

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Membrane elettrofilate di cheratina e poli(butilene succinato): effetti della composizione della miscela sulle proprietà chimico-fisiche delle membrane e sulla cinetica di rilascio di farmaci

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Edoardo Bondi

RELATORE

Chiar.ma Prof.ssa Nadia Lotti

CORRELATORI

Dott.ssa Annalisa Aluigi

Dott.ssa Giulia Guidotti

Indice

| | | |
|----------|---|-----------|
| I | Introduzione | 1 |
| 1 | Materiali polimerici | 3 |
| 2 | Polimeri sintetici | 7 |
| 2.1 | Poliesteri alifatici | 7 |
| 2.1.1 | Sintesi | 7 |
| 2.1.2 | Peso molecolare | 8 |
| 2.1.3 | Cristallinità | 9 |
| 2.1.4 | Proprietà termo-meccaniche | 10 |
| 2.1.5 | Proprietà reologiche | 12 |
| 2.1.6 | Biodegradabilità | 14 |
| 2.1.7 | Biocompatibilità | 19 |
| 2.1.8 | Poliesteri alifatici ad uso biomedicale | 19 |
| 2.1.8.1 | Acido poliglicolico (PGA) | 19 |
| 2.1.8.2 | Acido polilattico (PLA) | 20 |
| 2.1.8.3 | Acido polilattico-co-poliglicolico (PLGA) | 21 |
| 2.1.8.4 | Poli(ϵ -caprolattone) (PCL) | 22 |
| 2.1.8.5 | Poli(butilene-succinato) (PBS) | 22 |
| 3 | Polimeri naturali | 25 |
| 3.1 | Proteine | 26 |
| 3.1.1 | Cheratina | 29 |
| 3.1.1.1 | Metodi di Estrazione | 32 |
| 3.1.1.2 | Proprietà biologiche | 39 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4 | Miscele polimeriche | 41 |
| 5 | Applicazioni biomedicali | 45 |
| 5.1 | Rilascio controllato di farmaco | 45 |
| 5.1.1 | Meccanismi di rilascio | 46 |
| 5.1.2 | Patch transdermiche | 50 |
| 6 | Elettrofilatura | 55 |
| II | Parte Sperimentale | 61 |
| 7 | Scopo | 63 |
| 8 | Materiali e Metodi | 67 |
| 8.1 | Elettroforesi | 67 |
| 8.2 | Reologia | 70 |
| 8.3 | Elettrofilatura membrane | 71 |
| 8.4 | Morfologia membrane | 72 |
| 8.4.1 | Microscopia elettronica a scansione (SEM) | 72 |
| 8.5 | Caratterizzazione termica | 73 |
| 8.5.1 | Analisi termogravimetrica (TGA) | 73 |
| 8.5.2 | Calorimetria a scansione differenziale (DSC) | 73 |
| 8.6 | Caratterizzazione meccanica | 75 |
| 8.7 | Rilascio controllato di farmaco | 77 |
| 8.8 | Spettroscopia infrarossa (FTIR) | 78 |
| 9 | Risultati e Discussione | 81 |
| 9.1 | Elettroforesi | 81 |
| 9.2 | Reologia | 82 |
| 9.2.1 | Comportamento al flusso | 82 |
| 9.2.2 | Correlazione tra reologia ed elettrofilatura | 84 |
| 9.3 | Morfologia membrane | 85 |
| 9.3.1 | Microscopia elettronica a scansione (SEM) | 85 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 9.4 | Caratterizzazione termica | 87 |
| 9.4.1 | Analisi termogravimetrica (TGA) | 87 |
| 9.4.2 | Calorimetria a scansione differenziale (DSC) | 89 |
| 9.5 | Caratterizzazione meccanica | 91 |
| 9.6 | Rilascio controllato di farmaco | 93 |
| 9.7 | Spettroscopia infrarossa (FTIR) | 95 |
| 10 | Conclusioni | 97 |
| | Bibliografia | 101 |

Parte I

Introduzione

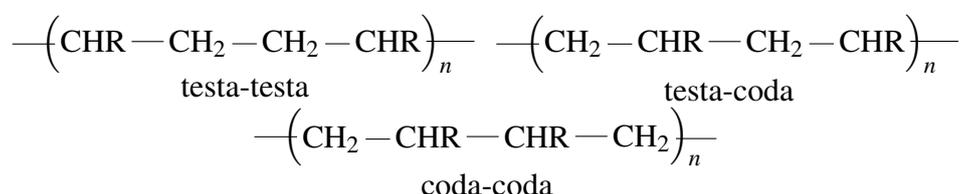
Capitolo 1

Materiali polimerici

Viene definito polimero una molecola ad elevato peso molecolare, costituita da numerosi monomeri, unità di peso molecolare minore, uniti mediante legami covalenti.

Le classificazioni riguardanti i polimeri possono essere molteplici. In base alla loro origine vengono separati in sintetici, intendendo quei polimeri prodotti mediante sintesi dall'uomo, e naturali, intendendo quei polimeri già presenti in natura.

In base alla composizione vengono definiti omopolimeri i polimeri derivanti da un solo monomero. Ad esempio, un generico monomero $\text{CH}_2=\text{CH}_2-\text{R}$ polimerizzato porta alla formazione dell'unità $\text{---}\left(\text{CH}_2-\text{CHR}\right)_n\text{---}$ che può essere collegata ad altre unità in posizione testa-testa, testa-coda o coda-coda:



Le unità strutturali bifunzionali portano alla formazione di polimeri lineari mentre unità polifunzionali possono portare alla formazione di polimeri reticolati.

Un copolimero è invece formato da due o più monomeri, diversi tra loro. Vengono generalmente suddivisi in base al tipo di ripetizione delle unità monomeriche in:

- statistici (A-co-B): le unità monomeriche si ripetono in modo casuale;
- alternati (A-alt-B): alternanza delle unità monomeriche;
- a blocchi (A-b-B): si alternano sequenze di una singola unità monomerica;
- aggraffati (A-g-B): catene secondarie di monomero si innestano lungo la catena principale formata dalla ripetizione di un'unica unità monomerica.

Il termine polimero non deve poi essere confuso con plastica. Vengono infatti definite materie plastiche quei “prodotti costituiti o contenenti, come ingrediente principale, una sostanza organica ad alto peso molecolare (polimero) e che, per quanto solidi allo stato finale, durante alcuni stadi della loro fabbricazione sono abbastanza plastici per poter essere foggiate, sfruttando nella maggior parte dei casi l’effetto della temperatura o della pressione o di ambedue”. [1]

Molte materie plastiche furono preparate ed utilizzate ben prima della scoperta della loro struttura macromolecolare. Già nel 15000 a.C. nelle pitture rupestri di Altamira, in Spagna, furono impiegati come rivestimenti decorativi l’albume o le proteine del sangue.

Nel Medioevo le corna di vacca erano utilizzate per preparare finestre per lanterne e intarsi in legno. La loro lavorazione era complessa e ben presto un sostituto delle corna venne scoperto dal monaco bavarese Wolfrang Seidel (1492-1562), facendo riferimento a ricette molto più antiche. Il corno di imitazione era basato sulla caseina, estratta dal latte scremato con acqua calda, che veniva quindi trattata con liscivia calda e modellata durante il riscaldamento; la forma desiderata veniva impressa mediante immersione in acqua fredda. In seguito, autori a noi sconosciuti scoprirono che aggiungendo cariche inorganiche se ne aumentava la stabilità meccanica. Lo stesso materiale verrà poi utilizzato da Otto Lilienthal (1848-1896) per produrre i mattoni da costruzione per i bambini. Un brevetto sui medesimi procedimenti fisici fu ottenuto da Emery Edwards Childs nel 1885. Il miglioramento apportato da Kricheldorf e Spitteler nel 1897, facendo reagire la formaldeide (CH_2O) con la caseina, portò alla creazione di un termoindurente che fu chiamato galalite (dal greco *gala*, latte e *lithos*, pietra), brevettato nel 1899, che è tuttora utilizzato come materiale per merceria.

Uno dei primi termoindurenti venne realizzato a partire dalla gomma naturale. Charles Goodyear, nel 1839, scoprì la reticolazione (vulcanizzazione) della gomma naturale ottenendo così un elastomero mediante l’utilizzo di zolfo e sotto l’azione di carbonato di piombo basico (PbCO_3) e del calore. Nel 1851 il fratello Nelson, utilizzando una maggiore quantità di zolfo, inventò l’ebanite, termoindurente nero e duro.

Il primo termoindurente completamente sintetico fu inventato nel 1906 dal chimico Leo H. Baekeland, che riscaldò vari fenoli con formaldeide sotto pressione e produsse masse dure insolubili. Nel 1909, queste bacheliti vennero riconosciute come eccellenti isolanti elettrici e divennero fondamentali nella moderna industria elettrica. Anche le resine fenoliche, osservate già da Adolf Von Baeyer nel 1872, diventarono materiali potenzialmente commerciali mediante

l'applicazione di calore e pressione secondo la tecnica utilizzata da Baekeland.

Le prime termoplastiche semi-sintetiche furono ottenute dal cotone, le cui fibre sono costituite da cellulosa. Sono stati molteplici i tentativi di migliorarne le proprietà tessili, a partire dal chimico inglese Mercer (1844), passando per il chimico francese Figuiet (1846), Gaine (1853, pergamena artificiale) e Taylor, che descrisse la formazione di materiali molto resistenti da strati di fogli di carta mediante l'azione combinata di cloruro di zinco e pressione.

Nel 1846 C.F. Schönbein scoprì casualmente che se materiali a base di cellulosa vengono trattati con una miscela di acido solforico e nitrico aveva luogo una reazione che porta alla formazione del nitrato di cellulosa (nitrocellulosa). Nel 1869 Hyatt brevettò, migliorando il metodo di Parkes del 1862 in cui trasformava il nitrato di cellulosa in masse termoplastiche mediante l'aggiunta di olio di ricino, canfora e coloranti, l'impiego della canfora senza olio di canfora o alcool per produrre la celluloida, considerata ancora oggi una termoplastica pionieristica.

Altre materie termoplastiche sintetiche hanno una storia molto più lunga, come ad esempio i polimeri di formaldeide, scoperti da Von Liebig nel 1839, ma che divennero materiali industriali solo nel 1956 dopo ampie indagini di Staudinger, negli anni '20 e '30, e ampi lavori di sviluppo industriale da parte di DuPont e Celanese.

Anche il poli(cloruro di vinile), PVC, venne prodotto commercialmente solo nel 1931 in Germania da I.G. Farben dopo che, nel 1838, Regnauld sintetizzò il cloruro di vinile e che Klatte, in Germania, e Ostromuiskensky, in Inghilterra, lo polimerizzarono nel 1912.

Il polistirene ricalca la medesima storia. Prodotto commercialmente nel 1930 da I.G. Farben, venne prima identificato come tale da Hofmann e Blyth nel 1845, e prima ancora da Simon nel 1839 che, convertendo lo stirene in massa solida, lo considerò come ossido di stirene.

Il polietilene (PE) sintetico leggermente ramificato fu ottenuto nel 1933, mediante polimerizzazione ad alta temperatura dell'etilene, presso l'Imperial Chemical Industries (ICI, Inghilterra), e la sua commercializzazione iniziò nel 1939. I polietileni lineari furono invece sintetizzati la prima volta nel 1953 mediante polimerizzazione a bassa pressione utilizzando catalizzatori a base di metalli di transizione (Ziegler), ossidi di cromo (Philips Petroleum) e ossido di molibdeno (Standard Oil of Indiana).

L'ingegnere chimico italiano Giulio Natta, migliorando i catalizzatori di Ziegler, polimerizzò le α -olefine, come il propene, ottenendo polimeri stereoregolari, cristallini e solidi come il polipropilene (PP). La commercializzazione iniziò nel 1957 in Italia, ad opera di Montecatini col

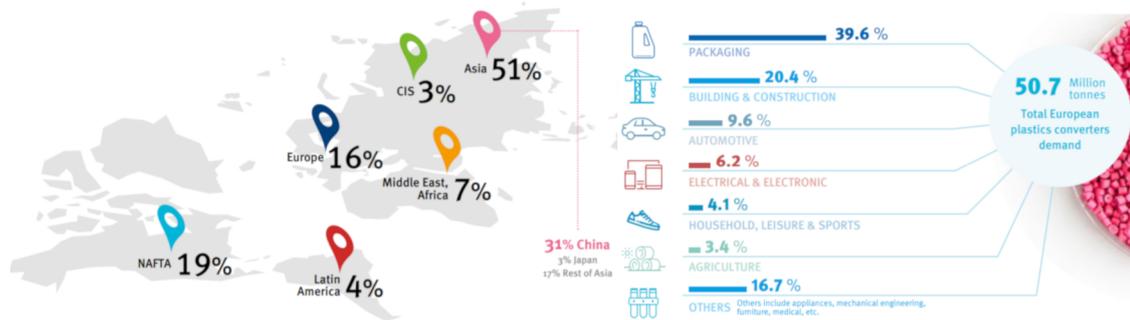


Figura 1.1: Percentuale di produzione di plastica per area geografica (a sinistra) e ripartizione della domanda di plastica a livello europeo (a destra)

nome commerciale di “moplen”, in Germania e USA. [2]

Negli anni '50 e '60 la disponibilità di materie prime a basso costo derivanti dalla raffinazione del petrolio e di catalizzatori come quelli di Ziegler e Natta hanno portato ad un'espansione incredibile dell'industria polimerica arrivando, ai giorni nostri, ad essere presente praticamente in ogni aspetto della vita quotidiana, grazie anche allo sviluppo di processi catalitici per la polimerizzazione eterogenea.

Ad oggi la produzione globale di plastica (Figura 1.1) ha raggiunto i 368 milioni di tonnellate, con l'Europa che si assesta sulle 58 milioni di tonnellate (16%). Quasi il 51% della produzione mondiale è collocata in Asia e ben il 31% in Cina. La domanda di plastica, a livello europeo, riguarda il *packaging* (39,6%), il settore delle costruzioni (20,4%), l'*automotive* (9,6%), l'elettronica (6,2%), l'abbigliamento (4,1%), l'agricoltura (3,4%) e tutti gli altri settori (16,7%) in cui è considerato anche l'impiego in ambito biomedicale. [3]

Capitolo 2

Polimeri sintetici

2.1 Poliesteri alifatici

I poliesteri alifatici sono tra i polimeri biodegradabili più utilizzati in campo biomedicale. Il loro nome deriva dalla presenza di legami esterei lungo la catena macromolecolare. In relazione ai monomeri di partenza, i poliesteri si distinguono in alifatici ed aromatici, a seconda della presenza o meno di anelli aromatici in catena. Grazie alle loro eccellenti biocompatibilità, biodegradabilità e resistenza meccanica, risultano la classe di maggior successo, importanza e diffusione commerciale tra tutti i polimeri biodegradabili. I poliesteri alifatici si sono rivelati ottimi candidati in ambito biomedicale, ad esempio, per la realizzazione di suture biorisorbibili, di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci, protesi e stent vascolari, protesi per legamenti e tendini.

2.1.1 Sintesi

Il metodo tradizionale per sintetizzare i poliesteri è la policondensazione, impiegando dioli e diacidi (o derivati degli acidi) o da idrossiacidi. La policondensazione, che rientra nella categoria della polimerizzazione a stadi, prevede la reazione tra due gruppi funzionali di un monomero, almeno bifunzionale, o di più monomeri (sempre almeno bifunzionali) diversi che porta alla scomparsa del centro attivo e all'eliminazione di una molecola a basso peso molecolare (H_2O , HCl , ecc...). Le continue reazioni portano alla rapida scomparsa del monomero di partenza e alla formazione di oligomeri (prima dimeri, poi trimeri, ecc...) determinando perciò un aumento del peso molecolare all'aumentare della conversione. Questo metodo presenta alcuni inconvenienti: è necessaria un'alta temperatura, i tempi di reazione sono lunghi, vi è la

necessità di allontanare i coprodotti ed è necessaria una precisa stechiometria tra gruppi acidi e idrossilici.

Un altro metodo di sintesi consiste nella polimerizzazione con l'apertura dell'anello (*ring-opening polymerization*) di lattoni, diesteri ciclici e acetali di cheteni ciclici. La reazione sui lattoni è quella maggiormente studiata e viene condotta generalmente in bulk o in soluzione (THF, toluene, ecc...), in presenza di iniziatori (anche se alcune reazioni di polimerizzazione possono essere spontanee o avvenire in presenza di calore) di tipo radicalico, carbocationico, anionico e coordinativo. Le rese ed i pesi molecolari più elevati sono ottenuti principalmente da queste ultime due. Gli iniziatori per la polimerizzazione anionica dei lattoni sono metalli alcalini, alcossidi di metalli alcalini, complessi di naftalenuro di metalli alcalini con eteri corona e metalli alcalini in grafite. La polimerizzazione coordinativa prevede che si propaghi una specie con legame covalente, riducendo in genere la velocità e la reattività della reazione, portando anche ad una minore quantità di reazioni collaterali. Alcuni degli iniziatori utilizzati sono alcossidi e fenossidi di stagno (IV), alcossidi di alluminio e μ -osso-alcossidi bimetallici solubili. [4]

2.1.2 Peso molecolare

Le masse molecolari dei polimeri possono variare notevolmente, anche all'interno dello stesso polimero, in quanto dipendono dai limiti delle procedure di polimerizzazione, dalle restrizioni imposte dai metodi di lavorazione e dalle proprietà desiderate. L'approccio moderno alla polimerizzazione impone l'utilizzo di metodi statistici per valutare l'inizio e la propagazione delle catene polimeriche in crescita, e i processi di terminazione e trasferimento, se avvengono. Ciò comporta che i polimeri presentino una distribuzione delle masse molari e che i valori determinati sperimentalmente risultino delle medie.

Vengono generalmente definite tre tipi di masse molari medie:

$$\text{Numerale } \bar{M}_n = \sum_i x_i M_i = \frac{\sum_i w_i}{\sum_i (w_i/M_i)}$$

$$\text{Ponderale } \bar{M}_w = \sum_i x_i M_i = \frac{\sum_i x_i M_i^2}{\sum_i x_i M_i}$$

$$\text{Media z (z average) } \bar{M}_z = \sum_i Z_i M_i = \frac{\sum_i w_i M_i^2}{\sum_i w_i M_i} = \frac{\sum_i x_i M_i^3}{\sum_i x_i M_i^2}$$

dove x_i è la frazione molare, M_i è la massa molare, w_i la frazione in massa e la frazione z è definita come $Z_i = z_i / \sum_i z_i = w_i M_i / \bar{M}_w$. Per la determinazione della massa molare media

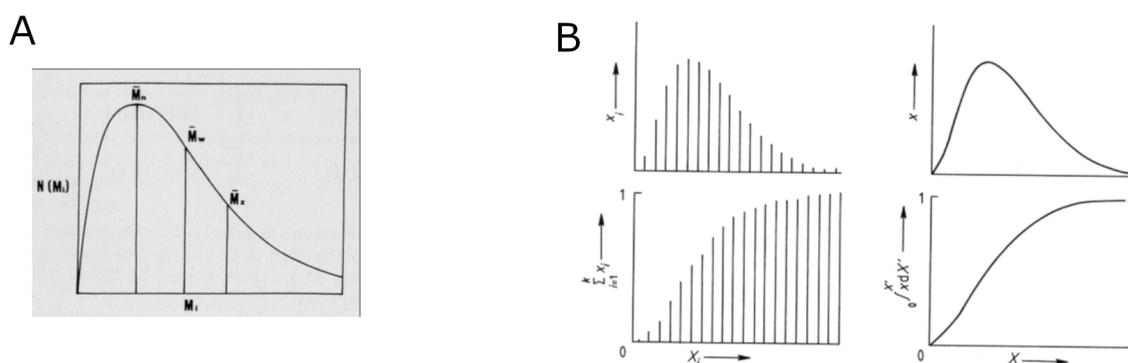


Figura 2.1: A: esempio di distribuzione dei pesi molecolari di un polimero coi valori delle medie;
 B: varie funzioni di distribuzione. A sinistra: discontinue (discrete); a destra: continue; in alto: differenziali; in basso: integrali (cumulative)

numerale si impiegano tecniche quali l'osmometria (principalmente), la crioscopia e l'ebullioscopia; invece \bar{M}_w è determinata principalmente attraverso *light scattering* o mediante metodi viscosimetrici. Una misura della polidispersità, solitamente indicata con D , è data dal rapporto tra \bar{M}_w ed \bar{M}_n ($\frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n} > 1$).

I tipi ed i parametri caratteristici delle distribuzioni di massa molare sono determinati cinematicamente o termodinamicamente in base alle condizioni di sintesi e, in misura minore, dalla lavorazione. Le distribuzioni sono descritte matematicamente da funzioni di distribuzione (Figura 2.1) che possono essere discontinue (discrete) o continue, differenziali o integrali (cumulative). In queste funzioni le molecole polimeriche di dimensione i -esima sono considerate in base ai loro pesi specifici, che possono essere ad esempio frazioni molari o frazioni in massa. Le distribuzioni possono essere determinate mediante frazionamento preparativo di polimeri in soluzione (ogni oligomero presenta infatti una leggera differenza di solubilità) variando la temperatura o aggiungendo un non-solvente. Un metodo molto più veloce è l'impiego della cromatografia a permeazione su gel (GPC). [2]

2.1.3 Cristallinità

I polimeri, allo stato solido, presentano generalmente due tipi di stati: uno amorfo, sempre presente, ed uno cristallino. Nello stato amorfo, in soluzione diluita, la molecola può assumere tutte le conformazioni possibili. I gruppi terminali delle catene polimeriche hanno libertà di

rotazione, determinando, in quanto puntano alla massima entropia, e quindi al massimo disordine, la formazione di un gomitolo statistico che in presenza di tante macromolecole lo porta a concatenarsi con altri, formando quelli che vengono definiti *entanglement*.

Lo stato cristallino viene a formarsi in determinate condizioni: è necessaria una regolarità costituzionale (unica specie costituente, regolarità nella successione degli atomi e dei legami), configurazionale (stereoregolarità) e conformazionale (disposizione nello spazio degli atomi mediante rotazione legami, conseguente alla prime due) e la sua formazione viene favorita da forti interazioni intermolecolari. È possibile che un polimero cristallizzi in diverse forme (polimorfismo) a causa di diverse conformazioni delle catene e di diverso impaccamento della macromolecola.

La cristallizzazione è possibile da soluzione diluita o da fuso. Nel primo caso la concentrazione del polimero deve essere molto bassa, la nucleazione e l'accrescimento dei cristalli sono contemporanei e si ha la formazione di monocristalli di dimensioni eterogenee. I singoli cristalli sono formati da catene polimeriche disposte a lamella, con spessore di centinaia di Å, dove l'asse della macromolecola è perpendicolare all'asse della lamella. Da fuso la cristallizzazione primaria, ed il suo successivo accrescimento, portano alla formazione di sferuliti, formate da un nucleo centrale, da cui si irradiano i cristalli lamellari che si ramificano in aggregati a simmetria sferica, al cui interno sono presenti parti di struttura amorfa. Queste ultime cristallizzano durante la cristallizzazione secondaria. Se sottoposte a stiro, da fuse, le sferuliti si orientano a formare delle fibrille con proprietà meccaniche diverse.

Per le misure del grado di cristallinità si assume che i contributi delle fasi amorphe e cristalline alle proprietà misurate siano additivi. Nessun polimero può essere solamente cristallino, pertanto il grado di cristallinità non sarà mai del 100%. Le misure del grado di cristallinità comprendono misure di densità, misure di diffrazione a raggi X e analisi DSC (calorimetria a scansione differenziale).

2.1.4 Proprietà termo-meccaniche

Osservando il termogramma di un ideale polimero semicristallino (Figura 2.2) si possono valutare diverse temperature caratteristiche. Le più importanti sono la temperatura di transizione vetrosa (T_g), ovvero quella temperatura alla quale un polimero allo stato vetroso (a $T < T_g$)

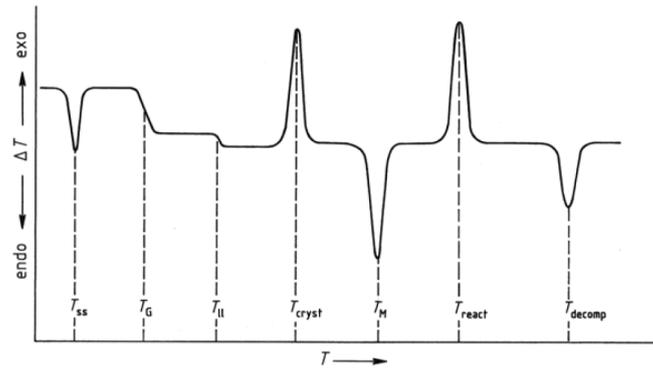


Figura 2.2: Termogramma ideale di un polimero semicristallino in cui sono indicate le temperature di: transizione solida-solida (T_{ss}), transizione vetrosa (T_G), transizione liquido-liquido (T_{ll}), cristallizzazione (T_c), fusione (T_M), massima di reazione (T_r) e di decomposizione (T_d)

passa allo stato amorfo (a $T > T_g$), la temperatura di cristallizzazione (T_c), la temperatura di fusione (T_m) e la temperatura di decomposizione (T_d).

Dal punto di vista meccanico, analizzando i comportamenti dei polimeri a prove a trazione, ovvero quelle prove in cui un provino di dimensioni standard viene sottoposto ad un carico monoassiale, fino alla rottura del provino stesso, si può valutare come la temperatura, il peso molecolare e il grado di cristallinità siano parametri da tenere in particolare considerazione.

Definendo il modulo di Young (E), o modulo elastico, come il rapporto tra lo sforzo (σ) e la deformazione (ϵ) nel tratto iniziale (a pendenza costante) di una curva di prova a trazione, questo diminuisce all'aumentare della temperatura. Si può osservare come a temperature inferiori a T_g il modulo rimanga alto e costante, configurando un comportamento rigido del polimero. Alla temperatura di transizione vetrosa si osserva una diminuzione del modulo elastico in quanto i movimenti della catena polimerica sono maggiormente permessi. Tale possibilità permette al polimero di comportarsi come un materiale duttile, presentando quindi, nella curva sforzo - deformazione, dopo il tratto elastico, un punto di snervamento (che sancisce il passaggio dal campo elastico a quello plastico), un tratto plastico e in seguito un punto di rottura. Altra variazione significativa del modulo si osserva alla temperatura di rammollimento (passaggio da stato amorfo a stato fuso), per i polimeri amorfi, e alla temperatura di fusione per i polimeri semicristallini.

La valutazione della giusta temperatura di esercizio di un polimero è quindi un aspetto molto importante: se serve un materiale dal comportamento rigido, è bene impiegare polimeri che alle

temperature di esercizio siano ben al di sotto della temperatura di transizione vetrosa. Considerazione opposta da effettuare nel caso in cui il materiale debba presentare caratteristiche duttili.

2.1.5 Proprietà reologiche

La viscosità è la misura della capacità di scorrimento di un fluido sotto l'azione di forze di taglio, ed è definita come il rapporto tra lo sforzo tangenziale (σ) e il gradiente di scorrimento, *shear rate*, ($\dot{\gamma}$):

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}}$$

La viscosità ha le dimensioni di una forza per unità di superficie moltiplicata per un tempo, che nel Sistema Internazionale corrisponde a [*Pa s*].

I fluidi vengono classificati generalmente in due categorie: Newtoniani e non Newtoniani. I fluidi Newtoniani hanno la caratteristica di avere una viscosità costante, a temperatura fissata, ovvero che non dipende dalle condizioni di flusso applicate.

I fluidi non Newtoniani presentano invece un legame tra sforzo di taglio e gradiente di scorrimento, che non è più lineare ma che è funzione del gradiente di velocità, secondo la relazione:

$$\sigma = f(\dot{\gamma})$$

Tali fluidi presentano quindi una viscosità variabile con le condizioni di flusso. A loro volta, essi possono essere classificati (Figura 2.3) in pseudo-plastici (*shear thinning*), se lo sforzo è una funzione crescente in modo meno che lineare con il gradiente di velocità e la viscosità diminuisce al crescere della velocità di deformazione, in fluidi dilatanti, se lo sforzo è crescente in modo più che lineare con il gradiente e la viscosità aumenta al crescere della velocità di deformazione oppure in fluidi plastici alla Birghan (o fluidi viscoplastici), in cui il fluido non scorre fino a quando non raggiunge uno sforzo di soglia (o *yield stress*), dopodiché si comporta come un fluido newtoniano.

I liquidi polimerici presentano un comportamento pseudo-plastico, determinato dalla lunghezza della catena polimerica così come da altri fattori quali la temperatura, il peso molecolare e la concentrazione, con un prima regione Newtoniana a bassi gradienti di velocità, seguita da una zona pseudo-plastica e quindi da una seconda regione Newtoniana, non sempre osservabile strumentalmente.

