

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

Film a base di alginato e cheratina per il
drug delivery

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Marta Giannelli

RELATORE

Prof.ssa Carla Boga

CORRELATORE

Dott.ssa Giovanna Sotgiu

Anno Accademico 2018-2019

*A mia sorella,
che mi tiene per mano ad ogni passo.*

*Ai miei genitori,
per tutto l'amore immenso
che non mi hanno mai fatto mancare.*

*A mia nonna,
per la dolcezza ed il calore
con cui mi è sempre accanto.*

Abstract

Negli ultimi anni si è osservato un interesse crescente nei confronti del *wound healing* e, più in generale, dei sistemi proteici per il rilascio controllato di farmaci. In questo lavoro sono stati studiati dei sistemi a base di cheratina ed alginato, caricati con due principi attivi (vitamina C e propoli). Tutti i film sono stati sintetizzati per casting e caratterizzati dal punto di vista morfologico e strutturale (SEM, ATR). Inoltre, è stato condotto uno studio reologico sulle soluzioni dei due costituenti principali, per vedere la loro effettiva miscibilità, ed un'analisi TGA per studiare il meccanismo di degradazione dei film e la loro resistenza termica. Infine, sono state condotte delle prove di rilascio della vitamina C, per vedere se il sistema sintetizzato è efficace nel *drug delivery*. I risultati ottenuti hanno evidenziato una totale biodegradabilità del film, che appare resistente in ambiente acquoso ed in grado di liberare il principio attivo contenuto al suo interno.

In recent years, there has been a growing interest in *wound healing* and, more generally, in protein-based materials for controlled drug release. In this thesis, systems based on keratin and sodium alginate, loaded with two active substances (vitamin C and propolis) were studied. All films were synthesized by casting (evaporation of solvent for 36 hours at room temperature) and characterized from a morphological and structural point of view. In addition, a rheological study on the solutions of the two main components and a TGA analysis on all films were carried out: the first one to observe their miscibility, and the second one to study the degradation mechanism of the films and their thermal resistance. Finally, vitamin C release tests were conducted to see if the system obtained is effective in drug delivery. The results have shown a total biodegradability of the film, which appears to be resistant in aqueous environment and able to release the active principle that is intercalated between chains of polysaccharide and protein.

Abbreviazioni ed acronimi

TGA: analisi termogravimetrica

IR-ATR: spettroscopia infrarossa in riflettanza totale attenuata

SEM: microscopia elettronica a scansione

Ker: cheratina

Alg: alginato

Prop: propoli

Vit C: vitamina C

DPPH: 1,1-difenil-2-picrilidrazile

IPN: *Interpenetrating polymer network*

H₂O milli-Q: acqua purificata e deionizzata ad un alto livello di purificazione

1. Introduzione	p. 1
1.1 Tipi di ferite	p. 2
1.2 Struttura della cute	p. 3
1.3 Processo di guarigione delle ferite	p. 4
1.4 Cheratina	p. 7
1.5 Alginato	p. 9
1.6 Vitamina C	p. 14
1.7 Propoli	p. 16
1.8 Rilascio controllato di principi attivi	p. 19
2. Scopo del lavoro	p. 20
3. Risultati e discussione	p. 22
3.1 Estrazione della cheratina	p. 22
3.2 Caratterizzazione della cheratina estratta	p. 24
3.3 Preparazione dei film	p. 25
3.3.1 Studio reologico delle soluzioni	p. 25
3.3.2 Preparazione dei film di cheratina ed alginato	p. 27
3.3.3 Preparazione dei film caricati con la vitamina C	p. 37
3.3.4 Preparazione dei film caricati con la vitamina C e la propoli	p. 38
3.4 Caratterizzazione dei film	p. 39
3.4.1 Caratteristiche morfologiche interne e superficiali	p. 39
3.4.2 Analisi SEM	p. 41
3.4.3 Analisi TGA	p. 43
3.4.4 Analisi FTIR-ATR	p. 47
3.4.5 Prove di swelling e biodegradazione	p. 49
3.4.6 Prove di rilascio della vitamina C	p. 50
3.4.6.1 Metodo spettrofotometrico diretto	p. 50
3.4.6.2 Metodo colorimetrico	p. 51
4. Conclusioni e sviluppi futuri	p. 54
5. Parte sperimentale	p. 56
5.1 Estrazione della cheratina dalla lana	p. 56
5.2 Caratterizzazione della cheratina estratta	p. 57
5.3 Preparazione dei film di alginato e cheratina	p. 57
5.3.1 Studio reologico	p. 57

