalla lana e dai capelli possiede sequenze leucina-acido aspartico-valina (LDV) e acido glutammico-acido aspartico-serina (EDS), in grado di favorire l'adesione cellulare [15,16].

Diversi studi si sono focalizzati sullo studio della cheratina come materiale per la realizzazione di nanoparticelle per il rilascio controllato di diversi farmaci, tra cui antitumorali, come doxorubicina [17,18] e antibatterici quali la clorexidina [19].

Tuttavia, a causa della sua eccessiva fragilità, che ne limita fortemente la lavorabilità, e della troppo rapida degradazione *in vivo* (la degradazione avviene in meno di una settimana in ambiente biologico, troppo velocemente, ad esempio, nel caso di alcuni sistemi a rilascio controllato), la cheratina è stata mescolata con altri materiali, sia di origine naturale che sintetica, al fine di ottimizzarne e modularne le proprietà, mantenendone allo stesso tempo l'eccellente biocompatibilità [20,21]. Ad esempio, mediante la combinazione con glicerolo, è

stato possibile ottenere film flessibili, biocompatibili e biodegradabili. L'aggiunta di chitosano, invece, ha permesso di ottenere film resistenti dalle elevate proprietà antibatteriche. L'introduzione di idrotalciti, solidi lamellari in grado di stabilizzare il principio attivo incapsulato, modulandone allo stesso tempo il rilascio, ha permesso la realizzazione di film ibridi per il rilascio controllato di diclofenac, un antinfiammatorio comunemente utilizzato [21]. Per quanto riguarda la combinazione con polimeri di origine sintetica, sono stati realizzati film a base di una blend tra cheratina e poli(etilene ossido) (PEO): la presenza di PEO ha permesso di stabilizzare la struttura  $\beta$  della cheratina, rendendo così possibile la realizzazione di membrane per rilascio controllato di farmaci, oltre che di *scaffold* nel campo dell'ingegneria tissutale [22].

Infine, sono state realizzate membrane porose a base di cheratina, in grado di mimare lo strato corneo umano, al fine di studiare la permeabilità di piccole molecole attraverso la pelle [23].

Alla luce di queste promettenti ricerche, nel presente lavoro di Tesi verrà studiata una blend di cheratina ed un altro poliestere alifatico biocompatibile, il poli(butilene succinato).

## **1.9 Drug release**

### **1.9.1 Meccanismi di rilascio convenzionali vs. rilascio controllato (*controlled drug release*)**

Negli ultimi anni, lo sviluppo di numerosi farmaci sempre più specifici in relazione alla particolare cura prevista ha comportato la necessità di disporre di sistemi a rilascio controllato del principio attivo in maniera sempre più puntuale, che siano sensibili e capaci di rispondere direttamente agli stimoli patologici. Il rilascio controllato di farmaci dunque può rappresentare una valida alternativa al rilascio convenzionale, al fine di superarne alcuni importanti limiti. Infatti, quando si somministra una singola dose di un farmaco veicolato in una forma farmaceutica convenzionale, si ottengono livelli ematici di quel farmaco che rientrano nel range terapeutico per tempi relativamente brevi, cioè il farmaco, in questo caso, ha un'azione di breve durata. Inoltre, siccome la distribuzione del farmaco stesso in tutto il corpo si verifica in maniera più o meno indiscriminata ed incontrollata attraverso la circolazione sanguigna, la quantità desiderata di farmaco non è quindi sempre in grado di raggiungere i siti recettoriali specifici localizzati nelle cellule bersaglio [24]. Questo può rendere necessario l'utilizzo di dosi maggiori, rischiando il superamento della soglia massima oltre la quale i livelli di farmaco risultano tossici per il paziente (Figura 1.22).

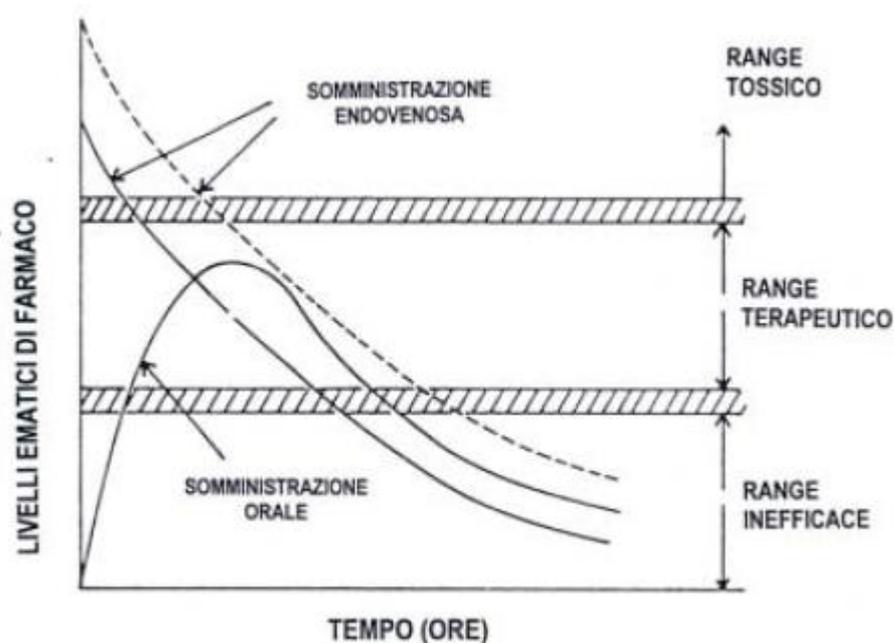


Figura 1.22 Confronto fra due modalità di somministrazione convenzionale di farmaci, orale ed endovenosa.

In generale, nelle formule farmaceutiche convenzionali, le modalità di rilascio dipendono soprattutto dalle caratteristiche chimico-fisiche del principio attivo.

Per poter risolvere l'inconveniente riguardante la breve durata d'azione del farmaco somministrato, soprattutto nel caso in cui questo presenti una breve emivita, si è inizialmente ricorsi alla cosiddetta terapia multidose, cioè alla somministrazione ripetuta di dosi di farmaco ad intervalli di tempo costanti, che si traduce in un andamento della concentrazione del farmaco nel plasma di tipo pulsatile, con indesiderate punte di massimo, anche oltre i limiti di tossicità, e gole di minimo al di sotto del livello ottimale (Figura 1.23).

Quindi anche la terapia multidose, nonostante sia in grado di ovviare al problema legato all'azione di breve durata del farmaco, presenta diversi problemi in termini di scarsa *compliance* del paziente e di profili ematici di farmaco non idonei.

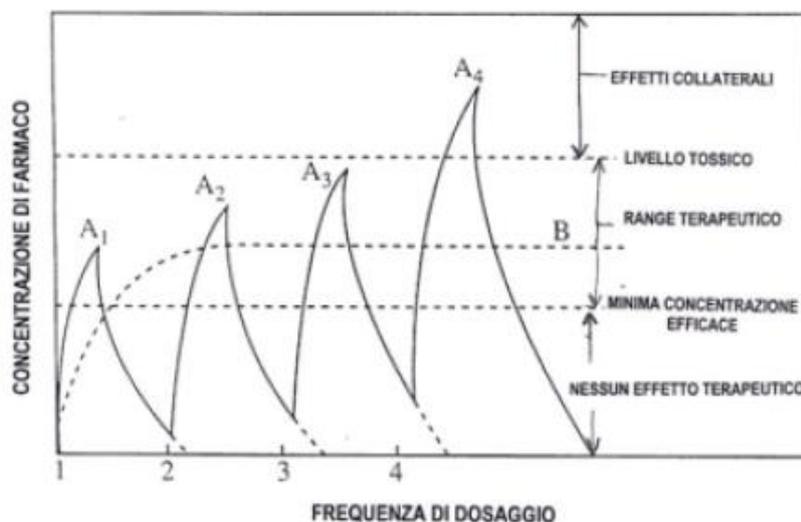


Figura 1.23 Concentrazione ematica di farmaco risultante dalla somministrazione di dosi multiple ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ ) di una forma farmaceutica convenzionale rispetto al profilo di concentrazione ematica ideale (B).

In questo contesto, la tecnologia del *controlled drug delivery* si pone come obiettivo proprio il superamento di tali problemi mediante l'utilizzo di sistemi, in genere polimerici, che consentano di controllare i seguenti aspetti:

- la cessione o meno del principio attivo nel tempo;
- la velocità di cessione del principio attivo, aumentandola o diminuendola nel tempo;
- la cessione del principio attivo nello spazio, cioè la possibilità che il farmaco raggiunga in modo mirato solo il sito di azione previsto (si parla anche di *targeting* o direzionamento);

I vantaggi di tale rilascio controllato sono molteplici; tra i più importanti figurano:

- mantenimento nel tempo dell'azione del farmaco conservando, per l'intera durata dell'intervallo terapeuticamente utile, la concentrazione desiderata nell'organismo e riducendo, nel contempo, gli effetti collaterali associati ad un modello cinetico del tipo "dente di sega" caratteristico di terapie multidose (Figura 1.24);
- maggiore efficacia della terapia;
- riduzione della quantità di farmaco somministrata;
- riduzione del numero delle somministrazioni giornaliere di farmaco ed aumento della *compliance* del paziente;
- creazione di condizioni riproducibili, prevedibili e controllabili di rilascio per periodi di tempo più o meno lunghi.

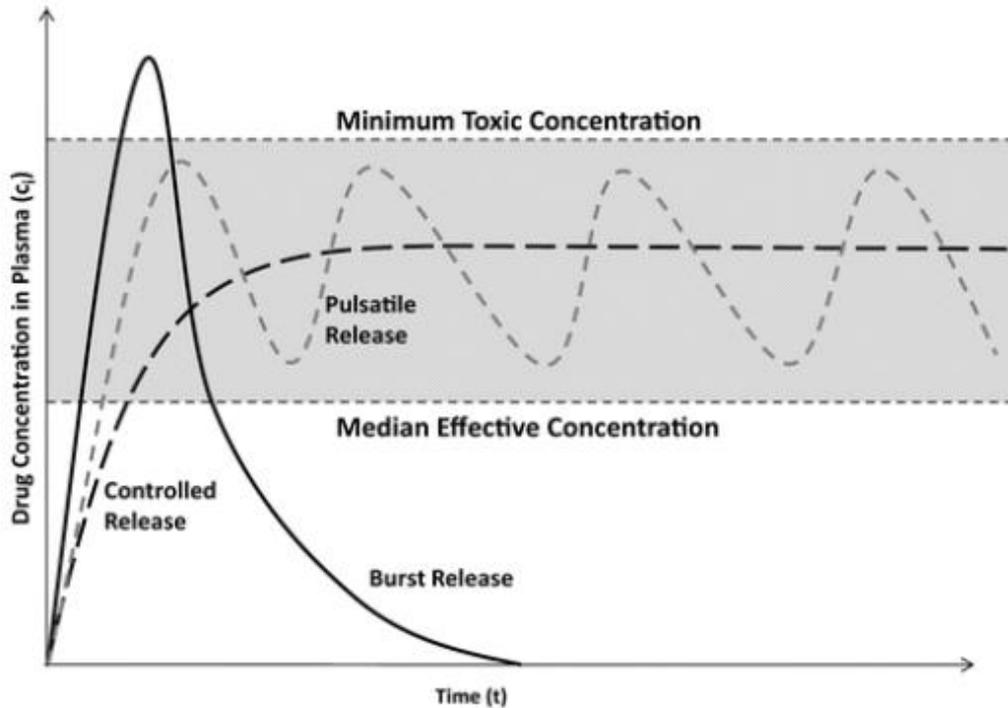


Figura 1.24 Andamento della concentrazione del farmaco nei tessuti dopo l'assunzione secondo la tecnica tradizionale e mediante rilascio controllato.

Una vasta gamma di farmaci può essere impiegata in questi sistemi di rilascio controllato, tra cui chemioterapici, immunosoppressori, agenti antiinfiammatori, antibiotici, oppiacei, steroidi, ormoni, anestetici e vaccini.

### 1.9.2 Meccanismi di rilascio controllato

Per poter realizzare un sistema a rilascio controllato il più idoneo possibile alla specifica applicazione, è necessario considerare tutti i fattori che possono influenzare il meccanismo di rilascio stesso, tra cui la tipologia del farmaco, la quantità da somministrare, il sito di azione, la durata della terapia e la stabilità delle molecole coinvolte. Per questo motivo, è importante che i sistemi a rilascio controllato forniscano un ampio intervallo di utilizzo e che presentino diverse cinetiche di rilascio, le quali soddisfino le necessità di somministrazione in determinati intervalli di tempo, nei tessuti interessati.

Le principali tipologie di rilascio sono mostrate in Figura 1.25, e sono di seguito elencate:

- Profilo I: rilascio convenzionale, ritardato, non costante;
- Profilo II: rilascio in cui la concentrazione è mantenuta al livello ottimale in termini di effetti terapeutici;

- Profilo III: rilascio ritardato seguito da rilascio costante. Utile per il rilascio di principi attivi che devono svolgere la loro azione durante la notte;
- Profilo IV: rilascio a impulsi ritardato. Valido per un'azione notturna o per il rilascio di ormoni, la cui somministrazione deve essere effettuata una singola volta e non gradualmente;
- Profilo V: rilascio impulsivo periodico, utilizzato per somministrazioni a distanze temporali costanti.

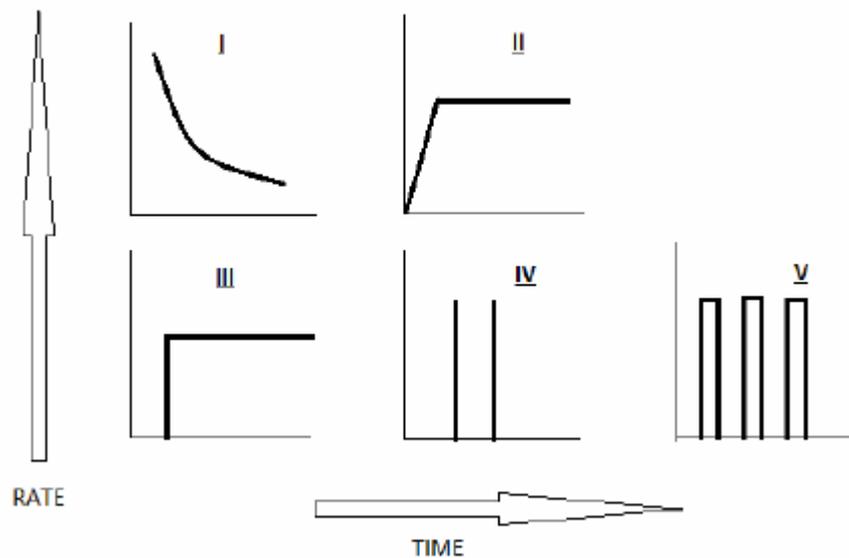


Figura 1.25 Principali meccaniche di rilascio.

I sistemi utilizzati per il rilascio controllato di farmaci possono essere classificati anche a seconda del meccanismo di controllo del rilascio (Figura 1.26):

1. **Sistemi a diffusione controllata:** sistemi che sfruttano il meccanismo di diffusione del farmaco attraverso il polimero, il quale andrà incontro a degradazione una volta che il farmaco è stato completamente rilasciato.

Si può avere un rilascio per diffusione da strutture di tipo matrice e di tipo serbatoio (reservoir). Nel caso di sistemi matriciali, il farmaco è dissolto uniformemente in una matrice polimerica e il rilascio segue una cinetica del primo ordine, con un alto tasso di diffusione all'inizio ed una successiva decrescita con l'aumento del percorso di diffusione e con la diminuzione dell'area della matrice;

Nel caso di sistemi a reservoir, costituiti da un nucleo interno di farmaco circondato da una membrana polimerica, il trasporto avviene tipicamente secondo cinetiche di ordine

zero, secondo cui la velocità di rilascio è costante nel tempo, finché il farmaco si trova in alta concentrazione all'interno della membrana.

2. Sistemi controllati chimicamente: il rilascio si verifica in ambiente acquoso, dove il polimero si degrada secondo un processo idrolitico o enzimatico, che coinvolge la superficie o il *bulk*. Questa caratteristica, da una parte, evita la necessità di una rimozione chirurgica, ma dall'altra richiede che i prodotti della degradazione non provochino reazioni tossiche o cancerogene, situazione non sempre facile da ottenere. Nei sistemi a catena pendente il principio attivo è legato chimicamente al polimero e viene rilasciato mediante una scissione idrolitica o enzimatica, con velocità proporzionale a quella con cui i legami vengono rotti dall'azione dell'acqua o delle proteine, consentendo al farmaco di agire su uno specifico tipo di cellule o tessuti.
3. Sistemi attivati dal solvente: questo tipo di meccanismo coinvolge principalmente gli idrogeli. Quando queste molecole entrano in contatto con un solvente compatibile termodinamicamente, le catene polimeriche si rilassano permettendo un flusso di acqua verso l'interno e la diffusione del farmaco verso l'esterno; questo meccanismo si verifica, in modo particolare, quando la temperatura di transizione vetrosa è inferiore a quella dell'ambiente circostante.
4. Sistemi a rilascio modulato: in questo caso, il rilascio viene controllato da stimoli esterni, quali la temperatura, il pH, campi elettrici o magnetici, radiazioni elettromagnetiche o raggi UV.