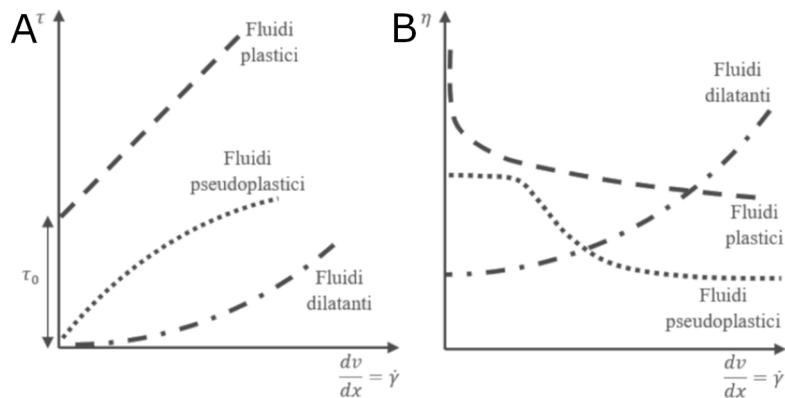


Figura 2.3: A: Andamento dello sforzo di taglio in funzione del gradiente di velocità in fluidi non Newtoniani;

B: Andamento della viscosità in funzione del gradiente di velocità in fluidi non Newtoniani

La viscosità dei polimeri è una funzione decrescente della temperatura, ovvero all'aumentare della temperatura la viscosità diminuisce. In molti polimeri fusi una variazione di meno di un'ordine di grandezza nella temperatura porta ad una variazione di oltre due ordini di grandezza nella viscosità. Anche il punto di transizione tra il regime Newtoniano e quello pseudo-plastico si sposta verso *shear rate* più alte all'aumentare della temperatura, mentre ad alti gradienti di velocità tutte le curve di viscosità confluiscono in una unica indipendente dalla temperatura. [5]

Le viscosità Newtoniane (*zero-shear viscosity*, η_0) del fuso mostrano due diversi regimi di dipendenza dalla massa molare ($\eta_0 = K M^a$): una dipendenza più debole per bassi pesi molecolari ($a \approx 1$) ed una dipendenza più alta ad alti pesi molecolari ($a \approx 3,4$). Al punto di variazione (Figura 2.4) è possibile identificare una massa molare critica (M_c). Si ritiene che il passaggio da un regime all'altro dipenda dall'insorgenza degli *entanglement*, che fanno sì che le macromolecole si comportino come reti fisicamente reticolate. [2, 6]

Le viscosità delle soluzioni polimeriche aumentano sia con la concentrazione sia con la massa molare. La viscosità intrinseca $[\eta]$, dove $[\eta] = K M^a$, misura il volume di molecole polimeriche per unità di massa di polimero. La concentrazione (c) è invece la misura della massa di polimero per unità di volume. Il prodotto $[\eta] \cdot c$ misura quindi la frazione volumetrica di molecole polimeriche che sarebbe occupata da catene polimeriche isolate. Ad alte concentrazioni,

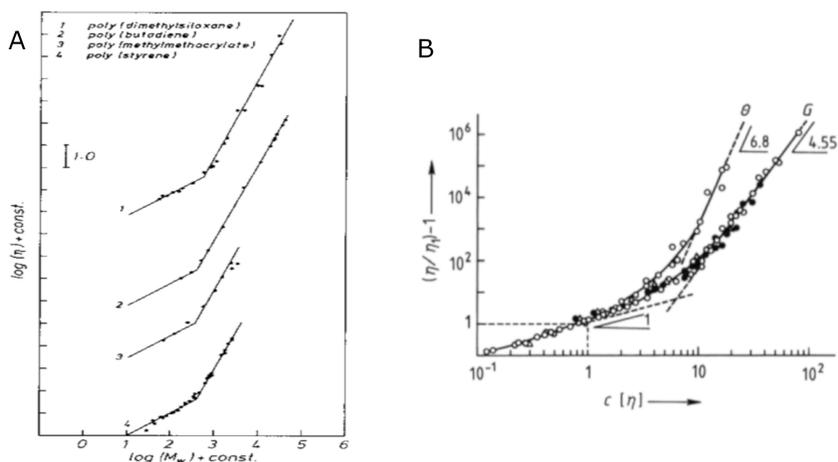


Figura 2.4: A: Variazione della *zero-shear viscosity* al variare del peso molecolare in polimeri fusi;
 B: incremento della viscosità relativa in funzione di $[\eta] \cdot c$ per polistirene (\circ) in trans-decalina (θ) o toluene (G) a 25°C e cis-1,4-poliisoprene (\bullet) in toluene a 34°C

le catene tendono a sovrapporsi ed il volume totale occupato è minore di quello delle singole catene isolate ($[\eta] \cdot c > 1$). A bassi valori di $[\eta] \cdot c$ la viscosità specifica η_i (definita come $\eta_i = (\eta/\eta_0) - 1$, con η corrispondente alla viscosità del polimero a riposo e η_0 la viscosità del solvente) è proporzionale a $[\eta] \cdot c$. Ad alti valori di tale prodotto la viscosità specifica è simile a $[\eta] \cdot c$ elevato a q ($\eta_i \sim ([\eta] \cdot c)^q$) e, siccome $[\eta] \sim M^a$, allora $\eta_i \sim c^q M^{aq}$. A concentrazioni molto alte $\eta_i \approx \eta/\eta_0$ e η si avvicina alla *zero-shear viscosity* per masse molecolari elevate ($\eta_0 \sim M^{3,4}$), $a \cdot q = 3,4$. Questi due parametri possono permettere di identificare dei buoni solventi (con valori di a tendenti a 0,764 e $q = 4,55$) e sono indipendenti dalla natura chimica sia del polimero che del solvente. [2]

2.1.6 Biodegradabilità

Per degradazione polimerica si intendono quelle modificazioni chimiche irreversibili, che si verificano per scissione della catena principale o delle catene laterali delle macromolecole, in grado di provocare modifiche nel comportamento di un materiale polimerico durante il suo utilizzo. In condizioni normali la degradazione è indotta da fotolisi, ossidazioni, radiolisi, attivazioni termiche, idrolisi e da attività biologica. [7]

Tutto ciò che è degradabile non necessariamente è anche biodegradabile in quanto, secondo la

IUPAC, un polimero per essere definito biodegradabile deve risultare suscettibile a degradazione per attività biologica, che si manifesta con una diminuzione della sua massa molare.[8]

I due principali processi degradativi che avvengono nei poliesteri alifatici per uso biomedicale sono l'idrolisi e la degradazione enzimatica (Figura 2.5). Talvolta, è possibile avere una combinazione di questi due processi, oppure può avere luogo anche una degradazione di tipo meccanico.

La degradazione idrolitica può essere definita come la scissione di legami sensibili di un polimero attraverso l'azione dell'acqua, con la formazione di due o più prodotti con peso molecolare inferiore rispetto a quello del materiale iniziale. Tale legame, nei poliesteri, è proprio il legame estereo. La presenza di strutture coniugate stabili, che delocalizzano la carica positiva nel gruppo carbonile, e l'inaccessibilità del legame dovuta ad effetti sterici e alla presenza di fase cristallina, densamente impaccata, sono tutti fattori che rallentano la degradazione. Essa avviene generalmente tramite scissione casuale, ovvero tutti i legami chimicamente identici mostrano la stessa reattività indipendentemente dalla loro posizione sulla catena; in seguito a ciò le catene di poliestere comprendenti terminali carbossilici e alcolici vengono tagliate in due parti, aumentando il numero relativo di terminali carbossilici e diminuendo il pH del mezzo. La degradazione idrolitica può essere classificata in bulk o superficiale in base al tempo necessario per l'idrolisi delle macromolecole più corte e in base al tempo di diffusione dell'acqua nel materiale durante l'idrolisi. Se la diffusione è più veloce dell'idrolisi avviene una degradazione in bulk. All'inizio di questo processo il peso molecolare diminuisce e, a causa della maggiore mobilità dei segmenti più corti, può aumentare il grado di cristallinità. Una volta che le catene sono abbastanza corte da essere solubilizzate esse vengono "espulse" nel mezzo circostante ed inizia una nuova fase contraddistinta da una perdita di peso. I sottoprodotti di degradazione degli acidi carbossilici e degli idrossili che si accumulano all'interno del materiale, fino ad "espulsione", portano a effetti di degradazione autocatalitica, che a sua volta accelera la cinetica di degradazione complessiva. L'accumulo di questi sottoprodotti in dispositivi medici causa effetti collaterali come, ad esempio, l'infiammazione dei tessuti circostanti. Al contrario, se l'idrolisi è più veloce della diffusione, avviene una degradazione superficiale, in cui il materiale perde peso linearmente con la scissione della catena polimerica. L'idrolisi avviene vicino alla superficie ed il bulk non viene coinvolto.

In seguito alla scissione della catena la mobilità delle macromolecole aumenta portando ad un

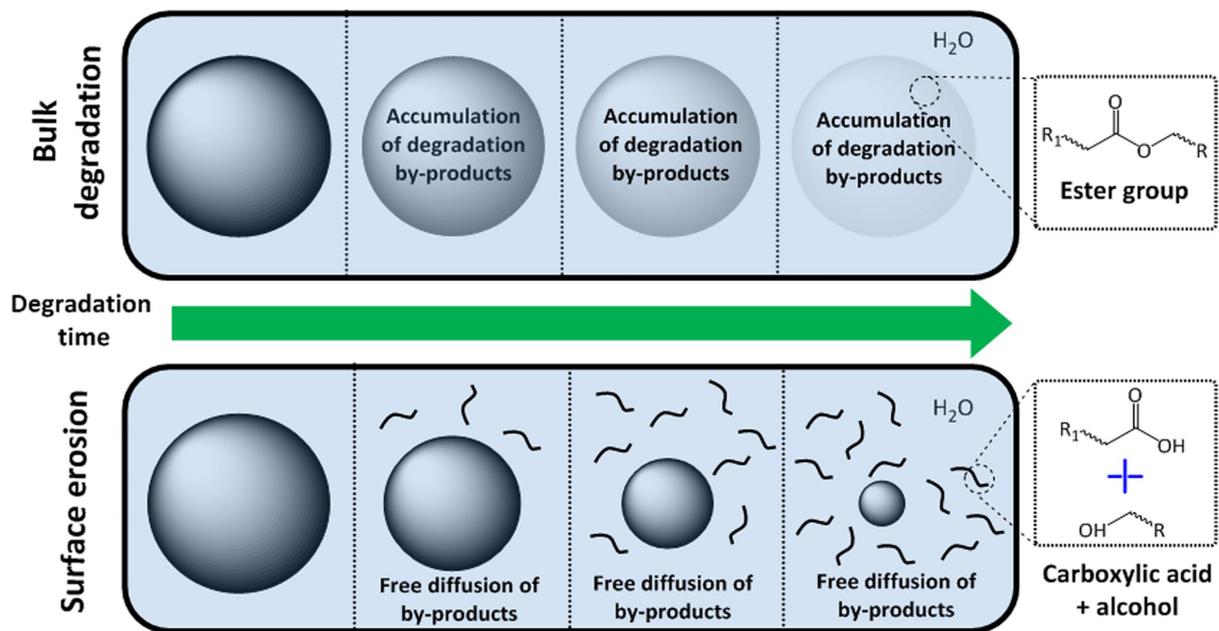


Figura 2.5: Schema semplificato dei principali processi degradativi che avvengono nei poliesteri alifatici.

incremento continuo e notevole del grado di cristallinità e delle dimensioni apparenti dei cristalli. La crescita dei cristalli procede molto più velocemente del processo di idrolisi determinando negli ultimi stadi di degradazione un suo rallentamento e producendo reazione indesiderate da corpo estraneo.

Molti fattori contribuiscono al controllo della cinetica di idrolisi. La composizione monomerica è l'aspetto più determinante poiché alcune unità mostrano una maggiore suscettibilità a subire reazioni di scissione rispetto ad altre. L'aggiunta di gruppi aromatici può portare ad un rallentamento dell'idrolisi, così come la presenza di monomeri otticamente puri (a parità di peso molecolare). L'aumento del peso molecolare porta ad una riduzione della velocità di idrolisi, a causa della ridotta mobilità molecolare imposta dalle lunghe catene, mentre la presenza di monomeri residui accelera la perdita di massa. La presenza di bassa cristallinità, quindi di ampie zone amorfe meno compatte e meno organizzate, porta ad una maggiore velocità di idrolisi, così come la presenza di zone idrofiliche (rapporto C/O basso). Anche la temperatura di fusione ha notevole rilevanza: più vicina sarà alla temperatura in cui il materiale viene incubato, maggiore sarà anche la velocità di degradazione. La geometria del materiale influisce notevolmente sulla degradazione dei poliesteri, in quanto l'area superficiale influenza l'interazione dell'acqua col polimero. Durante l'idrolisi superficiale, un rapporto superficie/volume elevato, come nel caso

delle microparticelle, aumenta la cinetica di reazione poiché sono disponibili numerose catene polimeriche da sottoporre a reazioni di scissione della catena. Al contrario, quando si verifica l'idrolisi a livello del bulk, più velocemente procederà la reazione tanto più risulterà denso il campione, in quanto i sottoprodotti della degradazione auto-catalizzano l'idrolisi abbassando il pH. Infatti, i materiali porosi sono più resistenti alla degradazione in quanto riescono ad allontanare gli oligomeri solubili, acidi, nel mezzo esterno, rallentando pertanto l'idrolisi. La temperatura aumenta la mobilità della catena, aumentando di conseguenza la suscettibilità dei legami esterei a subire reazioni di scissione della catena così come ambienti basici permettono una degradazione più veloce.

La degradazione enzimatica, mediata da acqua, enzimi e microrganismi, si verifica quando un enzima catalizza le reazioni di scissione della catena per formare due o più composti. Per innescare tale processo gli enzimi devono procedere ad un cambiamento conformazionale finché l'enzima e il substrato non possiedono una forma esattamente complementare, che ne permette un incastro perfetto (modello chiave-serratura). A causa delle loro elevate dimensioni gli enzimi agiscono esclusivamente sulla superficie del polimero, determinando un processo di erosione superficiale. La degradazione avviene in più fasi: per prima cosa i microrganismi devono aderire alla superficie del polimero ed espellere gli enzimi extracellulari responsabili della depolimerizzazione delle catene. La frammentazione del polimero in specie a più basso peso molecolare avviene sulla superficie a seguito dell'attacco enzimatico, che può venire classificato in endo o eso-idrolisi se avviene sui legami interni o esterni del polimero, e procede mediante reazioni biotiche (degradazione da parte di microrganismi) o abiotiche (idrolisi). Le catene più corte, di nuova costituzione, si solubilizzano (se il loro peso molecolare lo consente) e diffondono lontano dal substrato polimerico per alimentare le diverse vie metaboliche all'interno del microrganismo. La bioassimilazione e mineralizzazione delle catene più corte da parte dei microrganismi può avvenire in presenza (aerobiosi) o in assenza di ossigeno (anaerobiosi) e i prodotti finali risultanti sono anidride carbonica (CO_2), acqua, azoto (N_2) e nuova biomassa (oltre al metano, CH_4 , se la degradazione avviene in condizioni anaerobiche). Nel complesso i microrganismi utilizzano le superfici polimeriche come fonte di carbonio per estrarre energia, con produzione di acqua e CO_2 : quest'ultima, in funzione dell'input di carbonio totale, viene tipicamente utilizzata per monitorare il processo biodegradativo.

Anche per la degradazione enzimatica le proprietà chimico-fisiche del polimero, la morfologia

della superficie, oltre ai parametri abiotici come pH, temperatura, umidità, salinità e rapporto dei nutrienti, sono fattori da prendere in considerazione. Una maggiore flessibilità della catena polimerica si traduce in tassi di degradazione più alti, mentre avviene il contrario nel caso di poliesteri con catene laterali e pesi molecolari più elevati. Le lipasi, un importante gruppo di esterasi utili per la degradazione enzimatica, possono depolimerizzare solo poliesteri alifatici, mentre quelli aromatici vengono degradati molto più difficilmente. La presenza di frazioni aromatiche limitano pertanto l'accessibilità degli enzimi al legame estereo, se queste si trovano vicine, e quindi maggiore sarà la loro presenza più lenta risulterà la degradazione. I poliesteri che presentano un carbonio otticamente attivo sono resistenti alle lipasi. Le fasi amorfe dei polimeri semicristallini risultano più suscettibili all'attacco enzimatico rispetto alle zone cristalline; le sferuliti di grandi dimensioni, inoltre, diminuiscono la suscettibilità del polimero a subire degradazioni enzimatiche. Visto che la degradazione avviene in superficie risulta evidente come strutture microparticellari risultino più velocemente degradabili di superfici più ampie; inoltre, l'equilibrio idrofilico/idrofobico dei poliesteri risulta un fattore chiave per la riuscita del legame enzimatico poiché le superfici idrofobiche non consentono un contatto intimo tra il polimero e i siti attivi degli enzimi. Allo stesso tempo, però, gli intermedi idrosolubili non subiscono ulteriori reazioni di scissione della catena, pertanto, la degradazione enzimatica procede più velocemente con un rapporto idrofilicità/idrofobicità equilibrato. Anche in questo caso la velocità di degradazione dipende dalla differenza tra la temperatura di fusione del polimero e la temperatura del mezzo in cui avviene la degradazione, indipendentemente dalla microstruttura del materiale, in quanto più il polimero si avvicina alla sua T_m più i domini cristallini iniziano a sfaldarsi, rendendo più facile la degradazione da parte degli enzimi. Il pH modifica la conformazione enzimatica, modificando i siti attivi, ed altera la velocità di biodegradazione complessiva: la protonazione di catene ionizzabili a bassi valori di pH produce forze di repulsione carica-carica che a loro volta fermano lo sviluppo proteico, sopprimendo la struttura e la funzione dell'enzima.

Nel complesso, quindi, temperature più elevate, una maggiore idrofilicità, un basso grado di cristallinità e l'abbondanza di microrganismi si rivelano fattori efficaci per aumentare la velocità di biodegradazione dei poliesteri. [7]

2.1.7 Biocompatibilità

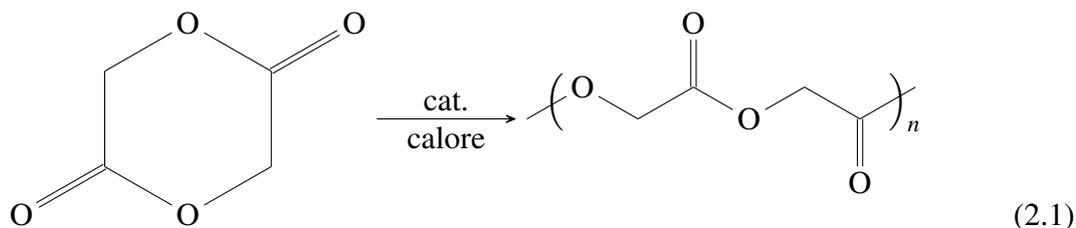
Per biocompatibilità si intende quella capacità del materiale di produrre un'appropriata risposta nell'organismo ospite in una specifica situazione. Come definizione è molto generale e si basa su tre concetti: il materiale deve "fare" qualcosa e non semplicemente esistere, la risposta deve essere appropriata ma, al contempo, la natura della risposta può variare da una situazione all'altra. Una definizione più appropriata e più esplicativa è stata fornita da David F. Williams: "la biocompatibilità si riferisce alla capacità di un biomateriale di svolgere la funzione desiderata rispetto a una terapia medica, senza suscitare alcun effetto locale o sistemico indesiderabile nel ricevente o beneficiario di quella terapia, ma generando la risposta cellulare o tissutale più appropriata in quella specifica situazione e ottimizzando le prestazioni clinicamente rilevanti di tale terapia".

Sono molti i fattori che contribuiscono a determinare la biocompatibilità di un materiale: oltre alle caratteristiche compositive (compreso il contenuto di acqua e il bilanciamento del rapporto idrofobicità/idrofilicità), morfologiche e di superficie (comprese la cristallinità e la porosità) e l'eventuale biodegradabilità, di grande rilevanza sono anche la qualità e la natura dell'intervento clinico che pone il materiale in contatto coi tessuti, così come, soprattutto per i dispositivi impiantabili, le caratteristiche dell'individuo in cui, o su cui, è posizionato il dispositivo quali età, sesso, salute generale e malattie concomitanti, mobilità fisica, stile di vita e stato farmacologico. [9]

2.1.8 Poliesteri alifatici ad uso biomedicale

2.1.8.1 Acido poliglicolico (PGA)

Scoperto nel 1893 da Bischoff e Walden, viene comunemente sintetizzato (Reazione 2.1) per polimerizzazione con apertura dell'anello del glicolide, un diestere ciclico.



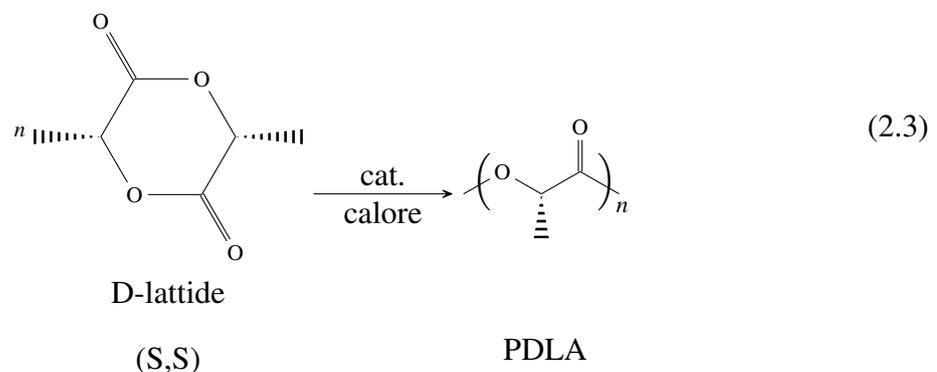
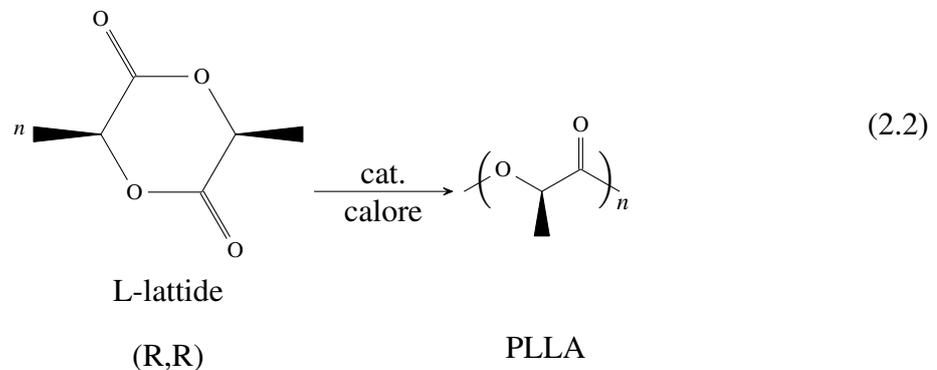
Materiale semicristallino, con T_g di 35 - 40 °C e T_m di 220 - 225 °C, presenta un modulo elastico (E) di 7 - 8,4 GPa, con uno sforzo a rottura (σ_M) di 890 MPa e un'elongazione a rottura (ϵ_M) del

30%. La temperatura di degradazione molto vicina a quella di fusione ne rende difficoltosa la lavorazione. La degradazione con meccanismo idrolitico o enzimatico porta alla formazione di acido glicolico ($pK_a=3,83$) e avviene completamente, *in vivo*, in un tempo compreso tra i due mesi e un anno. [7, 10, 11]

Viene impiegato principalmente come materiale per le suture o come copolimero con il PLA.

2.1.8.2 Acido polilattico (PLA)

Scoperto negli anni '30 da Carothers, il primo a pensare di impiegare l'acido polilattico in impianti chirurgici degradabili fu lo scienziato indiano Kulkarni nel 1966. Come nel caso dell'acido poliglicolico, anche il PLA viene sintetizzato (Reazioni 2.2 e 2.3) per polimerizzazione con apertura dell'anello a partire dal lattide, il diestere ciclico dell'acido lattico.



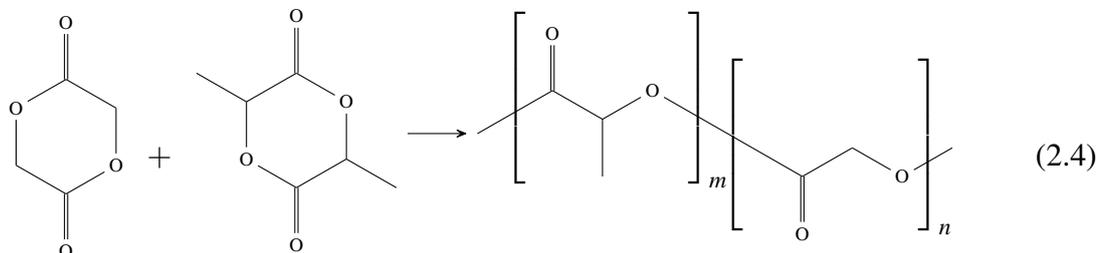
L'acido lattico è un composto asimmetrico con un centro chirale; l'enantiomero L è quello ricavabile biologicamente, tramite fermentazione, mentre procedendo alla sintesi è possibile ottenere una miscela di enantiomeri L e D. È possibile pertanto trovare tre diverse forme stereo-chimiche di polilattidi: il poli(acido-L-lattico), PLLA, e il poli(acido-D-lattico), PDLA, semi-cristallini, e l'atattico, amorfo, poli(acido-DL-lattico), PDLLA. Per ottenere un PLA cristallino e con proprietà meccaniche adeguate è necessario utilizzare come monomero di partenza un acido lattico otticamente puro.

Il materiale semicristallino presenta una T_g di 55 - 65 °C e T_m di 170 - 200 °C, un modulo elastico di 3,5 GPa, un σ_M di 55 - 60 MPa ed ϵ_M di 30 - 240%. La degradazione, *in vivo*, porta alla formazione di acido lattico ($pK_a=3,85$) e avviene completamente in tempi maggiori all'anno, per il prodotto semicristallino, mentre il PLA risulta essere più facilmente degradabile se costituito da rapporti variabili di monomeri L e D.

L'acido polilattico viene impiegato come fissante delle fratture, per la realizzazione di viti, ancoraggi per sutura, e riparazione di tendini e legamenti, in chirurgia ricostruttiva, come innesto vascolare, per la realizzazione di barriere di adesione, per la riparazione della cartilagine articolare, come sostituto dell'innesto osseo, di alcuni tessuti duri e della pelle e come *scaffolds* per l'ingegneria tissutale. Esistono diversi prodotti commerciali come la rete chirurgica Proceed™ (Ethicon Inc.) e la barriera bioassorbibile Artisorb™ (Atrix laboratories, USA). [7, 10, 11]

2.1.8.3 Acido polilattico-co-poliglicolico (PLGA)

I polimeri di acido polilattico-co-poliglicolico sono costituiti da una sequenza casuale di dimeri di lattato e glicolato e vengono sintetizzati (Reazione 2.4) generalmente per polimerizzazione del glicolide e del lattide.



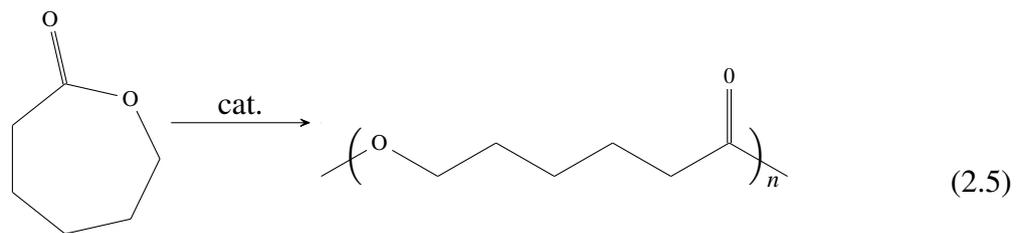
Impiegando diverse quantità dei due monomeri di partenza è possibile modulare le proprietà fisico-meccaniche del PLGA; tuttavia, rimane un copolimero piuttosto rigido e fragile, inadatto per applicazioni in cui è necessario un materiale flessibile. Risulta amorfo per composizioni che vanno dal 25 al 70% (in moli) di glicolide. Il PLGA al 50:50 presenta un modulo elastico di circa 2 GPa, un σ_M di 63 MPa e un ϵ_M del 3 - 10%. La degradazione, *in vivo*, avviene solitamente in 50-100 giorni e può essere anch'essa modulata in base al rapporto tra i monomeri e porta alla formazione di acido lattico e di acido glicolico: ad esempio, con un rapporto LA/GA 75/25% degradano completamente in 100 giorni.

Il PLGA viene impiegato, in composizione 85:15 (LA:GA), per la realizzazione di viti, piastre, ancoraggi di sutura e stent; in composizione 50:50 per suture, somministrazione di farmaci e per

riparazione della cartilagine articolare; in composizione 90:10 come pelle artificiale, per guarigione di ferite, riparazione delle ernie, sutura e per l'ingegneria tissutale in ambito vascolare. I prodotti commerciali sono molteplici come, ad esempio, le piastre Rapidsorb® (DePuy Synthes CMF, USA) e gli stent Xinsorb BRS™ (Huaan Biotechnology Group, Cina). [7, 10, 11]

2.1.8.4 Poli(ϵ -caprolattone) (PCL)

Il poli(ϵ -caprolattone) viene sintetizzato (Reazione 2.5) per polimerizzazione con apertura dell'anello a partire dall' ϵ -caprolattone.



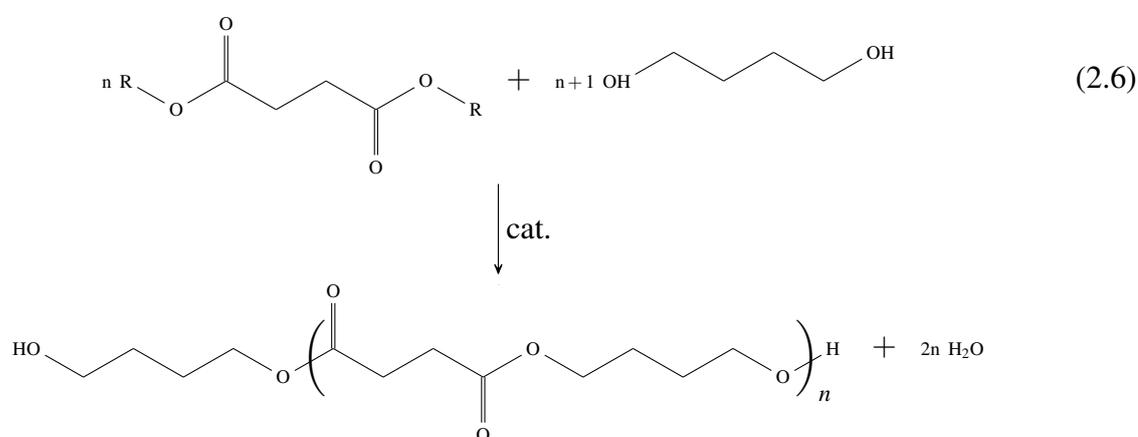
Materiale semicristallino, con una T_g di $-60\text{ }^\circ\text{C}$ ed una T_m di $60\text{ }^\circ\text{C}$, si presenta, a temperatura ambiente, in uno stato gommoso. Presenta un modulo elastico di $0,34 - 0,7\text{ GPa}$, un σ_M di $4 - 28\text{ MPa}$ ed ϵ_M di $300 - 1000\%$. La degradazione, *in vivo*, avviene per idrolisi e risulta molto lenta: si registrano perdite di peso dell'1% in 6 mesi e del 50% in 4 anni.