5.3.2	Preparazione dei film per <i>crosslinking</i> tramite succinimidilico	p. 58
5.3.3	Preparazione dei film per ossidazione dell'alginato	p. 59
	5.3.3.1 Caratterizzazione dell'alginato ossidato	p. 59
5.3.4	Preparazione dei film con reazione di Maillard	p. 60
5.3.5	Preparazione dei film con glutaraldeide e cloruro di calcio	p. 60
5.4	Preparazione dei film caricati con la vitamina C	p. 61
5.5	Preparazione dei film caricati con la vitamina C e la propoli	p. 61
5.6	Caratterizzazione dei film	p. 62
5.7	Analisi TGA	p. 62
5.8	Prova di <i>swelling</i>	p. 62
5.9	Prove di degradazione <i>in vitro</i>	p. 63
5.10	Rilasci vitamina C	p. 64
	5.10.1 Metodo spettrofotometrico	p. 64
	5.10.2 Metodo colorimetrico	p. 64
	Riferimenti Bibliografici	p. 66

1. Introduzione

Con le parole “ulcere cutanee” si indicano delle lesioni caratterizzate dal fatto di non avere una tendenza spontanea alla cicatrizzazione. Ciò è da attribuire a patologie come quelle vascolari, il diabete ed in generale tutte le condizioni che causano l'allettamento del paziente. L'attenzione su questo tipo di ferita deriva dal fatto che sono estremamente invalidanti, causa di forti dolori e di isolamento sociale; inoltre, possono comportare conseguenze pesanti, tra cui le amputazioni e nei casi più gravi la morte.

Per capire l'impatto delle lesioni croniche, basti pensare che soltanto in Italia colpiscono oltre 2 milioni di individui, di cui 30.000 bambini. Si stima che, in Europa, siano colpite più di 10 milioni di persone e circa 80 milioni della popolazione mondiale¹. L'incremento dell'incidenza di queste patologie è andato di pari passo con l'aspettativa di vita: il suo aumento, infatti, ha determinato una crescita esponenziale di una nuova categoria di malati, soprattutto anziani, con due o più malattie croniche.

Non da ultimo, è da considerare l'impatto che questo tipo di lesione ha sul bilancio economico del Servizio Sanitario Nazionale: esse, difatti, rappresentano una delle prestazioni più dispendiose in assoluto e si stima che ogni anno venga speso, in Italia, circa 1 miliardo di euro per il solo costo ospedaliero, a cui vanno sommate le spese indirette, come le giornate lavorative perse dai pazienti e dai loro familiari e l'acquisto dei materiali di medicazione.

Negli ultimi anni la ricerca scientifica ha mostrato un crescente interesse verso la cura ed il trattamento delle ferite, come mostrato dai dati in *Figura 1*.

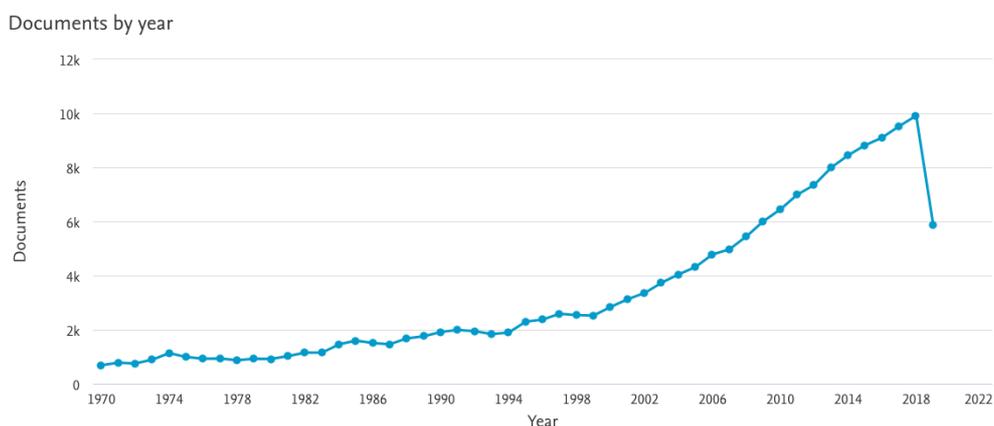


Figura 1. Andamento delle pubblicazioni scientifiche aventi come parole chiave “wound healing” dal 1970 al 31 luglio 2019, ricerca effettuata con *scopus.com*. Con il termine *wound healing* si indica l'insieme dei processi, attraverso cui l'organismo ripara un tessuto danneggiato.