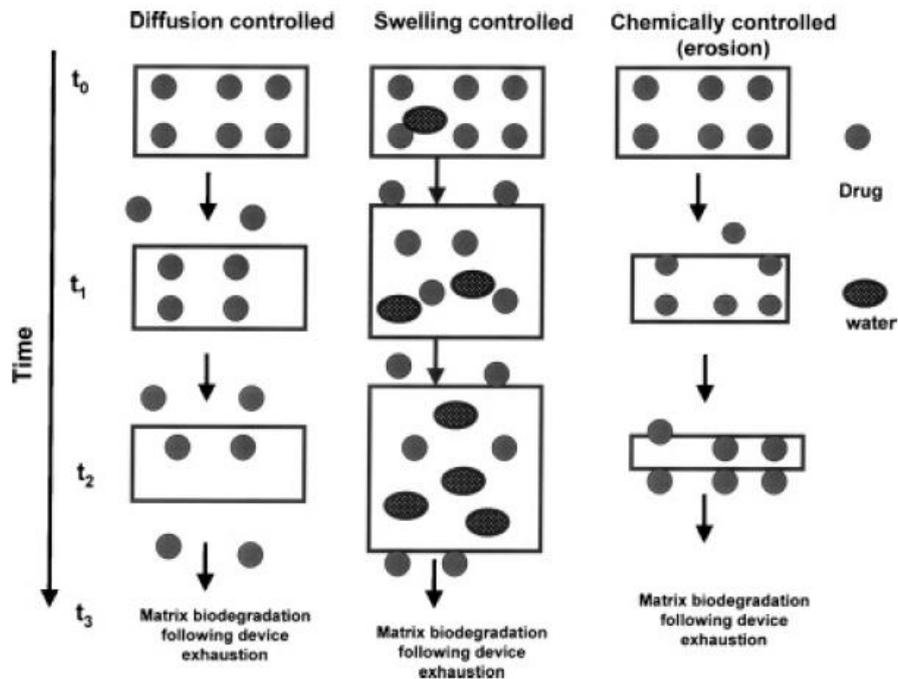


Figura 1.26 Schemi di alcuni meccanismi diffusionali.

### 1.9.3 Principali dispositivi utilizzati per il rilascio controllato

#### 1.9.3.1 Micro- e nanoparticelle

Con il termine microparticelle si intendono particelle dalle dimensioni massime di 250  $\mu\text{m}$ , che possono essere iniettate all'interno dell'organismo. Le nanoparticelle invece sono caratterizzate da dimensioni inferiori, con diametri nell'ordine di 1-100 nm. In quest'ultimo caso, la dimensione così ridotta è imposta dalla necessità, da parte del vettore, di poter viaggiare anche nei capillari senza il pericolo di ostruirli, e di poter penetrare all'interno della membrana cellulare.

L'elevato rapporto superficie/volume di queste particelle consente di legare chimicamente diversi gruppi funzionali, come agenti diagnostici e terapeutici, e tale versatilità permette di creare sistemi capaci di riconoscere il sito bersaglio dove è in atto la patologia, visualizzando e monitorando contemporaneamente la risposta del trattamento farmacologico.

Esistono numerose tecniche di microincapsulazione e la scelta di quella più appropriata dipende da diversi fattori riguardanti sia il materiale polimerico utilizzato sia il farmaco, tra cui la natura e il peso molecolare del polimero, la natura e la solubilità del farmaco da caricare, la destinazione d'uso e la durata della terapia, in quanto è necessario mantenere la stabilità e l'attività del farmaco sia durante la creazione delle particelle sia durante il trasporto in ambiente biologico.

Le tecniche più utilizzate sono le seguenti:

- Emulsione: si tratta di un processo cosiddetto *oil-in-water*, durante il quale il polimero viene prima disciolto in un solvente organico volatile, solitamente diclorometano o cloroformio, al quale viene successivamente aggiunto il farmaco in modo da creare un'emulsione (Figura 1.27). L'emulsione ottenuta deve poi essere rimossa attraverso un processo di estrazione o con una semplice evaporazione al fine di ottenere delle goccioline solide che andranno lavate, raccolte e asciugate per ottenere il prodotto finito da poter iniettare.

Per poter ottenere le dimensioni desiderate, è importante considerare che il diametro delle microparticelle dipende fortemente dalla temperatura e dalla viscosità; infatti, il diametro cresce all'aumentare della concentrazione del polimero e in situazioni termiche estreme (sia bassa, sia alta temperatura). Nonostante questi limiti, la tecnica di emulsione si rivela ideale per incapsulare sostanze liposolubili, come gli steroidi. Per quanto riguarda, invece, sostanze idrosolubili è più indicato utilizzare una tecnica *water-in-oil*.

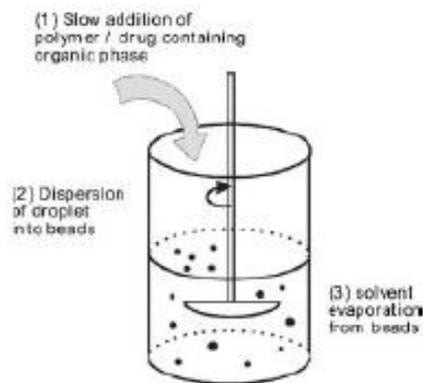


Figura 1.27 Descrizione della tecnica di emulsione.

- Separazione di fase: consiste nel diminuire la solubilità del polimero mediante l'aggiunta di un terzo componente alla soluzione organica; in questo modo, al termine del processo, si possono distinguere due fasi separate, una più densa composta dal polimero e una più liquida, in sospensione, povera di materiale polimerico. Il farmaco che si trovava disperso o disciolto nella soluzione polimerica risulta così rivestito dal polimero.

Il vantaggio principale di questa tecnica, rispetto a quella di emulsione, è rappresentato dal poter incapsulare farmaci sia liposolubili sia idrosolubili, mentre lo

svantaggio è legato alla necessità di grandi quantitativi di solvente organico, che risulta difficile da separare dalle microparticelle ottenute.

- Spray a secco: questa metodologia consiste nella sospensione o dissoluzione in solvente dei farmaci che si desiderano incapsulare, sia idrosolubili sia liposolubili, e nella loro successiva nebulizzazione sotto forma di spray a secco. Attraverso questa tecnica, particolarmente semplice e rapida, è possibile ottenere particelle di dimensioni minori di 5  $\mu\text{m}$ .

In sistemi di questo tipo, dunque, il principio attivo viene inserito all'interno del materiale polimerico e il farmaco può uscire dalla particella secondo un processo di diffusione verso l'esterno oppure in seguito alla degradazione della particella stessa. Occorre tenere presente che se il principio attivo è disperso all'interno della matrice polimerica, può venire rilasciato sia attraverso diffusione sia attraverso erosione del polimero, mentre nel caso in cui il principio attivo sia incapsulato risulta più significativo il processo diffusivo rispetto all'erosione: infatti, il rilascio per erosione è possibile solo quando quest'ultima interessa anche gli strati più interni, a ridosso del farmaco incapsulato.

La predominanza di un meccanismo sull'altro dipende principalmente dalle proprietà del polimero, quali l'idrofilicità, la flessibilità, la velocità di degradazione, il peso molecolare, la cristallinità, la geometria e la dimensione della particella, e la porosità della matrice. Dall'altro canto, la cinetica di rilascio è influenzata anche dalle caratteristiche del farmaco stesso, come il suo peso molecolare, la solubilità in acqua e la sua distribuzione all'interno della matrice. Ultime, ma non meno importanti, sono le caratteristiche del mezzo esterno, quali la temperatura e il pH.

### ***1.9.3.2 Idrogeli***

Gli idrogeli sono materiali cross-linkati insolubili in acqua ma che sono in grado di assorbirne anche in grande quantità (dal 10-20% fino a migliaia di volte il loro peso asciutto). Per questo motivo, essi presentano proprietà che assomigliano a quelle dei tessuti naturali altamente idratati, caratteristica che li rende eccellenti candidati per l'ingegneria tissutale e per il rilascio controllato di farmaci.

Quando un idrogel asciutto comincia ad assorbire acqua, le prime molecole che permeano la matrice idratano i gruppi più polari ed idrofilici, con conseguente rigonfiamento del polimero, tale da consentire l'esposizione all'acqua dei gruppi più idrofobici; a questo punto altra acqua

entra nella struttura a causa di forze osmotiche, fino al raggiungimento di un equilibrio. L'acqua che entra va a riempire gli spazi tra le catene, oppure il centro di larghi pori; se l'idrogel è realizzato con un polimero biodegradabile, quest'ultimo andrà incontro ad un processo di degradazione con velocità legata alla sua composizione chimica.

I diversi idrogeli si distinguono per la loro diversa abilità di rigonfiamento (anche in funzione di stimoli esterni come pH, luce, etc.), le caratteristiche superficiali, la biodegradabilità, l'eventuale presenza di siti di riconoscimento posti sulla superficie e la porosità, tutte modificabili e modulabili a seconda della particolare applicazione desiderata (Figura 1.28) [5].

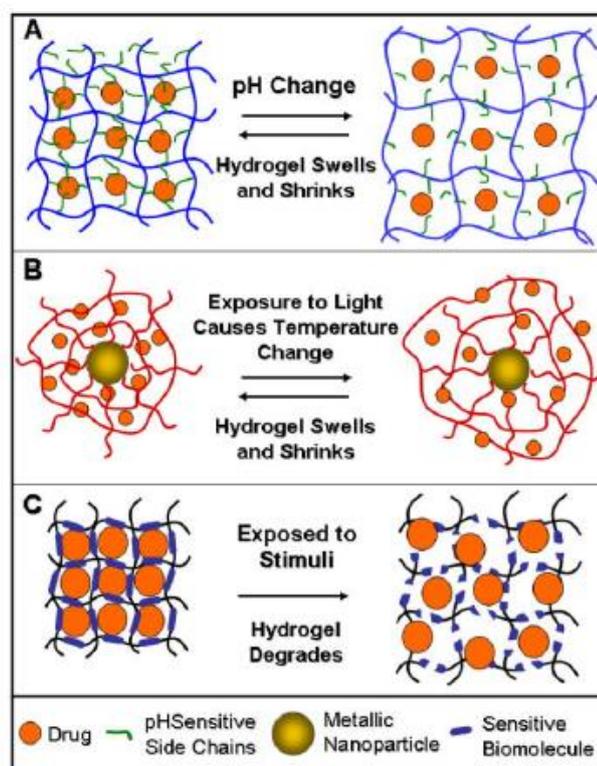


Figura 1.28 Esempio di idrogeli sensibili alle variazioni di A) pH, B) temperatura, C) idrogeli sensibili alla presenza di biomolecole.

### 1.9.3.3 Patch Transdermiche

Il termine *patch* transdermica (o *patch* dermica), indica una membrana adesiva medicata che viene posizionata sulla pelle per rilasciare una specifica dose di farmaco attraverso la pelle stessa.

Il primo sistema transdermico, *Transderm Scop* (Baxter), fu approvato dalla *Food Drug Administration* nel 1979, per la prevenzione di nausea e vomito associati ai viaggi, in particolare quelli in mare.

In senso generale, il termine *sistema transdermico per il rilascio di farmaci* (TDDS) include tutte le formulazioni volte al rilascio di farmaco in modo continuo attraverso la pelle verso la circolazione sistemica, per il trattamento o la prevenzione di disturbi locali o sistemici [25].

Il rilascio del farmaco transdermico rappresenta un'attraente alternativa alle tradizionali tecniche di somministrazione del farmaco stesso, come quella orale o endovenosa attraverso iniezioni o infusioni, poiché permette di superare un'ampia varietà di problemi legati a queste ultime somministrazioni, come il primo stadio del metabolismo epatico, la digestione enzimatica, l'idrolisi del farmaco in ambiente acido, irritazioni gastrointestinali, effetti indesiderati della terapia, ed il rischio di trasmissione di malattie. Inoltre, ulteriori vantaggi sono rappresentati dalla *compliance* del paziente, notevolmente aumentata, rispetto ai casi di somministrazione tradizionale, in quanto si tratta di sistemi non invasivi e che non provocano dolore, a bassi costi e con effetto sia locale che sistemico a seconda del tipo di principio attivo incapsulato. Infine, il rilascio transdermico, nella maggior parte dei casi, richiede un dosaggio inferiore rispetto alla somministrazione orale.

Di contro, alcuni svantaggi sono rappresentati dalla possibile irritazione cutanea e dalla difficoltà di rilascio di alcuni principi attivi, soprattutto nel caso di pazienti con un basso flusso ematico periferico. Inoltre, un importante limite fisico da considerare è costituito dallo strato corneo, la barriera più esterna della pelle che funge da difesa contro gli agenti esterni; questo strato, essendo idrofobico, impone un ostacolo alla diffusione della gran parte dei farmaci idrofilici. In più, nel caso in cui un farmaco riesca ad attraversare liberamente lo strato corneo, è possibile che vada incontro ad una degradazione precoce dovuta agli enzimi epidermici [25-27].

Viste tali limitazioni, negli ultimi anni sono stati sviluppati sistemi sempre più performanti, che vengono suddivisi in tre categorie, o "generazioni" (Figura 1.29). La *prima generazione* di patch transdermici ha avuto come obiettivo il perfezionamento della formulazione del farmaco per massimizzare la sua diffusione attraverso la pelle, in termini di proprietà fisico-chimiche del farmaco stesso, quali un elevato coefficiente di partizione, ed un basso peso molecolare. La *seconda generazione* ha riguardato la ricerca di agenti esterni, come il calore o l'elettricità, che fossero in grado di fornire energia al farmaco affinché quest'ultimo potesse attraversare più facilmente gli strati epidermici e raggiungere il circolo vascolare; in questo caso, quindi, l'attenzione fu posta sul miglioramento della permeabilità del farmaco usando attivatori chimici e stimolazioni esterne. La *terza generazione*, infine, ha previsto l'utilizzo di metodi che causano la distruzione microscopica dell'epidermide per facilitare il rilascio del

farmaco; gli approcci principali riguardano l'utilizzo di ablazione a radiofrequenza, ultrasuoni e laser, che distruggono temporaneamente lo strato corneo e permettono la penetrazione del farmaco attraverso la barriera danneggiata, oppure di microaghi, i quali perforano lo strato più esterno della pelle, preservando il derma, per offrire un percorso ridotto al farmaco.

In aggiunta alle tre principali generazioni sopra descritte, vi è una quarta generazione, che è stata sviluppata recentemente per far fronte alla crescita e alla diffusione della medicina personalizzata (ovvero una terapia personalizzata che prevede un preciso controllo del dosaggio del farmaco e della durata del rilascio in relazione alle specifiche condizioni del paziente), che prevede l'utilizzo di sistemi in grado non solo di controllare il rilascio ma di inviare anche un *feedback* sullo stato del farmaco stesso.

Questa quarta generazione riguarda dispositivi indossabili, sensori e attuatori, in grado di monitorare in modo preciso gli indicatori chiave del trattamento della malattia ed i potenziali effetti collaterali del rilascio del farmaco; in questo modo è possibile decidere in tempo reale la quantità appropriata di farmaco da rilasciare [27].

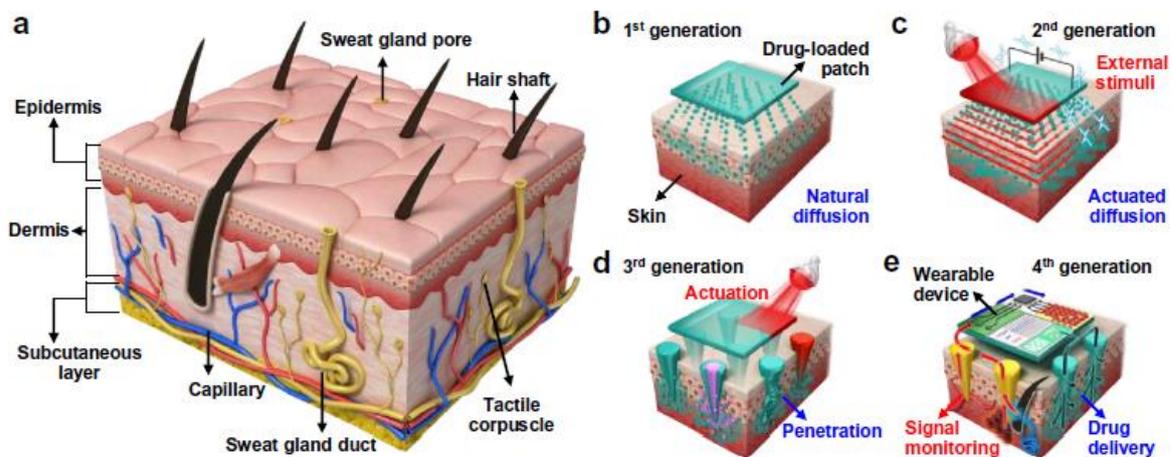


Figura 1.29 (a) Illustrazione schematica della pelle umana. (b-e) Schematizzazione delle generazioni dei patch transdermici.

I polimeri utilizzati nella realizzazione di *patch* transdermici hanno svariate funzioni, tra cui la formazione della matrice, il controllo della velocità di rilascio del farmaco, garantire una efficace pressione adesiva, fornire supporto strutturale e rivestimenti protettivi [26].

In base al loro design, le *patch* transdermiche possono essere suddivise in tre categorie principali (Figura 1.30):

- *Reservoir patch*: questo tipo di sistema presenta un serbatoio (reservoir), fra lo strato più esterno e la membrana permeabile. All'interno è presente il farmaco, tipicamente

sotto forma di liquido, che viene rilasciato da una membrana. Questo tipo di *patch* presenta vantaggi in termini di flessibilità e di un buon controllo della velocità di rilascio; tuttavia, l'intero design è piuttosto complicato da realizzare.