Il PCL viene impiegato per la realizzazione di suture, impianti ortopedici dentali, per l'ingegneria tissutale in ambito cardiovascolare (valvole cardiache ibride), reti chirurgiche, innesti vascolari, barriere di adesione, protesi auricolari, cerotti cardiaci, stent. A livello commerciale è presente, ad esempio, come patch per la riparazione dei tessuti (Ethicon Inc.), come agente di carica e riempimento (Angelo, 1996) e come DermaGraft™ (Organogenesis Inc. USA). [7, 10, 11]

2.1.8.5 Poli(butilene-succinato) (PBS)

Il poli(butadiene-succinato), o PBS, viene sintetizzato (Reazione 2.6) per policondensazione dell'acido succinico, o del suo estere dimetilico, e del 1,4-butandiolo, mediante policondensazione in massa a due stadi. Durante la prima fase, condotta a pressione atmosferica e in atmosfera inerte, hanno luogo le reazioni di esterificazione (o transesterificazione nel caso si utilizzi l'estere) con formazione di oligomeri a basso peso molecolare e rimozione di acqua (o metanolo), mentre la seconda, condotta a temperature più elevate e in condizioni di pressione ridotta, ha lo scopo di rimuovere il butandiolo 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 catalizzatori, solitamente a base di titanio, come ad esempio il titanio (IV) butossido (TBT), oppure a base di organometalli o di ossidi di metalli. La possibilità di sintesi mediante catalisi enzimatica, in particolar modo con una lipasi della *Candida antarctica* per polimerizzazione diretta o tramite l'apertura dell'anello (previa precondensazione dei monomeri), di dimetilsuccinato e 1,4-butandiolo, può portare ad una via sintetica più "green", pur in presenza di problematiche quali la lisciviazione e la disattivazione degli enzimi e la necessità di impiego di solventi per evitare la precipitazione del polimero.



Il PBS è un polimero semicristallino (grado di cristallinità tra il 35 e il 45%), con T_g di -37 - -30 °C e una T_m di 111 - 115 °C, dal comportamento meccanico fragile e rigido: presenta un modulo elastico di 0,3 - 0,7 GPa, un σ_M di circa 17,5 MPa e un ϵ_M del 6%. L'impiego di piccole quantità di diisocianati, generalmente esametilene diisocianato, utilizzati come estensori di catena ne migliorano l'allungamento a rottura fino a valori paragonabili a quelli delle poliolefine (400%). La degradazione può avvenire per via enzimatica o idrolitica e, *in vitro*, porta alla perdita di peso del 5 - 10 wt% in 100 giorni per via idrolitica, del 4 - 5% in 30 giorni per via enzimatica. Sono state svolte numerose prove di biocompatibilità, sia *in vivo* che *in vitro*, che hanno dimostrato come il PBS risulti biocompatibile, e non inneschi risposte infiammatorie e/o immunitarie nell'organismo ospite. In particolare, le prove *in vitro* sono state eseguite su cellule animali ed umane quali cellule staminali, fibroblasti (cellule che sintetizzano matrice extracellulare e collagene), osteoblasti (cellule responsabili nella sintesi dell'osso) e condrociti (cellule presenti nella cartilagine sana). Gli esperimenti *in vivo* sono stati condotti mediante impianti sottocutanei nei ratti, fino a 36 settimane, nei topi calvaria, per 8 settimane, nel difetto cranico e nella regione

sottomuscolare iliaca dei ratti Wistar, per 12 settimane, e nell'osso femorale di conigli per 4 e 8 settimane.

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. 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*. Come co-unità, ad esempio, sono stati utilizzati PLA, poli(L-lisina), poli(3-idrossibutirrato-co-valerato) (PHBV) e PCL, oppure polimeri aromatici come il poli(butilene tereftalato). [11, 12]

Già prodotto a livello industriale per applicazioni diverse da quella biomedicale (come materiale per imballaggi o nel settore dell'agricoltura), è stato ampiamente studiato in ambito di ingegneria tissutale e rilascio controllato di farmaci, come stent, come involucro di sterilizzazione e per *imaging* diagnostico o terapeutico. Le applicazioni più studiate per i copolimeri e per le miscele di PBS in ambito biomedico sono: il rilascio controllato di farmaco, la realizzazione di micro e nanosfere e di film e *scaffold* per estrusione o elettrofilatura. A livello commerciale sono presenti i prodotti medicali monouso Bionolle® 1000 e 3000 (Showa Highpolymer Co. Ltd.). [11, 12, 13, 14]

Capitolo 3

Polimeri naturali

La natura ha sviluppato, con relativamente poche sostanze di base, una varietà di materiali con proprietà e attività biologiche sorprendenti. I polimeri naturali (in Tabella 3.1 è presente una breve panoramica) possono essere definiti come macromolecole biologiche prodotte da organismi viventi e vengono classificati in:

- polipeptidi e proteine: macromolecole composte da amminoacidi;
- polisaccaridi: strutture di sequenze, lineari o ramificate, di carboidrati;
- polinucleotidi: macromolecole composte da 13 o più unità strutturali nucleotidiche.

Le fonti dei polimeri naturali possono essere microorganismi (batteri, funghi, muffe, etc...), piante o tessuti animali provenienti da organismi viventi (aerei, terrestri o marini).

Un biomateriale ideale da utilizzare in campo medico deve essere biocompatibile, biodegradabile e non tossico o immunogenico (abilità di provocare una risposta immunitaria nel corpo di un essere umano o di un animale) e sarebbe conveniente che tale materiale sia estraibile o processabile a costi contenuti e in forme diverse, presentando magari la possibilità di essere funzionalizzato biochimicamente. Fortunatamente molti biopolimeri di origine naturale pre-

Tabella 3.1: Principali biopolimeri di origine naturale

| Polimero | |
|-----------------------|--|
| Polisaccaridi | Cellulosa, Destrano, Chitina, Glicosaminoglicani, Amido, Alginato, Carragenina |
| Proteine | Cheratina, Collagene, Elastina, Seta, Soia, Zeina, Glutine |
| Polinucleotidi | Acido desossiribonucleico (DNA), Acido ribonucleico (RNA) |

sentano le caratteristiche sopracitate ed inoltre alcuni di essi presentano siti di legame, proteici e biochimici, che possono aiutare nella guarigione, rigenerazione e integrazione dei tessuti.

Tuttavia alcuni biopolimeri possono presentare diverse problematiche: alcuni causano una reazione immunogenica dopo l'impianto, altri propendono alla calcificazione (deposizione anormale di calcio nel tessuto corporeo). Anche la variabilità della struttura molecolare da "lotto a lotto", tipica di tutte le sostanze naturali (in particolar modo per quanto riguarda l'approvvigionamento animale), e la tendenza a denaturare o a decomporsi a temperature inferiori al loro punto di fusione sono problematiche molto comuni. [15]

L'impiego di biomateriali di origine naturale è un'area di ricerca già ben affermata. Basti pensare che la domanda di strutture biocompatibili, biodegradabili e funzionali è cresciuta costantemente negli Stati Uniti con un tasso del 6,2%, raggiungendo, nel 2018, un volume di affari di 7,2 miliardi di dollari. In Unione Europea il valore complessivo, nel 2019, si è assestato intorno a 1,15 miliardi di Euro. [15, 16]

3.1 Proteine

Le proteine sono macromolecole biologiche formate da uno o più lunghe catene di α -amminoacidi (molecola bifunzionale che contiene sia un gruppo carbossilico acido sia un gruppo amminico basico, legato all'atomo di carbonio in posizione α rispetto al carbonile) legati tra loro mediante legami amidici, detti legami peptidici, tra il gruppo α -amminico di uno e il gruppo α -carbossilico di un altro. Solitamente si definiscono peptidi le catene che presentano un numero di amminoacidi non superiore a 50, mentre quelle che ne presentano di più vengono definite proteine. La lunga sequenza atomica ripetitiva che costituisce la catena viene definita scheletro, mentre le unità monomeriche dei singoli amminoacidi sono comunemente dette residui. Presentano inoltre quattro livelli di struttura: quella primaria elenca la sequenza di amminoacidi, quella secondaria descrive il modo in cui segmenti locali dello scheletro peptidico si orientano in configurazioni regolari, quella terziaria descrive come l'intera molecola proteica si avvolge in una struttura tridimensionale complessiva mentre quella quaternaria descrive come le singole molecole proteiche si associano per formare strutture aggregate più grandi. Le strutture secondarie e terziarie vengono determinate mediante cristallografia ai raggi X.

Come altre macromolecole biologiche, le proteine sono parti essenziali degli organismi viventi dove svolgono un ruolo vitale nella segnalazione cellulare, nelle risposte immunitarie, nell'ade-

sione cellulare e nel ciclo cellulare. Alcune sono enzimi che catalizzano le reazioni biochimiche e sono essenziali per il metabolismo; altre hanno funzioni strutturali o meccaniche, conferendo durezza e rigidità ai componenti biologici. Il grande vantaggio delle proteine è che sono strutturalmente identiche, o molto simili, a sostanze macromolecolari che l'ambiente biologico è pronto a riconoscere e trattare metabolicamente. Di conseguenza, i problemi di tossicità e di insorgenza della risposta infiammatoria cronica vengono soppressi o fortemente ridotti.

Le proteine più importanti a livello biomedico sono cheratina, collagene, elastina e seta: la cheratina verrà trattata più approfonditamente in seguito.

Il collagene (Figura 3.1C) è la più abbondante proteina presente nei mammiferi rappresentando, tipicamente, il 30% della massa proteica corporea totale. Forma una parte significativa dei tessuti connettivi come ossa, tendini, legamenti, vasi sanguigni, nervi e pelle. Essendo una delle principali proteine strutturali presente in tutti i vertebrati, comprende una famiglia di molecole, geneticamente distinte, con una configurazione comune a tripla elica di tre sub-unità polipeptidiche, note come α -catene. Queste triple eliche formano una molecola di tropocollagene, l'elemento costitutivo del collagene. Le molecole di tropocollagene si associano in modo sfalsato per produrre fibrille di collagene che vengono stabilizzate e rafforzate da legami covalenti catalizzati enzimaticamente e non. L'entità di questi legami dipendono dall'età e dal tipo di tessuto. Ad oggi sono stati identificati e descritti 28 tipi di collagene: le variazioni sono dovute a differenze nell'assemblaggio delle sub-unità polipeptidiche, nelle lunghezze dell'elica e in interruzioni e terminazioni dei domini elicoidali collagenosi. Per scopi biomedicali il collagene, in particolare di tipo I, è stato per decenni la scelta principale per la produzione di gel, film, nanoparticelle, microsfele, membrane e *scaffold* per le sue caratteristiche di biocompatibilità, biodegradabilità, bassa immunogenicità nonché per la sua capacità di formare fibre resistenti con elevata resistenza alla trazione.

L'elastina (Figura 3.1B) è una proteina della matrice extracellulare (parte di un tessuto non composto da cellule) nota per fornire elasticità ad organi e tessuti, consentendo a questi di riprendere la loro forma dopo lo stiramento o la contrazione. È più abbondante nei tessuti connettivi, e in altre strutture del corpo, dove l'elasticità risulta di fondamentale importanza. L'elastina insolubile è una delle proteine più stabili con un'emivita di circa 70 anni. La tropoelastina, proteina precursore dell'elastina, e i peptidi simili all'elastina possiedono un'importante capacità di autoassemblarsi in condizioni fisiologiche. I biomateriali a base di elastina, e molecole



Figura 3.1: A: Immagine SEM di seta proveniente da una tela di ragno; B: micrografia istologica di elastosi solare che provoca accumuli di elastina nei tessuti; C: fasci di fibre di collagene, colorate

derivate, sono sempre più studiati per potenziali applicazioni nell'ingegneria dei tessuti. Può essere applicata in varie forme, comprese fibre di elastina insolubile, elastina solubile idrolizzata, tropoelastine ricombinate (o frammenti di tropoelastina) e come copolimeri a blocchi di elastina. Inoltre, mediante mezzi sintetici, possono essere prodotte, ricombinate e incorporate sequenze simili all'elastina. Utilizzati da soli o in combinazione con altri biopolimeri, i biomateriali contenenti elastina sono impiegati in applicazioni che includono sostituzione della pelle, innesti vascolari, valvole cardiache e cartilagine elastica.

La seta (Figura 3.1A) è una proteina fibrosa prodotta da *Lepidoptera larvae* come bachi da seta, ragni, scorpioni, acari e mosche. Le fibre di seta sono composte da almeno due proteine principali: sericina (globulare) e fibroina (fibrosa). I ragni possono trasformare le proteine della seta in un materiale che ha una resistenza alla trazione 16 volte maggiore di quella del nylon e un grado molto elevato di elasticità. La seta senza sericina mostra una ottima stabilità mentre la fibroina di seta mostra eccellenti proprietà fisiche e chimiche e per decenni è stata utilizzata come materiale per suture chirurgiche. La seta può essere lavorata in diverse forme tra cui fibre, membrane, gel, spugne, polveri e *scaffold* e risulta particolarmente interessante grazie alla sua bassa tossicità, elevata biocompatibilità, tasso di biodegradazione regolabile e notevoli caratteristiche meccaniche. Queste ultime e la capacità della fibroina di seta di supportare la differenziazione delle cellule staminali mesenchimali lungo il lignaggio osteogenico ne permettono l'uso per l'ingegneria del tessuto osseo. Inoltre, la fibroina può essere combinata con altri biomateriali e può essere modificata chimicamente; pertanto gli *scaffold* possono essere adattati

ad applicazioni come le protesi vascolari, gli impianti strutturali e le suture. [15]

3.1.1 Cheratina

La cheratina è la più abbondante proteina fibrosa presente in natura, essendo il principale costituente di capelli, lana, corna, unghie e piume. Le fonti di cheratina sono molteplici e vanno da peli, lana, corna, unghie, artigli e zoccoli di mammiferi (α -cheratina) a piume, becchi e artigli di uccelli (β -cheratina). [17]

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). [18]

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 30000 tonnellate/anno, di cui 20000 sono prodotte esclusivamente dall'Italia. [19, 20]

La cheratina è una proteina formata da diversi amminoacidi: cisteina, glicina, prolina e serina in elevate quantità; lisina, istidina e metionina in basse concentrazioni, mentre il triptofano è presente in bassissime quantità. Presenta legami intermolecolari attuati dall'amminoacido cisteina tramite ponti disolfuro e legami sia inter- che intramolecolari tra acidi polari e non polari. Proprio i ponti disolfuro, creando una struttura tridimensionale compatta, rendono la cheratina più stabile, meno solubile di altre proteine ed in grado di resistere maggiormente sia a reazioni chimiche che enzimatiche.

La presenza di legami ionici, tra anioni carbonilici e cationi amminici, è influenzata dal pH, ed è massima al punto isoelettrico (pH=4,9) quando la proteina è in forma di switterione. [21]

Le proteine, all'interno dell' α -cheratina, sono organizzate come bobine arrotolate (Figura 3.2). La struttura elicoidale è stabilizzata dai legami a idrogeno presenti all'interno della catena polipeptidica. Due catene isolate ad elica destrorsa, legate mediante ponti disolfuro, formano una bobina a spirale sinistrorsa denominata dimero. Quest'ultimo si aggrega "end-to-end" ed in modo sfalsato con altri dimeri, sempre tramite ponti disolfuro, per formare un protofilamento

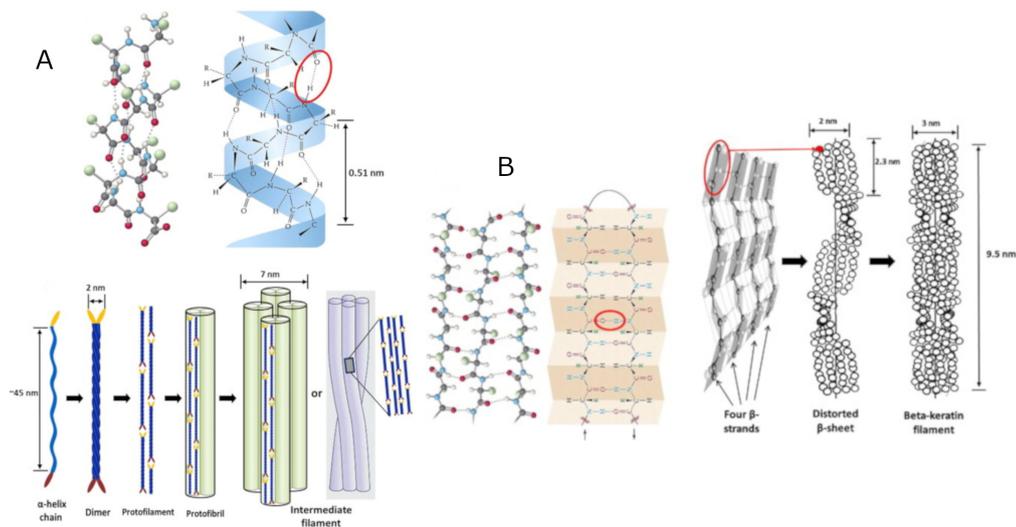


Figura 3.2: A: struttura dell' α -cheratina in cui si evidenzia (in alto) i legami ad idrogeno che si vengono ad instaurare sulla catena e (in basso) schema della formazione degli intermedi filamentosi; B: struttura della β -cheratina (a sinistra) e formazione (a destra) del filamento

con un diametro di circa 2 nm. Due protofilamenti a loro volta si associano lateralmente a formare una protofibrilla che, assieme ad altre tre, si combina in un filamento intermedio, circolare o elicoidale, di diametro 7 nm. A sua volta il filamento intermedio si impacchetta formando una struttura a spirale, che si collega con le proteine della matrice di cheratina amorfa ricca di zolfo, costituita da catene proteiche che presentano un'elevata quantità di residui di cisteina o di glicina, tirosina e fenilalanina.

Per quanto riguarda la β -cheratina, il foglio pieghettato è costituito da β -filamenti legati lateralmente, disposti in maniera parallela o antiparallela, le cui catene sono tenute insieme da legami a idrogeno intermolecolari. Il foglio pieghettato a sua volta si distorce e giace su una superficie elicoidale sinistroidale. I fogli pieghettati sono legati orizzontalmente a due a due, sovrapponendosi e scorrendo in direzioni opposte, a formare un filamento di diametro 4 nm. [22]

Vista la vastità di fonti, la cheratina presenta significative variazioni nella composizione della catena amminoacidica, nel peso molecolare e nella struttura secondaria della proteina, a seconda del tipo di tessuto e di organismo di provenienza: ad esempio, mentre lana e capelli presentano proteine polidisperse con peso molecolare compreso tra 10 e 75 kDa, costituite da α -eliche, le piume presentano proteine poco polidisperse con P.M. di circa 10 kDa strutturate soprattutto in

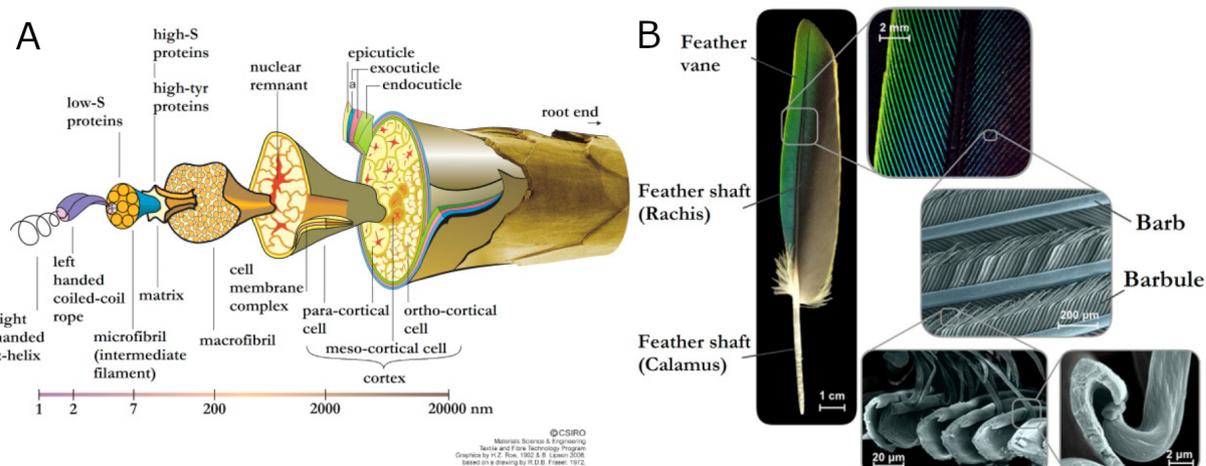


Figura 3.3: A: schema della struttura della lana; B: immagini e micrografie della struttura di una piuma

β -foglietti (Figura 3.3). Questa differenza risiede proprio nelle specifiche funzioni che questi due materiali devono svolgere.

I capelli e la lana presentano un'eccellente elasticità ed isolamento termico dovute alla loro struttura gerarchica. In particolar modo la lana è composta da tre componenti principali: uno strato esterno di lipidi idrofobici, che si trova sull'epicuticola ricca in cisteina, legato ad essa in modo covalente mediante frazioni tioesteriche; le cellule della cuticola dello strato esterno (di circa 0,5 mm di spessore), costituite dall'epicuticolo, dall'esocuticola e dall'endocuticola; il nucleo centrale, composto da un midollo circondato da una corteccia, costituito da un gran numero di cellule corticali (con macro-fibrille e micro-fibrille rispettivamente ad alto e basso contenuto di zolfo).

Le piume hanno invece caratteristiche tali da ottenere le massime prestazioni in volo (sollevamento, rigidità, aereodinamicità e resistenza ai danni) col minor peso possibile. Tutto ciò è possibile in quanto, oltre ad essere composte da β -cheratina, presentano una struttura divisa in due parti principali: un albero centrale (rachide e calamo), che conferisce rigidità, e palette laterali (barbigli e barbule) che catturano l'aria. La superficie piatta delle piume è creata da ramificazioni di barbigli dall'albero centrale e tra barbigli e barbule tenuti insieme da microami alla fine di queste ultime.

Le diverse caratteristiche della cheratina si riflettono inevitabilmente anche sulle proprietà dei dispositivi realizzati a partire dalla cheratina stessa: ad esempio, gli idrogel preparati con chera-

tina derivante da piume di pollo mostrano un modulo elastico notevolmente più elevato (7,6 - 11 kPa) rispetto a quelli preparati da capelli (circa 0,7 kPa) o da lana (0,06 - 0,16 kPa). Al tempo stesso, gli idrogel di cheratina da piuma presentano una capacità di rigonfiamento molto peggiore (1500%) rispetto agli idrogel di cheratina da lana o capelli (> 3000%), analogamente a quanto si verifica nel caso degli *scaffolds* ottenuti dalla liofilizzazione degli idrogel. Questo avviene a causa del minor peso molecolare e alla conformazione della cheratina da piuma che potrebbe facilitare l'autoassemblaggio di idrogel rigidi attraverso la riossidazione del legame disolfuro, mentre il maggiore peso molecolare e la conformazione α -elica nelle cheratine di capelli e lana portano a idrogel più flessibili e deboli. [17]

3.1.1.1 Metodi di Estrazione

I possibili metodi di estrazione della cheratina, dalle sue diverse fonti, sono molteplici. I principali sono la riduzione, l'impiego di basi, la solfitolisi, l'impiego di liquidi ionici, l'ossidazione, la *steam flash explosion*, l'estrazione assistita da microonde e processi in cui si impiegano microrganismi o enzimi.

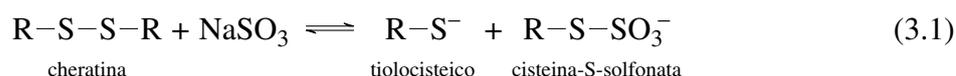
La riduzione è il metodo più antico (1930 - 1940). Come agente riducente si preferisce l'impiego di tioli: generalmente è pratica ordinaria l'utilizzo del 2-mercaptoetanololo (MEC) rispetto al tioglicolato di potassio, in quanto viene considerato un miglior agente riducente. Le differenze più marcate tra i due si notano ad alte concentrazioni, quando la forza ionica dei gruppi carbossilici del tioglicolato risulta particolarmente elevata. E' inoltre importante tenere conto dell'auto-ossidazione dei tioli alcalini, che può essere limitata operando sotto battente di azoto anche se, in questo caso, si ottengono estratti dalla composizione non uniforme. In alternativa, si possono utilizzare alti pH e/o alte temperature, condizioni che sono però responsabili di seria degradazione delle proteine e della formazione di lantionina. L'urea, agente denaturante delle proteine, è generalmente utilizzata per aumentare la solubilità della cheratina in acqua. Ad alte concentrazioni (8 M) ne causa il rigonfiamento della struttura, andando ad indebolire le interazioni idrofobiche presenti nella catena polipeptidica, migliorando in questo modo l'effetto degli agenti riducenti. Nel 1996 Yamauchi *et al.* proposero un metodo per l'estrazione in cui si prevede l'uso di urea, MEC e, come surfattante, sodio dodecilsolfato (SDS), con una resa del 40-50%. L'SDS aumenta sia il tasso di estrazione che la stabilità dell'estratto in ambiente acquoso in quanto previene l'aggregazione della catena. La formazione di un com-

plesso tra la cheratina e l'SDS giustifica la presenza di quest'ultimo in bassa quantità (circa il 20% secondo Schrooyen *et al.* dopo 65 h di dialisi) nei film prodotti. Tale quantità residua non può essere trascurata quando si vanno a realizzare applicazioni per l'ambito alimentare e farmaceutico. L'interazione tra surfatante (i più efficaci sono quelli cationici e quelli neutri) e cheratina dipendono dal tipo di cheratina (capelli, lana, unghie, ecc...), dalla sua struttura secondaria e terziaria e dal grado di ponti disolfuro. Viceversa, il "metodo Shindai", proposto da Nakamura *et al.*, prevede l'impiego di tiourea (H_2NCSNH_2), facilitatore della dissociazione delle proteine della cheratina, urea e MEC come agente riducente. Tale metodo permette l'estrazione da ogni fonte con rese superiori al "metodo Yamauchi", ma la proteina estratta può essere mantenuta solo in forma ridotta, richiedendo quindi la presenza degli agenti riducenti in soluzione. La cheratina precipita dopo la rimozione del MEC, pertanto l'uso della dialisi per rimuovere i reagenti può influire sulla solubilità della cheratina stessa. Inoltre, la stabilità della soluzione dipende fortemente dal rapporto MEC/urea: piccole variazioni possono causare la precipitazione della proteina, fattore che limita fortemente la produzione di materiali a partire da cheratina estratta con questo metodo. Il brevetto di Barrows permette di superare queste difficoltà: la soluzione contenente cheratina viene concentrata fino al punto in cui l'urea inizia a cristallizzare; tale soluzione viene quindi esposta ad aria o ad un agente ossidante, portando alla formazione di un idrogel flessibile, elastico, e lavorabile, che può essere lavato al fine di rimuovere i reagenti residui. Recentemente Xu *et al.* hanno sostituito il MEC con la cisteina, agente riducente "naturale", ottenendo una rottura controllata dei ponti disolfuro. Inoltre è stato dimostrato che i prodotti finali presentano buone proprietà meccaniche e di filabilità in forma di fibre, suggerendo la possibilità di utilizzare questo metodo per poter sviluppare con successo film, spugne e altre forme meccanicamente stabili.

Per quanto riguarda l'utilizzo di basi, un'elevata concentrazione di queste ultime è responsabile della dissociazione dell'idrogeno dal gruppo solfato e carbonilico, facilitano la solubilizzazione, favorendo però il danneggiamento della catena peptidica (la rottura di questi legami causa un poco piacevole odore solfureo). La richiesta di grandi quantità di basi, e di conseguenza di acidi per la neutralizzazione e la precipitazione della cheratina, oltre al danneggiamento sopra riportato, non permettono uno scale-up a livello commerciale. L'uso di alcali forti può ridurre la quantità di NaOH richiesta per l'estrazione della cheratina: ad esempio, aggiungendo l'1% di solfuro di sodio (Na_2S) ad una soluzione di NaOH 0,065 N è possibile degradare le fibre di

lana più velocemente che utilizzando solo idrossido di sodio (in trenta minuti oltre il 50% della massa lanosa viene solubilizzata). Nagai *et al.* hanno osservato che ben la metà del materiale di partenza è perso come amminoacidi liberi durante il processo di dialisi. In alternativa, si può utilizzare NaOH e solfato di rame (2:1 mol/mol): in questo modo la catena peptidica non viene danneggiata ed inoltre il residuo di cistina viene convertito in acido cisteico nella proteina ottenuta, in quanto il reagente agisce come catalizzatore. Il prodotto finale è un complesso proteina-rame dove il rame non può essere eliminato attraverso la dialisi ordinaria, in quanto il legame che si viene a formare risulta molto forte; di conseguenza la cheratina così ottenuta non può essere utilizzata per la il settore alimentare e farmaceutico.

Tenendo presente che l'impiego di MEC deve essere il più possibile limitato, a causa della sua tossicità, del suo alto costo e del suo odore sgradevole. Il solfito di sodio può rappresentare una valida alternativa. La solfitolisi della cisteina da parte di solfiti (Reazione 3.1) forma tioli cisteici e residui S-solfonati della cisteina.