1.1 Tipi di ferite

I tempi di guarigione di una normale ferita sono molto soggettivi e dipendono da diversi fattori, quali: l'età, lo stress, la presenza di malattie croniche, lo stato generale di salute fisico e mentale dell'individuo, la profondità e l'estensione della lesione, il consumo di alcool e tabacco, l'assunzione di determinati farmaci e l'alimentazione. In particolare, si possono distinguere due tipi di ferite:

- **Croniche:** si sostiene che le cause siano età, obesità e condizioni croniche, come, per esempio, il diabete. La totale guarigione, quando possibile, necessita di tempi lunghi, superiori alle due settimane²;
- **Acute:** richiedono dalle 8 alle 12 settimane per una totale guarigione e sono quelle causate da traumi, come ad esempio una bruciatura³. Questo tipo di lesione, tuttavia, può trasformarsi in una situazione più grave fino a sfociare in cronica.

Tra gli individui considerati più a rischio di contrarre infezioni in seguito ad un infortunio si individuano i diabetici: infatti, l'elevata concentrazione di glucosio nel sangue rallenta notevolmente il processo di guarigione. Inoltre, una patologia molto frequente che può colpire questi pazienti è l'arteriopatia periferica, che comporta delle gravi alterazioni dell'epidermide e che può sfociare, infine, nell'ulcerazione del piede: a questo punto, spesso, è richiesta l'amputazione dell'arto. Per comprendere meglio l'impatto numerico di questa patologia, basti pensare che colpisce circa il 15 % dei pazienti diabetici ed è responsabile del 50 – 70 % delle amputazioni non-traumatiche⁴.

Un altro esempio di condizione considerata a maggiore criticità è la formazione delle lesioni da decubito, causate da forze di pressione, trazione, frizione o da una combinazione di questi fattori, che si genera normalmente in corrispondenza di prominenze ossee e la cui gravità è classificata in diversi stadi⁵. Nella maggior parte dei casi questa situazione si manifesta in pazienti costretti a letto per lungo tempo e che spesso riportano un considerevole peggioramento dello stile di vita in seguito al

ricovero. Ad oggi non è conosciuto alcun trattamento che ne riduca al minimo la formazione, ma sono noti soltanto alcuni accorgimenti: è proprio per questo motivo che si cercano continuamente nuovi materiali e strumenti, che permettano una cura più veloce e mirata di tali lesioni.

Infine, un'altra situazione che richiede particolare attenzione è rappresentata dalle ustioni, in particolare quelle di maggiore gravità, classificate di grado II e III. Anche in questo caso la prassi da utilizzare non è quella comune: infatti, dal momento che i tessuti vengono danneggiati gravemente e che vi è un'alta percentuale di complicazioni, queste ferite rientrano all'interno di quelle a criticità elevata.

1.2 Struttura della cute

Per comprendere più a fondo come avviene il meccanismo di guarigione, si deve osservare la struttura stratificata della cute umana, rappresentata in *Figura 2*.

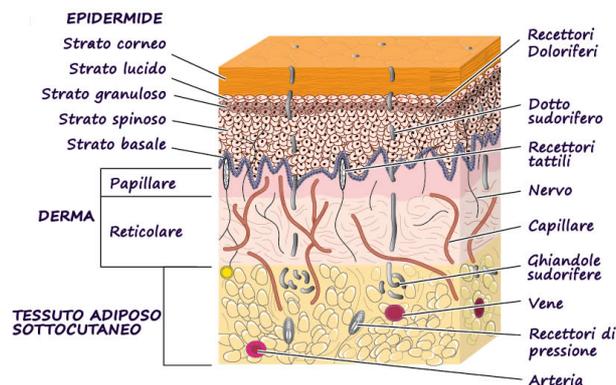


Figura 2. Struttura della cute

- primo strato: l'epidermide. È un sottile strato esterno che funge da barriera, impedendo da un lato la penetrazione dall'esterno di acqua, sostanze estranee e microrganismi, e dall'altro evitando che l'organismo rilasci acqua ed elettroliti. È formato, a sua volta, da cinque strati, ciascuno dei quali con una propria funzione. L'epidermide è priva di vasi e di conseguenza le sostanze nutritive le arrivano dai capillari del derma, mediante meccanismi di diffusione. Le cellule più comuni in questo strato sono i cheratinociti: capaci di sintetizzare la cheratina, proteina strutturale non solubile e molto resistente alle variazioni di temperatura e pH. Insieme ad essi si trovano anche i melanociti, che producono la melanina, pigmento cutaneo che determina il colore della pelle e dei capelli.