- *Matrix patch*: questo tipo di *patch* è composto da una matrice semi solida, sulla quale viene caricato il farmaco, uno strato adesivo esterno ed una membrana attraverso la quale diffonde il farmaco. Sebbene questo modello abbia una struttura più semplice rispetto a quella del reservoir patch, richiede comunque la realizzazione e l'assemblaggio di due parti, la matrice contenente il farmaco e lo strato adesivo.
- *Drug-in-adhesive patch*: questo tipo rappresenta la forma più semplice e più sviluppata delle *patch* transdermiche comunemente realizzate. Sono composte da una matrice adesiva contenente il farmaco, una membrana esterna impermeabile e una membrana interna attraverso la quale viene rilasciato il farmaco. In questo caso, il materiale polimerico utilizzato nella realizzazione della matrice viene sciolto in soluzione, alla quale viene aggiunto in un secondo momento il principio attivo da rilasciare [28].

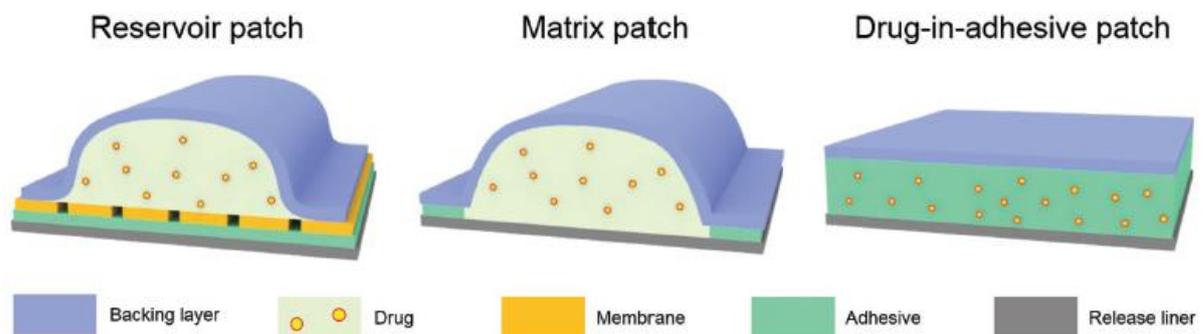


Figura 1.30 Illustrazione schematica dei tre differenti tipi di *patch* transdermiche.

### 1.9.3.3.1 Elettrofilatura

Una delle tecniche utilizzate per la realizzazione di membrane porose per il rilascio di farmaci è l'elettrofilatura, attraverso cui è possibile ottenere fibre continue di dimensioni micro- e nanometriche interconnesse e dall'elevato rapporto superficie/volume. Inoltre, attraverso la regolazione della dimensione delle fibre, è possibile modulare la porosità e la dimensione dei pori stessi. Questo consente di realizzare un supporto efficace e *ad hoc* sia per quanto riguarda l'incapsulamento del principio attivo, sia per quanto concerne il rilascio dello stesso, semplicemente variando alcuni parametri del processo [29].

La strumentazione impiegata è costituita da tre elementi principali, come illustrato in Figura 1.31: una siringa che contiene la soluzione di polimero disciolto in un solvente, un generatore di alta tensione (10-50 kV) che, mediante l'ago metallico della siringa, carica positivamente il polimero, ed un collettore metallico con messa a terra, da cui il polimero viene attratto.

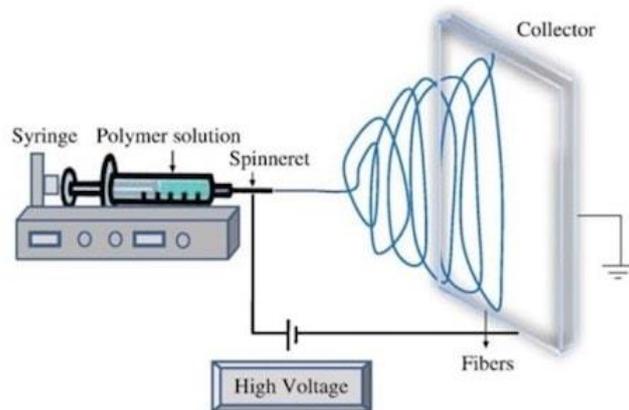


Figura 1.31 Schema del processo di elettrofilatura.

La soluzione costituisce un fattore chiave del processo, in quanto ha la duplice funzione di sciogliere il materiale e formare così la soluzione, e di condurre il materiale stesso verso il collettore. In questa seconda fase è importante tenere presente alcune caratteristiche del solvente come volatilità, tensione di vapore, tensione superficiale e punto di evaporazione, che influenzano notevolmente la morfologia della fibra.

Il fluido, sottoposto ad una differenza di potenziale, in corrispondenza della punta dell'ago subisce un aumento della sua carica superficiale e, una volta raggiunto un valore di tensione critica, l'accumulo di cariche uguali nella soluzione genera una forza auto-repulsiva maggiore della tensione superficiale della soluzione stessa. Questo provoca l'eruzione della soluzione, con la formazione di un getto polimerico nel verso del campo elettrico esterno, che termina sul collettore, solitamente collegato a terra, in prossimità del quale la carica viene rilasciata e si ha la formazione di fibre polimeriche solide in seguito all'evaporazione del solvente.

Come già detto, uno dei principali vantaggi offerti dal processo di elettrofilatura è l'ampio intervallo di parametri su cui è possibile agire in funzione delle applicazioni richieste; essi si suddividono in tre categorie:

1. Parametri di processo:

- tensione applicata: questo valore, variabile per diversi sistemi polimero/solvente ed influenzato anche dalla distanza tra ago e collettore, deve

essere tale da permettere la formazione di un getto continuo, dalla punta dell'ago al collettore;

- distanza ago-collettore: deve essere abbastanza elevata da consentire l'evaporazione del solvente, ma nello stesso tempo non eccessiva, al fine di non compromettere il percorso del getto e la morfologia finale della fibra;
- velocità del flusso: vengono solitamente scelte velocità, in quanto l'aumento della portata genera pori di dimensioni maggiori, ma può causare anche una granulosità indesiderata delle fibre, dovuta all'incapacità del solvente di evaporare prima di raggiungere il collettore;
- tipo di collettore: i più comuni sono costituiti da piastre di alluminio, ma vengono impiegati anche fogli di carta o tessuti conduttivi, oppure bagni liquidi di non solventi. Inoltre, è possibile scegliere un collettore fisso, se si desiderano fibre disposte in maniera casuale, oppure mobile, qualora si preferiscano fibre orientate.

## 2. Parametri della soluzione:

- concentrazione: in generale, la concentrazione della soluzione polimerica è direttamente proporzionale al diametro della fibra. È dunque necessario che questo parametro vari all'interno di un preciso intervallo di valori (se troppo basso si otterranno tappetini costituiti da un insieme di fibre e granelli, se troppo alto diventa invece impossibile mantenere un flusso costante a livello della punta dell'ago) (Figura 1.32);

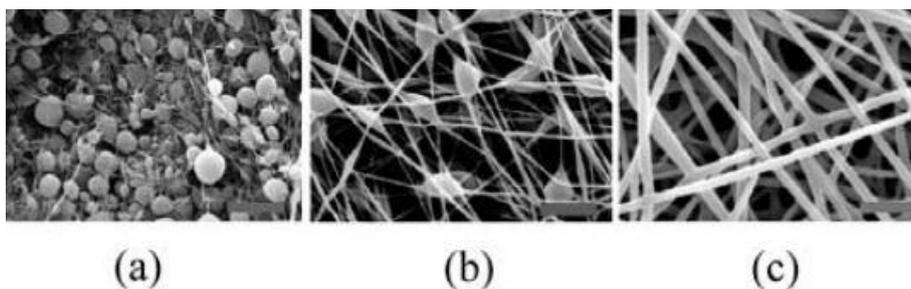


Figura 1.32 Effetto dell'aumento della concentrazione (da sinistra verso destra) di una soluzione di acido polilattico-co-glicolico sulla morfologia delle fibre ottenute.

- peso molecolare: influisce sulle caratteristiche morfologiche della fibra, poiché riflette il numero di legami tra le catene polimeriche in soluzione. Più in

dettaglio, al crescere del peso molecolare aumenta il diametro finale della fibra;

- viscosità: così come la concentrazione, anch'essa deve trovarsi all'interno di un certo range di valori. Infatti, se troppo bassa non si riescono ad ottenere fibre continue, viceversa se troppo alta diventa impossibile processare il materiale;
- tensione superficiale: influisce sul diametro e sulla granulosità delle fibre, ma anche sul valore della tensione critica in corrispondenza del quale ha inizio il processo di filatura. In generale, riducendo la tensione superficiale è possibile ottenere fibre prive di granuli ed operare con campi elettrici inferiori;
- conducibilità: gli ioni presenti nella soluzione polimerica incidono in maniera significativa sulle dimensioni e sull'uniformità delle fibre. Infatti, all'aumentare di tale parametro si verifica un significativo aumento del diametro della fibra; al contrario, una conducibilità troppo bassa causa una forza elettrica insufficiente, che non consente l'elongazione del getto e la formazione di una fibra uniforme, con la conseguente formazione di granuli.

### 3. Parametri ambientali

- temperatura: può influenzare il diametro della fibra modificando la viscosità del getto della soluzione polimerica. Generalmente, a temperature più alte si registrano valori di viscosità più bassi e viceversa;

umidità: influenza la morfologia delle fibre, in quanto se presente in percentuali eccessive può impedire l'evaporazione del solvente; viceversa, un tasso di umidità troppo basso provoca un eccessivo aumento della velocità di evaporazione, rendendo quindi impossibile il processo di elettrofilatura. L'umidità influisce inoltre sulla carica e sulla tensione superficiale della soluzione, promuovendo la scarica della fibra elettrofilata.

## 2 SCOPO

L'ingente sviluppo dell'ingegneria biomedica ha permesso di superare numerosi limiti legati alle tradizionali metodologie di cura del paziente, e di raggiungere soglie di innovazione sempre più elevate. La somministrazione dei farmaci in maniera controllata e mirata rientra fra gli aspetti maggiormente interessati da tale evoluzione. In questo senso, la ricerca si pone come ambiziosi obiettivi non solo lo studio di nuove biomolecole più efficaci dal punto di vista terapeutico, ma anche lo sviluppo di nuove modalità di somministrazione, variabili a seconda del trattamento richiesto, e che limitino il più possibile effetti collaterali legati alla scarsa efficacia della terapia, all'elevato numero di assunzioni di farmaco e al sovradosaggio dello stesso. La progettazione del vettore contenente il farmaco è dunque fondamentale per risolvere tali problematiche e poter effettuare un rilascio adeguato.

Attualmente, nell'ampio spettro dei biomateriali utilizzati per applicazioni biomedicali, stanno assumendo grande importanza i polimeri, sia quelli di origine sintetica sia quelli di origine naturale. Per quanto riguarda la classe dei polimeri sintetici, grande attenzione è posta sui poliesteri alifatici. Come noto, i poliesteri alifatici sono caratterizzati da buona biocompatibilità, bassi coefficienti di attrito, facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture complesse; inoltre, essi possono essere modificati chimicamente e/o fisicamente a livello della superficie e vi si possono immobilizzare cellule o biomolecole al loro interno.

Un poliестere che recentemente ha catalizzato una ingente attenzione sia dal punto di vista accademico che industriale è poli(butilene succinato). Esso infatti è caratterizzato da buona stabilità termica e da un'ampia finestra di lavorabilità, tra le più alte all'interno della classe dei poliesteri alifatici. Risulta inoltre biocompatibile e biodegradabile in ambiente biologico ed è stato recentemente approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA).

Per quanto riguarda, invece, la gamma dei polimeri naturali, la cheratina risulta essere uno dei materiali più utilizzati poiché, in quanto naturale, viene riconosciuta dai tessuti umani senza innescare reazioni immunitarie; inoltre, può essere ottenuta a basso costo a partire ad esempio da piume o scarti di lavorazione della lana. Come molti altri polimeri di origine naturale, è caratterizzata da scarse performance meccaniche: essa è difatti eccessivamente fragile e rigida, proprietà che ne riducono fortemente la processabilità, e dunque l'utilizzo come unico costituente di dispositivi biomedicali. Per questo motivo, la ricerca scientifica sta sperimentando nuovi materiali dati dall'unione di polimeri sintetici e di polimeri naturali. Il *blending* rappresenta una strategia ampiamente utilizzata con successo a livello industriale.

Tale approccio consente infatti di migliorare le prestazioni non soddisfacenti di un polimero senza andare a detrimento di quelle già buone.

Nell'ambito dei nuovi sistemi per rilascio controllato di farmaco, tra i vari dispositivi è doveroso citare le micro- e nanoparticelle ed i nanovettori, che offrono la possibilità di veicolare e rilasciare farmaci e/o agenti diagnostici, piccole molecole e proteine in essi incapsulati. Esistono, inoltre, i sistemi impiegati all'esterno dell'organismo del paziente: si tratta delle *patch* transdermiche, ovvero cerotti adesivi medicati, che una volta a contatto con la pelle rilasciano il principio attivo d'interesse.

Lo scopo del presente lavoro di Tesi, svolto presso i laboratori del Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali dell'Università di Bologna e presso i laboratori ISOF del CNR di Bologna, è la progettazione, sviluppo e caratterizzazione di una *patch* polimerica porosa a base di cheratina e poli(butilene succinato), per applicazioni nell'ambito del rilascio controllato di farmaco. In particolare, come molecola modello è stato utilizzato il diclofenac, comune farmaco antinfiammatorio presente nei cerotti medicati che si trovano in commercio.

Al termine di una fase preliminare di ricerca bibliografica, che ha permesso di conoscere lo stato dell'arte sull'argomento trattato, il progetto di Tesi è stato sviluppato secondo i seguenti punti:

- sintesi mediante policondensazione in massa a due stadi del poli(butilene succinato) (PBS) e caratterizzazione molecolare tramite NMR e GPC;
- preparazione della blend a base di PBS e cheratina, e successiva realizzazione delle *patch* per elettrofilatura;
- caratterizzazione termica e meccanica dei tappetini ottenuti;
- analisi della cinetica di rilascio di diclofenac dalle *patch*;
- analisi dei risultati ottenuti ed estrapolazione di correlazioni proprietà-struttura.

### 3 MATERIALI E METODI

Il presente lavoro di Tesi è stato svolto presso i laboratori del Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali dell'Università di Bologna e presso i laboratori dell'istituto ISOF del CNR di Bologna.

#### 3.1 Sintesi del poli(butilene succinato) (PBS) ad alto peso molecolare

Il poli(butilene succinato) è stato ottenuto attraverso un processo di policondensazione di due unità monomeriche diverse (Figura 3.1), l'estere dell'acido succinico, il dimetil succinato (DBE), che rappresenta l'unità acida, e il 1,4 butandiolo (BD), che rappresenta l'unità glicolica, con liberazione di metanolo, prodotto di scarto della reazione.

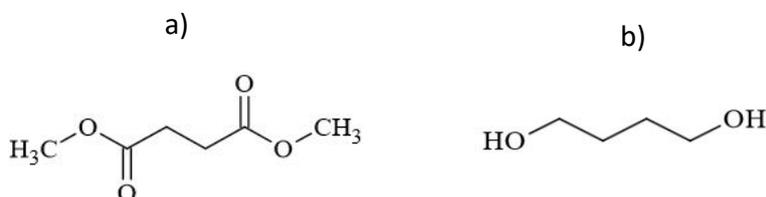


Figura 3.1 Strutture chimiche delle unità monomeriche e del PBS: a) dimetil succinato; b) 1,4-butandiolo.

Il procedimento seguito per effettuare la sintesi è il seguente:

1. A partire dai pesi molecolari delle due subunità di interesse, viene calcolato il peso molecolare del polimero che si desidera ottenere: tale peso è ottenuto sottraendo dai pesi delle due subunità di partenza il peso molecolare del prodotto di scarto.

$$\text{Peso molecolare del DBE} = 146,14 \text{ g/mol}$$

$$\text{Peso molecolare del gruppo terminale } CH_3 = 15 \text{ g/mol}$$

$$\text{Peso molecolare del BD} = 90,12 \text{ g/mol}$$

$$\text{Peso molecolare del gruppo funzionale OH} = 17 \text{ g/mol}$$

$$\text{Peso molecolare del PBS} = 146,14 - 2 \cdot (15) + 90,12 - 2 \cdot (17) = 172,26 \text{ g/mol}$$

2. Una volta determinato il peso molecolare del polimero da ottenere, vengono calcolate le quantità dei reagenti e del catalizzatore che è necessario utilizzare.

Quantità di PBS da ottenere: 35 g

$$n^{\circ} \text{ moli di PBS} = \frac{35 \text{ g}}{172,26 \text{ g/mol}} = 0,20318 \text{ mol}$$

Sapendo che i due reagenti reagiscono in proporzione 1:1, 1 mole di PBS si ottiene facendo reagire 1 mole di DBE con 1 mole di BD. Nel caso in esame, però, si necessita soltanto di 0.20318 moli di polimero per ottenere 35 g, quindi, sempre considerando il rapporto 1:1, è necessario far reagire 0.20318 moli di DBE e di BD.

$$DBE_g = 0,20318 \text{ mol} \cdot 146,14 \text{ g/mol} = 29,693 \text{ g}$$

$$BD_g = 0,20318 \text{ mol} \cdot 90,12 \text{ g/mol} \cdot 1,2 = 21,973 \text{ g} \text{ (siccome lavoriamo con un leggero eccesso di glicole del 20\%, moltiplichiamo la quantità del BD per 1,2)}$$

Il catalizzatore utilizzato è un catalizzatore a base di titanio, il titanio(IV)tetrabutossido, in quantità pari a 400 ppm/grammo di polimero teoricamente ottenibile.

$$TBT_g = 400 \text{ ppm} \cdot 35 \text{ g} \cdot 7,10925423 = 0,0995 \text{ g} \text{ (circa due gocce)}$$

Dopo aver determinato le quantità necessarie di reagenti e catalizzatore, si è proceduto con la preparazione della miscela all'intero del reattore di polimerizzazione, inserendo prima il reagente in difetto, poi il reagente in eccesso, ed infine il catalizzatore.