In ambiente acquoso sono maggiormente presenti il solfito (SO_3^{2-}), il bisolfito (HSO_3^-) e il disolfito ($\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$). La velocità di reazione degli ioni solfito con la cisteina è maggiore rispetto a quella degli ioni bisolfito e la concentrazione di tali ioni aumenta all'aumentare del pH (fino a pH = 9). A pH superiori a 9 il tasso di solfitolisi diminuisce a causa delle forze di repulsione degli anioni carbossilici sugli ioni solfito. Gli ioni disolfito sono maggiormente presenti in condizioni acide mentre gli ioni bisolfito a pH superiore a 7. In ogni caso il pH ottimale è da valutare considerando sia la velocità della reazione che la presenza dell'equilibrio, tenendo comunque presente che la struttura della cheratina si danneggia a valori di pH eccessivamente basici. La solfolisi, come visto, generalmente è una reazione reversibile: con l'aggiunta di urea e SDS tutti i legami disolfuro possono venire dissociati. Si può dunque aumentare l'entità dell'estrazione aumentando la concentrazione di bisolfito, agendo sulla temperatura della reazione o aggiungendo urea concentrata.

I liquidi ionici (Figura 3.4) sono sali composti da un catione organico e da un numero diverso di anioni, organici o inorganici, che si presentano liquidi a temperature inferiori a 100 °C. Sono caratterizzati da proprietà chimico-fisiche uniche quali: bassa tensione di vapore, elevata conducibilità ionica, non infiammabilità, elevata stabilità termica, elevata solvibilità per soluti

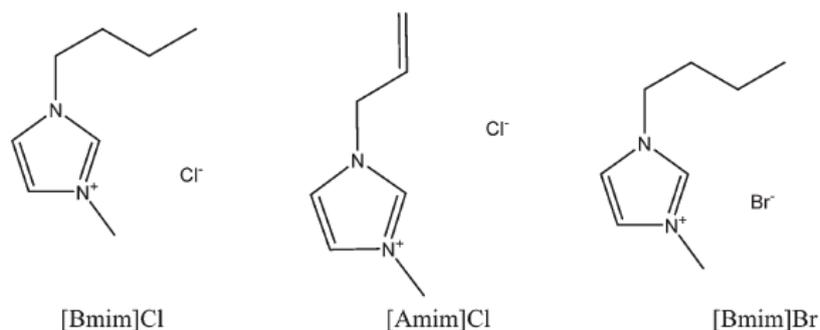


Figura 3.4: 1-Butil-3-metilimidazolio cloruro [Bmim]Cl, 1-Alil-3-metilimidazolio cloruro [Amim]Cl e 1-Butil-3-metilimidazolio bromuro [Bmim]Br.

specifici e non volatilità. Grazie a tutte queste caratteristiche, oltre al fatto di essere considerati solventi "verdi", sono ampiamente utilizzati per l'estrazione da biomasse, per la sintesi organica, per l'elettrochimica, come mezzo di conduzione ionica, in catalisi e per usi sotto vuoto dove vige il limite dell'evaporazione dei solventi tradizionali: è stato dimostrato che un liquido ionico contenente un cloruro presenta migliori capacità solventi rispetto ad altri ioni quali BF₄, PF₆ e Br. La precipitazione della cheratina estratta viene effettuata impiegando acqua, metanolo o etanolo e la sua estrazione deve essere eseguita in atmosfera inerte (ad esempio N₂), a causa dell'igroscopicità dei liquidi ionici. Sono pertanto necessari equipaggiamenti specializzati e costosi. Inoltre, la solubilità delle piume è fortemente influenzata dalla polarità del liquido ionico impiegato e la resa di estrazione aumenta aumentando la polarità. Nonostante la facilità del processo di estrazione, nella cheratina rigenerata la struttura ad α -elica viene distrutta. L'aggiunta di Na₂SO₃ a liquidi ionici come [Amim]Cl o [Bmim]Cl facilita la distruzione dei ponti solfurei (Reazione 3.2) in quanto i liquidi ionici sono molecole fortemente polari in grado di rompere i legami ad idrogeno.



Per quanto riguarda l'utilizzo di questa tecnica per estrarre cheratina dalla lana, è stato ipotizzato che la distruzione e la dissoluzione della lana inizi attraverso la rottura dello strato proteico protettivo delle fibre lanose. Questo strato consiste principalmente nell'acido 18-metilicosanoico, legato attraverso legami tioesterici alle proteine ricche di cisteina negli strati centrali. Dopo la rottura dei legami tioesterici da parte del Cl⁻ il liquido ionico penetra all'interno. Attraverso il calore avviene la dissociazione degli ioni Cl⁻ e BMIM che operano poi in parallelo: gli ioni

BMIM complessano i protoni idrossilici causando la rottura dei legami ad idrogeno mentre il cloruro si associa agli protoni idrossilici causando la dissoluzione della cheratina. In ogni caso il maggior impatto è ad opera degli anioni. Anche la temperatura riveste un ruolo fondamentale: ad esempio, operando a 120 °C e impiegando [Bmim]Cl si ottiene una resa di estrazione del 57% (wt%) di lana, con rapporto lana liquido di 1:6, maggiore di quella ottenibile a temperature di 150 °C e 180 °C. Aumentando la temperatura di processo si migliora la dissoluzione in quanto aumenta la mobilità degli ioni e diminuisce la viscosità del sistema. In parallelo, l'aumento della temperatura causa però una maggiore distruzione della struttura e una diminuzione della composizione degli amminoacidi presenti a fine processo: è necessario quindi raggiungere un compromesso in base al materiale che si vuole produrre. Altro limite di questo processo è che la lana va aggiunta in soluzione in quantità molto basse (1%) per essere completamente dissolta. Inoltre vi è un limite massimo di concentrazione di fibre che può essere disciolto in soluzione.

Il metodo ossidativo viene impiegato principalmente per l'estrazione da lana e capelli: viene impiegato acido peracetico (CH_3COOOH) al 2% per trenta ore, seguito da un trattamento con ammoniaca 0,2 N, per concludere con una precipitazione mediante acido cloridrico. In questo modo, la maggior parte della lana viene solubilizzata, anche se permangono residui di cheratina insolubilizzata (principalmente β -cheratina). Il trattamento con acido peracetico ossida parzialmente i ponti disolfuro della cheratina e li converte in gruppi solfonici, che essendo idrofili possono complessarsi con l'acqua. A seguito della rottura dei ponti disolfuro, il dipeptide cisteinilcisteina proveniente dalle sequenze Cys-Cys, ampiamente presenti, viene rilasciato dalla lana, producendo una proteina con residui di acido cisteico ($-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$). Il vantaggio di questo metodo di estrazione risiede nella sua facilità e nella possibilità di separare le diverse frazioni di cheratina ossidata (α , β e γ) in base al pH della soluzione. Bisogna però considerare che, proprio per la trasformazione dei ponti disolfuro in acidi solfonici, le proteine così ottenute presentano proprietà chimico-fisiche diverse. Inoltre, altri amminoacidi (triptofano, metionina) potrebbero venire distrutti durante il processo, a seconda delle diverse condizioni di reazione.

L'esplosione a vapore (*Steam flash explosion*, SFE) è un processo di idrolisi "verde" a basso costo e a basso impatto ambientale, che viene utilizzato per la produzione di materiali a base biologica (Figura 3.5). In questo processo il materiale viene esposto ad alte temperature e per tempi brevi ad un getto di vapore, che penetra nei tessuti e nelle cellule del materiale, e quindi ad una rapida decompressione, ed infine a esplosione, nel giro di pochi millisecondi. Più in detta-

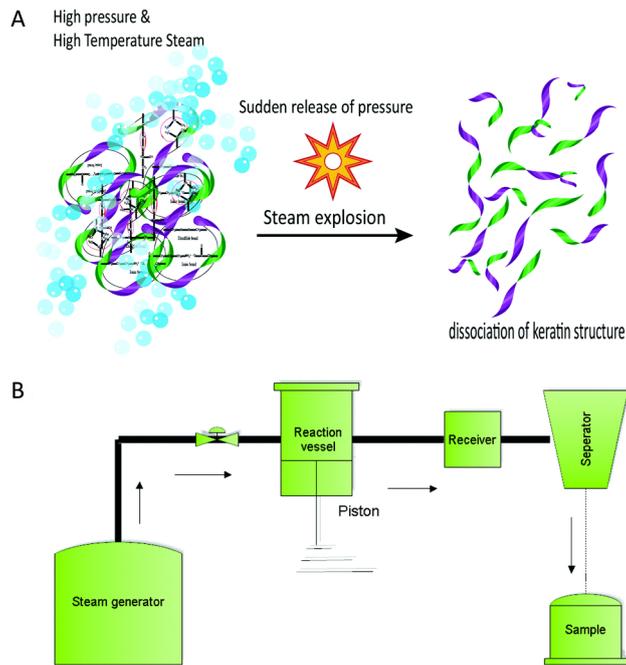


Figura 3.5: Disegno (A) e diagramma schematizzato (B) del processo di esplosione a vapore (SFE) per l'estrazione della cheratina

glio il vapore viene iniettato nella camera attraverso degli iniettori fino al raggiungimento della pressione desiderata. La camera principale è composta da un pistone e un cilindro che esplose all'aumentare della pressione attraverso il movimento del pistone. La rapida decompressione converte l'energia termica in energia meccanica con conseguente lacerazione e dissociazione fisica della biomassa. Numerosi fattori quali la temperatura, la dimensione delle particelle e il contenuto di umidità influenzano l'efficienza di questa tecnica. L'impiego di alte temperature (160 - 220 °C) porta alla distruzione della struttura chimica della cheratina, ottenendo pesi molecolari simili a quelli ottenibili con l'impiego di liquidi ionici, mentre una temperatura di soli 50 °C in un processo rapido (meno di tre minuti) può produrre energia sufficiente per interrompere e dispiegare la struttura compatta della proteina fibrosa. La cheratina ottenuta da SFE presenta un tasso di solubilizzazione in acqua più basso rispetto ai metodi chimici. Nonostante tempi di lavorazione rapidi e il potenziale utilizzo di basse temperature rispetto ad altri metodi convenzionali di esplosione del vapore, SFE permette di ottenere cheratina caratterizzata da una ridotta quantità di cistina.

L'applicazione di radiazioni a microonde con potenza variabile nell'intervallo 150 - 570 W per un massimo di 7 minuti e con temperature fino a 180 °C porta ad una resa in estrazione del

60 %. Tuttavia è difficile giustificare l'impiego di radiazioni a microonde se confrontato con il processo SFE che è più veloce, economico e può essere utilizzato ad una temperatura più bassa (50 °C). E' stato suggerito però che il riscaldamento a microonde, rispetto a quelli tradizionali, potrebbe ridurre significativamente l'energia di attivazione richiesta per l'estrazione della cheratina.

Le cheratinasi sono proteasi microbiche che possono idrolizzare la cheratina. Presentano una vasta gamma di applicazioni come la pulizia e il trattamento dell'ostruzione nei sistemi fognari, la pulizia della lana, il trattamento di finitura dei tessuti e la rimozione delicata dei peli dalla pelle nell'industria conciaria senza la necessità di applicare sostanze chimiche forti, che inciderebbero negativamente sulle proprietà meccaniche della pelle. L'idrolisi della cheratina da parte degli enzimi microbici è un metodo ecologico e sicuro per l'ambiente, che non danneggia la struttura proteica e preserva le proprietà funzionali della cheratina in determinate condizioni di lavorazione. In generale, questi microrganismi possono essere classificati in cheratinolitici, ovvero in grado di degradare e solubilizzare completamente la cheratina dura, o potenzialmente cheratinolitici, se invece possono produrre forti proteasi. I batteri Gram-positivi sono stati ampiamente studiati principalmente per la degradazione di materiali contenenti β -cheratina come le piume, mentre i funghi procarioti e cheratinofili hanno la capacità di degradare materiali con un alto contenuto di α -cheratina. Più in dettaglio gli *actinomiceti*, i funghi cheratinofili e alcuni altri batteri, in particolare del genere *Bacillus*, sono in grado di disintegrare completamente la cheratina e usarla come fonte di energia, carbonio, azoto e zolfo. I funghi sono considerati specie cheratinolitiche deboli se possono solubilizzare fino al 40% del substrato cheratinico dopo 8 settimane; se si verifica solo il 20%, o meno, di solubilizzazione sono considerati non cheratinolitici. La capacità di degradazione della piuma è stata ampiamente confermata per i ceppi di *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilis*, *B. cereus* e *B. subtilis*. Anche i batteri non sporigeni della specie *Stenotrophomonas* e *F. islandicum* sono stati segnalati per avere buone capacità di cheratinolisi. Tuttavia a livello commerciale queste tecniche non sono utilizzate molto frequentemente a causa della limitata presenza di enzimi che possano avere sia un'alta efficienza che un'adattabilità a diversi substrati e a causa della necessità di produrre microrganismi in quantità sufficiente per l'impiego su grandi scale. [21]

3.1.1.2 Proprietà biologiche

La cheratina presenta importanti caratteristiche che la rendono adatta per l'applicazione in campo biomedicale, prima fra tutte la biocompatibilità, ampiamente testata sia *in vitro* che *in vivo*. Nel primo caso una risposta positiva è stata ottenuta testando ben 12 diverse linee cellulari. E' emerso inoltre come i film di cheratina possono essere una valida alternativa a basso costo per l'impiego come rivestimento di coltura cellulare al posto del collagene o di altri materiali usati frequentemente.

In vivo la biocompatibilità corneale di film di cheratina da capelli è stata studiata con successo su ratti modello, come alternativa alla membrana amniotica per la ricostruzione della superficie oculare. Altri studi sono stati effettuati su ratti (film di cheratina da lana e idrogel di cheratina da piume), indicando che impianti sub-cutanei non hanno dato luogo a reazioni infiammatorie e non hanno indotto tossicità a livello sistemico.

Anche la biodegradabilità risulta essere una caratteristica di grande importanza per applicazioni biomedicali, in particolare nell'ingegneria tissutale, in quanto il supporto artificiale deve poter degradarsi con una cinetica compatibile a quella di formazione del nuovo tessuto, il quale a sua volta deve possedere idonee proprietà strutturali e funzionali. La comprensione dei meccanismi, ed il controllo della velocità di degradazione, sono dunque indispensabili. La cheratina si è dimostrata sensibile alla degradazione proteolitica da parte di enzimi come la proteinasi K. In ogni caso l'uomo non è in grado di produrre cheratinasi, enzimi in grado di degradare specificamente la cheratina, rendendo di conseguenza tale proteina molto più stabile di altre presenti all'interno del corpo umano, come ad esempio il collagene.

Altra caratteristica di primaria importanza in ambito biomedico è l'adesione cellulare, che costituisce il primo passo fondamentale per garantire la vitalità, la proliferazione e l'eventuale differenziamento cellulare. I vari tipi di cheratina (ossidata, ridotta, ecc...) contengono sequenze (*cellular binding motifs*) di EDS (acido glutammico-acido aspartico-serina), LDV (leucina-acido aspartico-valina) e RGD (acido arginina-glicina-aspartico) alle quali le cellule sono in grado di attaccarsi facilmente.

Il meccanismo di adesione cellulare su film di cheratina da capelli è stato studiato usando come cellule modello degli epatociti: i risultati di tali studi hanno dimostrato che l'adesione degli epatociti ai substrati di cheratina non è dovuta al riconoscimento mediato dalle integrine β_1 e β_2 , ma

dal recettore non integrinico del recettore epatico dell'asialoglicoproteina (ASGPR). Tuttavia, in un altro studio, bloccando le integrine β_1 e β_3 , l'adesione piastrinica agli idrogeli di cheratina da capelli è stata significativamente ridotta, suggerendo che la cheratina può contenere siti di legame intrinseco specificamente riconosciuti dalle subunità β_1 e β_3 delle integrine. Pertanto, mentre l'adesione di epatociti alla cheratina diminuisce bloccando la subunità di integrina β_1 , le piastrine sono ancora in grado di interagire con la cheratina anche quando manca dell'integrina β_1 , probabilmente attraverso un diverso modello di matrice cellulare, suggerendo quindi che la cheratina può intrinsecamente favorire l'adesione di diversi tipi di cellule. [23]

Di contro, la sua elevata rigidità e fragilità, sono i due fattori principali che limitano fortemente il campo di applicazione della cheratina, in quanto la rendono difficilmente processabile e lavorabile in forme e strutture anche complesse (particelle, film, elettrofilati, ecc). Ad oggi, 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 e antibatterici quali la clorexidina. [24, 25]

Tuttavia, a causa come già detto della sua eccessiva fragilità 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. 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. Per quanto riguarda la combinazione con polimeri di origine sintetica, sono stati realizzati film a base di una blend tra cheratina e poli(etilen ossido) (PEO): la presenza di PEO ha permesso di stabilizzare la struttura β della cheratina, rendendo così possibile la realizzazione di membrane per rilascio controllato di farmaci, oltre che di *scaffold* nel campo dell'ingegneria tissutale. [26, 27, 28]

Capitolo 4

Miscele polimeriche

Le miscele polimeriche sono materiali preparati miscelando due polimeri o copolimeri, ciascuno dei quali caratterizzato da proprietà peculiari. Sono quindi miscele fisiche di due o più polimeri, senza alcun legame covalente tra loro, le cui uniche interazioni sono le forze di Van der Waals, le interazioni dipolari o il legame ad idrogeno.

La miscelazione è interessante perché risulta essere un processo semplice e a basso costo, già ampiamente impiegato a livello industriale, che presenta la possibilità di fabbricare nuovi materiali con le proprietà desiderate (meccaniche, termiche e morfologiche) andando a migliorare quelle non soddisfacenti di ciascun materiale di partenza senza andare a deperimento delle caratteristiche già idonee per la peculiare applicazione richiesta.

La miscibilità dei componenti polimerici dipende da molti fattori quali, ad esempio, la polarità dei componenti, la composizione, il peso molecolare, la temperatura e la pressione di lavorazione. Può essere predetta usando parametri termodinamici attraverso l'energia libera di miscelazione di Gibbs (ΔG_m):

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m < 0$$

dove ΔH_m e ΔS_m sono rispettivamente l'entalpia e l'entropia di miscelazione. L'entropia di miscelazione per le macromolecole è generalmente molto bassa, se non addirittura trascurabile, a causa del limitato numero di possibili configurazioni molecolari, mentre il contributo dell'entalpia rende positivo il valore di ΔG_m . *Blend* miscibili si possono quindi formare se il contributo entropico supera quello entalpico in presenza di eccellenti interazioni intermolecolari. Oltre al valore negativo dell'energia libera deve essere rispettata anche la seguente disuguaglianza:

$$\left(\frac{\delta^2 \Delta G_m}{\delta \Phi_i^2} \right)_{T,p} > 0$$

dove Φ_i rappresenta la frazione volumetrica dei componenti.

In base alla miscibilità è possibile classificare le *blend* polimeriche in tre categorie: miscibili, compatibili ed immiscibili. Le *blend* miscibili presentano una morfologia omogenea con una sola temperatura di transizione vetrosa, che si trova tra le T_g dei singoli componenti di partenza. L'entalpia di miscelazione risulta minore di zero a causa di interazioni specifiche ed omogeneità osservabili su scala nanometrica, rendendo negativa anche ΔG_m . La miscibilità dipende dalla natura chimica dei polimeri, dalla polarità, dal rapporto tra le viscosità, dalla tensione interfacciale e dalle interazioni esotermiche come quelle dipolo-dipolo, il legame a idrogeno, le forze di Van der Waals, le forze dispersive e le interazioni acido-base. Le equazioni di Fox, di Gordon e Taylor e di Couchman permettono, inoltre, di calcolare la dipendenza della T_g in funzione della composizione. Un esempio di *blend* miscibili sono le miscele di polistirene e polifenilenoossido (PPO).

Nel caso di *blend* parzialmente miscibili una parte di un componente viene sciolto nell'altro; entrambe le fasi della miscela sono omogenee e presentano una propria T_g che, rispetto a quelle dei componenti puri, si avvicinano tra loro. Un esempio sono le miscele policarbonato (PC) e acrilonitrile-butadiene-stirene (ABS).

Le *blend* immiscibili, infine, presentano una morfologia eterogenea e due temperature di transizione vetrosa e di fusione, corrispondenti a quelle di ciascun componente. Possiedono un'interfase acuta che evidenzia l'assenza di forti interazioni tra i componenti; sono però osservabili, talvolta, interazioni deboli come il legame a idrogeno e le forze di Van der Waals. Un esempio sono le miscele di polietilene tereftalato (PET) e PVC o le miscele PP e PE.

Nel caso di miscele polimeriche immiscibili è possibile avere quattro morfologie di base: morfologia a gocciolina (*droplet morphology*) o dei domini dove si ha una dispersione della fase minore in quella maggiore, continua, dispersione di fibre nella fase principale, morfologia a lamelle in presenza di fasi planari alternate e morfologia bicontinua o co-continua. Quest'ultima può essere definita in modo diverso: ad esempio, come la coesistenza di due o più strutture continue oppure come struttura con continuità a doppia fase o continuità in co-fase. Queste strutture si formano in un certo intervallo compositivo, intorno alla composizione di inversione di fase, tant'è che nella struttura co-continua almeno una parte di ciascuna fase forma una struttura continua coerente che permea l'intero volume.

Nel caso della morfologia dei domini, la fase minore è dispersa nella fase continua maggiore ma

la distribuzione dimensionale dei domini varia con la composizione. Generalmente la dimensione del dominio del componente disperso aumenta all'aumentare della sua concentrazione, a causa della coalescenza, correlata ad un aumento delle collisioni tra particelle, e l'inversione di fase può essere osservata dopo una particolare composizione. Prima di questa ci si può aspettare lo sviluppo di una morfologia co-continua, dipendente dal rapporto di viscosità dei componenti. La coalescenza, causata dalle collisioni tra i domini, dipende a sua volta dalla concentrazione, dalla viscosità dei componenti e da diversi tipi di interazioni. In generale, il tasso di coalescenza è maggiore con una elevata tensione interfacciale, una bassa velocità di taglio e lunghi tempi di miscelazione. Se la viscosità della fase minore è inferiore a quella della fase maggiore, la velocità di coalescenza diminuisce a causa della limitata diffusione dei domini nella fase continua altamente viscosa. Anche la distribuzione dimensionale dei domini di fase dipende direttamente dalla composizione della fase minore e questa dipendenza può essere osservata maggiormente a concentrazioni intermedie. [29]

Capitolo 5

Applicazioni biomedicali

5.1 Rilascio controllato di farmaco

Negli ultimi anni, lo sviluppo di farmaci sempre più specifici in relazione alla particolare terapia prevista ha comportato la necessità di disporre di sistemi a rilascio controllato del principio attivo in modo sempre più puntuale e mirato, che siano in grado di rispondere direttamente agli stimoli patologici. Il rilascio controllato di farmaci rappresenta dunque una valida alternativa al rilascio convenzionale, al fine di superarne alcuni limiti; in particolare, quando si somministra una singola dose di un farmaco in una forma farmaceutica convenzionale, si ottengono livelli ematici che rientrano nel range terapeutico per tempi relativamente brevi. Inoltre, siccome la distribuzione del farmaco stesso si verifica in modo indiscriminato e incontrollato in tutto il corpo attraverso la circolazione sanguigna, il principio attivo non sempre riesce a raggiungere i siti recettoriali specifici localizzati nelle cellule bersaglio. Questo può rendere necessario l'utilizzo di dosi maggiori, rischiando il superamento della soglia di tossicità, seguiti da gole di minimo al di sotto del livello di efficacia. In alternativa, dunque, la somministrazione controllata del farmaco può essere utilizzata per ottenere: una concentrazione costante dei composti terapeutamente attivi nel sangue con fluttuazioni minime, tassi di rilascio prevedibili e riproducibili per un lungo periodo di tempo, protezione dei composti bioattivi aventi un'emivita molto breve, l'eliminazione degli effetti collaterali, di sprechi di farmaco e riduzione dei dosaggi, una terapia ottimizzata con migliore *compliance* del paziente, e la soluzione del problema della stabilità del farmaco. [30]

La prima formulazione a rilascio controllato fu introdotta dall'azienda farmaceutica Smith Kline & French (USA), nel 1952, per la somministrazione in un intervallo di dodici ore di dextroamphetamine (Dexedrine), uno stimolante del sistema nervoso centrale prescritto per il trattamento

del disturbo da deficit di attenzione e iperattività. Da quel momento, fino a circa all'inizio degli anni '80, è stata acquisita la comprensione di base dei meccanismi a rilascio controllato e sono stati sviluppati numerosi sistemi di somministrazione per via orale e transdermici. Successivamente gli sforzi si sono concentrati sullo sviluppo di sistemi di consegna con cinetica di rilascio ad "ordine zero" finalizzati a mantenere una concentrazione costante di farmaco nel sangue. Sono stati inoltre sviluppate molte altre tecnologie come polimeri e idrogel "intelligenti" in grado di attivarsi in base a cambiamenti di fattori ambientali come pH, temperatura o livelli di glucosio, sebbene le applicazioni cliniche siano ancora poche. Microparticelle biodegradabili, impianti solidi e impianti gelificanti in situ sono stati utilizzati per fornire peptidi e proteine per periodi di un mese, come nel caso della goserelina, commercializzata a partire dal 1989 in forma di acetato, con il nome di Zoladex® da Depot (ora AstraZeneca). Dal primo decennio degli anni duemila ci si è concentrati su sistemi nanometrici per il rilascio di farmaci antitumorali o per terapie geniche utilizzando varie tipologie di nanoparticelle. Per quanto riguarda le sfide future, la ricerca dovrà concentrarsi sullo studio di dispositivi per il rilascio di insulina con capacità di commutazione "on-off", per la già citata somministrazione mirata di agenti antitumorali, la somministrazione di farmaci a lungo termine (da sei mesi ad un anno) e metodi di test *in vitro* in grado di prevedere i profili farmacocinetici *in vivo*. In particolare la somministrazione di insulina risulta un caso particolarmente emblematico, in quanto presenta dal punto di vista tecnico molteplici problematiche: essa, infatti, deve essere erogata al momento giusto, ovvero quando il livello di glucosio nel sangue aumenta, in una quantità precisa ed in maniera "pulsante", terminando l'erogazione dopo che la concentrazione di glucosio è diminuita, per evitare fenomeni di ipoglicemia. Il sistema inoltre dovrebbe essere impiantato per lunghi periodi e dovrebbe al contempo rispondere nel giro di pochi secondi o, al massimo, di pochi minuti. [31]

5.1.1 Meccanismi di rilascio

In Figura 5.1 sono mostrati cinque comuni profili di rilascio. Il profilo I mostra un rilascio convenzionale, ritardato ma non costante. I profili II e III presentano entrambi un rilascio costante, che rimane all'interno dell'intervallo di efficienza terapeutica, ma il primo viene definito di ordine zero, mentre il secondo presenta un ritardo nel rilascio. Quest'ultimo può essere utile per somministrazioni notturne di farmaci. Il profilo IV mostra un rilascio ritardato ad impulsi, utile ad esempio per la somministrazione di ormoni, mentre il profilo V presenta impulsi multipli in

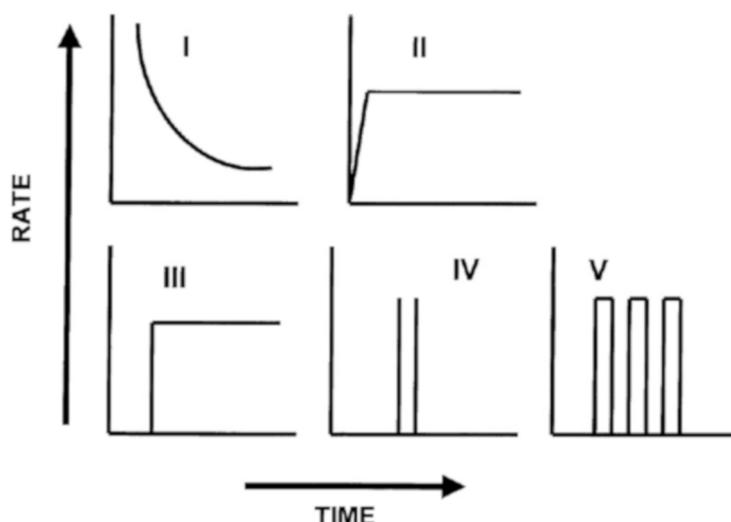


Figura 5.1: Cinque comuni profili di rilascio. Profilo I, convenzionale non costante; profilo II, ordine zero; profilo III, ritardato costante; profilo IV, ritardato ad impulsi; profilo V, ritardato con impulsi a tempo.

intervalli di tempo specifici.

I sistemi impiegati si possono classificare in quattro categorie, sulla base del diverso meccanismo di rilascio: a diffusione controllata, a controllo chimico, ad attivazione da parte del solvente (idrogel) e a rilascio modulato.