- secondo strato: il derma. È costituito da tessuto connettivo spesso, ricco di vasi e nervi. Le cellule caratteristiche di questa regione sono i fibroblasti, fondamentali per lo sviluppo di nuovo tessuto: infatti, sono in grado di sintetizzare i precursori, per esempio, del collagene e dell'elastina. Altri componenti che si trovano nel derma sono i macrofagi ed i linfociti: entrambi partecipano ai meccanismi di difesa dell'organismo, perciò svolgono un ruolo fondamentale nel processo di guarigione. Anche questo strato è suddiviso in altri due, che differiscono per lo spessore e l'ordinamento delle fibre.

- terzo strato: il sottocutaneo. È costituito da tessuto connettivo, che in profondità è legato alla fascia muscolare ed ai legamenti. In tutto questo strato si può depositare tessuto adiposo con funzione isolante, modellante e di deposito energetico.

1.3 Processo di guarigione delle ferite

I fenomeni che intervengono durante il processo di guarigione delle ferite (*wound healing*) sono:

- la *riparazione*, che consiste nella sostituzione di tessuti specializzati attraverso la deposizione di collagene;
- la *rigenerazione*, che, invece, prevede la proliferazione cellulare e la successiva differenziazione ad opera di cellule preesistenti o staminali⁶.

Per quanto riguarda la riparazione tissutale, vi sono tre modi attraverso cui può essere espletata l'attività di guarigione:

- Per prima intenzione: è ciò che si verifica per le comuni "suture chirurgiche". I tempi di guarigione sono brevi: infatti, la sutura avvicina i due lembi cutanei ed in questo modo la rigenerazione del tessuto cicatriziale è più veloce;
- Per seconda intenzione: si tratta di un processo molto lungo, che viene attuato soprattutto in caso di gravi ustioni. I tempi prolungati dipendono dal fatto che il tessuto rigenerato, ovvero quello che andrà a formare la *nuova* pelle, si forma sul fondo della ferita e cresce pian piano verso la zona effettivamente esposta;
- Per terza intenzione: viene effettuata in seguito a complicazioni del primo caso illustrato e consiste in una medicazione di seconda intenzione.

Il *wound repair* avviene in quattro stadi⁷, brevemente illustrati in *Figura 3*:

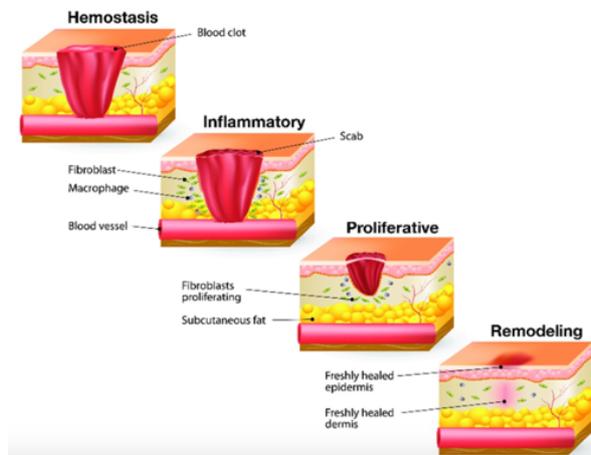


Figura 3. Fasi di guarigione di una lesione

- 1- *Emostasi e coagulazione*: avvengono subito dopo l'infortunio e durano pochi minuti. Questi due meccanismi intervengono per prevenire l'eccessiva perdita di sangue e per formare una matrice, necessaria per le cellule che intervengono negli stadi successivi. Praticamente, l'organismo si difende attraverso la vasocostrizione dei vasi lesionati; contemporaneamente viene attivata la coagulazione: i componenti del sangue, insieme alle piastrine, entrano in contatto con il collagene esposto e con le specie della matrice extracellulare, provocando il rilascio dei fattori di coagulazione dalle piastrine. In questo modo si ha la formazione di un coagulo di sangue, costituito da fibroectina, fibrina, vitronectina e trombospondina^{8,9}. Quest'ultimo e le piastrine, contenute al suo interno, sono importanti non solo per l'emostasi, ma anche perché creano una matrice provvisoria per la migrazione cellulare delle fasi successive. Inoltre, nel citoplasma delle piastrine sono contenute delle particolari molecole che attirano i neutrofili e successivamente anche i macrofagi, le cellule endoteliali ed i fibroblasti¹⁰. In aggiunta, intervengono delle ammine vasoattive, come la serotonina, che causano vasodilatazione ed accrescono la permeabilità vascolare: in tal modo portano alla formazione dell'edema, che, poi, cresce durante lo step successivo^{11,12}.
- 2- *Infiammazione*: serve per creare una barriera immunitaria contro i microrganismi invasori. È caratterizzata da quattro sintomi (arrossamento, calore, gonfiore, dolore) e si articola in due momenti:

- Fase iniziale: inizia durante la fine della coagulazione ed è molto breve. Nella zona lesionata penetrano i neutrofili, che hanno il compito principale di prevenire l'infezione, distruggendo e rimuovendo i batteri presenti. Essi vengono richiamati nelle prime 24 – 36 ore ed hanno il compito di fagocitare le sostanze nocive e rilasciare enzimi. Quando tutti i batteri sono stati rimossi, l'attività dei neutrofili cambia ed essi devono essere eliminati, prima di passare alla fase successiva, attraverso meccanismi di apoptosi¹³.
 - Fase tardiva: inizia 48 – 72 ore dopo la lesione, con la comparsa dei macrofagi, che continuano la fagocitosi^{14,15}. Anche loro sono attirati nel luogo della ferita da numerosi agenti chemoattrattivi¹⁶, come accade per i neutrofili. I macrofagi agiscono come regolatori di cellule ed attivano cheratinociti, fibroblasti e cellule endoteliali. Le ultime specie che intervengono nel processo sono i linfociti, adibiti alla regolazione del collagene ed implicati nella sintesi dei componenti della matrice extracellulare¹⁷.
- 3- *Proliferazione*: inizia il terzo giorno ed ha una durata di circa due settimane. In questa fase si ha la migrazione dei fibroblasti e la deposizione di una nuova matrice extracellulare. Visivamente si osserva la comparsa di un tessuto granuloso. Questo processo è molto complesso e costituito da diversi step:
- Migrazione dei fibroblasti: giunti sul luogo della lesione, iniziano a proliferare e producono una matrice costituita da diversi elementi, tra cui procollagene di tipo I e III. La formazione di una quantità consistente di questo tessuto provoca la contrazione della ferita;
 - Sintesi di collagene: i diversi tipi di questo materiale vengono sintetizzati dai fibroblasti e servono per dare sostegno ai tessuti;
 - Angiogenesi: durante questa fase si verifica la formazione del tessuto di granulazione, grazie all'attività dei fibroblasti che stimolano la produzione di collagene. All'interno di questo nuovo tessuto si formano contemporaneamente nuovi vasi, per fornire sostanze nutritive attraverso il flusso sanguigno;
 - Protrusione, adesione, trazione ed epitelizzazione: il processo termina con la totale copertura della lesione con nuovo epitelio e di conseguenza con la chiusura della ferita stessa. Man mano, poi, l'attività dei fibroblasti ed il numero di capillari diminuiscono: così avviene la trasformazione del tessuto da granuloso a cicatriziale;

- 4- *Rimodellamento*: è la fase più lunga di tutto il processo, può durare anche anni. Si tratta praticamente della maturazione della ferita, al fine di ottenere una cicatrice solida e robusta.

Si può, quindi, concludere che la guarigione di una lesione non è affatto un processo semplice e che spesso viene richiesto un aiuto differente a seconda della situazione che si presenta. La difficoltà del meccanismo, unita ad un bisogno sempre crescente di trattamenti mirati e personalizzabili, è stata lo spunto per numerosi studi su nuovi materiali. I *wound dressings*, ossia i materiali che vengono utilizzati per coprire le ferite, possono essere classificati come: **normali** (comuni garze), derivati da biomateriali, **interattivi** (films, gels, schiume a base di alginato, chitosano, gelatina) e **bioattivi** (per esempio, alginato caricato con fattori di crescita ed agenti antimicrobici). In generale, una medicazione dovrebbe avere le seguenti caratteristiche: essere permeabile all'umidità ed all'ossigeno, permettere lo scambio di sostanze nutritive, mantenere una temperatura vicina a quella corporea, essere anallergica e garantire la rimozione dei liquidi extra-corporei.