La strumentazione per la sintesi si compone di un reattore in vetro a tre colli, un agitatore meccanico con misuratore di *torque* (grazie all'azione di estensimetri) ed una pompa da vuoto (Figura 3.2).

Il reattore in vetro presenta 3 colli, grazie ai quali si collega ai restanti componenti del sistema. Il collo a sinistra permette il collegamento del reattore con un flusso di azoto, necessario per mantenere l'atmosfera inerte, il collo centrale consente l'inserimento dell'agitatore, mentre il collo a destra garantisce il collegamento del reattore alla trappola, che ha il compito di raccogliere il metanolo che si forma in seguito all'unione delle unità monomeriche acida e glicolica.

Il reattore viene inserito in un bagno contenente una miscela di sali inorganici al fine di garantire il mantenimento di una temperatura uniforme e costante lungo tutto il corso della reazione.

Come già detto, il poli(butilene succinato) è stato ottenuto mediante policondensazione in massa a due stadi. Più in dettaglio, durante il primo stadio, condotto alla temperatura di 180 °C, si verificano le reazioni di transesterificazione, grazie alle quali si formano oligomeri a basso peso molecolare, e la contemporanea distillazione del metanolo, raccolto nella trappola. In questa prima fase, la velocità di rotazione della pala viene mantenuta costante a 100 rpm. Nel secondo stadio, che ha inizio quando almeno il 90% del metanolo teorico viene distillato, avvengono altre reazioni di transesterificazione tra gli oligomeri precedentemente ottenuti, con la formazione di catene polimeriche ad elevato peso molecolare. Durante questa seconda fase, la temperatura viene aumentata gradualmente fino al raggiungimento di 230 °C. Inoltre, è stato creato un graduale vuoto, fino al raggiungimento di un vuoto spinto di circa  $6 \cdot 10^{-2}$  mbar, al fine di eliminare il glicole in eccesso e spostare dunque l'equilibrio di reazione verso i prodotti. Durante questo stadio, è possibile osservare un graduale aumento del *torque*, dovuto all'aumento della viscosità del polimero, ovvero del suo peso molecolare.

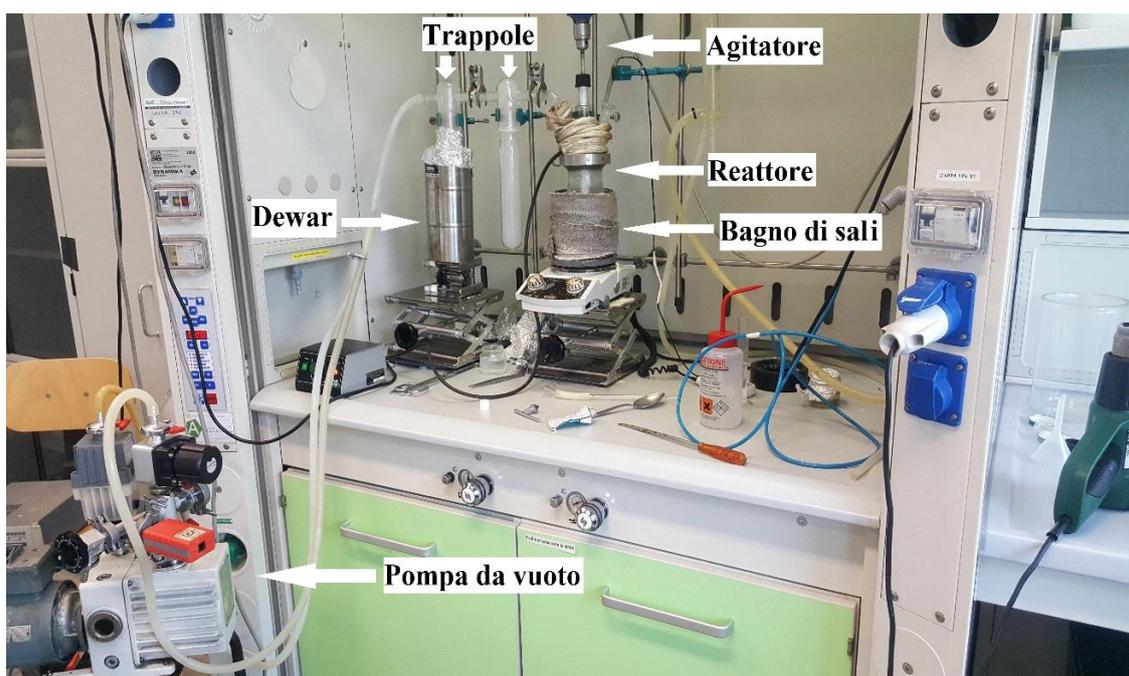


Figura 3.2 Strumentazione utilizzata per la sintesi.

### 3.1.1 Purificazione del PBS

Al fine di eliminare eventuali residui e prodotti di reazione indesiderati, il PBS ottenuto è stato purificato; per effettuare la purificazione, il polimero è stato sciolto in una piccola quantità di cloroformio fino ad ottenerne la completa solubilizzazione. La soluzione così ottenuta è stata poi fatta sgocciolare in un becker contenente metanolo in largo eccesso, un

comune non solvente. A contatto con il metanolo, il PBS solidifica istantaneamente, precipitando sul fondo, mentre le componenti a basso peso molecolare rimangono sospese all'interno del metanolo, il quale diventa visibilmente più opaco col procedere della purificazione.

Infine, il polimero precipitato, di colore bianco (Figura 3.3), è stato filtrato e lasciato a riposo sottovuoto per permettere l'evaporazione di metanolo e cloroformio residui.



Figura 3.3 PBS purificato.

## 3.2 Caratterizzazione molecolare

### 3.2.1 Risonanza magnetica nucleare (NMR)

La Risonanza Magnetica Nucleare è una tecnica utilizzata per analizzare la struttura chimica dei materiali. Il sistema diagnostico utilizzato si compone di un elettromagnete che genera un campo magnetico stabile ed omogeneo, un emettitore di onde radio, un ricevitore e una apparecchiatura che ha lo scopo di variare la frequenza della radiazione emessa.

Il principio di funzionamento di questa tecnica sfrutta la capacità che hanno i nuclei di alcuni atomi di generare un campo magnetico in seguito alla rotazione intorno al proprio asse, se sottoposti a un campo magnetico esterno. Tale rotazione, o spin, è legata ad un momento di spin  $I$  rispetto al centro del proprio nucleo, definito come:

$$I = \frac{n}{2} \cdot \frac{h}{2\pi}$$

in cui  $n$  è il numero quantico principale e  $h$  la costante di Planck.

Una volta fissato il numero quantico principale, e quindi la specie chimica in esame, il momento di spin risulta costante. A tale momento di spin  $I$  viene associato un momento magnetico elementare  $\mu$ , che dipende dallo stesso  $I$ :

$$\mu = \gamma \cdot I$$

in cui  $\gamma$  è il rapporto giromagnetico.

Inoltre, il momento magnetico nucleare  $\mu$ , in seguito all'allineamento del nucleo, non rimane fermo ma continua ad oscillare attorno alla direzione del campo magnetico esterno  $B$ , compiendo un moto di precessione, simile a quello di una trottola (Figura 3.4).

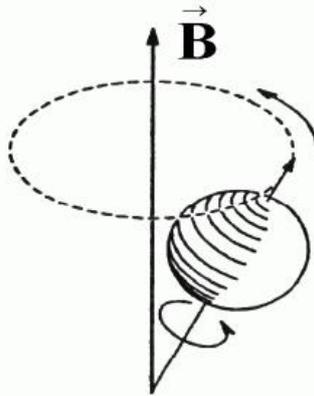


Figura 3.4 Moto di precessione dei momenti magnetici.

Quando i nuclei di atomi con spin non intero vengono sottoposti ad un campo magnetico esterno  $B$ , la loro rotazione si sincronizza, e gli assi di rotazione si dispongono lungo le linee di flusso del campo magnetico. Ad esempio, per un nucleo con spin  $1/2$ , gli orientamenti possibili sono due: uno parallelo al campo ( $m = +1/2$ ) e uno antiparallelo ( $m = -1/2$ ) (Figura 3.5). Gli atomi che tipicamente vengono utilizzati sono  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , che hanno spin  $1/2$ .

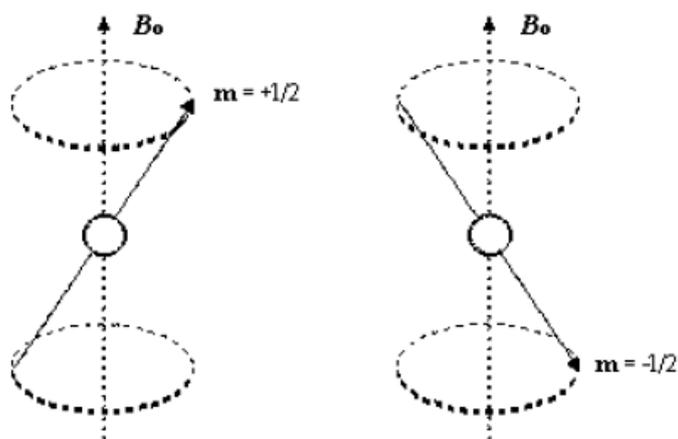


Figura 3.5 Possibili orientamenti dei nuclei con spin  $1/2$  in presenza di campo magnetico.

In base a queste due possibili disposizioni, i nuclei si troveranno anche su due livelli energetici differenti: quelli orientati in senso parallelo avranno minore energia mentre gli altri avranno maggiore energia (Figura 3.6).

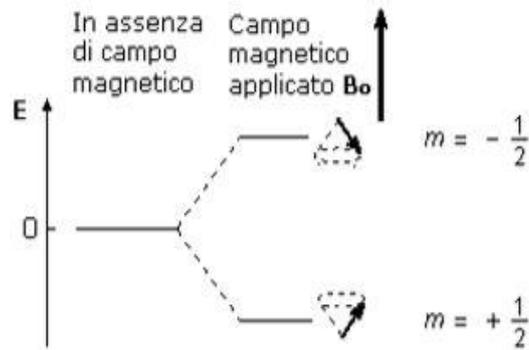


Figura 3.6 Energia ed orientamento dei nuclei in presenza di un campo magnetico esterno.

La differenza di energia tra i due livelli è direttamente proporzionale all'intensità del campo magnetico applicato, ed è pari a:

$$\Delta E = 2 \cdot \vec{\mu} \cdot \vec{B} \xrightarrow{\text{legge di Planck}} h \cdot \nu$$

dove  $\nu = \frac{2 \cdot \vec{\mu} \cdot \vec{B}}{h}$  è la frequenza di risonanza.

Tuttavia, essa risulta essere molto piccola; di conseguenza, la popolazione di nuclei sui due livelli energetici è molto simile, ad eccezione di una leggera prevalenza per lo stato a minor energia; grazie a questa piccola differenza è possibile ricavare il segnale NMR.

A questo punto, se viene applicato un secondo campo magnetico  $B_1$  orientato perpendicolarmente a quello già presente, il vettore campo magnetico complessivo ed il vettore magnetizzazione si defletteranno dall'asse del campo  $B$  di un certo angolo, detto angolo di nutazione o di precessione. Questo fenomeno avviene soltanto se  $B_1$  possiede una frequenza specifica, detta frequenza di Larmor, che dipende dalla specie atomica in esame e dal campo  $B$ , pari a:

$$f = \frac{|\gamma \cdot B|}{2 \cdot \pi}$$

Una volta che il campo magnetico  $B_1$  cessa di essere applicato, il vettore magnetizzazione ritorna in allineamento con il campo  $B$ , entro un certo tempo, rilasciando energia.

Il segnale viene generato secondo il metodo ad impulso, in cui gli impulsi sono generati e ricevuti da un sistema di bobine magnetiche secondo una sequenza ben precisa, detta FID

(*Free Induction Decay*). Esso porta il sistema di spin ad inclinare il proprio vettore magnetizzazione di  $90^\circ$  rispetto alla verticale; una volta terminato l'impulso, i nuclei iniziano a cedere rapidamente energia per ritornare alla posizione iniziale, generando così un segnale che si smorza velocemente nel tempo. Se questo segnale viene espresso in funzione della frequenza, invece che del tempo, si ottiene lo spettro NMR relativo alla sostanza in esame (Figura 3.7), costituito da un insieme di picchi collocati a specifiche frequenze.

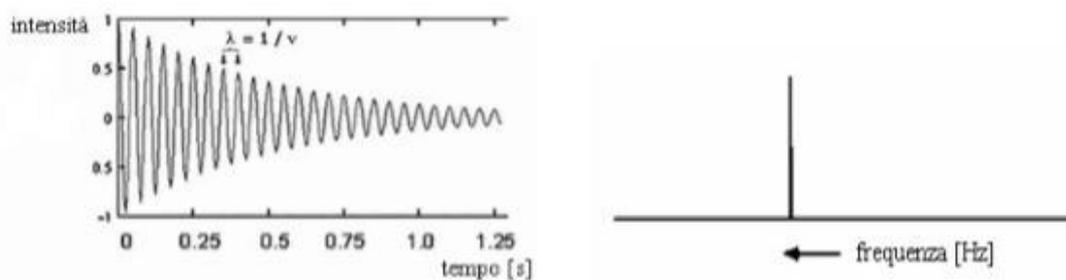


Figura 3.7 Grafico FID e relativo spettro NMR.

La posizione dei picchi è strettamente legata all'intorno chimico che circonda l'atomo in esame, considerando che gli elettroni provocano un effetto di schermatura. Più in dettaglio, tanto più grande è la densità elettronica, maggiore sarà la schermatura; questo significa che i nuclei che si trovano in un intorno ricco di elettroni sentiranno un campo magnetico più basso e subiranno, di conseguenza, la transizione da un livello energetico all'altro ad una frequenza applicata più bassa, rispetto ai nuclei situati in intorni poveri di elettroni.

Lo spostamento risultante nel segnale NMR per un dato nucleo è detto spostamento chimico; in generale, protoni o carboni adiacenti ad atomi elettronegativi risultano deschermati e, di conseguenza, avvertono un campo magnetico applicato più intenso, subiscono transizione a frequenze maggiori, e, nello spettro, si trovano ad uno spostamento chimico più alto. Lo spostamento chimico assoluto risulta tanto maggiore quanto è più intenso il campo applicato; questo significa che strumenti diversi fornirebbero spostamenti chimici assoluti diversi in rapporto all'intensità del loro campo magnetico. Per questo motivo, si preferisce considerare lo spostamento chimico relativo  $\delta$ , definito come:

$$\delta = \frac{\nu_r - \nu}{\nu_r} \cdot 10^6$$

Dove  $\nu$  è la frequenza di risonanza del campione e  $\nu_r$  è la frequenza di risonanza del tetrametilsilano (TMS), nucleo di riferimento.

Tipicamente, per il nucleo dell'atomo  $^1\text{H}$  e per gran parte delle molecole organiche,  $\delta$  è compreso nell'intervallo fra 0 e 10 ppm.

Inoltre, considerando l'area sottesa da ogni picco e valutandola in termini relativi, risulta possibile determinare il rapporto tra i vari tipi di atomi di idrogeno presenti. L'area di un picco è, infatti, indipendente dalla struttura a cui è legato l'atomo di idrogeno e dipende unicamente dalla frequenza con cui tale atomo è ripetuto all'interno della molecola. Dividendo poi l'area di ogni picco per il numero di idrogeni a cui corrisponde, si ottengono valori perfettamente confrontabili con quelli dati dalla formula chimica del polimero analizzato.

Gli spettri oggetto della presente Tesi sono stati ottenuti con uno spettrometro NMR Varian XL-400. Le soluzioni sono state preparate sciogliendo circa 10 mg di polimero in cloroformio deuterato (0.03%), i cui atomi di idrogeno vengono sostituiti da atomi dell'isotopo deuterio, al fine di escludere la presenza di qualsiasi fonte di protoni, ad eccezione di quelli relativi alla molecola da analizzare. Gli spettri sono stati acquisiti a temperatura ambiente con concentrazione dei polimeri pari al 0.5 wt%, tempo di rilassamento pari a 0 secondi e tempo di acquisizione di 1 secondo per 100 ripetizioni.

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

La cromatografia a permeazione su gel (GPC) è una tecnica di separazione fisica che permette di determinare la distribuzione del peso molecolare di un polimero.

Lo strumento utilizzato è composto da una pompa volumetrica, una colonna cromatografica contenente particelle porose (polistirene reticolato con divinilbenzene) ed un rivelatore, che per i poliesteri alifatici è generalmente ad indice di rifrazione (Figura 3.8).

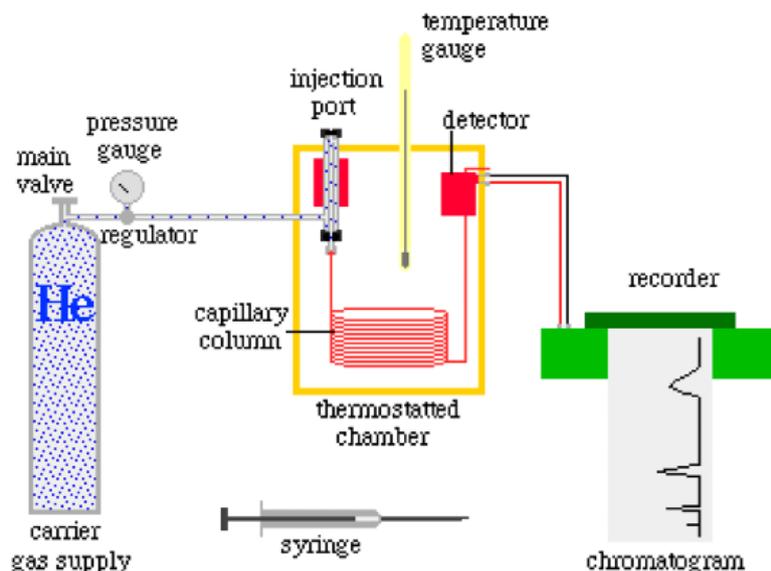


Figura 3.8 Schematizzazione del cromatografo.