Nei sistemi a diffusione controllata (Figura 5.2A) il farmaco diffonde attraverso il polimero, il quale può subire una successiva degradazione all'esaurimento del farmaco. Finché il farmaco viene mantenuto nel nucleo del polimero in uno stato saturo il rilascio seguirà una cinetica di ordine zero. I dispositivi impiegati sono principalmente di due tipi: a serbatoio (o a matrice laminata) e a matrice (monolitici). Nel primo caso si tratta di dispositivi cavi in cui un nucleo di farmaco (disciolto, sospeso o puro) è circondato da una membrana polimerica che ne controlla la velocità di rilascio. Il farmaco deve essere saturo per poter mantenere un gradiente di concentrazione costante attraverso la membrana; esso infatti prima si dissolve nel lato interno della membrana, diffonde lungo di essa e poi desorbe nel lato esterno. Nei sistemi a matrice il farmaco viene invece disciolto o disperso uniformemente, e viene rilasciato in seguito a degradazione del polimero a cui il farmaco è legato. Il principale svantaggio è presentato da un profilo di rilascio di primo ordine con velocità di rilascio in continua diminuzione. Questo comportamento è causato dalla crescente lunghezza del percorso di diffusione e dalla diminuzione dell'area di

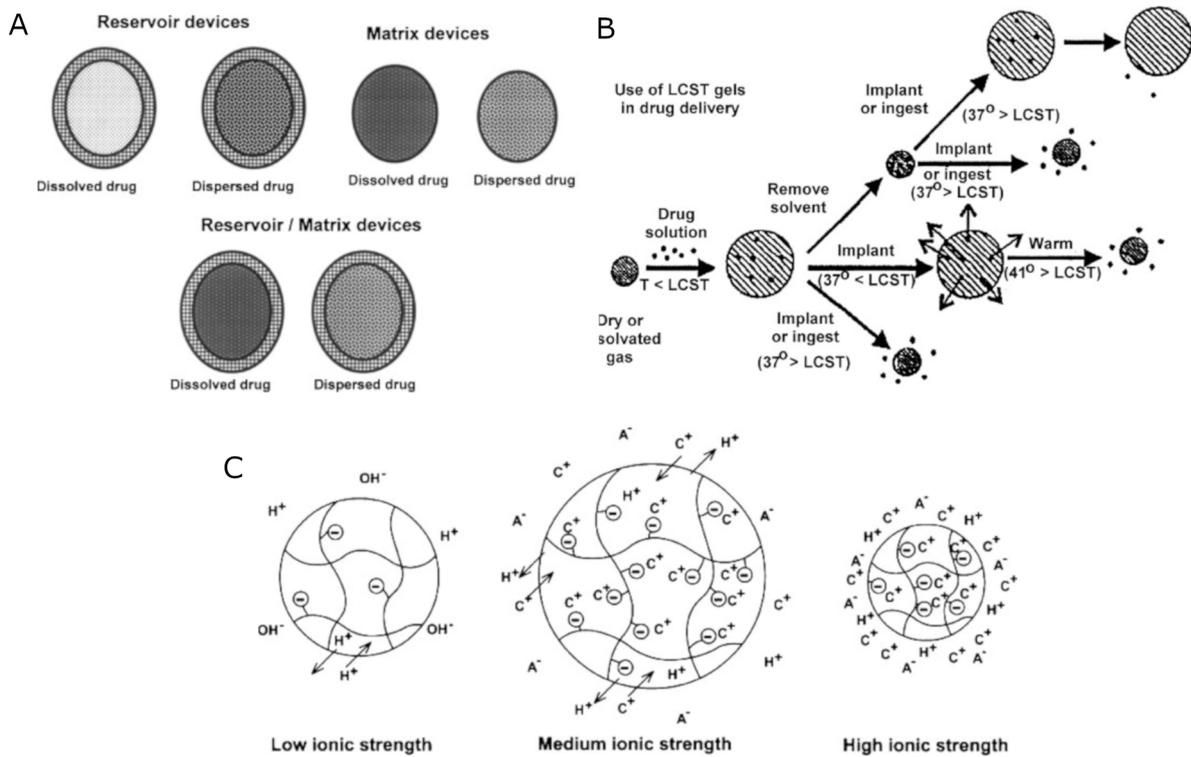


Figura 5.2: Disegni schematici di diversi sistemi per rilascio di farmaco. **A:** diffusione controllata; **B:** idrogel termosensibile; **C:** idrogel sensibile al pH

diffusione man mano che il rilascio dalla matrice procede.

Nei sistemi controllati chimicamente, il rilascio del principio attivo avviene nell'ambiente acquoso mediante uno o più meccanismi: biodegradazione graduale di un sistema polimerico contenente un farmaco, biodegradazione dei legami instabili mediante i quali il farmaco è accoppiato al sistema polimerico o diffusione di un farmaco da microsferi iniettabili e biodegradabili. Nei sistemi bioerodibili e biodegradabili il polimero si erode a causa della presenza di legami idroliticamente o enzimaticamente labili mentre nei sistemi a catena pendente la molecola del farmaco è legata chimicamente ad una spina dorsale polimerica e viene rilasciata mediante scissione idrolitica o enzimatica. La velocità di rilascio è controllata dalla velocità di idrolisi.

Gli idrogel sono costituiti da catene macromolecolari reticolate a formare una struttura a maglie aggrovigliate, adatta per l'intrappolamento di farmaci. Quando vengono in contatto con un solvente termodinamicamente compatibile le catene polimeriche si rilassano, se la temperatura è inferiore a quella di transizione vetrosa. A livello macroscopico si osserva un rigonfiamento,

con il farmaco che si diffonde nel mezzo ricevente esterno, attraversando lo strato polimerico rigonfio, mentre le molecole d'acqua penetrano all'interno. Se la T_g del polimero è ben inferiore a quella sperimentale, il polimero sarà allo stato gommoso e le catene polimeriche avranno un'elevata mobilità, che consente una più facile penetrazione del solvente e il successivo rilascio del farmaco. Ciò si traduce in una velocità di diffusione del farmaco più lenta della velocità di rilassamento della catena ($R_{diff} \ll R_{relax}$). Se invece la temperatura di esercizio è inferiore alla T_g le catene non sono sufficientemente mobili per consentire l'immediata penetrazione del solvente. Ciò determina due possibili scenari, a seconda che la velocità di diffusione sia maggiore a quella di rilassamento ($R_{diff} \gg R_{relax}$) o che sia invece simile ($R_{diff} \sim R_{relax}$, diffusione anomala).

Nei sistemi a rilascio modulato il rilascio di farmaco è controllato da stimoli esterni quali, ad esempio, temperatura, pH, forza ionica, un campo elettrico o radiazioni elettromagnetiche. La temperatura è il segnale di attivazione maggiormente utilizzato in quanto la temperatura corporea è solita discostarsi dal valore fisiologico di 37 °C in presenza di patogeni o pirogeni. Questi sistemi sfruttano varie proprietà dei polimeri come la capacità di rigonfiamento, la transizione vetrosa e la fusione. Gli idrogel termosensibili costituiscono la categoria di idrogeli maggiormente studiata e possono essere classificati in termosensibili negativi (Figura 5.2B), positivi e termicamente reversibili in base alla loro temperatura critica di soluzione. Gli idrogel termosensibili negativi presentano una temperatura critica inferiore di soluzione (LCST), che può essere definita come la temperatura critica al di sotto della quale il polimero si gonfia mentre al di sopra di essa si contrae: sotto all'LCST prevale il termine entalpico, dovuto al legame idrogeno tra il polimero e le molecole di acqua, e che è responsabile del rigonfiamento; al di sopra domina invece il termine entropico, dovuto alle interazioni idrofobiche, che portano alla contrazione del polimero. Gli idrogel termosensibili positivi presentano invece una temperatura critica superiore di soluzione (UCST) e si contraggono al di sotto di essa.

Per quanto riguarda invece i sistemi controllati dal pH (Figura 5.2C), tra i principali figurano i polielettroliti. Un polielettrolita è una macromolecola in grado di dissociarsi in ioni polimerici quando si dissolve in acqua o in un altro solvente ionizzante. La catena, a causa della repulsione tra le cariche sulla stessa, si espande quando viene ionizzata in un solvente adatto. Tuttavia, se il solvente impedisce la ionizzazione del polielettrolita, la catena disciolta rimane in uno stato compatto e piegato. L'interazione tra l'energia superficiale idrofobica e la repulsione elettro-

statica tra le cariche determina quindi il comportamento del polielettrolita. Poiché il grado di ionizzazione di un polielettrolita debole è controllato dal pH e dalla composizione ionica del mezzo acquoso, i polimeri "intelligenti" cambiano drasticamente la conformazione in risposta a piccoli cambiamenti nel pH dell'ambiente acquoso. Tutti i polimeri sensibili al pH contengono gruppi acidi o basici che accettano o donano protoni in risposta al pH ambientale. Il rigonfiamento di un idrogel aumenta all'aumentare del pH esterno nel caso in cui contenga gruppi debolmente acidi (anionici), ma diminuisce in presenza di gruppi debolmente basici (cationici). Infine, i sistemi a rilascio controllato elettricamente sensibili sono preparati con polimeri che contengono una concentrazione relativamente alta di gruppi ionizzabili: ad esempio, sotto l'influenza di un campo elettrico, gli idrogel elettroresponsivi generalmente o si sgonfiano o si piegano, a seconda della forma e dell'orientamento del gel; in particolare, l'idrogel si piega quando è parallelo agli elettrodi, mentre si sgonfia se risulta perpendicolare ad essi. [30]

5.1.2 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 in maniera costante nel tempo. La somministrazione transdermica di farmaci rappresenta già un'alternativa a quella orale e potrebbe diventarlo anche per quanto riguarda le iniezioni ipodermiche. Presenta, infatti, vari vantaggi rispetto ad entrambe. In particolare viene utilizzata quando è maggiormente marcato l'effetto del passaggio attraverso il fegato, che causa una metabolizzazione prematura dei farmaci somministrati per via orale. Le iniezioni ipodermiche sono invece dolorose, generano rifiuti sanitari pericolosi e comportano il rischio di trasmissione di malattie mediante il riutilizzo dell'ago, soprattutto nei paesi in via di sviluppo. Viceversa i sistemi transdermici non sono invasivi, possono essere auto-somministrati, possono fornire rilasci per lunghi periodi di tempo (fino ad una settimana) e sono generalmente poco costosi; inoltre, permettono di evitare il metabolismo del fegato e sono assolutamente sicuri per quanto riguarda la potenziale trasmissione di malattie.

Il primo sistema transdermico per la somministrazione sistemica fu un cerotto caricato con scopolamina per il trattamento della cinetosi, approvato per l'uso negli Stati Uniti nel 1979. Solo un decennio dopo, i cerotti alla nicotina diventarono un prodotto di largo consumo.

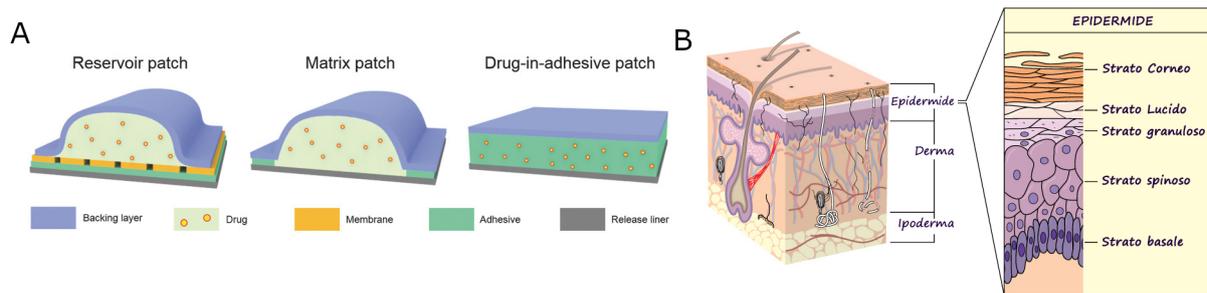


Figura 5.3: A: illustrazione schematica che mostra diversi tipi di *patch* transdermiche;
 B: disegno schematico della pelle umana

In quasi tutti i modelli di cerotti transdermici (Figura 5.3A), il farmaco è conservato in un serbatoio, racchiuso su un lato con un supporto impermeabile e sull'altro con un adesivo, che entra in contatto con la pelle. Alcuni modelli utilizzano farmaci disciolti in un serbatoio liquido o a base di gel, per semplificare le formulazioni e consentire l'uso di esaltatori chimici liquidi, come l'etanolo. Questi design sono generalmente composti da quattro strati: una membrana di supporto impermeabile, un serbatoio del farmaco, una membrana semipermeabile che può fungere da barriera limitatrice di velocità e uno strato adesivo. Altri progetti incorporano il farmaco in una matrice polimerica solida in modo da semplificare la produzione. I sistemi a matrice possono avere tre strati, eliminando la membrana semipermeabile, o solo due strati, incorporando il farmaco direttamente nell'adesivo.

É possibile classificare i sistemi transdermici in tre generazioni di sviluppo. La prima generazione raccoglie la maggior parte dei cerotti transdermici che sono stati finora utilizzati in ambito clinico. I significativi progressi nella tecnologia dei cerotti e l'accettazione da parte del pubblico hanno consentito un aumento del numero di cerotti transdermici di prima generazione presenti sul mercato; tuttavia, l'approccio di prima generazione al rilascio transdermico è limitato principalmente dalla barriera posta dallo strato più esterno della pelle (Figura 5.3B) chiamato strato corneo, che ha uno spessore da 10 a 20 μm . Al di sotto di questo strato si trova l'epidermide vitale, che misura da 50 a 100 μm ed è avascolare. Più in profondità c'è il derma, con uno spessore di 1–2 mm, contenente un ricco letto capillare adatto per l'assorbimento sistemico del farmaco. Un esame più attento della barriera dello strato corneale rivela infatti una struttura del tipo mattoni e malta, dove i mattoni rappresentano cellule corneocitarie non viventi, composte principalmente da cheratina reticolata, e la malta intercellulare è una miscela di lipidi organiz-

zata in gran parte in doppi strati. Il trasporto del farmaco attraverso lo strato corneo comporta tipicamente la diffusione attraverso i lipidi intercellulari seguendo un percorso che si snoda tortuosamente intorno ai corneociti, dove le molecole idrofile viaggiano attraverso le regioni di testa, lipidiche, e le molecole lipofile viaggiano attraverso le code lipidiche. Questa via di trasporto è fortemente vincolata dalla solubilità e dalla diffusività del principio attivo all'interno dei doppi strati lipidici dello strato corneale. Una variazione del cerotto transdermico tradizionale prevede l'applicazione di uno spray liquido, un gel o un'altra formulazione topica sulla pelle che, all'evaporazione o all'assorbimento, può guidare piccoli farmaci lipofili nello strato corneo che, a sua volta, funge da serbatoio del farmaco per il rilascio prolungato nell'epidermide per diverse ore. Ad esempio, i gel di testosterone sono in uso da diversi anni e uno spray transdermico è stato recentemente approvato per la somministrazione di estradiolo.

La seconda generazione si basa sul fatto che il miglioramento della permeabilità cutanea è condizione necessaria per espandere la portata dei farmaci transdermici. Idealmente si dovrebbe aumentare la permeabilità cutanea interrompendo in modo reversibile la struttura dello strato corneo, evitando nel contempo lesioni ai tessuti viventi più profondi. Tuttavia, i metodi di miglioramento sviluppati in questa generazione, come gli esaltatori chimici convenzionali, la ionoforesi e gli ultrasuoni non cavitazionali, si scontrano con la necessità di mantenere un equilibrio tra il raggiungimento di una maggiore diffusione e la protezione dei tessuti più profondi. Di conseguenza, questa generazione di sistemi ha portato ad un avanzamento nella pratica clinica principalmente migliorando il rilascio di piccole molecole per applicazioni localizzate, dermatologiche, cosmetiche e in alcuni casi sistemiche, ma ha avuto un effetto clinicamente scarso sul rilascio di macromolecole.

La terza generazione è destinata invece ad avere un grande impatto perché indirizza i suoi effetti direttamente allo strato corneo. Questo approccio consente una maggiore interruzione della barriera dello strato corneo e quindi un rilascio transdermico più efficace, proteggendo allo stesso tempo i tessuti più profondi. È stato dimostrato, mediante studi clinici sull'uomo, che i nuovi stimolatori chimici, l'elettroporazione, gli ultrasuoni cavitazionali e più recentemente i microaghi, la termoablazione e la microdermoabrasione possono rilasciare efficacemente attraverso la pelle macromolecole, comprese proteine terapeutiche e vaccini. Questi progressi sono stati resi possibili anche grazie allo sviluppo di tecnologie utili a localizzare gli effetti sullo strato corneo e, allo stesso tempo, con il riconoscimento che la sicurezza offerta dalla localizzazione

dovrebbe rendere questi approcci, più aggressivi, clinicamente accettabili. [32]

Capitolo 6

Elettrofilatura

L'elettrofilatura è una delle principali tecniche utilizzate per la realizzazione di membrane porose per il rilascio di farmaci, attraverso cui è possibile ottenere fibre continue di dimensioni micro- e nanometriche interconnesse e dall'elevato rapporto superficie/volume. Inoltre, variando la dimensione delle fibre, è possibile modulare la porosità e la dimensione dei pori stessi. Ciò permette di realizzare supporti con proprietà ad hoc sia per quanto riguarda l'incapsulamento che il rilascio del principio attivo. Tale tecnica, che esiste dall'inizio del XX secolo, venne originariamente brevettata da A. Formhals il quale per primo praticò l'elettrofilatura di una soluzione polimerica per ottenere fibre ultrafini nanometriche e micrometriche. Nel 1980, l'Ufficio brevetti degli Stati Uniti divulgò un altro metodo, l'elettrofilatura a fusione, in cui il polimero viene prima fuso e poi elettrofilato. Questo processo produce fibre che sono 1–2 ordini di grandezza più grandi di quelle ottenute mediante elettrofilatura in soluzione dalle applicazioni più limitate. Ad ogni modo, queste invenzioni hanno gettato le basi per un ulteriore sviluppo e avanzamento delle tecnologie in tale ambito: dall'inizio del XXI secolo, le tradizionali tecnologie di elettrofilatura si sono sviluppate rapidamente in tutto il mondo, sia in ambito accademico che in quello industriale. Nel 2003 è stata proposta una nuova tecnologia di elettrofilatura, che permette di ottenere nanofibre elettrofilate coassiali con struttura core-shell, in cui due diverse soluzioni vengono espulse simultaneamente attraverso un ugello coassiale, consentendo anche l'incapsulamento di diverse sostanze, tra cui farmaci antitumorali. In alternativa alle due soluzioni, si può procedere emulsionando un componente non filabile con una soluzione che può essere elettrofilata.

E' evidente, dunque, che le tecniche di elettrofilatura possono essere molto diverse (Figura 6.1); quella tradizionale prevede l'applicazione di una tensione elevata su una soluzione polimerica per creare un cono di Taylor sulla punta dell'ugello, solitamente un ago smussato. Più

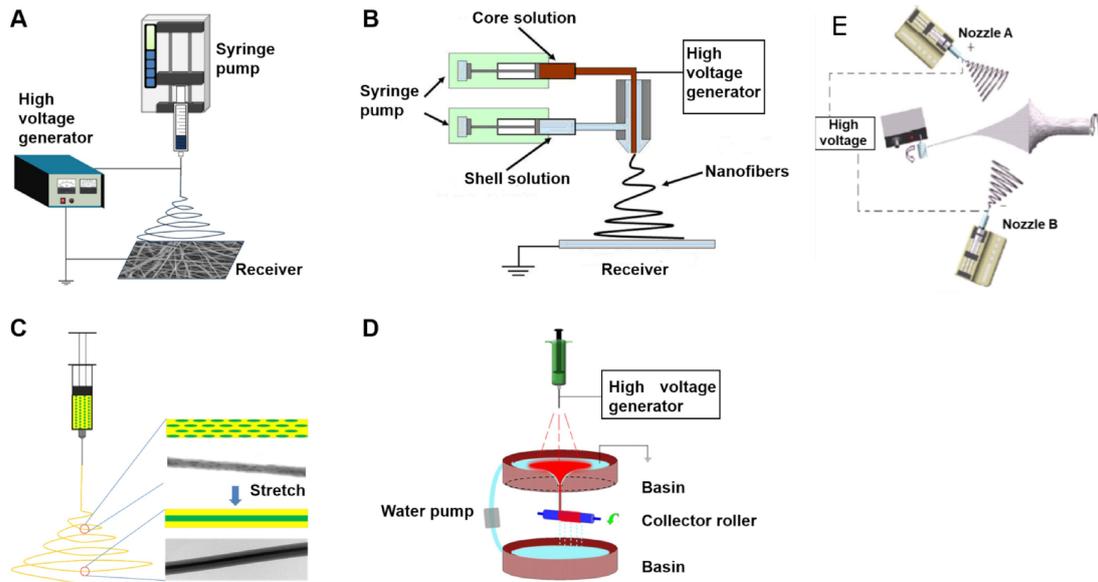


Figura 6.1: Schemi di diverse tecniche di elettrofilatura. **A:** tradizionale; **B:** coassiale; **C:** in emulsione; **D:** dinamica a flusso d'acqua; **E:** a doppio spruzzo

in dettaglio, utilizzando una pompa collegata ad una siringa, per il controllo della portata della soluzione, un getto parte dal cono di Taylor quando la differenza di potenziale tra la soluzione caricata e il collettore supera la tensione superficiale della soluzione stessa. Il getto di liquido crea delle nanofibre che, continuando a viaggiare verso il collettore, si asciugano in seguito all'evaporazione del solvente. A seconda della forma del collettore, è possibile fabbricare strutture nanofibrose membranose o tubolari e l'allineamento delle fibre può essere o meno regolato a seconda della velocità di rotazione del collettore stesso.

Simile all'elettrofilatura tradizionale, l'elettrofilatura coassiale, utilizzata per produrre nanofibre di tipo *core-shell*, prevede un ugello coassiale, contenente due ugelli di diverse dimensioni, con uno che forma un manicotto attorno all'altro. L'ugello con il diametro interno più piccolo trasporta la soluzione del nucleo, mentre l'ugello con il diametro interno più grande trasporta la soluzione del guscio. In questo modo le soluzioni, contenute in serbatoi separati, vengono espulse simultaneamente attraverso l'ugello coassiale e la nanofibra *core-shell* viene creata con lo stesso meccanismo dell'elettrofilatura tradizionale. Un vantaggio di questa tecnica è che solo la soluzione del guscio deve essere filabile, quindi alcuni farmaci non filabili, o altri additivi, possono essere incorporati nella soluzione centrale.

L'elettrofilatura in emulsione crea nanofibre con struttura a guscio a partire però da emulsioni

polimeriche. Questo processo è vantaggioso perché l'emulsione può essere filata da un unico ugello rotante per ottenere la nanofibra con una struttura *multi-core* o *core-shell* senza l'utilizzo di un ugello coassiale. Più in dettaglio, se le goccioline di soluzione vengono inglobate nelle nanofibre, si avrà una struttura *core-shell* mentre se rimangono in forma di goccioline si avrà una struttura *multi-core*.

L'elettrofilatura dinamica a flusso d'acqua è una procedura in cui le nanofibre vengono prima raccolte su una superficie d'acqua, attorcigliate da un vortice d'acqua e successivamente raccolte su un collettore rotante. In questo metodo, vengono utilizzati un bacino d'acqua superiore e uno inferiore. Il primo contiene un piccolo foro alla base, da cui l'acqua può fluire per gravità, formando così un vortice sulla superficie. Le nanofibre vengono filate sulla superficie dell'acqua fluendo attraverso il vortice, si avvolgono in un filo che viene raccolto su un ricevitore rotante, generando un'impalcatura porosa. Rispetto alle membrane elettrofilate tradizionalmente, questi materiali hanno superfici più ruvide, dimensioni dei pori più grandi e porosità più elevate.

Un altro approccio è l'utilizzo di un doppio spruzzo di nanofibre elettrofilate per preparare nanofilati in modo continuo. Un ugello rotante produce nanofibre caricate positivamente attraverso l'applicazione di un'alta tensione positiva e un altro ugello rotante produce nanofibre caricate negativamente attraverso l'applicazione di un'alta tensione caricata negativamente. Questa disposizione si traduce nell'avvolgimento di fibre caricate in modo opposto che vengono raccolte su un imbuto rotante per formare una bobina di nanofilato. [33]

Nonostante la relativa facilità, l'elettrofilatura presenta numerosi parametri che possono influenzare la qualità del prodotto finale. Rispetto al processo, è importante definire la tensione applicata, la portata del polimero e la distanza tra capillare e collettore. La forza del campo elettrico applicato controlla il diametro delle fibre, che può variare da diversi micron a decine di nanometri al diminuire della tensione applicata. L'intensità del campo non ottimale potrebbe portare a difetti nelle fibre filate o addirittura a problemi nella formazione del getto. Esiste una finestra ottimale di intensità di campo elettrico per ogni sistema polimero/solvente, poiché un campo troppo debole o troppo forte porterà alla formazione di fibre in rilievo.

La portata di polimero ha un notevole impatto sulla dimensione della fibra e inoltre ne può influenzare sia la porosità che la forma. Generalmente, il diametro della fibra e la dimensione dei pori aumentano con l'aumentare della portata: a portate elevate le fibre possono presentare diversi difetti, a causa dell'incapacità delle fibre di asciugarsi completamente prima di raggiun-

gere il collettore. L'essiccazione incompleta delle fibre porta anche alla formazione di fibre a nastro (o appiattite), con una morfologia diversa da quella ottimale, che prevede fibre di sezione trasversale circolare.

Sebbene in modo minore, anche la distanza tra la punta del capillare e il collettore può influenzare la dimensione della fibra di 1 o 2 ordini di grandezza: il diametro della fibra, infatti, diminuisce con l'aumentare della distanza.

Oltre ai parametri di processo, anche le caratteristiche della soluzione, come la concentrazione del polimero, la volatilità e la conduttività del solvente, giocano un ruolo importante. Sebbene sia possibile tracciare una serie di relazioni generali tra i parametri di lavorazione e la morfologia della fibra, è importante sottolineare che la relazione esatta sarà diversa per ciascun sistema polimero/solvente. Modificando le caratteristiche della soluzione, è possibile ottenere risultati molto diversi utilizzando lo stesso polimero e la stessa configurazione di elettrofilatura. Detto questo, ci sono tendenze generali utili per determinare le condizioni ottimali per un certo sistema.

Più in dettaglio, la concentrazione del polimero determina la filabilità di una soluzione, influenzando sia la viscosità che la tensione superficiale della soluzione, parametri molto importanti nel processo di filatura. Se la soluzione è troppo diluita, la fibra polimerica si romperà in goccioline prima di raggiungere il collettore a causa degli effetti della tensione superficiale. Invece, se la soluzione è troppo concentrata, le fibre non si possono formare a causa dell'elevata viscosità che rende difficile il controllo della portata della soluzione attraverso il capillare. Pertanto, esiste un intervallo ottimale di concentrazioni in cui le fibre possono essere elettrofilate quando tutti gli altri parametri sono mantenuti costanti. All'interno di tale intervallo il diametro della fibra aumenta con l'aumentare della concentrazione.

La scelta del solvente, oltre a influenzare la porosità delle fibre, è fondamentale affinché la filatura possa avvenire; infatti, per far sì che si abbia la completa evaporazione del solvente prima che la fibra raggiunga il collettore, è necessario utilizzare un solvente sufficientemente volatile. Mentre il getto di fibre viaggia verso il collettore, si verifica una separazione di fase prima che le fibre polimeriche solide siano depositate, processo che è fortemente influenzato dalla volatilità del solvente. Questa separazione di fase, facilitata quando il non solvente in fase vapore penetra nella soluzione polimerica, risulta tuttavia ridotta per solventi troppo volatili.

Anche la conducibilità della soluzione, pur giocando un ruolo minore, può influenzare la dimen-

sione della fibra di 1-2 ordini di grandezza. Le soluzioni con elevata conduttività avranno una maggiore capacità di carico rispetto alle soluzioni con bassa conduttività. Pertanto, il getto di fibra di soluzioni altamente conduttive sarà sottoposto a una forza di trazione maggiore, rispetto a un getto di fibra da una soluzione a bassa conduttività, in presenza del medesimo campo elettrico (è stato infatti dimostrato che il raggio del getto di fibra è inversamente correlato alla radice cubica della conducibilità della soluzione). Soluzioni altamente conduttive sono estremamente instabili in presenza di forti campi elettrici e danno luogo a fibre dalla distribuzione particolarmente ampia. Viceversa, liquidi semiconduttori e isolanti come l'olio paraffinico producono fibre relativamente stabili.

La capacità di regolare le dimensioni delle fibre è uno dei punti di forza dell'elettrofilatura. Le fibre con diametri nanometrici imitano le dimensioni delle proteine fibrose presenti nella matrice extracellulare naturale (ECM), come il collagene. Questa capacità imitativa è vitale perché la dimensione della struttura gioca un ruolo importante nella proliferazione cellulare e l'adesione stessa è determinata dalla topografia del supporto. Inoltre, i tappetini nanofibrosi sono caratterizzati da un elevatissimo rapporto superficie/volume, il che li rende ideali per favorire l'adesione cellulare. Anche la porosità dei tappetini elettrofilati gioca un ruolo chiave, in quanto deve essere sufficientemente elevata ed interconnessa per permettere prima l'infiltrazione da parte delle cellule, ed in un secondo momento il passaggio dei nutrienti e lo smaltimento dei prodotti di scarto. Infine, i tappetini nanofibrosi, sempre grazie all'elevato rapporto superficie/volume, sono in grado di incapsulare maggiori quantità di farmaco rispetto ad altri sistemi a rilascio controllato. [34]

Parte II

Parte Sperimentale

Capitolo 7

Scopo

Ad oggi, tra le principali sfide che la biomedicina è chiamata ad affrontare figura la necessità di superare i numerosi limiti legati alle metodologie convenzionali di cura del paziente, e di poter somministrare farmaci e principi attivi in maniera controllata e mirata. In questo senso, è necessario sviluppare non solo nuove biomolecole più efficaci dal punto di vista terapeutico, ma anche studiare nuove modalità di somministrazione, variabili a seconda del trattamento richiesto, e che limitino quanto più possibile eventuali effetti collaterali. La progettazione del dispositivo di rilascio riveste dunque un ruolo chiave. Attualmente, nell'ampio spettro dei biomateriali utilizzati per applicazioni biomedicali, i biopolimeri di derivazione naturale vengono già ampiamente utilizzati per la fabbricazione di medicazioni per ferite e come sistemi per il rilascio controllato di farmaci, a causa della loro disponibilità, della loro possibilità di essere facilmente modificabili per via chimica, nonché della loro potenziale biodegradabilità e biocompatibilità. In questo quadro, gli scarti di cheratina sono un'importante fonte di biopolimeri grezzi, che possono essere ottenuti, ad esempio, dallo smaltimento di sottoprodotti dell'industria tessile, da lana non adatta alla filatura o da scarti dell'industria casearia e della carne. In particolare, la cheratina di origine animale è una proteina strutturale fibrosa caratterizzata da un elevato numero di residui di cistina e, in modo simile al collagene, contiene sequenze di adesione cellulare, quali arginina-glicina-acido aspartico (RGD) e leucina-acido aspartico-valina (LDV), che mimano i siti di attacco cellulare funzionali alla crescita di fibroblasti e cheratinociti. Inoltre, grazie alla sua struttura primaria, composta da amminoacidi sia idrofili che idrofobi, la cheratina è in grado di trasportare diversi tipi di sostanze con caratteristiche sia idrofiliche che idrofobiche, cariche negativamente o positivamente, rendendola particolarmente interessante per applicazioni nell'ambito di rilascio controllato di farmaci. Tuttavia, il suo peso molecolare relativamente basso e l'elevata fragilità, che ne rende molto difficile la processabilità, ne limitano notevolmente la

gamma di applicazioni. Per ovviare a questi inconvenienti la miscelazione della cheratina con polimeri rappresenta senza dubbio una strategia dall'enorme potenziale.