Scopo del mio lavoro di tesi è stato lo studio di un nuovo sistema da impiegare nella cura delle ferite, costituito da **alginato** e **cheratina** in forma di film, contenente **vitamina C** e **propoli**.

1.4 Cheratina

La cheratina è la più abbondante proteina fibrosa presente in natura ed ha principalmente una funzione strutturale. È costituita da lunghe catene di amminoacidi ed in *Figura 4* si può osservare la sua struttura caratteristica.

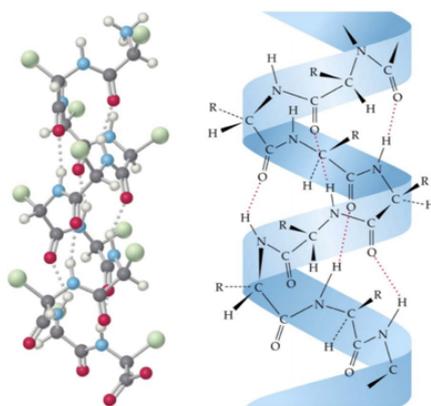


Figura 4. Struttura secondaria ad α -elica di un filamento proteico

Ciò che la contraddistingue da altre proteine come, per esempio, il collagene, è la presenza di numerose cisteine, che rappresentano circa il 7 – 20 % dei suoi amminoacidi ed i cui residui tiolici sono uniti da legami a ponte di zolfo (S-S). Da questa caratteristica derivano le proprietà principali della cheratina: infatti, queste reticolazioni conferiscono elevata stabilità e scarsa solubilità, con un guadagno in proprietà meccaniche, chimiche e termiche¹⁸. All'interno delle catene proteiche, inoltre, vi sono anche altri tipi di legami: le interazioni idrofobiche tra gruppi non polari, i legami ad idrogeno e quelli ionici, che vedono coinvolti i cationi NH_3^+ e gli anioni COO^- . È contenuta nello strato più esterno della pelle, l'epidermide, e costituisce il componente di alcuni materiali naturali come capelli, unghie, lana e piume.

Le fibre di questo materiale mostrano una struttura cellulare complessa, composta da una regione esterna, la *cuticola*, ed una interna porosa, la *corteccia*, costituita da cellule corticali e da una matrice detta *Cell Membrane Complex*. Per comprendere più nel dettaglio la morfologia delle fibre di lana, bisogna fare una breve descrizione dei suoi componenti:

- *Cuticola*: ha una funzione protettiva, in quanto agisce da barriera contro l'attacco degli agenti chimici nei confronti dello strato più interno. Rispetto alla corteccia, ha un contenuto maggiore di cisteina, che le conferisce una rigidità più elevata, nonché di prolina, valina e serina: questi amminoacidi si dispongono generalmente in maniera disordinata, formando delle regioni amorfe¹⁹;
- *Corteccia*: è formata da diverse cellule corticali, costituite principalmente da fasci di fibre di cheratina, che sono orientate verticalmente e compongono il tronco fibroso;
- *Cell Membrane Complex*: ha la funzione di legare insieme le cellule corticali e quelle che costituiscono la cuticola.

L'utilità della cheratina nel campo del *wound healing* e, più in generale, nell'intero panorama biomedico, è da attribuire ad alcune importanti proprietà, quali: biocompatibilità, biodegradabilità, azione antinfiammatoria ed emostatica. Tutti questi fattori contribuiscono a renderla una potenziale materia prima *green*, che potrebbe essere utilizzata nel *wound care*, nel *tissue repair*, nel *drug delivery*, nonché in cosmetica. Un altro vantaggio è la presenza, nella struttura primaria di questa proteina,