La separazione dei diversi pesi molecolari è dovuta al fatto che le molecole più grandi che costituiscono il polimero non penetrano nei pori, limitandosi ad aggirare i corpi di riempimento, mentre le molecole più piccole riescono ad entrare nei suddetti pori, dove il liquido scorre più lentamente; di conseguenza, le molecole ad alto peso molecolare usciranno in tempi brevi mentre quelle a basso peso molecolare impiegheranno più tempo (Figura 3.9).

Durante la scansione in colonna, viene fatto circolare un solvente con portata volumetrica costante. I campioni in analisi vengono disciolti nello stesso solvente circolante in colonna, filtrati attraverso l'utilizzo di una siringa per poter eliminare le eventuali particelle non solubili che potrebbero ostruire i pori, e infine iniettati.

Una volta uscita dalla colonna, la soluzione viene analizzata da un sensore che fornisce, istante per istante, un segnale la cui intensità è proporzionale alla concentrazione del soluto, il cromatogramma; secondo quanto detto, il risultato finale dell'analisi è un grafico che riporta l'andamento dell'intensità del segnale in funzione del tempo. Per convertire i tempi in pesi molecolari, è necessario fare riferimento alle curve di taratura, ottenute analizzando campioni standard di peso molecolare noto.

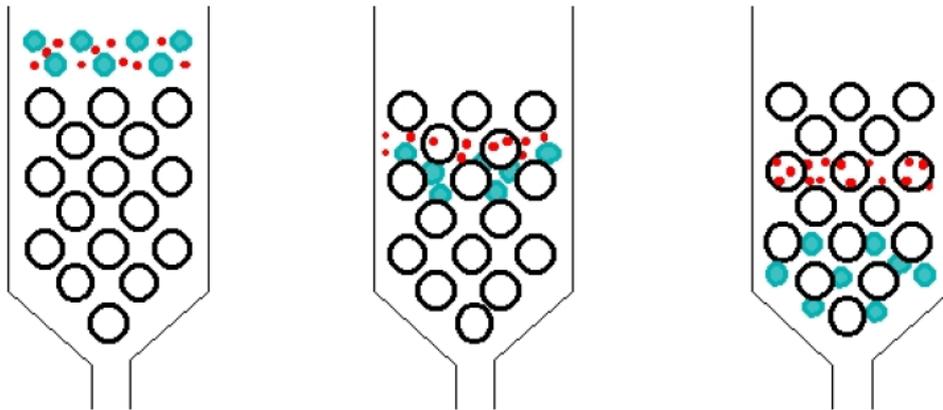


Figura 3.9 Separazione delle molecole, ad alto e a basso peso molecolare all'interno della colonna cromatografica.

Il cromatografo utilizzato è composto da due colonne disposte in serie: la prima è una PLgel MiniMIX-A (20  $\mu\text{m}$  con dimensioni di 250x4.6 mm) seguita da una seconda colonna TOSOH TSKgel SuperMultipore HZ-M (4  $\mu\text{m}$  con dimensioni 150x4.6 mm). I cromatogrammi sono stati registrati ed elaborati con il software Agilent GPC/SEC versione A.02.01. Come eluente è stato utilizzato cloroformio, con flusso in colonna pari a 0.2 ml/min, al quale viene aggiunto toluene (2  $\mu\text{l}$  /20 ml) come riferimento.

### 3.3 Realizzazione di *scaffold* tramite elettrofilatura

Gli *scaffold* utilizzati per la realizzazione di patch transdermici per il rilascio controllato di farmaci, oggetto del presente lavoro di Tesi, sono stati ottenuti mediante elettrofilatura.

Lo strumento utilizzato (Figura 3.10) è costituito da un generatore di tensione ad alto voltaggio ( $\pm 30$  kV, 5mA) SVH150 Alintel Power Electronics (Italia), una siringa dotata di ago di diametro variabile tra 0.2 mm e 1.5 mm, contenente la soluzione polimerica da elettrofilare, una pompa per infusione KDS200 KD Scientific Inc. (Usa), che ha la funzione di spingere lo stantuffo della siringa ad una velocità costante, ed un collettore metallico in acciaio inossidabile ad un potenziale più basso rispetto a quello applicato alla soluzione polimerica (di solito collegato a terra), su cui vengono depositate le nanofibre che costituiscono il tappetino elettrofilato.



Figura 3.10 Strumentazione per elettrofilatura, laboratorio istituto ISOF del CNR di Bologna.

Nel caso del presente lavoro di Tesi, 600 mg di PBS purificato sono stati disciolti in 4 ml di esafluoro-isopropanolo in modo da avere una soluzione al 15% peso/volume.

Una volta che il polimero si è disciolto completamente, la soluzione è stata caricata all'interno di una siringa, con ago di diametro di 0.8 mm, posta sul portacampione a una distanza di 15 cm dal collettore. Successivamente è stata messa in funzione la pompa per infusione con una velocità di 0.03 ml/min ed è stato applicato un campo elettrico di 20 kV.

Lo stesso procedimento è stato ripetuto per la blend a base di PBS e cheratina; in questo caso 300 mg di PBS e 300 mg di cheratina sono stati disciolti separatamente, ciascuno in 2 ml di esafluoro-isopropanolo, e poi uniti insieme per formazione un'unica soluzione più omogenea possibile. La soluzione così ottenuta è stata poi elettrofilata nelle medesime condizioni sopra descritte. Tali procedure, della durata di 40 minuti ciascuna, hanno permesso di ottenere tappetini di dimensioni 15x15 cm.

Per quanto riguarda i tappetini caricati con farmaco diclofeac (principio attivo del prodotto commerciale Voltaren), nel caso del tappetino realizzato con solo PBS sono stati sciolti 140 mg di Diclofenac in 4 ml di esafluoro-isopropanolo insieme a 600 mg di PBS. Nel caso della miscela PBS/cheratina, invece, sono stati sciolti 70 mg di Diclofenac in 2 ml di esafluoro-

isopropanolo insieme a 300 mg di PBS e, parallelamente, 70 mg di Diclofenac in 2 ml di esafluoro-isopropanolo insieme a 300 mg di cheratina. In questo secondo caso, poi, le soluzioni sono state unite, poste in agitazione per un'ora ed elettrofilate, utilizzando i medesimi parametri di cui sopra.

Secondo questo procedimento, sono stati ottenuti tappetini contenenti complessivamente 140 mg di Diclofenac, la medesima quantità presente nei cerotti medicati comunemente presenti in commercio.

### **3.4 Caratterizzazione morfologica**

#### **3.4.1 Microscopia elettronica a scansione (SEM)**

La microscopia elettronica a scansione è una tecnica utilizzata per analizzare e studiare la morfologia di un determinato campione in esame. La principale differenza dei microscopi elettronici, rispetto a quelli ottici, è l'utilizzo di radiazioni provenienti non da fotoni luminosi, ma da elettroni, i quali sono caratterizzati da una frequenza molto più alta (maggiore energia); questo permette di ottenere immagini con una risoluzione molto elevata, anche inferiore al nanometro.

In generale, un microscopio elettronico a scansione (Figura 3.11) è composto da un generatore di elettroni, detto cannone elettronico, nel quale un filamento di tungsteno, una volta portato ad un elevato potenziale, si riscalda per effetto Joule liberando elettroni, che vengono a loro volta accelerati verso il basso. Per poter focalizzare gli elettroni verso il basso, evitando dispersioni in diverse direzioni, vengono poste delle lenti collimatrici che assicurano la convergenza sul campione. È inoltre presente un sistema di quattro bobine di scansione, il quale fa scorrere il fascio su tutta la superficie del campione, posto su un supporto mobile. Il fascio di elettroni, una volta investito il campione in esame, colpisce una serie di lenti che lo proiettano su un primo schermo fluorescente che converte il segnale elettrico in luce visibile, e infine su un secondo schermo, dal quale si ottiene l'immagine finale all'ingrandimento desiderato, visualizzabile su uno schermo digitale. Da tali immagini è possibile ottenere informazioni sulla chimica superficiale, sulla struttura e sulla composizione chimica del materiale irradiato.

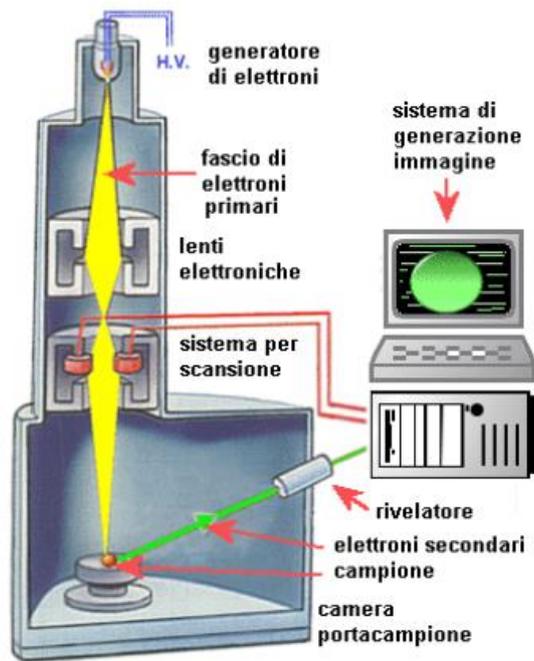


Figura 3.11 Struttura del SEM.

Lo strumento utilizzato per le rilevazioni per la presente Tesi è un microscopio EVO LS LaB6. Le immagini SEM sono state acquisite utilizzando un voltaggio di 5 kV ed una distanza di lavoro di 5 mm su campioni metallizzati con oro e posizionati su opportuni supporti (*stub*) collegati a massa, allo scopo di scaricare l'eventuale deposito superficiale di elettroni sul campione, che lo renderebbero invisibile al microscopio. L'analisi delle immagini è stata condotta con GIMP 2.8 con un software di acquisizione e analisi di immagine (EDAX Genesis) mentre la distribuzione dei diametri delle fibre elettrofilate è stata calcolata misurando il diametro di 150 fibre.

### 3.5 Caratterizzazione termica

#### 3.5.1 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

La calorimetria a scansione differenziale o DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) è una tecnica utilizzata per analizzare le transizioni termiche dei materiali e determinarne le proprietà termodinamiche, come la temperatura di transizione vetrosa, punto di fusione e calore di fusione.

Il principio di funzionamento di questa analisi consiste nel raffreddare e riscaldare in maniera controllata il campione in analisi, misurando la differenza di flusso termico fra il campione in esame e uno di riferimento, mentre i due sono vincolati ad una temperatura variabile definita da un programma prestabilito.

La strumentazione è costituita da due piatti dedicati al posizionamento di altrettante capsule, contenenti una il campione da analizzare e l'altra il campione di riferimento, in questo caso rappresentato dalla capsula vuota.

I piatti su cui vengono posizionate le capsule costituiscono microcalorimetri, mantenuti in atmosfera di azoto inerte durante le misure (Figura 3.12). I due piatti, o celle calorimetriche, sono sottoposti allo stesso programma termico: in assenza di transizioni di fase, il campione ed il riferimento sono alla stessa temperatura mentre, nel caso in cui si dovessero verificare variazioni di fase, si crea uno squilibrio termico che viene rilevato dalle termoresistenze. Queste termoresistenze hanno il compito di controllare la potenza elettrica fornita ai microcalorimetri; infatti, nel caso di una transizione di fase, essendo diversa la temperatura del riferimento rispetto a quella del campione, le termoresistenze forniscono energia al microcalorimetro corrispondente al campione, per annullare la differenza di temperatura creatasi.

Il computer interfacciato allo strumento consente di impostare il programma termico, di rilevare ed elaborare i dati.

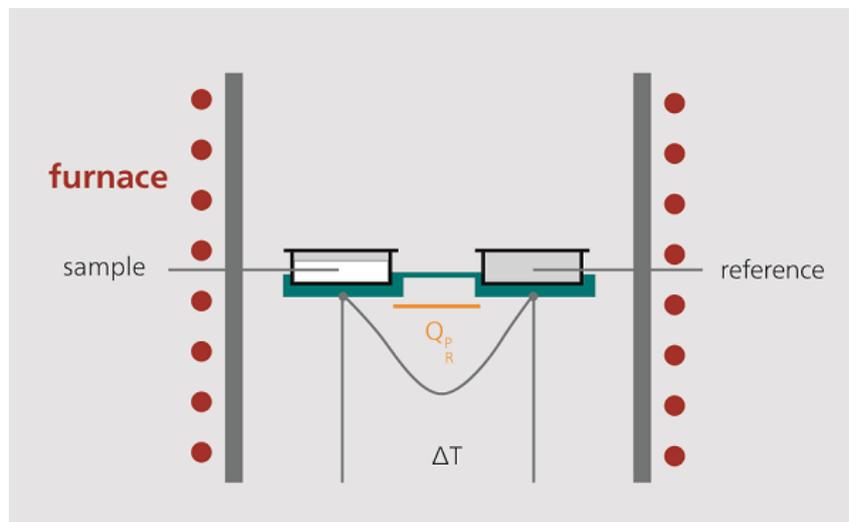


Figura 3.12 Schematizzazione del funzionamento della DSC.

La temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) si manifesta come una variazione endotermica della linea di base e il suo valore è determinato in corrispondenza della metà della variazione di calore specifico associata alla transizione (Figura 3.13).

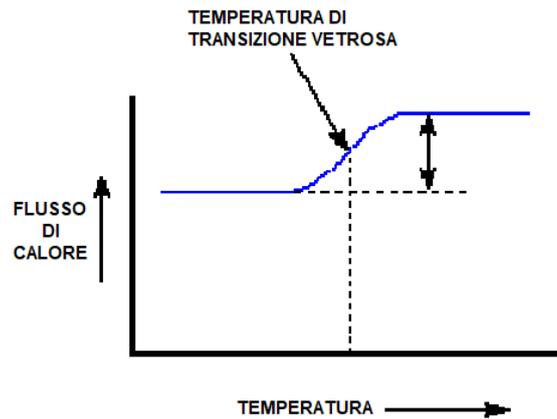


Figura 3.13 Calcolo della  $T_g$ .

L'entità della variazione di calore specifico associato alla transizione vetrosa ( $\Delta C_p$ ), proporzionale alla componente amorfa presente nel materiale, è pari alla distanza verticale tra le linee di base estrapolate alla  $T_g$ :

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

dove  $dT/dt$  = velocità di scansione.

Per quanto riguarda, invece, la temperatura di fusione ( $T_m$ ), questa si presenta nel tracciato come un picco endotermico (Figura 3.14); in particolare, la temperatura di fusione corrisponde all'ascissa di tale picco mentre l'area sottesa rappresenta il calore di fusione  $\Delta H_m$  (J/g), tanto più elevato quanto più è alto il grado di cristallinità del materiale. Il rapporto tra quest'ultima grandezza ed il calore di fusione del polimero completamente cristallino costituisce il grado di cristallinità.

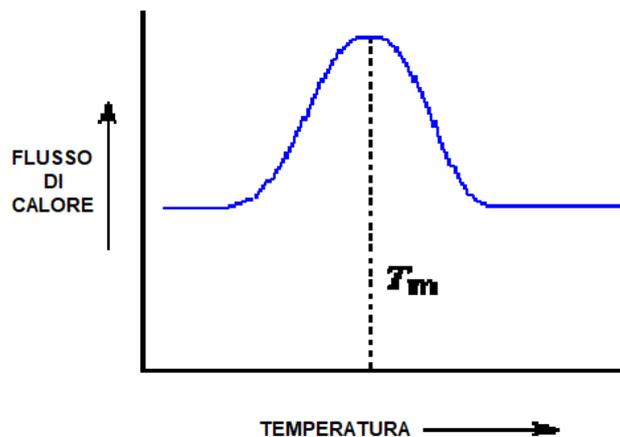


Figura 3.14 Calcolo della  $T_m$ .

Le misure DSC effettuate sui campioni in esame sono state ottenute con un calorimetro DCS6 Perkin-Elmer equipaggiato di accessori per il raffreddamento a temperature minori di 0 °C e calibrato con standard ad elevata purezza.

La capsula contenente il campione è stata riempita con circa 10 mg di materiale e, insieme alla capsula di riferimento, lasciata vuota, è stata sottoposta al seguente programma termico:

1. Prima scansione: riscaldamento da -70 °C a 200 °C con velocità pari a 20 °C/min, mantenendo il sistema a 200 °C per 4 minuti;
2. Raffreddamento rapido (velocità pari a 100 °C/min) fino a -70 °C e mantenimento a -70 °C per 15 minuti;
3. Seconda scansione: riscaldamento in condizioni di temperatura e velocità analoghe alla prima scansione.

### **3.5.2 Analisi termogravimetrica (TGA)**

L'analisi termogravimetrica (TGA) è una tecnica analitica che permette di ottenere informazioni riguardanti sia la cinetica del processo di decomposizione sia la stabilità termica del materiale. Tali informazioni sono di fondamentale importanza per definire il valore di temperatura che non deve essere oltrepassato nel trattamento del polimero, per evitare che il polimero vada incontro a degradazione.