Una classe di polimeri particolarmente interessante è quella dei poliesteri alifatici, in quanto biocompatibili, facilmente processabili e lavorabili in forme anche complesse e dalle proprietà variabili e modulabili a seconda dell'applicazione richiesta. In particolare, il poli(butilene succinato), PBS, che ha recentemente ottenuto l'approvazione dalla FDA (*Food and Drug Administration*), ha riscosso una ingente attenzione sia dal punto di vista accademico che industriale, in quanto biodegradabile, compostabile (secondo normativa DIN EN 13432), caratterizzato da buona stabilità termica e da un'ampia finestra di lavorabilità, tra le più alte all'interno della classe dei poliesteri alifatici. Esistono già alcuni produttori industriali di PBS a base biologica come la PTT MCC Biochem Co. (Thailandia) e la Mitsubishi Chemical Performance Polymers (USA).

Per quanto riguarda la tipologia di dispositivo di rilascio, di particolare interesse risultano le nanofibre ed i supporti nanofibrosi, con cui è possibile realizzare sistemi transdermici per il trattamento locale e/o sistemico di diverse patologie. I vantaggi attribuiti alle nanofibre rispetto ai tradizionali sistemi transdermici di rilascio di farmaci includono un ampio rapporto superficie-volume, grande porosità, condizioni di simulazione della matrice extracellulare e, d'altra parte, la capacità di controllare la velocità di rilascio del farmaco. In particolare, il processo di elettrofilatura è stato riconosciuto come quello più efficace per realizzare nanofibre, in termini di progettazione dei materiali, velocità di produzione, scalabilità e costi. Questa tecnologia, infatti, permette di processare un'ampia varietà di polimeri comprese le loro miscele e soluzioni composite, assicurando inoltre un'elevata efficienza di incapsulamento dei farmaci.

In tale contesto si inserisce il presente lavoro di Tesi, svolto presso i laboratori ISOF (Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività) del CNR di Bologna e presso i laboratori del Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali (DICAM) dell'Università di Bologna, che ha avuto come scopo quello di realizzare miscele e membrane elettrofilate a base di PBS e cheratina a diversa composizione, e di valutare l'effetto della composizione sulle proprietà chimico-fisiche delle membrane elettrofilate e sulla cinetica di rilascio di farmaci.

Più in dettaglio, dopo un attento studio della letteratura di riferimento, per prima cosa si è proceduto a valutare l'effetto del solvente (1,1,1,3,3,3-esaffluoro-2-propanolo, HFIP) sulla cheratina, osservando la distribuzione dei pesi molecolari della cheratina pura e di quella rigenerata post

elettroforesi. È stata quindi effettuata un'analisi del comportamento reologico delle miscele di cheratina e PBS, in tre rapporti in peso (70/30, 50/50 e 30/70), e si è quindi proceduto alla loro elettrofilatura. I tappetini elettrofilati sono stati caratterizzati mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) e quindi sottoposti ad analisi termiche (TGA e DSC) e a prove meccaniche (trazione e adesione). Sono state quindi condotte delle prove di rilascio su membrane contenenti rodamina, una molecola modello, utilizzate per simulare il comportamento del farmaco. Infine, tali membrane sono state analizzate tramite spettroscopia infrarossa (FTIR), sia prima che dopo il rilascio, per osservare eventuali variazioni compositive.

Capitolo 8

Materiali e Metodi

8.1 Elettroforesi

L'elettroforesi è un metodo analitico in cui le separazioni si basano sulla diversa mobilità di due o più analiti carichi (composti ionici), trattenuti in un mezzo conduttore, sotto l'influenza di un campo elettrico applicato a corrente continua. In elettroforesi il movimento avviene verso l'elettrodo di carica opposta rispetto a quella della particella o ione da separare: i cationi si muovono verso l'elettrodo negativo (il catodo), gli anioni verso l'elettrodo positivo (l'anodo). È importante notare che le specie neutre non si muovono sotto l'influenza del campo elettrico, sebbene possano diffondersi dalla posizione di carico o essere trasportate dal flusso elettroosmotico.

La velocità di migrazione di qualsiasi particella carica in un campo elettrico può, nella sua forma più semplice, essere considerata come la somma vettoriale di una forza motrice (la forza elettrica) e di qualsiasi forza di resistenza o di aiuto. Qualsiasi ione, composto o corpo che trasporta una carica complessiva a un dato valore di pH si sposterà in soluzione in condizioni appropriate. In soluzioni semplici, gli ioni si muoveranno liberamente verso l'elettrodo di carica opposta e il prodotto della carica sullo ione e il campo elettrico applicato (E) fornisce la forza elettrica sperimentata dallo ione. Tuttavia, poiché anche un semplice ione può essere considerato come una particella, questo movimento è contrastato da una resistenza di attrito data dalla legge di Stokes. Si può giungere ad un'equazione per determinare teoricamente la velocità migratoria di una specie carica:

$$v = \frac{qE}{6\pi r\eta}$$

dove q è la carica totale dello ione, η la viscosità del mezzo ed r il raggio della molecola.

Una specie piccola e altamente carica, ad esempio uno ione, avrà un'elevata mobilità mentre un composto ionizzabile di grandi dimensioni, come una proteina, avrà una bassa mobilità. È chiaro che l'elettroforesi può separare facilmente specie ioniche grandi e piccole. Quindi, per due o più specie ioniche strettamente correlate, se i descrittori di base usati sono noti, dovrebbe essere semplice calcolare le condizioni di separazione e il grado di risoluzione che può essere ottenuto. La carica su una molecola ionizzabile, come un amminoacido, è determinata dal pH del mezzo elettroforetico. Sarà anche nota con precisione la viscosità del mezzo ad una data temperatura. La difficoltà da un punto di vista predittivo teorico è determinare il raggio di una molecola. È anche chiaro che la distanza percorsa è proporzionale alla tensione applicata e al periodo di tempo in cui viene applicata. Le forze di resistenza non sono solo dovute al "semplice" attrito ma possono anche includere effetti come: dimensione e forma della molecola, concentrazione di elettroliti, solubilità, adsorbimento alle superfici, complessazione con specie nella soluzione elettrolitica.

Le due equazioni elettriche di base che governano l'elettroforesi sono la prima legge di Ohm ($V = iR$, dove i è la corrente e R è la resistenza) e la potenza, ovvero il prodotto di corrente e tensione o, in alternativa, il calore generato, che è dato da $W = Ri^2$ dove W è la potenza misurata in watt. Questo effetto di riscaldamento è chiamato riscaldamento Joule. La quantità di calore generata dipende dal tempo. Lo sviluppo di gradienti di calore nell'elettroforesi porta a: correnti di convezione, ampliamento diffusivo/termico, evaporazione, cambiamenti di viscosità, variazioni di pH e degradazione termica degli analiti, in particolare proteine e matrici.

Tutti questi cambiamenti si traducono in un ampliamento della banda e in una minore risoluzione degli analiti separati. Il calore può anche causare l'essiccazione dei gel, l'ebollizione dei tamponi e in situazioni estreme persino incendi. L'effetto dei processi di riscaldamento sulle separazioni elettroforetiche è complesso e spesso variabile. Tradizionalmente, si contrastano questi effetti utilizzando tamponi che generano correnti basse, ad esempio soluzioni tampone diluite, tamponi a bassa conduttività, operando a basse tensioni (100-500 V), operando in modalità di corrente costante o di potenza costante e, naturalmente, utilizzando sistemi di raffreddamento esterni, come la circolazione dell'acqua fredda intorno allo strumento.

Le proteine mostrano notevoli differenze nei loro rapporti complessivi carica-massa. A seconda del pH, la loro carica può variare da cationica ad anionica e da idrofobica a idrofilica, e la loro forma può variare da globulare a lineare con vari gradi di reticolazione. L'introduzione



Figura 8.1: Set per elettroforesi. A sinistra: cella di elettroforesi Tetra Mini-PROTEAN. A destra: alimentatore di base PowerPac™ (Bio-Rad)

dell'elettroforesi in presenza di sodio dodecil solfato (SDS), un tensioattivo anionico utilizzato per solubilizzare le proteine che prima denatura e poi si lega alla dorsale idrofobica delle proteine, ne permette una loro analisi. Il tipo ed il grado di denaturazione possono essere migliorati utilizzando soluzioni di SDS che contengono urea e/o un tiolo. Il complesso ora è più o meno lineare con una carica complessiva negativa, quindi tutte le proteine migrano in un'unica direzione. Le proteine così denurate vengono sottoposte ad elettroforesi mediante gel di poliacrilammide (PAGE) in un sistema tampone che incorpora SDS. Eseguendo una serie di standard noti in una corsia parallela, la tecnica può essere utilizzata per ottenere informazioni sul peso molecolare in quanto esiste una relazione fissa fra la distanza di migrazione relativa del complesso proteina-SDS e il peso molecolare della proteina pura. [35]

La cheratina rigenerata da 1,1,1,3,3,3-esfluoro-2-propanolo, HFIP, (KER-HFIP) è stata preparata sciogliendone, pura, in HFIP una quantità tale per ottenere una concentrazione del 1 % w/v e quindi lasciata sotto agitazione per tutta la notte. Successivamente, la soluzione è stata colata in uno stampo posto quindi per 24 ore in forno a 40 °C per permettere l'evaporazione del solvente.

La distribuzione dei pesi molecolari, sia della cheratina pura che di quella rigenerata, viene determinata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE) utilizzando, come in Figura 8.1, una cella di elettroforesi verticale Tetra Mini-PROTEAN (Bio-Rad). I campioni sono stati sciolti in una soluzione di tampone Tris(idrossimetil)-aminometano - acido cloridrico (Tris-HCl, 500 mM, pH 8,6) contenente

ditiotreitolo (DTT, 140 mM) e urea (8M) per ottenere una concentrazione di 10 mg/mL. Entrambe le soluzioni di cheratina, separatamente, sono state aggiunte al 2xLaemmli sample buffer (Bio-Rad) in rapporto 1:1 e fatte bollire a 90 °C per 5 minuti per denaturare la proteina. La separazione è stata eseguita in un gel con gradiente 4 - 20% (Bio-Rad) a 200 V per 45 minuti. Al termine della separazione il gel è stato risciacquato con acqua ultrapura e colorato con la soluzione di colorazione Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad) per una notte. La decolorazione è stata eseguita, per una notte, in acido acetico diluito (5%).

8.2 Reologia

La viscosità delle soluzioni è stata analizzata mediante un reometro Anton Paar MCR 102, dotato di un dispositivo per il controllo della temperatura (PDT 200/56/1, Peltier) impostato alla temperatura di 25 ($\pm 0,1$) °C, utilizzando una geometria di tipo piatto-cono (75 mm diametro, angolo di 1° e 45 μ m troncamento) e con velocità di deformazione controllata. Il gradiente di scorrimento ($\dot{\gamma}$) ad ogni raggio (r), è dato dal rapporto tra la velocità del piatto in movimento (Ω) e la distanza tra i piatti (h):

$$\dot{\gamma} = \frac{\Omega r}{h} \approx \frac{\Omega r}{r\alpha} = \frac{\Omega}{\alpha}$$

dove α è l'angolo del cono. Il gradiente di scorrimento è uniforme in tutto il campione, rendendo possibile il calcolo della viscosità che è il rapporto tra lo sforzo tangenziale (F/A) ed il gradiente di scorrimento (v/h):

$$\eta = \frac{F h}{A v}$$

Inoltre lo sforzo tangenziale può essere descritto come:

$$\frac{F}{A} = \frac{3M}{2\pi R^3}$$

dove M è il momento di coppia ed R il raggio del piatto. L'equazione della geometria cono-piatto diventa dunque:

$$\eta = \frac{3M\alpha}{2\pi R^3 \Omega}$$

e fornisce con ottima approssimazione la viscosità di un fluido purché l'angolo del cono sia sufficientemente piccolo (in genere $\alpha < 5$). [5]

Le miscele di cheratina e PBS sono state preparate sciogliendo i due polimeri, separatamente, in HFIP, lasciandoli in agitazione tutta la notte e quindi unendoli. La concentrazione dei due polimeri è del 13% w/v, sia uniti che separati, e il rapporto in peso tra i due varia in base alla miscela analizzata (KER/PBS 30/70, 50/50, 70/30). Sono state preparate anche soluzioni, sempre al 13% w/v, di sola cheratina e solo PBS.

8.3 Elettrofilatura membrane

Le membrane contenenti PBS e cheratina sono state elettrofilate mediante un apparato di elettrofilatura costituito da un generatore di tensione ad alto voltaggio (± 30 kV, 5 mA) SVH150, AlintelPowerElectronics (Italia), una siringa dotata di ago di diametro variabile tra 0,2 e 1,5 mm, contenente la soluzione polimerica da elettrofilare, una pompa per infusione KDS200, KD ScientificInc. (USA) ed un collettore metallico in acciaio inossidabile, collegato a terra, su cui vengono depositate le nanofibre.

Le soluzioni da elettrofilare sono state preparate prima sciogliendo separatamente PBS e cheratina in HFIP, lasciandole in agitazione per tutta la notte, e quindi unendo le due soluzioni. Le miscele polimeriche risultanti sono state lasciate in agitazione per almeno un'ora. Le membrane contenenti rodamina sono state preparate sciogliendone la quantità desiderata in HFIP (3% in peso rispetto al peso totale dei due polimeri) e aggiungendo tale soluzione alla cheratina. La soluzione è stata poi lasciata in agitazione per tutta la notte, coperta con carta stagnola per evitarne l'esposizione alla luce. La soluzione di PBS è stata preparata come descritto precedentemente. Dopo l'unione delle soluzioni è stata garantita un'agitazione per almeno un'ora, con la soluzione mantenuta anche in questo caso coperta con carta stagnola. La concentrazione di cheratina e PBS, sia in presenza che in assenza di rodamina, è del 13% w/v, sia nelle soluzioni di partenza che in quella finale, mentre i rapporti in peso tra i due componenti variano in base alla membrana analizzata (KER/PBS 30/70, 50/50 e 70/30).

Le soluzioni finali sono state quindi caricate in una siringa da 5 mL che presenta un ago di 0,8 mm, posto a 18 cm dal collettore. Il flusso applicato dalla pompa è di 0,03 mL/min mentre il campo applicato è di 18 kV.

8.4 Morfologia membrane

8.4.1 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

La peculiarità dei microscopi elettronici rispetto a quelli ottici è l'impiego di radiazioni provenienti da elettroni, anziché da fotoni, caratterizzati da una lunghezza d'onda minore. Ciò permette di ottenere immagini con risoluzione molto più alta e, quindi, l'osservazione di dettagli dalle dimensioni anche inferiori al nanometro. La struttura del sistema SEM è così schematizzabile: un generatore di elettroni, detto cannone elettronico, all'interno del quale un filamento in tungsteno, portato ad un elevato potenziale, si riscalda per effetto Joule, libera elettroni che vengono a loro volta accelerati verso il basso dove è presente il campione. Al fine di focalizzare gli elettroni verso il basso, evitando che si disperdano 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, inviando contemporaneamente al sistema esterno di elaborazione il segnale corrispondente al fascio incidente su ogni porzione di superficie del campione. Altre quattro bobine di correzione servono per omogeneizzare il campo magnetico e mantenerne, con un sistema di controllo in retroazione, la simmetria cilindrica. Prima e dopo tali bobine, il fascio incontra una serie di lenti collimatrici, che servono a focalizzare il fascio stesso e ad aumentare la luminosità finale dell'immagine. L'interno del tubo elettronico appena descritto, è posto, tramite apposite pompe da vuoto, a pressioni molto basse (10^{-4} mmHg). Il fascio di elettroni investe il campione, posto su un supporto mobile, per poi colpire una serie di lenti che lo proiettano su un primo schermo fluorescente, che converte il segnale elettronico in luce visibile, generando così la cosiddetta immagine intermedia, ed in seguito su un secondo schermo, dal quale si ottiene l'immagine finale all'ingrandimento desiderato, visualizzabile su uno schermo digitale.

La morfologia delle nanofibre elettrofilate è stata studiata mediante il microscopio elettronico a scansione (SEM) Zeiss EVO LS 10 LaB6, con una tensione di accelerazione di 5 kV e una distanza di lavoro di 4,3 mm e 5,2 mm. I campioni sono stati spruzzati con oro per 1 minuto prima dell'analisi. I diametri delle fibre sono stati ottenuti utilizzando il software GIMP 2.10 (GNU Image Manipulation Program). In particolare, il diametro medio e la distribuzione del diametro delle nanofibre sono stati valutati da 135 misurazioni raccolte casualmente da diverse immagini SEM dello stesso campione. Tutte le analisi matematiche delle distribuzioni dei

diametri sono state eseguite con il software Origin Plus.

8.5 Caratterizzazione termica

8.5.1 Analisi termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica è una tecnica dalla quale è possibile ricavare informazioni sulla stabilità termica del campione, sulla sua cinetica di decomposizione e sul suo comportamento durante determinati processi termici. Tali informazioni sono di fondamentale importanza, ad esempio, per definire il valore di temperatura che non deve essere oltrepassato durante la lavorazione del polimero, al fine di non incorrere nella sua degradazione. Il principio di funzionamento consiste nel riscaldamento controllato del campione, in presenza di un'atmosfera controllata (aria, O₂, N₂), e nella valutazione della sua progressiva perdita di peso in funzione dell'aumento di temperatura. Le variazioni di peso sono dovute a perdite di sostanze volatili in seguito a processi fisici o chimici che modificano la natura del composto: nel caso dei polimeri, i prodotti di decomposizione più comuni saranno anidride carbonica e acqua. La strumentazione è composta da una bilancia analitica (dalla portata in genere compresa tra 5 e 20 mg), un forno in grado di riscaldare il campione a velocità controllata, un sistema di gas di spurgo per assicurare un'atmosfera controllata e da un elaboratore per il controllo dello strumento, l'acquisizione e la visualizzazione dei dati. Da un termogramma è possibile ricavare: la temperatura in corrispondenza della quale inizia il processo di degradazione (T_{onset}) e la temperatura alla quale si rileva la massima velocità di perdita di peso (T_{max}).

Le analisi TGA sono state ottenute usando la bilancia termo gravimetrica PerkinElmer TGA 4000, in atmosfera di azoto (flusso di 40 ml/min) partendo da circa 5 mg di campione. La velocità di riscaldamento impostata è di 10 °C/min e la temperatura varia nell'intervallo 40 - 800 °C.

8.5.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

La calorimetria a scansione differenziale (DSC, *differential scanning calorimetry*) è una delle indagini termiche maggiormente utilizzate per ottenere informazioni legate alle proprietà termodinamiche di un materiale. Il principio di base di questa tecnica consiste nel riscaldare o raffreddare in maniera controllata il materiale di interesse, misurando, al contempo, la differen-

za di flusso termico tra il campione in esame e quello di riferimento mentre i due sono sottoposti ad un ciclo termico prestabilito. La strumentazione è costituita da due piatti dedicati all'alloggiamento di altrettante capsule, l'una contenente il campione, l'altra il riferimento, costituito da una capsula vuota. Gli alloggiamenti costituiscono dei microcalorimetri, mantenuti in atmosfera inerte con un flusso continuo ed uniforme di azoto. Il flusso di calore viene regolato e controllato tramite un computer, in modo tale che le due celle siano sottoposte in ogni istante al medesimo programma termico. Quando avvengono delle transizioni nel materiale analizzato, e quindi il crogiuolo contenente il campione si trova ad una temperatura diversa rispetto al riferimento, viene immediatamente fornita energia al microcalorimetro, in modo da riportare il campione e il riferimento alla stessa temperatura. Queste variazioni di energia sono registrate dal software e risultano essere il vero e proprio segnale DSC.

Con questo tipo di analisi si possono valutare, ad esempio, le temperature di transizione vetrosa, di fusione, di cristallizzazione ed i calori associati a tali transizioni. In particolar modo, la temperatura di transizione vetrosa (T_g) si manifesta come una variazione endotermica della linea di base ed il suo valore è determinato in corrispondenza della metà della variazione di calore specifico associata alla transizione. L'entità della variazione di calore specifico associata alla transizione vetrosa (Δ_{cp}), proporzionale alla componente amorfa presente nel materiale, è pari alla distanza verticale tra le linee di base estrapolate alla T_g . Per quanto riguarda invece il fenomeno della fusione, esso si presenta nel tracciato come un picco endotermico; la temperatura di fusione (T_m) corrisponde all'ascissa di tale picco, mentre l'area sottesa rappresenta il calore di fusione (ΔH_m), che sarà tanto più grande quanto più alto è il grado di cristallinità del materiale. Il rapporto tra quest'ultima grandezza e il calore di fusione del polimero completamente cristallino costituisce il grado di cristallinità del materiale.

Le misure DSC sono state ottenute con un DCS6 Perkin-Elmer equipaggiato di accessori per il raffreddamento a temperature minori di 0 °C e calibrato con standard ad elevata purezza. La capsula 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:

- prima scansione: riscaldamento da -70 °C a 380 °C a velocità di 20 °C/min, mantenimento a 380 °C per 4 minuti;
- raffreddamento rapido (velocità di 100 °C/min) fino a -70 °C e mantenimento a -70 °C

per 15 minuti;

- seconda scansione: riscaldamento in condizioni di temperatura e velocità analoghe alla prima scansione.

8.6 Caratterizzazione meccanica

Le misure di resistenza meccanica permettono di studiare il comportamento dei materiali in presenza di sollecitazioni meccaniche di diverso tipo. In particolar modo, quando si vuole indagare la resistenza di un materiale alla trazione, vengono eseguite prove tensili. Le proprietà meccaniche di un materiale si deducono dal grafico sforzo-deformazione, in cui viene registrata la tensione esercitata sul materiale in funzione della deformazione subita. Più precisamente, si definisce lo sforzo (σ) come il rapporto tra il carico applicato in direzione normale (N) e l'area della sezione del provino resistente a riposo (A):

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

La deformazione, (ϵ), indica l'allungamento subito dal provino (Δl), rapportato alla lunghezza iniziale (l_0):

$$\epsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$$

La strumentazione con cui si effettuano tali prove è costituita da un dinamometro schematizzabile in alcuni sottocomponenti: una base rigida con aggancio rigido, due aste laterali di sostegno, una traversa orizzontale con aggancio superiore che può spostarsi verticalmente lungo le barre laterali, un attuatore meccanico che controlla il moto della struttura superiore, un pannello di controllo e un visualizzatore a video.

Generalmente è possibile individuare, sul grafico sforzo-deformazione, due regioni distinte: il campo elastico e quello plastico, al superamento del punto di snervamento (o *yielding*). Il punto finale della curva coincide con il momento in cui il materiale si rompe. Il campo elastico è contraddistinto da un tratto lineare, approssimabile ad una retta. Tensione e deformazione sono direttamente proporzionali, ed il fattore di proporzione che li lega è il modulo elastico (E) o modulo di Young, in accordo con la legge di Hooke:

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

Se il materiale viene deformato all'interno della zona lineare, non presenterà nessun tipo di deformazione irreversibile al termine dell'applicazione del carico; questa condizione si verifica se il valore di tensione applicata rimane al di sotto di un determinato valore limite (limite di snervamento). Oltre tale punto, il materiale manifesta una deformazione plastica, irreversibile, che cresce all'aumentare del carico applicato, causata dallo scorrimento dei piani reticolari all'interno del materiale. Se si scarica il provino una volta che è stato snervato, il grafico percorrerà a ritroso una retta parallela al tratto lineare, che parte dal punto di rilascio del carico; l'intersezione tra tale retta e l'asse delle ascisse è la deformazione residua, che ci dà informazioni su quanto il materiale si è snervato. Oltre il punto di snervamento si entra, quindi, nella regione plastica, caratterizzata da una grande deformazione per piccoli incrementi di tensione. In questa zona, il provino manifesta un restringimento della sua sezione all'aumentare dello sforzo applicato. All'aumentare del carico, si giungerà infine al punto di rottura. Studiando l'area sottesa all'intero grafico, è possibile ricavare anche il valore della tenacità, che coincide con l'energia necessaria per portare a rottura il materiale o, in altre parole, l'energia che il campione assorbe prima di rompersi. Occorre tenere presente che i dati ottenuti, oltre ad essere funzione del materiale utilizzato nel test, risentono anche delle condizioni ambientali, quali temperatura e umidità, e delle condizioni sperimentali, come velocità di scorrimento, forma e dimensione dei provini.

Le prove meccaniche sono state condotte utilizzando un dinamometro Instron 5966 con cella di carico di 10 KN. Lo strumento è costituito da una struttura rigida di base e una traversa mobile posta nella parte superiore. A partire dagli *scaffold* polimerici a base di PBS e della miscela KER/PBS 50/50, sono state ottenute striscioline rettangolari dalle dimensioni di 5x50 mm, il cui spessore è stato misurato in tre punti diversi per mezzo di un micrometro (Mitutoyo): lo spessore utilizzato ai fini dell'analisi è stato ottenuto operando una media sulle tre misure. I provini sono stati dunque 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 (Figura 8.2A); 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. Tali prove sono state condotte a temperatura ambiente, su 6 provini diversi, con

velocità pari a 10 mm/min. Il modulo elastico, calcolato dalla pendenza del tratto iniziale della curva sforzo-deformazione ottenuta, è stato riportato come valore medio \pm deviazione standard delle 6 prove.

Studi di adesione sono stati condotti sugli *scaffold* ottenuti da solo PBS e dalla blend KER/PBS 50/50, utilizzando una membrana di acetato di cellulosa per simulare il comportamento della pelle umana. Più in dettaglio, per ogni materiale (sia tappetini elettrofilati che membrane di acetato di cellulosa) sono state ricavate striscioline rettangolari dalle dimensioni di 5x50 mm. Tali striscioline sono state immerse in acqua distillata per un minuto, al fine di simulare al meglio le caratteristiche di umidità della pelle umana, quindi tamponate con carta da filtro, e fatte aderire tra loro per un tratto di lunghezza pari a 2 cm. I provini così ottenuti sono stati agganciati agli afferraggi (Figura 8.2B), ed è stata applicata una velocità di stiramento costante e pari a 10 mm/min. Le prove sono state condotte a temperatura ambiente, su 6 provini diversi, ed è stato misurato il valore medio di *shear stress* (σ_s) derivato dalle 6 prove, dove σ_s corrisponde al valore massimo di tensione raggiunto prima che le striscioline di *scaffold* e di acetato di cellulosa si staccino tra loro. Le stesse prove sono state condotte anche in condizioni asciutte: i provini sono stati preparati mediante la procedura sopra descritta, ma prima di procedere con le misure dello *shear stress* essi sono stati lasciati riposare in essiccatore fino a completa asciugatura.

8.7 Rilascio controllato di farmaco

A partire dalle membrane contenenti rodamina (KER/PBS 70/30 e 50/50), sono stati ottenuti dei campioni quadrati di dimensione 1,5x1,5 cm. Questi, dopo essere stati pesati, sono stati posti in provette con 6 mL di tampone fosfato a pH 7,4 e mantenuti alla temperatura di 37 °C in stufa. Dal t_0 sono stati effettuati dei prelievi di 100 μ L di soluzione a tempi prestabiliti. Ad ogni prelievo è stata aggiunta una pari quantità di tampone fosfato per mantenere il volume costante all'interno della provetta.

La soluzione prelevata è stata diluita in 900 μ L di tampone fosfato a pH 7,4 ed analizzata mediante spettroscopia UV-Vis (Agilent Technologies Cary Series UV-Vis Spectrophotometer). La concentrazione di rodamina in soluzione è stata determinata attraverso l'impiego di una retta di taratura, misurando l'assorbanza a 555 nm. Dalla concentrazione di rodamina in soluzione si ricava la frazione in peso rilasciata rispetto al peso totale presente all'interno del campione.