di determinate sequenze, capaci di richiamare sulla zona lesionata cellule fondamentali al processo di guarigione, come, per esempio, i cheratinociti ed i fibroblasti²⁰. In particolare, le sequenze amminoacidiche in grado di promuovere l'adesione e la crescita cellulare sono: Arg-Gly-Asp e Leu-Asp-Val²¹. Un ulteriore fattore che ne favorisce l'utilizzo è legato allo smaltimento della lana, sia quella industriale che quella proveniente dalla tosatura delle pecore, ed è di natura ambientale. Infatti, la lana di tosa degli allevamenti non è adatta alla filatura a causa della grossezza del filo. Questo comporta un problema per il suo smaltimento, dal momento che non può essere lasciata nei campi all'aria, in quanto rischia di richiamare batteri, ma dall'altra parte il suo incenerimento è molto inquinante a causa della presenza di zolfo, problematica che ovviamente si riscontra anche per il materiale proveniente dagli scarti dell'industria tessile. La soluzione, quindi, è trovarle una nuova applicazione, in un'ottica di economia circolare. Inoltre, le vigenti normative europee prevedono che la cheratina utilizzata per la fabbricazione di dispositivi biomedicali non debba provenire da derivati umani, ma solo animali.

La cheratina utilizzata in questo progetto è stata estratta da fibre di lane di scarto, provenienti dalla tosa di allevamenti ovini, ed il processo utilizzato è quello della solfitolisi, che verrà spiegato successivamente nel dettaglio. La proteina denaturata così ottenuta è maggiormente solubile in acqua, ma si provoca un peggioramento di alcune proprietà meccaniche importanti. Un metodo per evitare che ciò si verifichi è mescolare la cheratina con un altro polimero avente caratteristiche meccaniche ottimali, come, per esempio, l'alginato di sodio.

1.5 Alginato

L'alginato è la parte anionica dei sali dell'acido alginico. Quest'ultimo è un copolimero lineare a blocchi formato da due acidi, D-mannuronico e L-guluronico. È un polisaccaride molto abbondante nella parete cellulare dell'alga bruna e viene anche prodotto da alcuni batteri²². Le sue proprietà variano a seconda del rapporto tra le concentrazioni dei due monomeri: per comprendere le differenze che vi possono essere, basti pensare che soltanto i blocchi del tipo G interagiscono con i cationi divalenti, per avere reticolazione intermolecolare.

L'acido alginico è insolubile in acqua, ma attraverso un processo industriale viene purificato e solitamente commercializzato in forma salina, generalmente come alginato di sodio, che, invece, è solubile in soluzione acquosa. In *Figura 5* è schematizzata la struttura di un alginato.

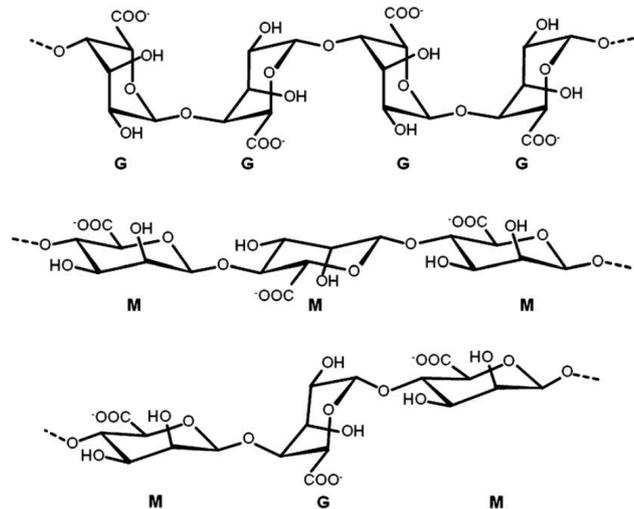


Figura 5. Struttura di un alginato. Blocchi omopolimerici di D- mannuronato, di L-gulonato, o polimero costituito da monomeri di acido D-mannuronico ed L-gulonico alternati e legati con legame glicosidico $\beta(1,4)$

Tra tutti i prodotti di origine naturale, alcuni polisaccaridi sono molecole particolari, che, grazie alle loro proprietà, possono fornire diversi ed utili benefici alla pelle, motivo per cui trovano numerose applicazioni sia nel campo della cosmetica che in quello biomedico²³. Tra gli esempi di benefici che queste molecole apportano, per esempio, troviamo: effetto idratante sulla pelle, aumento della stabilità delle formulazioni cosmetiche e riduzione della perdita d'acqua trans-epidermica. Più in generale, si può affermare che i polisaccaridi hanno un grande potenziale, dal momento che possono migliorare la protezione e l'idratazione della pelle, promuovendo la formazione di prodotti stabili e con piacevoli proprietà sensoriali²⁴. A seconda della loro carica, questi polimeri vengono suddivisi in: anionici, cationici, non-ionici, anfoteri ed idrofobici. All'interno della categoria dei polisaccaridi, l'alginato è sicuramente quello che ha richiamato maggiormente l'attenzione in diversi campi dei settori farmaceutico e cosmetico.