La tecnica consiste nel determinare le variazioni di peso del campione quando è sottoposto ad un graduale aumento di temperatura, in presenza di atmosfera controllata di gas di diverso tipo (N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, aria); i cambiamenti di peso sono dovuti a perdite di sostanze volatili in seguito a processi fisici o chimici che modificano la natura del composto. Nel caso dei polimeri, i prodotti derivanti dalla loro decomposizione saranno acqua e anidride carbonica.

Lo strumento utilizzato è composto da una bilancia analitica (portata: 5-20 mg), da un forno che riscalda a velocità controllata, da un sistema di gas di spurgo che assicura un'atmosfera inerte e da un elaboratore per il controllo dello strumento, l'acquisizione e la visualizzazione dei dati (Figura 3.15).

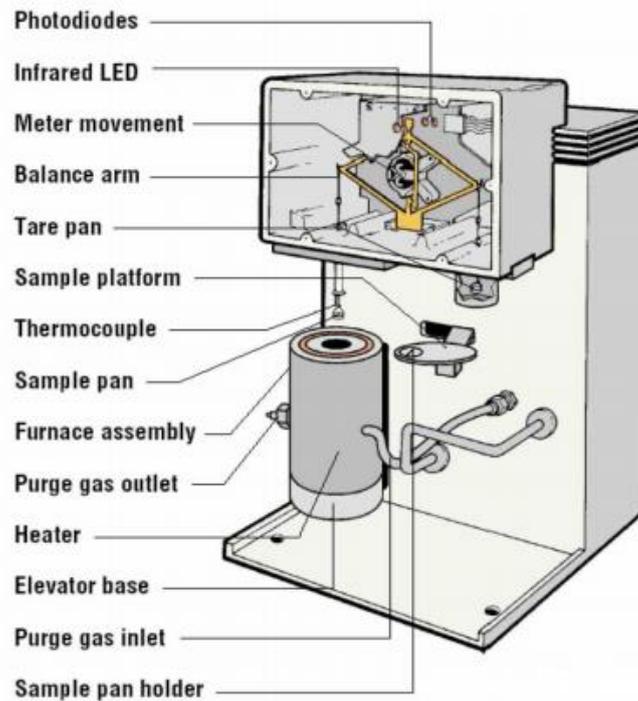


Figura 3.15 Esempio di strumentazione per TGA.

A partire dal termogramma, è possibile ricavare due importanti valori di temperatura:

- $T_{\text{ONSET}}$ : temperatura in corrispondenza della quale inizia il processo di degradazione;
- $T_{\text{MAX}}$ : temperatura alla quale si rileva la massima velocità di perdita di peso.

Le curva TGA ottenute per il polimero in esame nella presente Tesi sono state ottenute usando la bilancia termogravimetrica PerkinElmer TGA 4000, in atmosfera di azoto partendo da 5 mg di campione. La velocità di riscaldamento è stata impostata a 10 °C/min e la temperatura è stata fatta variare nell'intervallo 40-800 °C.

### 3.6 Caratterizzazione meccanica

Le misure di resistenza meccanica vengono utilizzate per studiare il comportamento dei materiali polimerici in presenza di sollecitazioni di diverso tipo. In particolare, quando si vuole indagare la resistenza del materiale in esame alla trazione, si effettuano prove tensili.

Nel caso di prove tensili si definisce tensione (*stress*) il rapporto tra lo sforzo normale applicato e l'area della sezione del provino a riposo:

$$\sigma = \frac{N}{A}$$

mentre la deformazione (*strain*) è definita come l'allungamento del provino in relazione alla sua lunghezza iniziale:

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l}$$

Durante la prova si misura il valore dell'allungamento in funzione del carico applicato. I risultati ottenuti vengono trasportati su un diagramma  $\sigma$ - $\varepsilon$ , cioè il grafico che descrive la deformazione che subisce il provino in funzione della tensione applicata, ottenendo la curva sforzo-deformazione, caratteristica del materiale in esame. Un andamento tipico è mostrato in Figura 3.16.

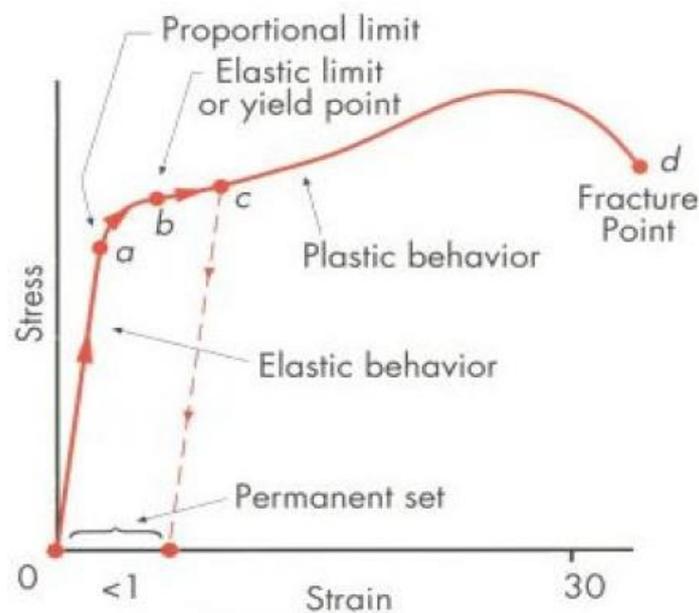


Figura 3.16 Esempio di diagramma  $\sigma$ - $\varepsilon$ .

Dall'analisi della curva è possibile individuare due regioni distinte: la regione elastica, che corrisponde alla prima parte della suddetta curva, e la regione plastica. Il termine della curva corrisponde con il momento in cui il materiale si rompe.

Il campo elastico è caratterizzato da un andamento lineare della curva in cui il materiale si deforma in maniera reversibile secondo la legge di Hooke, in cui tensione e deformazione sono direttamente proporzionali, e la costante di proporzionalità è data dal modulo elastico E:

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

All'aumentare della tensione applicata al provino in esame si arriva ad un valore limite della tensione, detta di snervamento, oltre la quale, una volta rimosso il carico, la deformazione permane e si entra così nel campo plastico.

Dall'area sottesa alla curva è possibile valutare la tenacità del materiale, ossia la misura dell'energia necessaria per rompere il materiale.

È necessario ricordare che i dati ottenuti risentono, oltre che del materiale utilizzato nel test, anche delle condizioni ambientali, quali temperatura e umidità, e sperimentali, come velocità di scorrimento, forma e dimensione dei provini.

Le prove meccaniche sono state condotte utilizzando un dinamometro Instron 4465 con cella di carico di 10 KN. Lo strumento utilizzato è costituito da una struttura fissa di base e una traversa mobile posta nella parte superiore (Figura 3.17). A partire dagli scaffold polimerici, sono state ricavate striscioline rettangolari dalle dimensioni di 5x50 mm, il cui spessore, di circa 100  $\mu\text{m}$ , è stato misurato in tre punti diversi per mezzo di un micrometro (Mitutoyo); lo spessore utilizzato al fine delle analisi è la media sulle tre misure. I provini sono stati fissati per mezzo di agganci in maniera tale da presentare un tratto utile di 20 mm e l'applicazione del carico è avvenuta tramite il movimento verso l'alto della struttura superiore.

Il valore della tensione applicata viene misurato direttamente dalla cella di carico mentre l'allungamento è stato determinato sulla base della distanza percorsa dalla traversa mobile.

Le prove a rottura sono state condotte a temperatura ambiente su 6 provini diversi con velocità pari a 10 mm/min.

Il modulo elastico dei campioni in esame, calcolato dalla pendenza del tratto iniziale della curva tensione-deformazione, è stato riportato come valore medio  $\pm$  deviazione standard delle sei prove.



Figura 3.17 Prova a trazione su campione di PBS elettrofilato.

### 3.7 Studio di rilascio di farmaco

Gli studi di rilascio, oggetto della presente Tesi, riguardano, come già detto, il diclofenac, comune antinfiammatorio nonché principio attivo di diverse creme e cerotti medicati presenti in commercio.

Più in dettaglio, per effettuare la prova di rilascio, sono stati ricavati quadratini di lato 1 cm dai tappetini elettrofilati, realizzati sia in solo PBS, sia a partire dalla blend PBS/cheratina. Le prove sono state condotte anche su tappetini di entrambi i materiali ma senza diclofenac, in modo da avere il bianco.

Successivamente, ciascun quadratino è stato inserito all'interno di membrane per dialisi (cut-off range di 12-14 KDalton), le quali, a loro volta, sono state inserite in una provetta con tappo, contenente 6 ml di tampone fosfato. Le membrane per dialisi hanno la funzione di lasciar passare il diclofenac attraverso i suoi pori, ostacolando invece il passaggio in soluzione di PBS e cheratina.

Le provette preparate sono state dunque poste in un forno ad una temperatura costante di 37 °C, al fine di ricreare le condizioni fisiologiche, e sono state prelevate aliquote di 100 µl di soluzione dopo 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 e 24 h dal tempo t<sub>0</sub>. Al termine di ciascun prelievo, 100 µl di soluzione tampone sono stati aggiunti a ciascuna provetta al fine di ripristinare il volume iniziale.

I campioni prelevati sono stati analizzati attraverso uno spettrofotometro a raggi UV-visibile: le aliquote sono state portate a volume in una eppendorf (Figura 3.18), aggiungendo 900 µl di tampone fosfato (al fine di raggiungere il volume di 1 mL necessario per la misura).



Figura 3.18 Preparazione dei campioni, all'interno di eppendorf, per analisi ai raggi UV.

È stata misurata l'assorbanza ( $\lambda = 276 \text{ nm}$ ) di ciascuna soluzione dalla quale è stato possibile, mediante curve di calibrazione ottenute a partire da soluzioni contenenti una concentrazione nota di farmaco, risalire alla quantità di diclofenac rilasciata.

La prova, secondo le modalità sopra descritte, è stata svolta tre volte, ed i risultati ottenuti sono riportati come valore medio  $\pm$  deviazione standard delle tre misure.

## 4 RISULTATI E DISCUSSIONI

### 4.1 Sintesi polimerica e caratterizzazione molecolare

Il polimero ottenuto è caratterizzato da un colore caramello (Figura 4.1), un po' più scuro rispetto alle aspettative, dovuto probabilmente alla presenza di un catalizzatore a base di Titanio.



Figura 4.1 Poli(butilene succinato) al termine della sintesi.

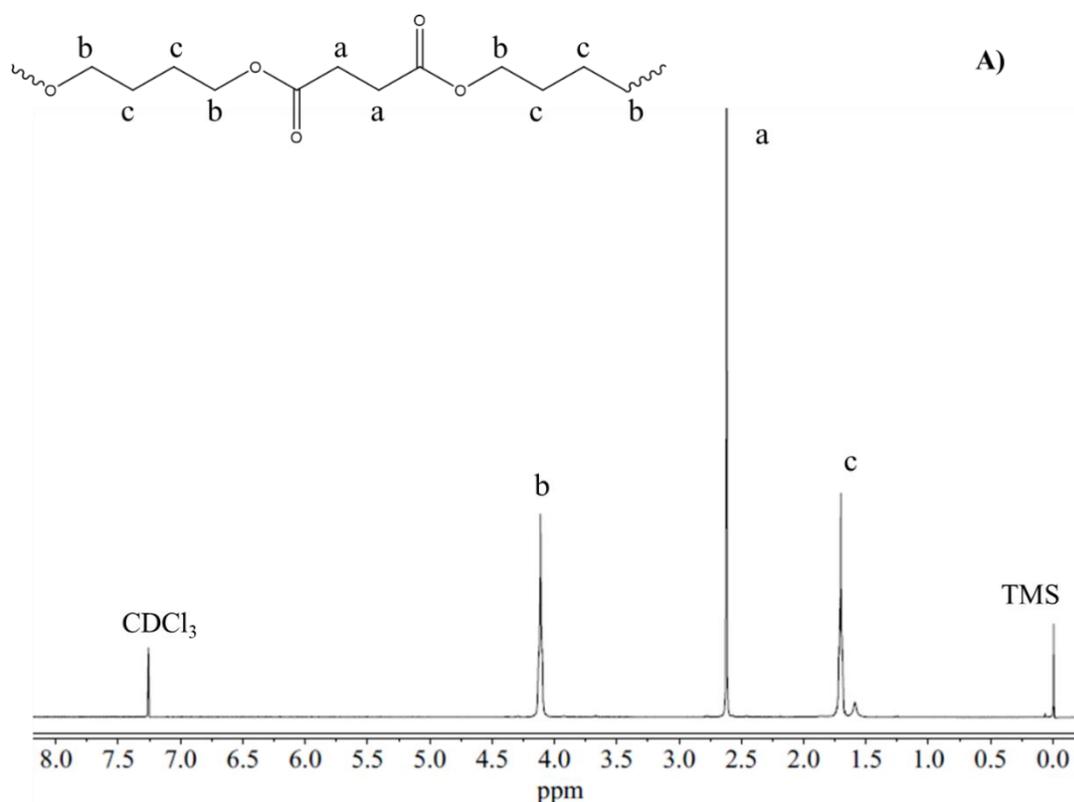
In seguito al processo di purificazione, lo stesso materiale assume una forma a “fiocchi” di colore bianco. Lo *scaffold* di PBS ottenuto per elettrofilatura si presenta come un solido poroso bianco e piuttosto flessibile, così come il tappetino ottenuto miscelando PBS e cheratina in percentuale 50:50 in peso (PBS50KER50).

Per quanto riguarda, invece, la cheratina, questa si presenta come un solido bianco molto cristallino, di aspetto aghiforme e consistenza decisamente leggera, di cui non è stato possibile ottenere un tappetino mediante elettrofilatura, a causa della difficile processabilità.

Tutti i materiali oggetto del presente lavoro di Tesi risultano caratterizzati da una buona solubilità in esafluoro-isopropanolo, solvente utilizzato per preparare la soluzione da elettrofilare; il PBS, inoltre, risulta solubile in cloroformio.

La struttura chimica del PBS è stata analizzata mediante spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$ . Lo spettro ottenuto, riportato in Figura 4.2, risulta coerente con la struttura prevista, permettendo di escludere la presenza di reazioni secondarie durante la polimerizzazione.

Lo spettro mostra, oltre ai segnali del solvente (cloroformio) a  $\delta$  7.25 ppm e del riferimento (tetrametilsilano) a  $\delta$  0 ppm, i segnali caratteristici del PBS: a  $\delta$  4.19 ppm e a  $\delta$  1.70 ppm sono registrati i segnali degli idrogeni della subunità glicolica, rispettivamente il tripletto *b* ed il multipletto *c*, mentre a  $\delta$  2.61 ppm si trova il singoletto corrispondente agli idrogeni della subunità acida, *a* (Figura 4.2 B).



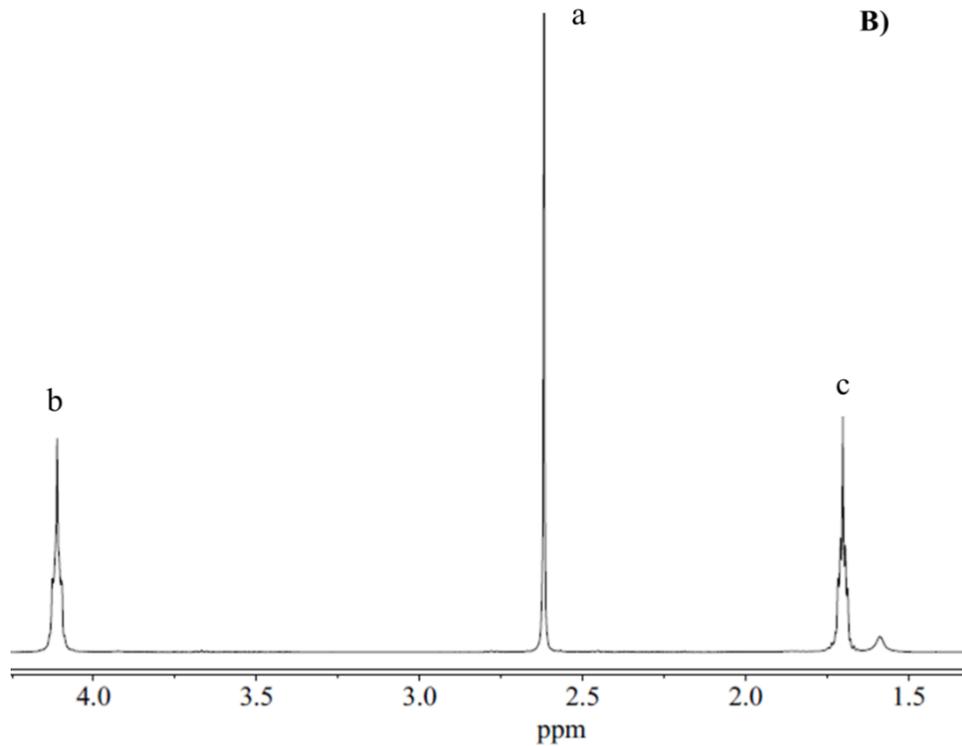


Figura 4.2 A) Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del PBS con attribuzione dei picchi; B) Ingrandimento della regione compresa tra 1 e 4.5 ppm.

Tramite cromatografia a permeazione su gel (GPC), è stato misurato il peso molecolare del campione di PBS, che risulta essere elevato ( $M_n = 50000 \text{ g/mol}$ ), e l'indice di polidispersità  $D$ , piuttosto ridotto ( $D = 2.1$ ), che indica un buon controllo del processo di sintesi.