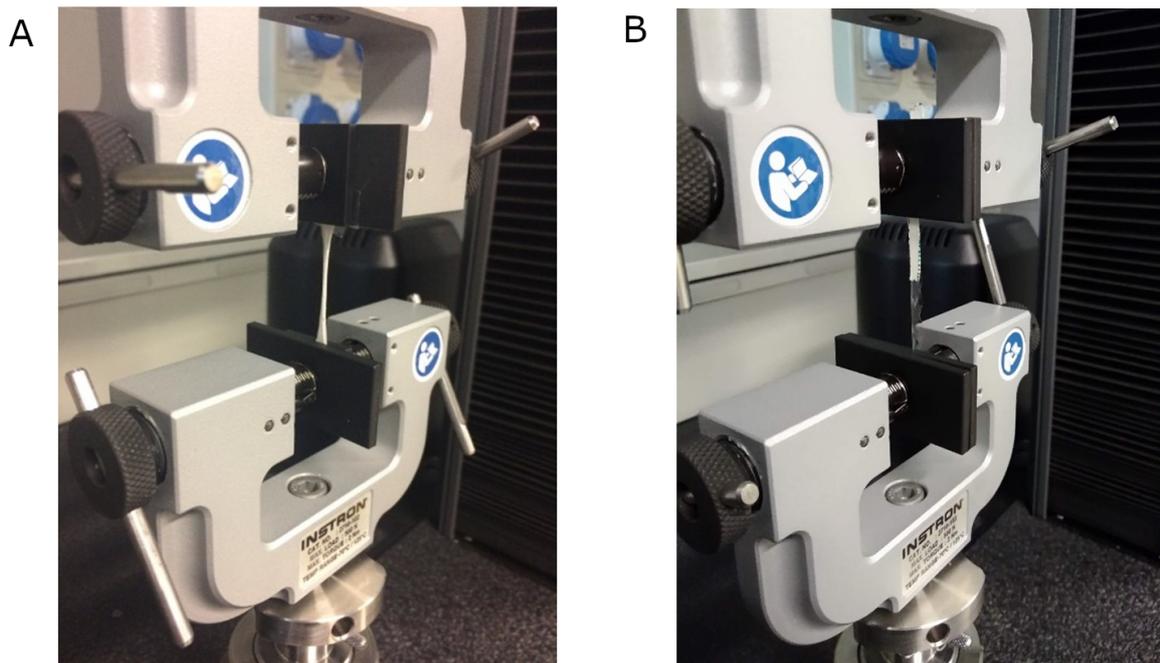


Figura 8.2: Provino sottoposto a prova a trazione (A) ed a misure di shear stress (B)

8.8 Spettroscopia infrarossa (FTIR)

La spettroscopia infrarossa IR è una tecnica spettroscopica che si basa sull'interazione fra una radiazione elettromagnetica e la materia, generalmente utilizzata in chimica analitica ed in chimica fisica per la caratterizzazione dei materiali e lo studio dei legami chimici. Si tratta di una spettroscopia di vibrazione, dal momento che quando una molecola viene investita da una radiazione infrarossa con frequenza compresa fra 10000 e 100 cm^{-1} , a causa dell'energia ceduta dalla radiazione passa da uno stato vibrazionale fondamentale ad uno eccitato. Tale energia può essere di stiramento (*stretching*), se la vibrazione avviene lungo l'asse di legame, con conseguente variazione della distanza di legame, oppure di piegamento (*bending*), che si verifica in corrispondenza di variazioni dell'angolo di legame, sia lungo il piano su cui giace il legame stesso, sia fuori da tale piano. La condizione necessaria affinché una radiazione infrarossa possa originare una transizione vibrazionale consiste nel verificarsi di un cambiamento del momento di dipolo elettrico all'interno della molecola. Quindi molecole omoatomiche come N_2 o O_2 non sono attive all'infrarosso, mentre molecole quali la CO_2 possono entrare in risonanza con la radiazione solamente grazie alle vibrazioni asimmetriche che producono un momento di dipolo

istantaneo.

Gli spettrofotometri più diffusi sono quelli a trasformata di Fourier (FTIR), nei quali, attraverso un interferometro, lo spettro IR è registrato contemporaneamente in tutto l'intervallo di riferimento. La scansione è possibile grazie a uno specchio mobile che spostandosi introduce una differenza di cammino ottico, la quale origina una interferenza costruttiva o distruttiva con il raggio riflesso da uno specchio fisso. Si ottiene così un interferogramma, che riporta l'intensità in funzione del tempo. Applicando la trasformata di Fourier si ottiene lo spettro infrarosso, ovvero la rappresentazione dell'intensità in funzione della frequenza. Infine, è possibile analizzare lo spettro in termini di trasmittanza percentuale, ovvero analizzando i fotoni infrarossi non assorbiti dalla molecola, oppure, viceversa, in funzione dell'assorbanza.

Generalmente, lo spettro IR si può suddividere in due diverse zone: quella dei gruppi funzionali, che si estende da 3800 a 1300 cm^{-1} e che comprende bande dovute sia a stiramenti (nel range 3800 a 1500 cm^{-1}) che a deformazioni (nel range 3800 a 1300 cm^{-1}) di legami singoli, doppi e tripli e la zona delle impronte digitali, da 1300 a 500 cm^{-1} , che deve il suo nome al fatto che le varie deformazioni, interagendo fra loro, si combinano dando luogo ad una serie di bande che costituiscono una sorta di impronta digitale della molecola.

Gli spettri infrarossi sono stati acquisiti utilizzando la tecnica della riflettanza totale attenuata (ATR) con un interferometro Bruker Vertex 70 dotato di un cristallo di diamante Platinum ATR a riflessione singola, nella regione 4000 - 600 cm^{-1} , con 100 scansioni e risoluzione di 4 cm^{-1} .

Capitolo 9

Risultati e Discussione

9.1 Elettroforesi

La stabilità della cheratina in HFIP è stata studiata analizzando le distribuzioni del peso molecolare delle proteine mediante analisi SDS-PAGE. In Figura 9.1 il pattern della cheratina incontaminata (riga 2) è stato confrontato con quello della cheratina rigenerata di HFIP (riga 3). La cheratina incontaminata mostra le bande caratteristiche a 60 e 45 kDa attribuibili alla cheratina a basso tenore di zolfo e le bande a 28 e 11 kDa relative alla cheratina ad alto contenuto di zolfo. La cheratina rigenerata da HFIP mostra lo stesso pattern di quella incontaminata confermando che il solvente non degrada la proteina.

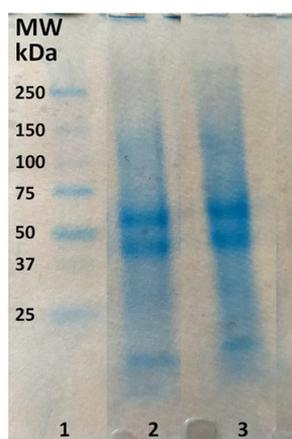


Figura 9.1: Gel elettroforetico post decolorazione in cui sono presenti gli standard dei pesi molecolari (riga 1), la cheratina incontaminata (riga 2) e quella rigenerata da HFIP (riga 3).

9.2 Reologia

9.2.1 Comportamento al flusso

Il grado di miscibilità è stato analizzato per le miscele di cheratina e PBS applicando la regola di miscibilità per miscele ideali:

$$\ln \eta_T = \sum_i w_i \ln \eta_i$$

dove w_i e η_i sono, rispettivamente, la frazione in peso e la viscosità del componente i -esimo e η_T è la viscosità totale della miscela. La viscosità è stata valutata ad un valore di *share rate* di 100 s^{-1} , in quanto tale valore risulta associabile a diversi processi di lavorazione, tra cui l'elettrofilatura. Infatti, nel momento in cui la soluzione parte dall'ugello, a causa della differenza di potenziale tra la soluzione caricata e il collettore, essa sarà soggetta ad una forza di taglio.

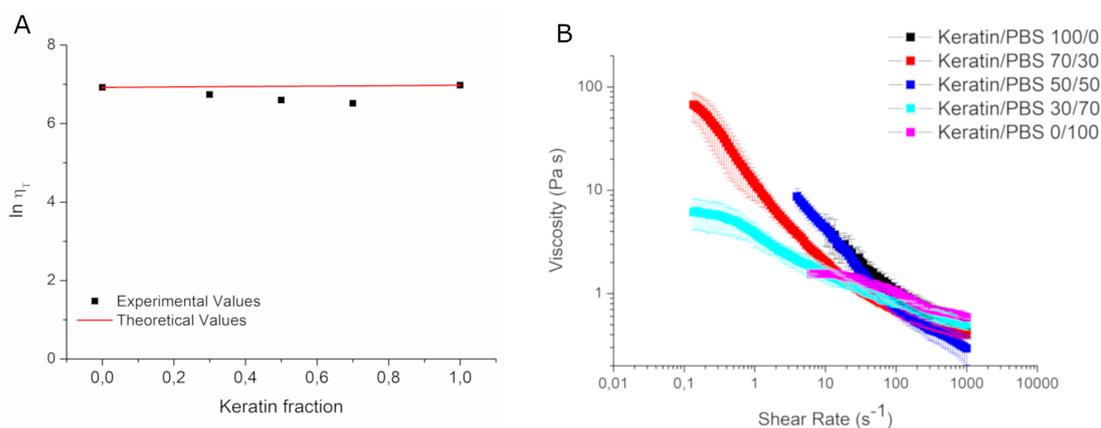


Figura 9.2: A: valori sperimentali e teorici di viscosità per le soluzioni pure di cheratina e PBS e per le miscele di KER/PBS ottenute a *share rate* di 100 s^{-1} .

B: viscosità apparente (η) in funzione della velocità di taglio ($\dot{\gamma}$) per tutte le miscele analizzate.

Come si può osservare in Figura 9.2A, le misure sperimentali hanno mostrato una deviazione negativa rispetto ai valori teorici, confermando la presenza di fenomeni repulsivi tra cheratina e PBS. In particolar modo, la maggiore deviazione riguarda la miscela KER/PBS 70/30, seguita da quella 50/50 e dalla 30/70, suggerendo che all'aumentare della cheratina, aumentano i fenomeni repulsivi.

Tabella 9.1: Indici di consistenza (K) e di flusso (n) e coefficienti di correlazione (R^2) per le miscele di cheratina e PBS ottenuti adattando l'equazione di Osteward-DeWeale

| KER/PBS | K (s) | n | R^2 |
|---------|-----------------|-------------------|---------|
| 0/100 | $3,09 \pm 0,04$ | $0,753 \pm 0,003$ | 0,99159 |
| 30/70 | $3,79 \pm 0,03$ | $0,64 \pm 0,01$ | 0,9881 |
| 50/50 | $24,5 \pm 0,3$ | $0,237 \pm 0,006$ | 0,9976 |
| 70/30 | $12,6 \pm 0,1$ | $0,25 \pm 0,01$ | 0,9912 |
| 100/0 | $14,8 \pm 0,6$ | $0,43 \pm 0,01$ | 0,9808 |

In Figura 9.2B, la viscosità apparente (η) è diagrammata in funzione della velocità di taglio ($\dot{\gamma}$). Si osserva un comportamento di *shear thinning*, ovvero una diminuzione della viscosità all'aumentare dello *shear rate*, per tutti i rapporti di miscelazione testati. Il comportamento di *shear thinning* è dovuto ad un disentanglements delle catene polimeriche e all'orientamento delle stesse lungo la direzione del taglio. Per ogni rapporto di miscelazione, la regione di *shear thinning* è stata interpolata con l'equazione di Ostward-DeWaele:

$$\eta = K\dot{\gamma}^{(n-1)}$$

dove K è l'indice di consistenza e n l'indice di flusso espressa in secondi.

Il modello indica che per bassi valori di n la pseudo-plasticità del fluido aumenta, allontanandosi perciò dalle caratteristiche di un fluido newtoniano. Quando n aumenta, tendendo ad essere uguale ad uno, il fluido diventa newtoniano, mostrando perciò una viscosità costante al variare dello *shear rate*. I fluidi pseudo-plastici presentano una viscosità apparente che diminuisce all'aumentare della velocità di taglio e sono solitamente soluzioni contenenti polimeri di grandi dimensioni.

In Tabella 9.1 sono riportati gli indici di consistenza, di flusso ed il coefficiente di correlazione (R^2). Per tutti i rapporti di miscelazione studiati i valori di n sono inferiori ad uno, indicando che tutte le miscele mostrano proprietà di *shear thinning* ben definite. Inoltre, le miscele ricche di cheratina (con una percentuale di cheratina maggiore 50%) presentano valori di n inferiori e valori di K più elevati rispetto alle miscele ricche di PBS, presentando così una maggiore deviazione del flusso dal comportamento newtoniano.

Tabella 9.2: Viscosità di taglio a *shear rate* zero (η_0) ed infinito (η_∞), costante di tempo (λ_c) e di velocità (n) e coefficiente di correlazione (R^2) per le miscele di cheratina e PBS ottenuti adattando il modello di Cross

| KER/PBS | η_0 (Pa s) | η_∞ (Pa s) | λ (s) | n | R^2 |
|---------|-----------------|----------------------|---------------|-----------------|---------|
| 30/70 | $0,5 \pm 0,1$ | 227 ± 33 | 14 ± 3 | $0,99 \pm 0,03$ | 0,99672 |
| 50/50 | $0,27 \pm 0,02$ | 32 ± 4 | $0,7 \pm 0,1$ | $0,97 \pm 0,02$ | 0,99939 |
| 70/30 | $0,68 \pm 0,02$ | $14,7 \pm 0,5$ | $3,1 \pm 0,3$ | $0,83 \pm 0,02$ | 0,99766 |

9.2.2 Correlazione tra reologia ed elettrofilatura

L'elettrofilabilità di un fluido polimerico è fortemente influenzata dalle proprietà reologiche dello stesso: in generale, dovrebbe presentare le caratteristiche di un fluido non Newtoniano pseudo-plastico (*shear thinning fluid*), presentando perciò una viscosità che diminuisce al crescere della velocità di deformazione.

Al fine di studiare il comportamento di *shear thinning* delle miscele di cheratina e PBS, le relative viscosità sono state fittate con il modello di Cross:

$$\frac{\eta - \eta_\infty}{\eta_0 - \eta_\infty} = \frac{1}{1 + (\lambda_c \dot{\gamma})^n}$$

dove η_∞ e η_0 sono, rispettivamente, i valori della viscosità di taglio a zero *shear rate* ed a valori di *shear rate* infinito, λ_c (s) è una costante di tempo ed n è la costante di velocità, adimensionale, che indica il grado di dipendenza della viscosità dallo *share rate* nella regione di *shear thinning*. In questo caso, un valore di n pari a 0 indica un comportamento newtoniano, mentre un valore tendente all'unità indica un comportamento di *shear thinning* crescente. Il reciproco della costante di tempo ($1/\lambda_c$) corrisponde ad una velocità di taglio critica, utile per fornire una indicazione circa la velocità di taglio in cui inizia il comportamento di *shear thinning*: minore sarà la velocità di taglio critica, maggiore sarà il un tempo di rilassamento delle catene polimeriche. Come riportato in Tabella 9.2 tutte le miscele mostrano un valore di n molto vicino all'unità, confermando un importante comportamento di *shear thinning*. Inoltre, l'inizio dello *shear thinning* per le miscele di KER/PBS avviene nel seguente ordine: 30/70 < 70/30 < 50/50, suggerendo che la miscela contenente la stessa quantità dei due polimeri mostra un tempo di rilassamento delle catene polimeriche inferiore rispetto alle altre miscele.

9.3 Morfologia membrane

9.3.1 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Tutte le miscela KER/PBS sono state elettrofilate con successo in membrane indipendenti come mostrato nella Figura 9.3. Tuttavia, l'elettrofilatura delle soluzioni ricche di PBS si è rivelata difficoltosa a causa della formazione di coaguli nelle soluzioni all'interno della siringa. La Figura 9.5 mostra le immagini SEM delle nanofibre della miscela KER/PBS e le relative distribuzioni del diametro. Tutte le nanofibre sono orientate in modo casuale, presentano una forma cilindrica e prive di difetti, poiché non sono state osservate fibre a forma di perline o a nastri.

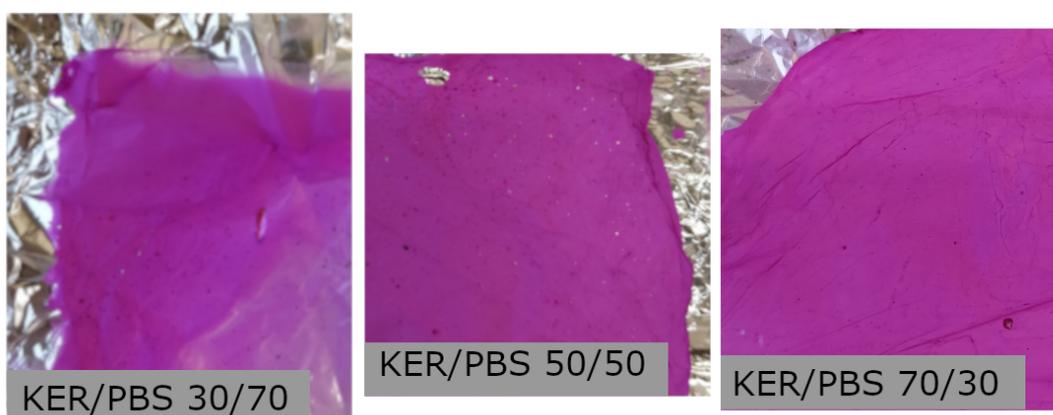


Figura 9.3: Membrane elettrofilate contenenti rodamina

Al fine di ottenere informazioni sulla dimensione e l'omogeneità delle nanofibre, le distribuzioni dei diametri sono state adattate con la funzione Gaussiana, dove il centro del picco χ_c e l'ampiezza a metà altezza (FWHM) sono stati utilizzati per valutare, rispettivamente, la dimensione media delle nanofibre e l'omogeneità del campione (Figura 9.4).

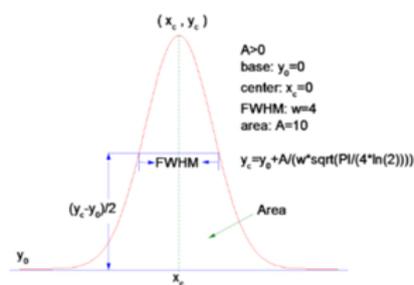


Figura 9.4: Distribuzione Gaussiana

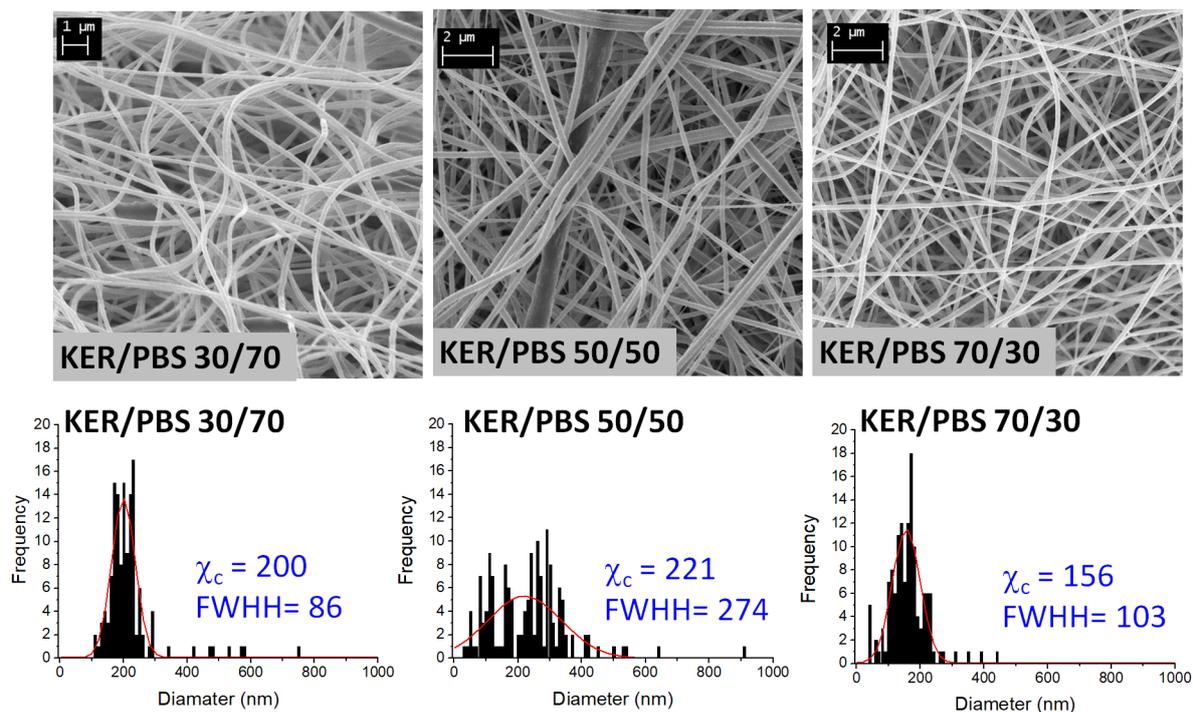


Figura 9.5: Immagini SEM delle nanofibre delle membrane elettrofilate (in alto) e relative distribuzioni di diametro (sotto)

In generale le nanofibre presentano un diametro medio compreso tra 150 e 250 nm. Tuttavia, la miscela KER/PBS 50/50 dà origine a nanofibre meno omogenee con distribuzioni di diametro più ampie. Le dimensioni più sottili delle nanofibre e le distribuzioni dei diametri più strette possono essere attribuite a un effetto combinato della conducibilità delle soluzioni, che aumenta con l'aumentare della cheratina, nonché al loro comportamento di *shear thinning*. In questo caso, la miscela KER/PBS 30/70 mostra un tempo di rilassamento significativamente più lungo delle catene polimeriche (valore λ più alto, come precedentemente segnalato) e questo potrebbe giocare un ruolo nella promozione e nel mantenimento dell'allungamento delle catene polimeriche durante lo *shear thinning* imposto dal processo di elettrofilatura. Al contrario, la soluzione KER/PBS 50/50 ha mostrato il valore di λ inferiore, indicando un tempo di rilassamento delle catene polimeriche più breve, che probabilmente contribuisce a contrarre il getto del polimero in partenza dall'ugello, riducendo così l'allungamento delle catene polimeriche durante l'elettrofilatura, e ciò si traduce in nanofibre meno omogenee e più spesse. Viste le difficoltà nell'elettrofilatura di membrane di KER/PBS 30/70, come precedentemente segnalato, queste ultime non sono state più oggetto di analisi.

9.4 Caratterizzazione termica

La caratterizzazione termica dei materiali elettrofilati e della cheratina, sia pura che rigenerata in HFIP è stata condotta mediante analisi termogravimetrica (TGA) e calorimetria a scansione differenziale (DSC).

9.4.1 Analisi termogravimetrica (TGA)

Le curve TGA dei tappetini studiati, PBS, KER/PBS 70/30, KER/PBS 50/50 e della cheratina, sia pura (KER) che rigenerata (KER-HFIP), sono riportate in Figura 9.6, mentre le temperature corrispondenti all'inizio della degradazione e alla velocità di massima perdita di peso sono raccolte in Tabella 9.3.

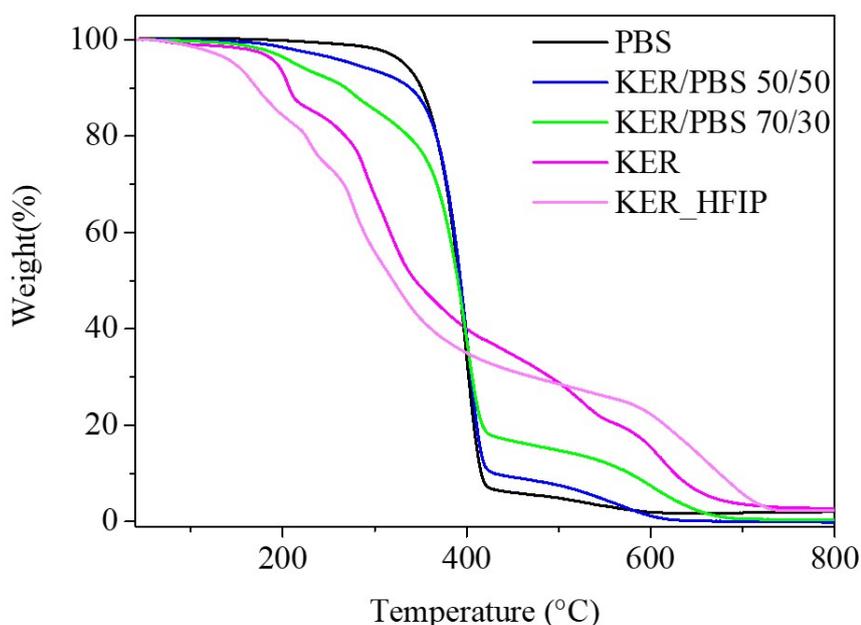


Figura 9.6: Curve termogravimetriche dei vari campioni analizzati (PBS, KER, KER-HFIP e miscele KER/PBS 70/30 e KER/PBS 50/50)

Il PBS puro risulta il materiale termicamente più stabile, mentre la cheratina il meno stabile, in particolar modo nel caso della proteina rigenerata. Più in dettaglio, la curva TGA della cheratina pura presenta tre step, il primo si manifesta a partire da 71 °C, il secondo da 188 °C, l'ultimo da 271 °C. Le prime due perdite di peso sono dovute all'acqua legata alla cheratina mediante:

Tabella 9.3: Dati di caratterizzazione termica (TGA e DSC) dei materiali elettrofilati

| Campione | I Scan | | | | II Scan | | | | | | | |
|---------------|----------|-----------|-------|--------------|---------|-------|--------------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|
| | T_{id} | T_{max} | T_g | ΔC_p | T_d | T_m | ΔH_d | ΔH_m | T_g | ΔC_p | T_m | ΔH_m |
| | °C | °C | °C | J/g °C | °C | °C | J/g | J/g | °C | J/g °C | °C | J/g |
| KER | 71 | 320 | - | - | 93 | - | 120 | - | - | - | - | - |
| | 188 | | | | 282 | | 83 | | | | | |
| | 271 | | | | | | | | | | | |
| KER-HFIP | 80 | 321 | - | - | 223 | - | 62 | - | - | - | - | - |
| | 128 | | | | 276 | | 94 | | | | | |
| | 229 | | | | (303) | | | | | | | |
| | 266 | | | | | | | | | | | |
| KER/PBS 70/30 | 174 | 401 | -32 | 0,09 | 77 | 112 | 67 | 23 | -32 | 0,02 | 98 | 3 |
| | 270 | | | | 276 | | 56 | | | | | |
| KER/PBS 50/50 | 168 | 402 | -32 | 0,114 | 62 | 112 | 16 | 44 | -30 | 0,06 | 107 | 41 |
| | 365 | | | | 280 | | 14 | | | | | |
| PBS | 363 | 398 | -32 | 0,193 | - | 114 | - | 64 | -32 | 0,251 | 114 | 53 |

interazioni fisiche ($T_{id} \approx 71$ °C) e legami a idrogeno ($T_{id} \approx 188$ °C). L'ultimo step è invece ascrivibile al vero e proprio processo di degradazione della proteina. Per quanto riguarda la cheratina rigenerata, la degradazione avviene in step multipli, alle temperature rispettivamente di 80, 128, 229 e 266 °C. Nel caso del PBS, invece, la perdita di peso avviene in un unico stadio, e si verifica a temperature più elevate rispetto alla cheratina (T_{id} e T_{max} rispettivamente pari a 363 e 398 °C). Le miscele presentano stabilità intermedie, coerentemente con la loro composizione: si può infatti notare che la miscela KER/PBS 50/50, più ricca in PBS, mostra una stabilità termica simile all'omopolimero PBS, con perdita di peso in due step e T_{max} pari a 402 °C (Tabella 9.3). Viceversa, la blend più ricca in cheratina (KER/PBS 70/30) presenta un profilo di degradazione sempre a due step, ma più simile a quello della cheratina pura, nonostante sia caratterizzata, rispetto ad essa, da una T_{max} più elevata e comparabile a quella del PBS, ad indicare come la presenza dell'omopolimero, anche in basse percentuali in peso, contribuisca a migliorare la stabilità termica delle miscele. Per quanto riguarda il peso residuo, esso è praticamente nullo nel caso del PBS e delle miscele, mentre per la cheratina, sia pura che rigenerata, è presente un residuo di piccola entità, pari a circa il 3% del peso iniziale.

9.4.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

La cheratina pura e rigenerata, così come tutti i campioni elettrofilati, sono stati poi sottoposti ad analisi calorimetrica. I dati relativi alle curve calorimetriche di prima e seconda scansione sono riportati in Tabella 9.3, mentre i tracciati DSC di prima e seconda scansione sono mostrati in Figura 9.7.

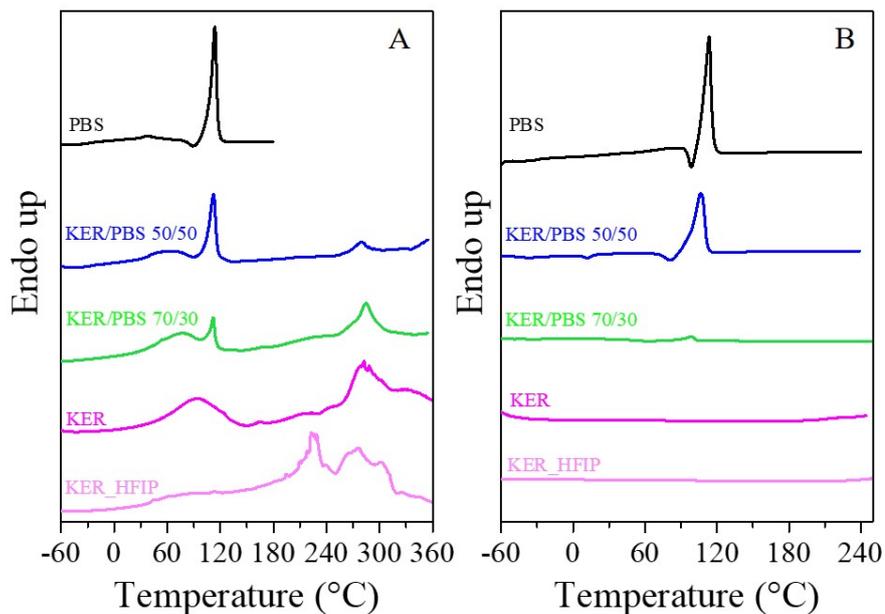


Figura 9.7: Curve DSC della cheratina pura e rigenerata, e dei tappetini a base di PBS e delle relative miscele. **A:** I scan (20 °C/min); **B:** II scan (20 °C/min) dopo rapido raffreddamento dal fuso.