#### 4.2 Caratterizzazione morfologica degli scaffold

La Figura 4.3 riporta, a titolo di esempio, l'immagine SEM, con ingrandimento 10.00K X, di due tappetini elettrofilati, il primo dell'omopolimero PBS e il secondo della blend PBS50KER50, ottenuti mediante il processo di elettrofilatura precedentemente descritto.

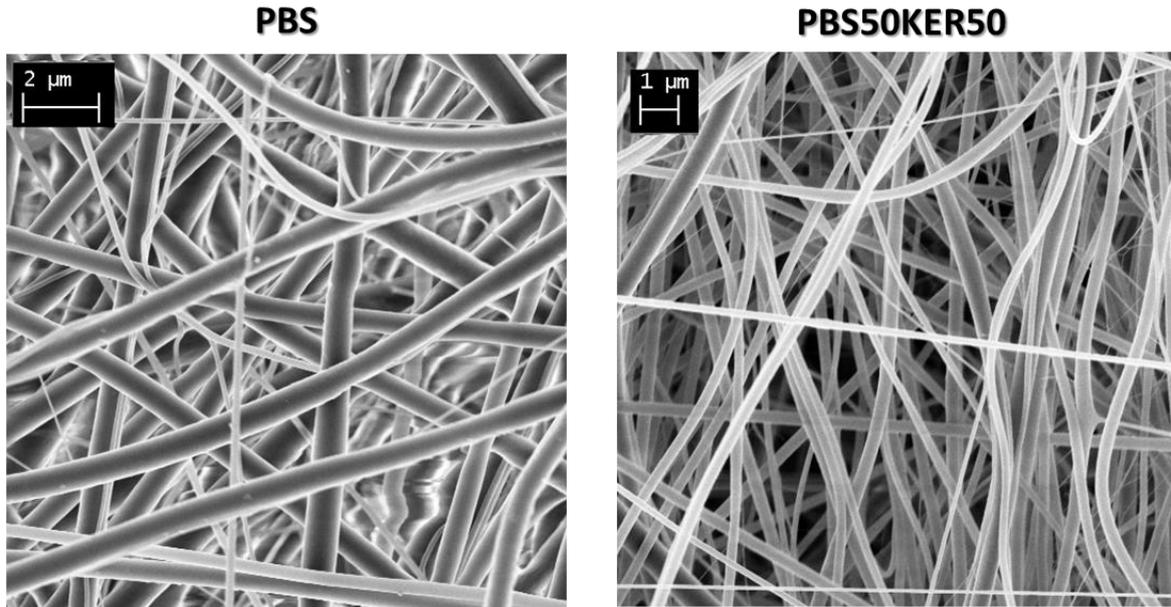


Figura 4.3 Immagine SEM delle fibre di PBS e PBS50KER50.

L'assenza di *beads* e difetti indica che il processo di elettrofilatura è stato ottimizzato; in particolare, lo sviluppo della fase cristallina durante l'evaporazione del solvente permette di evitare la formazione di agglomerati, conferendo alle fibre solidità strutturale. Nel caso del PBS, il tappetino ottenuto risulta un intreccio di fibre di dimensioni diverse, probabilmente dovuto a fenomeni di jet-splitting, che partono dal getto primario e causano getti secondari di dimensioni inferiori. Per quanto riguarda le fibre caratterizzanti la blend di PBS50KER50, presentano diametri di dimensioni minori, rispetto a quelle ottenute dal solo PBS, e una distribuzione delle dimensioni dei diametri più stretta, in accordo con le differenze a livello reologico tra le due soluzioni. La dimensione delle nanofibre è compresa fra i 150 e 900 nm nel caso del PBS e fra 40 e 450 nm nel caso della blend PBS50KER50 (Figura 4.4).

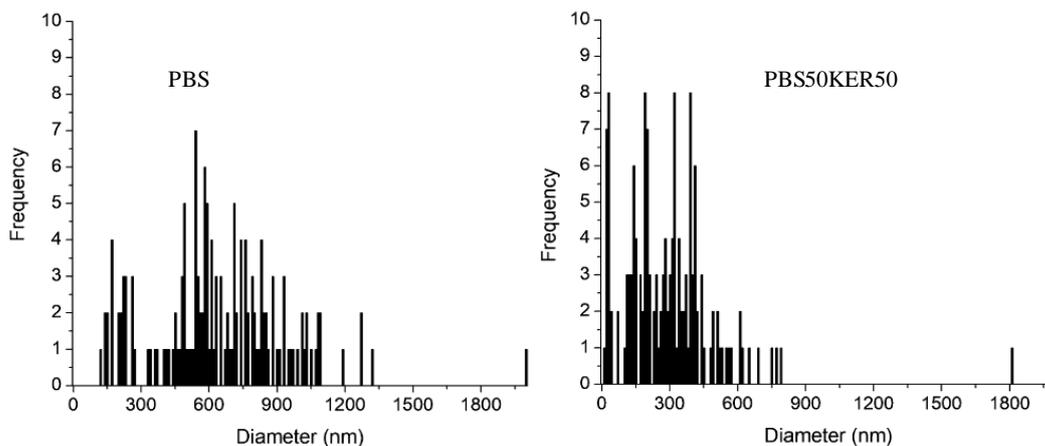


Figura 4.4 Distribuzione delle dimensioni delle fibre di PBS e PBS50KER50.

### 4.3 Caratterizzazione termica

Per quanto riguarda le prove effettuate per la caratterizzazione termica dei tappetini in esame, sono state condotte l'analisi termogravimetrica (TGA) e l'analisi calorimetrica (DSC).

Le curve TGA dei materiali studiati, PBS, cheratina (KER) e PBS50KER50, sono riportate in Figura 4.5, mentre in Tabella 4.1 sono raccolte le temperature di inizio decomposizione ( $T_{id}$ ) e le temperature corrispondenti alla massima velocità di degradazione ( $T_{max}$ ).

Si può notare che il PBS risulta il materiale termicamente più stabile, mentre la cheratina quello meno stabile. In accordo con la sua composizione (50:50), la miscela PBS50KER50 presenta una stabilità intermedia.

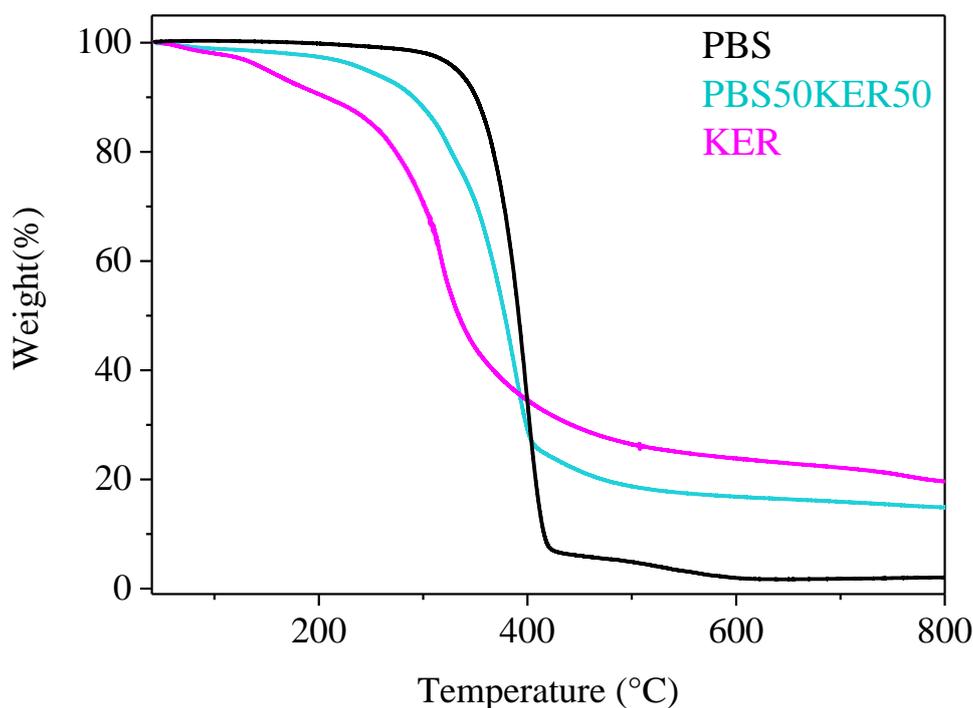


Figura 4.5 Curve TGA in atmosfera di  $N_2$  di PBS, KER e PBS50KER50.

In particolare, analizzando attentamente la curva TGA della cheratina, è possibile riscontrare una perdita di peso in tre step, il primo che parte già a 40 °C, il secondo a 113 °C e l'ultimo a 278 °C (Tabella 4.1); le prime due perdite di peso sono dovute all'acqua legata alla cheratina mediante rispettivamente interazioni fisiche ( $T_{id} \approx 40^\circ\text{C}$ ) e legami a idrogeno ( $T_{id} \approx 113^\circ\text{C}$ ), mentre l'ultimo step è dovuto al processo di degradazione della proteina stessa. Nel caso del PBS e di PBS50KER50, invece, la perdita di peso si verifica in un unico stadio e avviene a temperature più elevate, rispettivamente a 363 °C e a 326 °C (Tabella 4.1); questo aspetto sottolinea come il PBS sia il componente responsabile del miglioramento della stabilità termica della blend.

Un altro importante aspetto ricavabile dalle curve TGA è quello relativo al peso residuo; nel caso del PBS è praticamente nullo mentre per la cheratina si aggira intorno al 20%. Esso è attribuibile a residui carboniosi di urea e sodio dodecil solfato (SDS) utilizzati durante la fase di estrazione. Anche in questo caso, il campione PBS50KER50 presenta un comportamento intermedio, con un peso residuo del 15%.

Per quanto concerne l'analisi calorimetrica, i tracciati DSC dei materiali in esame PBS, KER e PBS50KER50 sono riportati in Figura 4.6, mentre i dati relativi alle scansioni sono raccolti in Tabella 4.1.

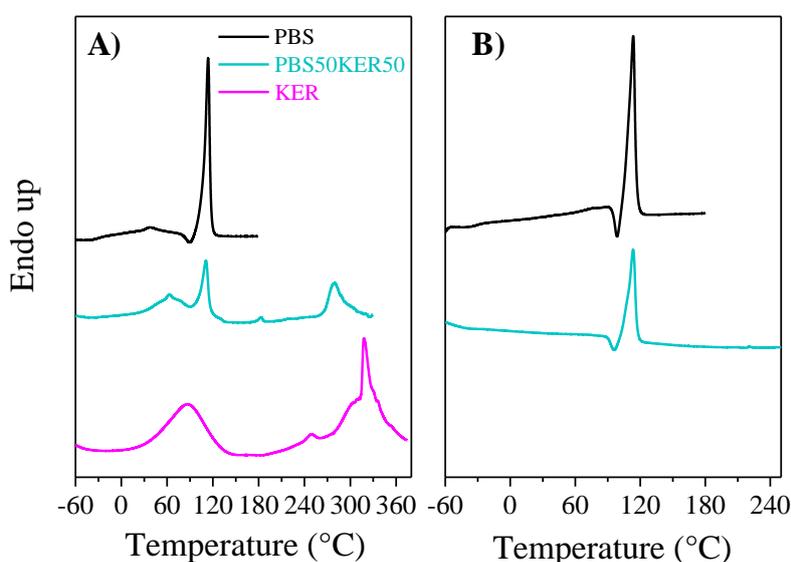


Figura 4.6 Tracciati DSC dei campioni PBS, KER e PBS50KER50: **A)** I scan (20 °C/min); **B)** II scan (20 °C/min) dopo rapido raffreddamento dal fuso.

Come si può notare, il PBS risulta un polimero semicristallino: infatti, la curva calorimetrica relativa alla prima scansione (Figura 4.6 A) è caratterizzata da una leggera variazione endotermica della linea di base, associata alla transizione vetrosa, caratteristica della porzione amorfa del materiale, al di sotto della temperatura ambiente ( $T_g \approx -32^\circ\text{C}$ ), seguita da un picco endotermico a più alta temperatura, relativo alla fusione della porzione cristallina del materiale. Sempre considerando la prima scansione, la curva DSC della cheratina presenta invece tre picchi endotermici di diversa intensità e forma: il primo, molto allargato e centrato intorno a  $87^\circ\text{C}$ , è legato all'evaporazione dell'acqua legata alla proteina, il secondo, di minore intensità e posizionato a  $248^\circ\text{C}$ , è dovuto alla denaturazione delle strutture secondarie (principalmente  $\alpha$ -eliche) mentre il terzo, a più alta temperatura ( $T = 318^\circ\text{C}$ ) è dovuto al

processo di degradazione, in accordo con i dati ottenuti dalle analisi TGA (Tabella 4.1). Infatti, la cheratina, essendo un polimero di origine naturale, non subisce una vera e propria fusione, ma va incontro prima ad una denaturazione, in cui si ha la perdita delle strutture quaternarie e terziarie, la sequenza amminoacidica rimanendo comunque inalterata, poi ad una vera e propria degradazione. Per quanto riguarda, invece, la miscela PBS50KER50, il corrispondente tracciato DSC relativo alla prima scansione mostra sia i fenomeni endotermici caratteristici della cheratina che le transizioni tipiche del PBS ( $T_g$ ,  $T_d$  e  $T_m$ ).

In riferimento al campione PBS50KER50, per quanto riguarda le temperature a cui si manifestano le transizioni della cheratina nella miscela, queste risultano inferiori rispetto a quanto osservato nel campione di sola cheratina; ciò potrebbe essere dovuto ad un minore sviluppo della struttura secondaria a  $\alpha$ -elica, a causa dell'effetto combinato di rapida evaporazione del solvente e di elevata orientazione delle fibre, durante il processo di elettrofilatura. Per quanto riguarda, invece, le transizioni caratteristiche del PBS, il calore associato alla fusione ( $\Delta H_m$ ) risulta circa dimezzato rispetto a quello del PBS (36 J/g vs. 64 J/g), in accordo con le quantità di PBS presente all'interno della blend, mentre i valori di  $T_g$  e  $T_m$  rimangono praticamente invariati.

I campioni di PBS e PBS50KER50 sono stati sottoposti anche ad una seconda scansione, dopo rapido raffreddamento dal fuso (Figura 4.6 B), detto “*quenching*”, per cercare di reprimere la cristallinità del PBS e fare emergere, di conseguenza, la  $T_g$ . Analizzando le curve DSC associate a questa seconda scansione, si evidenzia, in entrambi i casi, un comportamento molto simile a quello verificatosi nella prima scansione: dopo la variazione endotermica della linea di base, associata alla transizione vetrosa, è presente un intenso picco, legato alla fusione della porzione cristallina del PBS. Questo indica che non è stato possibile reprimere la cristallizzazione del materiale attraverso le condizioni sperimentali adottate, a riprova del fatto che il PBS presenta una capacità di cristallizzazione particolarmente elevata.

Tabella 4.1 Dati di caratterizzazione termica (TGA e DSC) dei materiali studiati.

Polimeri	$T_{id}$ °C	$T_{max}$ °C	I scan						II scan			
			$T_g$ °C	$\Delta c_p$ J/g°C	$T_d$ °C	$T_m$ °C	$\Delta H_d$ J/g	$\Delta H_m$ J/g	$T_g$ °C	$\Delta c_p$ J/g°C	$T_m$ °C	$\Delta H_m$ J/g
<b>PBS</b>	363	398	-32	0.193	-	114	-	64	-32	0.251	114	53
<b>PBS50KER50</b>	326	388	-32	0.124	63 183 280	111	36 2 111	36	-32	0.164	109	30
<b>KER</b>	40 113 278	315	-	-	87 248 318	-	134 4 109	-	-	-	-	-

#### 4.4 Caratterizzazione meccanica

Le misure meccaniche *stress-strain* sono state condotte su striscioline di *scaffold* di forma rettangolare e dimensioni 50x5x0.1 mm, attraverso prove a trazione, ovvero allungando a velocità costante il provino e misurando la variazione dello sforzo a trazione in funzione della deformazione.

I campioni sottoposti a questo tipo di prove sono stati solo PBS e PBS50KER50 poiché la cheratina, come già detto, risulta essere troppo rigida e fragile per essere processata ed elettrofilata.

In Figura 4.7 sono rappresentate le curve sforzo-deformazione per i due campioni in esame mentre in Tabella 4.2 sono raccolti i valori di modulo elastico (E), sforzo a rottura ( $\sigma_b$ ) e deformazione a rottura ( $\epsilon_b$ ).

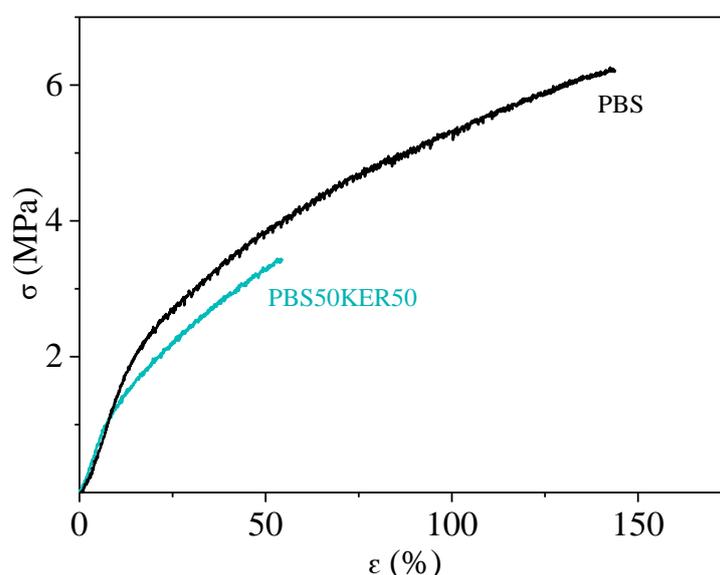


Figura 4.7 Grafico sforzo-deformazione dei campioni PBS e PBS50KER50.