In prima scansione (Figura 9.7A), il campione PBS risulta semicristallino: la corrispondente curva calorimetrica è infatti caratterizzata da una variazione endotermica della linea di base associata alla transizione vetrosa, caratteristica della porzione amorfa del materiale, al di sotto di temperatura ambiente ($T_g = -32$ °C), seguita da un picco endotermico a più alta temperatura, relativo alla fusione della porzione cristallina presente nel materiale ($T_m = 114$ °C). La curva DSC della cheratina pura presenta invece due picchi endotermici di diversa intensità e forma: il primo, molto allargato e centrato intorno a 93 °C, è legato all'evaporazione dell'acqua legata alla proteina, il secondo, a più alta temperatura ($T_d = 282$ °C) è imputabile al processo di degradazione, in accordo con i dati ottenuti dall'analisi TGA (Tabella 9.3). La deviazione dalla linea di base di minore intensità, a circa 210 °C, è ascrivibile invece alla denaturazione delle strut-

ture secondarie (principalmente α -eliche). Per quanto concerne la cheratina rigenerata (KER-HFIP), essa mostra un profilo DSC piuttosto diverso, con una variazione endotermica a circa 45 °C, ascrivibile all'evaporazione dell'esafuoro residuo rimasto intrappolato nella proteina (la temperatura di ebollizione di HFIP è pari a 52 °C), seguita da un intenso picco endotermico a 223 °C e da un picco multiplo a temperature ancora maggiori. È possibile che a 223 °C si verifichi la denaturazione delle strutture secondarie, come già visto per la cheratina pura, mentre nell'intervallo compreso tra 276 e 303 °C avvenga la degradazione della proteina. Anche in questo caso, i risultati ottenuti sono in accordo con quelli ricavati dall'analisi TGA (Tabella 9.3). I tracciati DSC dei tappetini contenenti sia PBS che cheratina mostrano sia i fenomeni endotermici caratteristici della cheratina pura (T_d), che le transizioni tipiche del PBS (T_g e T_m), con intensità variabile e coerente con la composizione della miscela.

Tutti i campioni in esame sono stati anche sottoposti a una seconda scansione calorimetrica dopo rapido raffreddamento “*quenching*” dal fuso (Figura 9.7B). Per quanto riguarda la sola cheratina, sia pura che rigenerata, il profilo DSC risulta piatto, in quanto durante la prima scansione la proteina è stata degradata in maniera irreversibile. Dalle curve DSC del PBS e delle miscele, invece, si evidenzia un comportamento simile a quello osservato in prima scansione per il PBS (in corrispondenza dei picchi della cheratina, anche in questo caso, la linea di base non presenta alcuna variazione, a causa dei processi di degradazione intercorsi): dopo la variazione endotermica della linea di base, associata alla transizione vetrosa, è possibile notare un picco endotermico, legato alla fusione dei cristalli di PBS. È interessante notare come tale picco di fusione si sposti a temperature più basse all'aumentare del contenuto di cheratina, ad indicare come la presenza della proteina dia luogo alla formazione di cristalli meno perfetti. Per quanto riguarda i valori di ΔH_m , essi presentano intensità variabile in funzione della composizione delle blend, ad indicare una minore quantità di fase cristallina presente; per questi campioni, nelle condizioni sperimentali adottate, la velocità di raffreddamento dello strumento è risultata inferiore alla velocità di cristallizzazione del PBS. Unica eccezione è rappresentata dal campione più ricco in cheratina: in questo caso il ΔH_m , associato alla fusione dell'omopolimero è risultata particolarmente bassa (3 J/g), indicando come la capacità a cristallizzare del PBS sia quasi completamente soppressa a causa dell'elevata percentuale in peso di cheratina contenuta nel tappetino. Tutte queste evidenze sono in linea con un effetto disturbante della cheratina verso il processo di cristallizzazione del PBS.

9.5 Caratterizzazione meccanica

Le misure meccaniche *stress-strain* sono state eseguite su striscioline di scaffold di forma 50 x 5 mm, allungando un provino di forma rettangolare a velocità costante, e misurando la variazione dello sforzo in funzione della deformazione. Sono stati sottoposti a trazione solo i campioni PBS e KER/PBS 50/50 perché la cheratina è risultata troppo rigida e fragile per poter essere elettrofilata, mentre la miscela più ricca in cheratina, nonostante sia stato possibile ottenere un tappetino elettrofilato, è risultata troppo fragile per poter effettuare le prove con gli strumenti in dotazione.

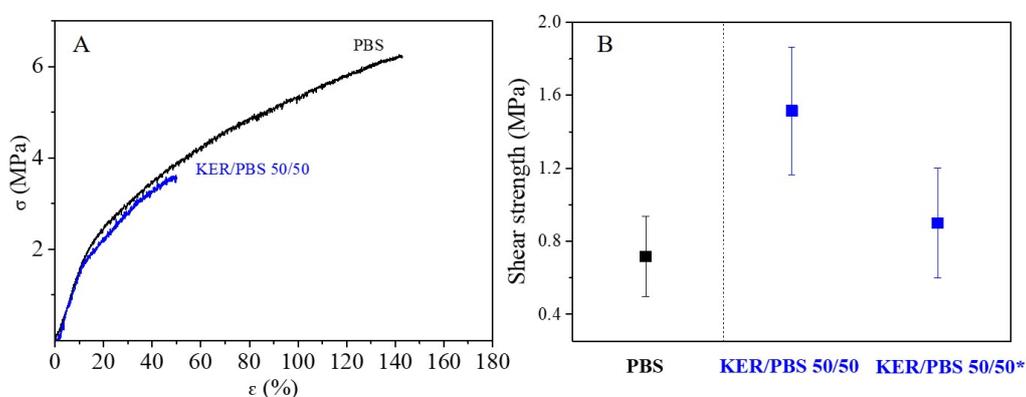


Figura 9.8: Grafico sforzo-deformazione (A) e valori di shear strength (B) (σ_S) dei campioni elettrofilati a partire da PBS e KER/PBS 50/50 (KER/PBS 50/50* rappresenta il valore di σ_S del tappetino asciutto).

In Figura 9.8A sono rappresentate le curve sforzo-deformazione, mentre in Tabella 9.4 sono raccolti i valori di modulo elastico (E), di sforzo a rottura (σ_B) e deformazione a rottura (ϵ_B). Come si può notare (Figura 9.8A e Tabella 9.4), i campioni analizzati mostrano valori di modulo elastico (E) e tensione a rottura (σ_B) comparabili, a conferma del fatto che è stato possibile ottenere un nuovo materiale a base di cheratina processabile, con rigidità molto simile a quella dell'omopolimero PBS e decisamente inferiore a quella della cheratina. Per quanto riguarda l'allungamento a rottura, invece, esso risulta maggiore nel caso dello scaffold realizzato in solo PBS (151% vs. 56%, ovvero circa tre volte maggiore della miscela). Nello scaffold ottenuto miscelando PBS e cheratina il minore allungamento a rottura può essere ascrivito alla presenza di due fasi difficilmente miscibili, che tendono a separarsi se sottoposte a sforzi di tipo meccanico.

Tabella 9.4: Dati di caratterizzazione meccanica dei campioni elettrofilati a partire da PBS e KER/PBS 50/50.

| Campioni | E MPa | σ_B MPa | ϵ_B % | σ_S MPa | σ_S^* MPa |
|---------------|----------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| KER/PBS 50/50 | 16 ± 5 | 3,3 ± 0,3 | 56 ± 9 | 1,5 ± 0,3 | 0,9 ± 0,3 |
| PBS | 20 ± 3 | 6,2 ± 0,7 | 151 ± 7 | 0,7 ± 0,2 | - |

Occorre inoltre tenere presente che la cheratina è caratterizzata da una deformazione a rottura praticamente nulla.

Tenendo presente che uno degli scopi della presente Tesi è quello di realizzare patch adesivi per potenziali applicazioni in ambito di rilascio di farmaco per via transdermica, sono stati condotti test in vitro di adesione dei due tappetini PBS e KER/PBS 50/50 su membrane di acetato di cellulosa, materiale che simula la pelle umana, in condizioni sia umide che secche. Le prove sono state eseguite su striscioline di *scaffold* di forma 50 x 5 mm e su striscioline di acetato di cellulosa delle stesse dimensioni, fatte aderire tra loro per un tratto di lunghezza pari a 2 cm. I provini così ottenuti sono stati stirati a velocità costante, ed è stata misurata la tensione massima necessaria per staccare tra loro le due striscioline, detta anche shear stress (σ_S). I valori di σ_S sono riportati in Tabella 9.4 e rappresentati in Figura 9.8B. Fin da subito, è stato possibile osservare che il tappetino di solo PBS aderiva con più difficoltà rispetto a quello contenente cheratina. Tale comportamento è stato confermato dai valori di σ_S ottenuti per i due diversi tappetini: nel caso del PBS si sono raggiunti valori di σ_S pari a 0,7 MPa, a differenza del tappetino contenente cheratina, che ha raggiunto valori di σ_S pari a 1,5 MPa: la resistenza allo scorrimento è risultata dunque più che raddoppiata nel caso della *blend*, grazie all'elevatissima capacità di adesione conferita dalla cheratina (Figura 9.9). Per questi provini, inoltre, si è osservato che prima del distacco la porzione di provino costituita dallo *scaffold* ha mostrato un leggero allungamento, ad indicare come tale materiale sia più incline a deformarsi piuttosto che a distaccarsi dal substrato che mima la pelle. L'adesione è stata verificata anche sui provini completamente asciutti, e si è potuto notare come le due membrane mostrino un comportamento completamente diverso: mentre i tappetini di PBS, durante l'asciugatura, si sono completamente staccati dalla membrana di acetato di cellulosa (rendendo impossibile lo svolgimento del test), quelli relativi alla blend KER/PBS 50/50 hanno mostrato una buona aderenza anche da asciutti. I valori di

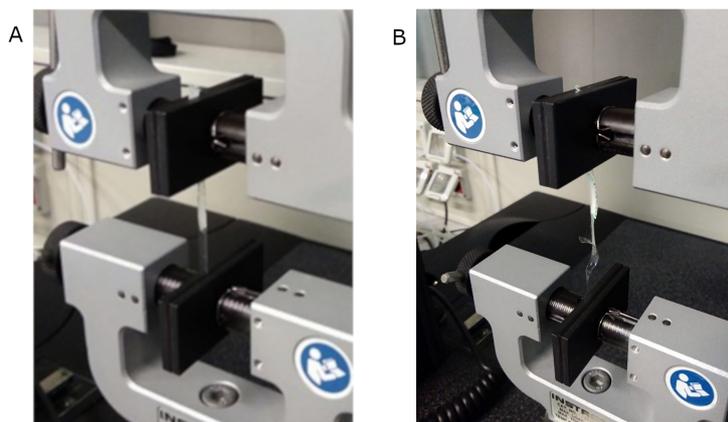


Figura 9.9: Immagini relative ai provini KER/PBS 50/50 (A) e PBS (B) sottoposti a prove di resistenza allo scorrimento.

shear stress per il tappetino asciutto (σ_S^*) di KER/PBS 50/50 sono riportati in Tabella 9.4 e mostrati in Figura 9.8B: anche se si assiste ad una diminuzione del valore di *shear stress* rispetto al tappetino umido, che rappresenta la condizione di adesione ottimale, i tappetini asciutti mostrano comunque una buona aderenza. Tale risultato rappresenta un'ulteriore riprova di come il tappetino ottenuto dalla miscela KER/PBS 50/50 sia migliorativo rispetto a quello di solo PBS per questo tipo di applicazione.

9.6 Rilascio controllato di farmaco

Il rilascio di rodamina dai tappetini elettrofilati di KER/PBS è stato valutato in funzione della composizione delle miscele e della morfologia delle fibre. I profili del rilascio di rodamina dalle membrane elettrofilate a base di KER/PBS 70/30 e 50/50 sono evidenziati in Figura 9.10.

Per quanto riguarda il campione KER/PBS 70/30 il 90% della rodamina è stato rilasciato nella prima ora (Figura 9.10A), mentre nelle successive 265 ore (11 giorni) si è verificato un lento rilascio fino al 100% (Figura 9.10B). Anche nel caso del tappetino KER/PBS 50/50, è possibile osservare un profilo di rilascio di rodamina a due fasi ma, rispetto alla 70/30, durante la prima fase il rilascio è risultato parziale, con valori intorno al 56% dopo la prima ora, per raggiungere una percentuale di rilascio pari al 75% negli 11 giorni successivi.

Per studiare ulteriormente il meccanismo del rilascio bifasico di rodamina dalle nanofibre di KER/PBS, i profili di rilascio nella prima ora sono stati analizzati col modello Korsmeyer-

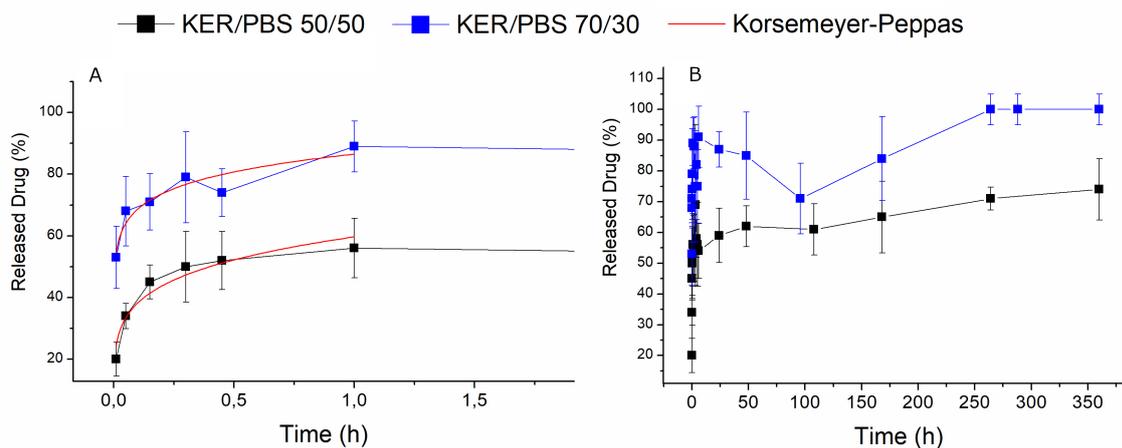


Figura 9.10: Profili del rilascio di rodamina nelle membrane KER/PBS 70/30 e 50/50 dopo la prima ora (A) e dopo 265 ore (B)

Peppas, applicando la seguente equazione:

$$Q_t = kt^n$$

dove Q_t è la frazione del farmaco rilasciata al tempo t , k è una costante che riflette le caratteristiche strutturali e geometriche delle fibre e n è l'esponente di rilascio, che indica il meccanismo di rilascio del farmaco.

I risultati ottenuti sono mostrati nella Figura 9.10A ed i parametri ottenuti sono evidenziati in Tabella 9.5. In base ai valori del coefficiente di regressione R^2 , è stato osservato un buon adattamento per entrambi i tappetini. I valori di n ottenuti sono inferiori a 0,45, indicando che il rilascio di rodamina da entrambi i campioni segue un meccanismo di diffusione Fickiano. Inoltre, la costante cinetica del rilascio di rodamina del tappetino KER/PBS 70/30 è superiore a quella ottenuta per il tappetino di KER/PBS 50/50, suggerendo un rilascio più rapido del farmaco dalle nanofibre più ricche di cheratina.

Tabella 9.5: Parametri cinetici per il modello di Korssemeyer-Peppas

| Campione | k (min^{-n}) | n | R^2 |
|---------------|---------------------------|-----------------|-------|
| KER/PBS 50/50 | 60 ± 3 | $0,20 \pm 0,03$ | 0,924 |
| KER/PBS 70/30 | 86 ± 3 | $0,10 \pm 0,02$ | 0,889 |

9.7 Spettroscopia infrarossa (FTIR)

Per comprendere meglio il comportamento delle matrici nanofibrose durante il rilascio di rodamina, sono stati confrontati gli spettri FTIR dei due campioni prima e dopo i test di rilascio.

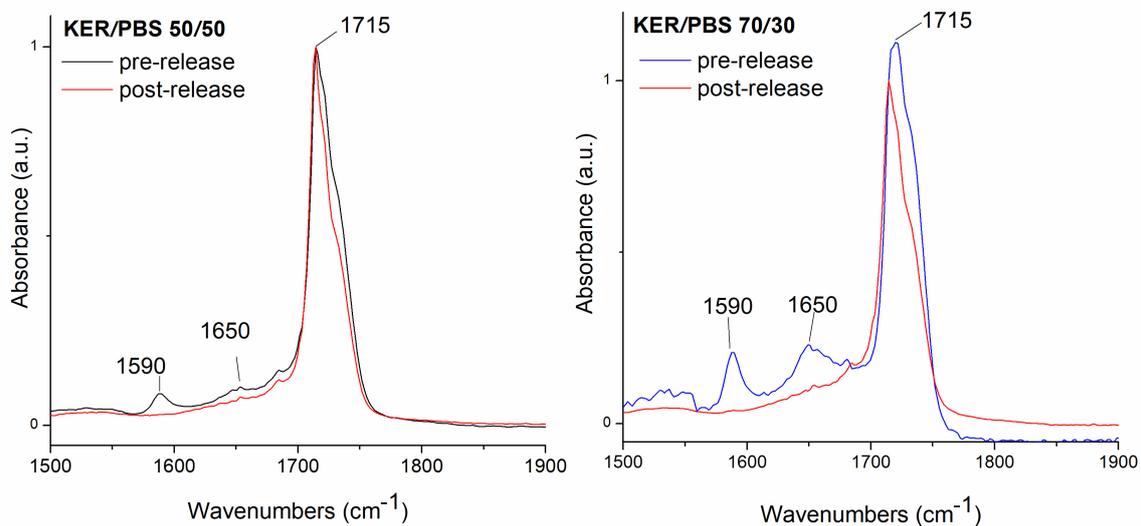


Figura 9.11: Spettri FTIR delle membrane di KER/PBS 70/30 e 50/50 prima e dopo le prove di rilascio di farmaco, nel range 1500 - 1900 cm⁻¹

Nella Figura 9.11, sono mostrati gli spettri FTIR delle membrane elettrofilate contenenti rodamina di KER/PBS 50/50 e 70/30, acquisiti prima e dopo gli esperimenti di rilascio, normalizzati per i picchi di assorbimento del carbonile (C=O) del PBS a 1715 cm⁻¹. Gli spettri FTIR dei campioni di partenza (pre-rilascio) mostrano i tipici picchi di assorbimento associati all'ammide I (1650 cm⁻¹) e all'ammide II (1590 cm⁻¹) della cheratina [36]. Come si può osservare, negli spettri acquisiti dopo le prove di rilascio del farmaco, i picchi riconducibili alla cheratina sono totalmente scomparsi, suggerendo che il farmaco viene probabilmente rilasciato come complesso farmaco-proteina attraverso un meccanismo di diffusione Fickiano.

Capitolo 10

Conclusioni

Le nuove conoscenze nel campo della farmacologia e dei biomateriali hanno permesso lo sviluppo e la realizzazione di dispositivi altamente performanti nel campo del rilascio controllato di farmaci, che può sicuramente considerarsi uno dei principali ambiti di investimento all'interno del mondo della biomedicina. Per ottenere un rilascio controllato nel tempo e mirato al sito in cui è in atto la patologia, si può agire sullo sviluppo di nuove biomolecole intelligenti, ma soprattutto sulla realizzazione di opportuni dispositivi. Per quanto riguarda questi ultimi, di particolare interesse risultano i supporti nanofibrosi, con cui è possibile realizzare sistemi transdermici di varia natura, caratterizzati da elevata efficienza di incapsulamento del principio attivo. Inoltre, se per realizzare le nanofibre vengono utilizzate miscele polimeriche, di origine sia naturale che sintetica, si possono modulare sia le proprietà chimico-fisiche, sia la cinetica di rilascio, semplicemente variando la composizione della miscela. Più in dettaglio, nel presente lavoro di Tesi, sono state realizzate miscele a base di cheratina e poli(butilene succinato), di cui sono state analizzate la stabilità, la miscibilità, le proprietà reologiche e termo-meccaniche, la capacità di adesione ed il profilo di rilascio. Dalle diverse analisi condotte è emerso che:

- In primo luogo, il solvente utilizzato per analizzare le miscele, ovvero l'esaffluoro isopropanolo, non degrada la proteina;
- Studiando la miscibilità del sistema cheratina/PBS si osservano fenomeni repulsivi all'aumentare della quantità di cheratina presente;
- È stato osservato un comportamento di *shear thinning* in tutte le miscele analizzate, più evidente nelle miscele più ricche in cheratina;

- È stato possibile elettrofilare con successo tutte le miscele, ed i tappetini ottenuti risultano privi di difetti, presentano nanofibre orientate in modo casuale e dalla forma cilindrica. La distribuzione delle fibre è piuttosto omogenea, ad eccezione del tappetino KER/PBS 50/50, probabilmente a causa del minore tempo di rilassamento delle catene polimeriche;
- Dalle analisi termiche emerge che la presenza del PBS va a migliorare la stabilità termica della cheratina: tutte le miscele presentano infatti stabilità termiche intermedie rispetto a quelle dei due componenti la miscela;
- L'unione di PBS e cheratina ha permesso di migliorare le proprietà meccaniche della cheratina, rendendola processabile in tappetini in grado di autosostenersi e con caratteristiche simili a quelle del polimero sintetico;
- La presenza di cheratina porta ad un notevole miglioramento della capacità di adesione dei tappetini in condizioni sia umide sia asciutte;
- Dalle prove di rilascio di rodamina emerge che, nonostante in tutti i casi il meccanismo di rilascio sia quello di diffusione Fickiana, per il tappetino più ricco in cheratina tale rilascio risulti più veloce. Inoltre, osservando gli spettri FTIR delle membrane prima e dopo l'esperimento, si nota che i picchi relativi alla cheratina scompaiono totalmente in seguito al rilascio, suggerendo che la rodamina viene rilasciata in soluzione come un complesso con la proteina.

I diversi profili di rilascio di farmaco e la diversa resistenza meccanica, suggeriscono dunque che è stato possibile modulare le proprietà di tali membrane semplicemente agendo sulla composizione della miscela, e tale modulazione può essere sfruttata in vista di diversi utilizzi. Ad esempio, la membrana KER/PBS 70/30 può essere utilizzata come *patch* transdermica in situazioni in cui è preferibile avere un rilascio di farmaco in modo rapido ed in elevate quantità, mentre la membrana KER/PBS 50/50 può essere impiegata in situazioni in cui la *patch* deve essere in grado di resistere a sollecitazioni di tipo meccanico e in casi di somministrazione prolungata nel tempo. In conclusione, i risultati ottenuti al termine del presente lavoro di Tesi Magistrale sono oltremodo incoraggianti, e possono rappresentare il punto di partenza per ricerche future, soprattutto per quanto riguarda i possibili profili di rilascio. Infatti, se si tiene

conto del fatto che l'elettrofilatura permette di poter elettrofilare più strati di membrane, diventa possibile, in un modo tra l'altro facile ed economico, ottenere tappetini multistrato con caratteristiche variabili in funzione degli strati.

Bibliografia

1. Treccani. *plastiche, materie* <https://www.treccani.it/enciclopedia/materie-plastiche/> ().
2. Elias, H.-G. & Mülhaupt, R. in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 1–70 (American Cancer Society, 2015).
3. PlasticsEurope. *Plastics - the Facts 2020* <https://www.plasticseurope.org/en/resources/market-data>.
4. Albertsson, A.-C. & Varma, I. K. Aliphatic Polyesters: Synthesis, Properties and Applications. *Advances in Polymer Science* **157** (2002).
5. Grizzuti, N. *Reologia dei materiali polimerici. Scienza ed ingegneria* (Edizioni Nuova Cultura, 2012).
6. Barnes, H. A., Hutton, J. F. & Walters, K. *An introduction to rheology* 97–103 (Elsevier, 1989).
7. Larrañaga, A. & Lizundia, E. A review on the thermomechanical properties and biodegradation behaviour of polyesters. *European Polymer Journal* **121** (2019).
8. IUPAC. Biodegradable polymer. *Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")* (1997).
9. Williams, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **29**, 2941–2953 (20 lug. 2008).
10. Barrows, T. Degradable implant materials: a review of synthetic absorbable polymers and their applications. *Clinical Materials* **1**, 233–257 (4 1986).
11. Manavitehrani, I., Fathi, A., Badr, H., Daly, S., Shirazi, A. N. & Dehghani, F. Biomedical applications of biodegradable polyesters. *Polymers* **8** (1 2016).

12. Gigli, M., Fabbri, M., Lotti, N., Gamberini, R., Rimini, B. & Munari, A. Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review. *European Polymer Journal* **75**, 431–460 (2016).
13. Fabbri, M., Guidotti, G., Soccio, M., Lotti, N., Govoni, M., Giordano, E., Gazzano, M., Gamberini, R., Rimini, B. & Munari, A. Novel biocompatible PBS-based random copolymers containing PEG-like sequences for biomedical applications: From drug delivery to tissue engineering. *Polymer Degradation and Stability* **153**, 53–62 (2018).
14. Fabbri, M., Soccio, M., Gigli, M., Guidotti, G., Gamberini, R., Gazzano, M., Siracusa, V., Rimini, B., Lotti, N. & Munari, A. Design of fully aliphatic multiblock poly(ester urethane)s displaying thermoplastic elastomeric properties. *Polymer* **83**, 154–161 (2016).
15. Davidenko, N., Cameron, R. & Best, S. in *Encyclopedia of Biomedical Engineering* 162–176 (Elsevier, 2019).
16. Eurostat. *Prodcom Annual Data 2019* <https://ec.europa.eu/eurostat/web/prodcom/data/excel-files-nace-rev.2> ().
17. Donato, R. K. & Mija, A. Keratin associations with synthetic, biosynthetic and natural polymers: An extensive review. *Polymers* **12** (1 gen. 2020).
18. Ferroni, C., Sotgiu, G., Sagnella, A., Varchi, G., Guerrini, A., Giuri, D., Polo, E., Orlandi, V. T., Marras, E., Gariboldi, M., Monti, E. & Aluigi, A. Wool Keratin 3D Scaffolds with Light-Triggered Antimicrobial Activity. *Biomacromolecules* **17**, 2882–2890 (2016).
19. Li, R. & Wang, D. Preparation of Regenerated Wool Keratin Films from Wool Keratin-Ionic Liquid Solutions. *Journal of Applied Polymer Science* **127** (feb. 2013).
20. Xie, H., Li, S. & Zhang, S. Ionic liquids as novel solvents for the dissolution and blending of wool keratin fibers. *Green Chemistry* **7** (ago. 2005).
21. Shavandi, A., Silva, T. H., Bekhit, A. A. & Bekhit, A. E. D. A. Keratin: Dissolution, extraction and biomedical application. *Biomaterials Science* **5**, 1699–1735 (9 set. 2017).
22. Wang, B., Yang, W., McKittrick, J. & Meyers, M. A. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science* **76**, 229–318 (mar. 2016).

23. Rajabi, M., Ali, A., McConnell, M. & Cabral, J. Keratinous materials: Structures and functions in biomedical applications. *Materials Science and Engineering C* **110** (mag. 2020).
24. Li, Y., Zhi, X., Lin, J., You, X. & Yuan, J. Preparation and characterization of DOX loaded keratin nanoparticles for pH/GSH dual responsive release. *Materials Science and Engineering: C* **73**, 189–197 (2017).
25. Aluigi, A., Ballestri, M., Guerrini, A., Sotgiu, G., Ferroni, C., Corticelli, F., Gariboldi, M. B., Monti, E. & Varchi, G. Organic solvent-free preparation of keratin nanoparticles as doxorubicin carriers for antitumour activity. *Materials Science and Engineering: C* **90**, 476–484 (2018).
26. Zhi, X., Wang, Y., Li, P., Yuan, J. & Shen, J. Preparation of keratin/chlorhexidine complex nanoparticles for long-term and dual stimuli-responsive release. *RSC Adv.* **5**, 82334–82341 (100 2015).
27. Posati, T., Giuri, D., Nocchetti, M., Sagnella, A., Gariboldi, M., Ferroni, C., Sotgiu, G., Varchi, G., Zamboni, R. & Aluigi, A. Keratin-hydroxycalcium hybrid films for drug delivery applications. *European Polymer Journal* **105**, 177–185 (2018).
28. Mi, X., Xu, H. & Yang, Y. Submicron amino acid particles reinforced 100% keratin biomedical films with enhanced wet properties via interfacial strengthening. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **177**, 33–40 (2019).
29. Ajitha, A. & Sabu, T. in *Compatibilization of Polymer Blends* (cur. Ajitha, A. & Sabu, T.) 1–29 (Elsevier, 2020).
30. Bajpai, A. K., Shukla, S. K., Bhanu, S. & Kankane, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **33**, 1088–1118 (11 nov. 2008).
31. Park, K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *Journal of Controlled Release* **190**, 3–8 (set. 2014).
32. Prausnitz, M. R. & Langer, R. Transdermal drug delivery. *Nature Biotechnology* **26**, 1261–1268 (11 nov. 2008).

33. Xie, X., Chen, Y., Wang, X., Xu, X., Shen, Y., ur Rehman Khan, A., Aldalbahi, A., Fetz, A. E., Bowlin, G. L., El-Newehy, M. & Mo, X. Electrospinning nanofiber scaffolds for soft and hard tissue regeneration. *Journal of Materials Science and Technology* **59**, 243–261 (dic. 2020).
34. Sill, T. J. & von Recum, H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* **29**, 1989–2006 (13 mag. 2008).
35. Perrett, D. in *Encyclopedia of Separation Science* (cur. Wilson, I. D.) 103–118 (Academic Press, Oxford, 2000).
36. Guidotti, G., Soccio, M., Posati, T., Sotgiu, G., Tiboni, M., Barbalinardo, M., Valle, F., Casettari, L., Zamboni, R., Lotti, N. & Aluigi, A. Regenerated wool keratin-polybutylene succinate nanofibrous mats for drug delivery and cells culture. *Polymer Degradation and Stability* **179**, 109272 (2020).