Tabella 4.2 Dati di caratterizzazione meccanica dei campioni PBS e PBS50KER50.

Polimero	E (MPa)	$\sigma_b$ (MPa)	$\epsilon_b$ (%)
PBS	19.8±3.3	6.2±0.7	151±7
PBS50KER50	17.3±1.9	3.6±0.4	54±10

Confrontando i risultati ottenuti (Tabella 4.2 e Figura 4.7), si può notare che i due campioni in esame presentano valori di modulo elastico (E) e tensione a rottura ( $\sigma_b$ ) comparabili; questo aspetto sottolinea il fatto che è stato possibile realizzare un nuovo materiale a base di cheratina avente rigidità molto simile a quella dell'omopolimero PBS e quindi decisamente inferiore a quella della cheratina. L'allungamento a rottura, invece, risulta inferiore nel caso

della blend di PBS e cheratina, circa un terzo di quello relativo allo *scaffold* realizzato in solo PBS; il risultato relativo alla blend può essere dovuto sia alla presenza di due fasi legate fisicamente, e non chimicamente, che tendono a rompersi se sottoposte a sforzo meccanico a trazione, sia alla disposizione *random* delle nanofibre in seguito al processo di elettrofilatura.

#### 4.5 Studi di rilascio

La Figura 4.8 riporta le curve di rilascio cumulativo di Diclofenac nel tempo nel caso dei tappetini realizzati in solo PBS e a partire dalla blend PBS50KER50.

Tali curve sono state ottenute tramite spettrofotometria UV-VIS, attraverso il confronto sia con opportune curve di taratura, sia con i relativi bianchi, come descritto nella parte sperimentale.

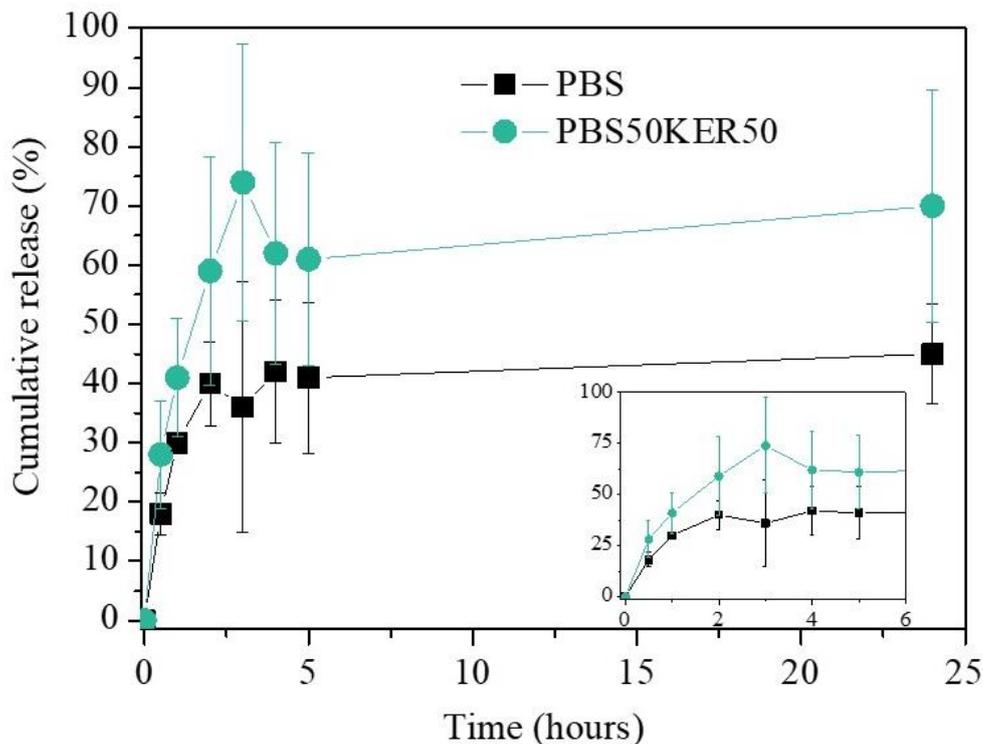


Figura 4.8 Curve di rilascio di diclofenac dai tappetini di PBS e di blend PBS50KER50.

Come si evince dal grafico, la blend contenente cheratina rilascia più velocemente già dopo le prime ore rispetto al PBS. Inoltre, un aspetto di notevole importanza è quello relativo al rilascio dopo 24 h: il PBS, infatti, rilascia solo il 40% del Diclofenac caricato al suo interno, mentre la blend PBS50KER50 rilascia una quantità pari al 70% della quantità totale di principio attivo, a riprova del fatto che la presenza di cheratina migliora l'efficienza di rilascio dei tappetini. Inoltre, mentre nel caso del PBS già dopo 6 ore viene raggiunto il valore di

plateau, nel caso della blend si può osservare un aumento del rilascio cumulativo di circa il 10% dalle 6 h alle 24 h. La ragione di tale trend può essere spiegata sulla base della degradazione della cheratina, la quale in condizioni fisiologiche risulta completamente degradata nel giro di tre giorni; di conseguenza, già dopo poche ore, a causa del processo degradativo si creano canali preferenziali attraverso i quali il farmaco può essere rilasciato più facilmente.

#### 4.6 Osservazioni sull'adesione di campioni di PBS e PBS50KER50

Tenendo presente che l'obiettivo della presente Tesi è quello di realizzare patch per il rilascio di farmaco per via transdermica, sono stati condotti test di adesione dei due tappetini su pelle umida dopo diversi tempi di applicazione (Figura 4.9).



Figura 4.9 Applicazione su pelle umida di campioni di PBS e di PBS50KER50.

Sin da subito, è stato possibile osservare che il tappetino di solo PBS aderisce con più difficoltà rispetto a quello contenente cheratina. La adesione è stata verificata anche dopo un'ora e mezzo dall'applicazione e si è notato che i due patch avevano un comportamento completamente diverso: mentre il cerotto di PBS cominciava a staccarsi perché più secco, quello relativo alla blend PBS50KER50 è rimasto ben adeso ed idratato (Figura 4.10).



Figura 4.10 Verifica dello stato di adesione dopo un'ora e mezzo dall'applicazione.

Dopo 3 h, il cerotto di PBS è risultato praticamente staccato. Al contrario, quello realizzato con la blend PBS50KER50 era ancora ben adeso alla pelle, (Figura 4.11). Tale risultato rappresenta un'ulteriore riprova che il tappetino ottenuto dalla miscela PBS50KER50 sia migliorativo rispetto a quello di solo PBS. Possiamo dunque affermare che la combinazione di questi due materiali risulta vincente per l'applicazione richiesta.



Figura 4.11 Valutazione dell'adesione dopo 3 ore dall'applicazione.

## 5 CONCLUSIONI

Le nuove conoscenze dell'ingegneria biomedica nel campo dei biomateriali hanno permesso lo sviluppo e la realizzazione di dispositivi altamente performanti nel campo della diagnostica precoce di numerose patologie, nel campo del rilascio modificato di farmaci e nell'area dell'*imaging*, come confermato dai dati di mercato relativi a tali dispositivi, in continua e rapida crescita. Infatti, l'analisi di questi dati suggerisce che nei prossimi anni il settore del rilascio controllato di farmaci, insieme a quello relativo all'ingegneria tissutale, potranno considerarsi i principali ambiti di investimento all'interno del mondo delle tecnologie per l'ingegneria biomedica.

Inoltre, l'utilizzo di nanotecnologie, che si basano sulla comprensione e la conoscenza approfondita delle proprietà della materia su scala nanometrica, ha permesso di ottenere rilasci di tipo controllato e modulato direttamente nel sito in cui è necessaria la terapia, evitando così effetti indesiderati di sovradosaggio, tipici dei sistemi a rilascio convenzionale, ed una maggiore efficacia della cura.

In questo ambito hanno assunto, e tutt'ora assumono notevole importanza i biomateriali polimerici, in particolare i poliesteri alifatici, grazie alle loro proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità, facile lavorabilità, compatibilità meccanica con il sito di applicazione e la possibilità di effettuare modifiche e funzionalizzazioni superficiali, permettendo il controllo della farmaco-cinetica.

Tra questi, oltre agli ormai noti acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA), poli( $\epsilon$ -caprolattone) (PCL) ed i loro copolimeri, più recentemente è comparso sulla scena il poli(butilene succinato) PBS, anche lui approvato dalla *Food and Drug Administration* come polimero sintetico biocompatibile.

Nel presente lavoro di Tesi, questo polimero sintetico è stato fisicamente mescolato con un polimero di origine naturale, la cheratina. Quest'ultima risulta caratterizzata da scarse proprietà meccaniche a causa dell'elevata rigidità e fragilità, con conseguente limitata processabilità, ma, in quanto naturale, risulta assolutamente biocompatibile a contatto con il corpo umano.

Dalla suddetta miscela sono stati ottenuti tappetini ibridi nanofibrosi mediante elettrofilatura, allo scopo di ottenere delle *patch* porose per applicazioni nell'ambito del rilascio controllato di farmaco. La combinazione di PBS e cheratina ha permesso di migliorare, da un lato, le proprietà meccaniche della cheratina, rendendola processabile, dall'altro di mantenere la

buona stabilità termica del poli(butilene succinato), caratteristica necessaria per garantire una buona processabilità. In seguito, alla miscela è stato aggiunto un principio attivo, il diclofenac, un comune antinfiammatorio, che è stato incorporato all'interno della struttura fibrosa delle *patch*. Sui tappetini contenenti il principio attivo è stato dunque studiato il rilascio in condizioni fisiologiche.

Dai risultati ottenuti è stato possibile osservare che l'aggiunta di cheratina ha notevolmente migliorato il profilo di rilascio, poiché la quantità di principio attivo rilasciato da queste membrane in rapporto a tappetini composti da solo poli(butilene succinato) risulta maggiore di circa il 30%.

Dunque, la progettazione e realizzazione di dispositivi con nuovi materiali ibridi, composti da polimeri naturali e sintetici, ha permesso di migliorare sia le proprietà termiche e meccaniche del materiale finale sia le quantità di principio attivo rilasciato. Inoltre, sono state condotti test di adesione prettamente empirici, i quali hanno confermato le migliori prestazioni della blend ibrida.

In conclusione, i risultati ottenuti al termine del presente lavoro di ricerca sono oltremodo incoraggianti, e possono rappresentare il punto di partenza per ricerche future, soprattutto per quanto riguarda i possibili profili di rilascio.

## **BIBLIOGRAFIA**

- [1] Patitapabana Parida, Ajit Behera, Subash Chandra Mishra, Classification of Biomaterials used in Medicine, International Journal of Advantages in Applied Sciences, Vol. 1, 2012, 3, 125-129.
- [2] Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons, An Introduction to Materials in Medicine 2nd Edition, Elsevier Academic Press, 2004.
- [3] Riccardo Pietrabassa, Biomateriali per protesi e organi artificiali, Patròn editore, 1° edizione, 1996.
- [4] Venina dos Santos, Rosmary Nichele Brandalise, Michele Savaris, Biomaterials: Characteristics and Properties, Engineering of Biomaterials, 2017, VIII, 5-15.
- [5] Buddy D. Ratner, Steèhanie J. Bryant, Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going, Annu. Rev. Biomed. Eng., 2004, 6, 41-75.
- [6] Fu-Rong Zeng, Yang Liang, Zi-Long Li, Precision Aliphatic Polyesters via Segmer Assembly Polymerization, Molecules, 2018, 23, 452.
- [7] Rong Tong, New Chemistry in Functional Aliphatic Polyesters, Industrial & Engineering Chemistry Research, 2017, 56, 4207-4219.
- [8] Ruairì P. Brannigan, Andrew P. Dove, Synthesis, properties and biomedical applications of hydrolytically degradable materials based on aliphatic polyesters and polycarbonates, Biomaterials Science, 2017, 5, 9-21.
- [9] Astrid J. R. Lasprilla, Guillermo A. R. Martinez, Betânia H. Lunelli, André L. Jardim, Rubens Maciel Filho, Poly-lactic synthesis for application in biomedical devices – A review, Biotechnology Advances, 2012, 30, 312-3128.

- [10] Matteo Gigli, Martina Fabbri, Nadia Lotti, Rita Gamberini, Bianca Rimini, Andrea Munari, Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review, *European Polymer Journal*, 2016, 75, 431-460.
- [11] Martina Fabbri, Giulia Guidotti, Michelina Soccio, Nadia Lotti, Marco Govoni, Emanuele Giordano, Massimo Gazzano, Rita Gamberini, Bianca Rimini, Andrea Munari, Novel biocompatible PBS-based random copolymers containing PEG-like sequences for biomedical applications: From drug delivery to tissue engineering, *Polymer Degradation and Stability*, 2018, 153, 53–62.
- [12] Martina Fabbri, Michelina Soccio, Matteo Gigli, Giulia Guidotti, Rita Gamberini, Massimo Gazzano, Valentina Siracusa, Bianca Rimini, Nadia Lotti, Andrea Munari, Design of fully aliphatic multiblock poly(ester urethane)s displaying thermoplastic elastomeric properties, *Polymer*, 2016, 83, 154–161.
- [13] Claudia Ferroni, Giovanna Sotgiu, Anna Sagnella, Greta Varchi, Andrea Guerrini, Demetra Giuri, Eleonora Polo, Viviana Teresa Orlandi, Emanuela Marras, Marzia Gariboldi, Elena Monti, Annalisa Aluigi, Wool Keratin 3D Scaffolds with Light-Triggered Antimicrobial Activity, *Biomacromolecules*, 2016, 17, 9, 2882-2890.
- [14] Jillian G. Rouse, Mark E. Van Dyke, A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications, *Materials*, 2010, 3, 999–1014.
- [15] Kelsey G. DeFrates, Robert Moore, Julia Borgesi, Guowei Lin, Thomas Mulderig, Vince Beachley, Xiao Hu, Protein-based fiber materials in medicine: a review, *Nanomaterials*, 2018, 8, 457.
- [16] Balaji Srinivasan, Ramadhar Kumar, Kirubanandan Shanmugam, Uma Tiruchirapalli Sivagnam, Neelakanta Pully Reddy, Praveen Kumar Sehgal, Porous Keratin scaffold-promising biomaterial for tissue engineering and drug delivery, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2009, 92, 5-12.

- [17] Yanmei Li, Xuelian Zhi, Jiantao Lin, Xin You, Jiang Yuan, Preparation and characterization of DOX loaded keratin nanoparticles for pH/GSH dual responsive release, *Material Science and Engineering C*, 2017, 73, 189-197.
- [18] Annalisa Aluigi, Marco Ballestri, Andrea Guerrini, Giovanna Sotgiu, Claudia Ferroni, Franco Corticelli, Marzia Bruna Gariboldi, Elena Monti, Greta Varchi, Organic solvent-free preparation of keratin nanoparticles as doxorubicin carriers for antitumor activity, *Material Science and Engineering C*, 2018, 90, 476-484.
- [19] X. Zhi, Y. Wang, P. Li, J. Yuan, J. Shen, Preparation of keratin/chlorhexidine complex nanoparticles for long-term and dual stimuli-responsive release, *RSC Advances*, 2015, 5, 82334.
- [20] Xiang Mi, Helan Xu, Yiqi Yang, Submicron amino acid particles reinforced 100% keratin biomedical films with enhanced wet properties via interfacial strengthening, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019, 177, 33–40.
- [21] Tamara Posati, Demetra Giuri, Morena Nocchetti, Anna Sagnella, Marzia Gariboldi, Claudia Ferroni, Giovanna Sotgiu, Greta Varchi, Roberto Zamboni, Annalisa Aluigi, Keratin-hydroxycalcites hybrid films for drug delivery applications, *European Polymer Journal*, 2018, 105, 177–185.
- [22] Annalisa Aluigi, Claudia Vineis, Alessio Varesano, Giorgio Mazzucchetti, Franco Ferrero, Claudio Tonin, Structure and properties of keratin/PEO blend nanofibers, *European Polymer Journal*, 2008, 44, 2465-2475.
- [23] Francesca Selmin, Francesco Cilurzo, A. Aluigi, Silvia Franzè, Paola Minghetti, Regenerated keratin membrane to match the *in vitro* drug diffusion through human epidermis, *Results in Pharma Sciences* 2, 2012, 2, 72-78.
- [24] Mary Caldorera-Moore, Nicholas A. Peppas, Micro and nanotechnologies for intelligent and responsive biomaterial-based medical systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, 61, 1391-1401.

[25] Sajid Ali, Maryam Shabbir, Nabeel Shahid, The structure of skin and transdermal drug delivery system, *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2015, 8, 103-109.

[26] Othman A. Al Hanbali, Haji Muhammad Shoaib Khan, Muhammad Sarfraz, Mosab Arafat, Shakeel Ijaz, Abdul Hameed, Transdermal patches: Design and current approaches to painless drug delivery, *Acta Pharmaceutica*, 2019, 69, 197-215.

[27] Hyunjae Lee, Changyeong Song, Seungmin, Baik, Dokyoon Kim, Taeghwan Hyeon, Dae-Hyeong Kim, Device-assisted transdermal drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2018, 127, 35-45.

[28] Insol Hwang, Hong Nam Kim, Minho Seong, Sang-Hyeon Lee, Minsu Kang, Hoon Yoi et al., Multifunctional smart skin adhesive patches for Advanced Health Care, 2018, 7, 1800275.

[29] Mitchell R. Ladd, Tanner K. Hill, James J. Yoo, Sang Jin Lee, Electrospun Nanofibers in Tissue Engineering, in: *Nanofibers - Production, Properties and Functional Applications*, 2011, 347-372.