Gli idrogel di questo materiale possono essere sintetizzati attraverso diversi metodi di *crosslinking* e trovano numerose applicazioni nel campo del *wound healing*, perché sono in grado di mimare la matrice extracellulare dei tessuti. Le medicazioni di

alginato, inoltre, permettono di mantenere un microambiente fisiologico umido, fondamentale per il processo di guarigione di una lesione, e di minimizzare le infezioni batteriche.

Alcuni esempi di metodiche utilizzate per formare l'idrogel di alginato sono:

- 1) *Crosslinking ionico*: è il procedimento più comune e consiste semplicemente nel miscelare insieme una soluzione di alginato di un catione monovalente, tipicamente Na^+ , con un'altra contenente uno ione positivo divalente. È stato osservato che gli ioni con carica +2 si legano solo ai blocchi di guluronato: questi, poi, formano delle giunzioni con altri blocchi uguali di catene polimeriche adiacenti, dando la struttura illustrata in *Figura 6*.

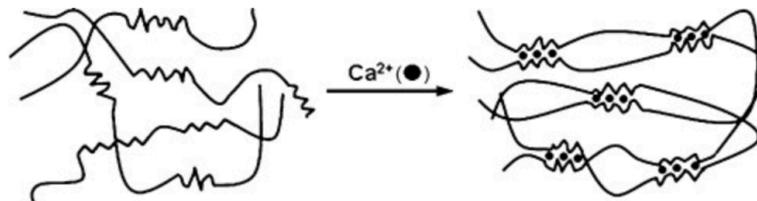


Figura 6. Sistema di alginato crosslinkato mediante cationi di Ca^{2+}

L'agente più comunemente usato per compiere questa reticolazione è CaCl_2 , che, però, ha il grande limite di comportare una gelificazione troppo veloce per poter essere controllata. Questa caratteristica può rappresentare un problema notevole, soprattutto nelle situazioni in cui è richiesta una struttura estremamente uniforme. Vi sono due possibili soluzioni: la prima consiste nell'utilizzo di un tampone fosfato, la seconda è quella di agire su un controllo della temperatura. È evidente che le proprietà del prodotto finale dipendano da un insieme di fattori, primi tra tutti la struttura dell'alginato di partenza e le condizioni in cui viene condotto il processo.

Una proprietà degli idrogel ottenuti mediante questo metodo è quella di essere biodegradabili: infatti, il polisaccaride di suo non lo sarebbe, perché nel nostro organismo non possediamo gli enzimi necessari per degradarlo, ma la presenza di un *crosslinking* di tipo ionico ne permette un graduale deterioramento in ambiente fisiologico. Questo processo è dovuto al fatto che i cationi Ca^{2+} subiscono processi di scambio con quelli monovalenti, come Na^+ , per esempio²⁵. Nel caso in cui si vogliano produrre delle bende biomedicali, che

non devono essere rimosse dal luogo della lesione, questa proprietà rappresenta sicuramente un grande vantaggio.

2) *Crosslinking covalente*: permette di ottenere delle strutture più stabili, che, quindi, non subiscono fenomeni di biodegradazione, e, inoltre, è possibile avere un maggiore controllo sulla gelificazione. Un esempio di reagente utilizzato in questo campo è il glicole polietilenico (PEG). La problematica principale di questo processo è che spesso gli agenti *crosslinkanti* sono tossici e, di conseguenza, è necessario eliminare la frazione che non ha reagito attraverso meccanismi di purificazione dispendiosi.

3) *Gelificazione termica*: gli idrogel termo-sensitivi hanno avuto un grande successo nel *drug delivery*, dal momento che il loro *swelling*, ovvero il rigonfiamento, cambia in risposta ad una variazione di temperatura, permettendo un rilascio controllato del principio attivo contenuto nel gel.

Questi materiali possiedono una temperatura caratteristica, nota come LCST (*Lower Critical Solution Temperature*): al di sotto di questo valore, il polimero è solubile in soluzione, al di sopra si verifica una separazione di fase. Sfruttando il valore di questo limite, è possibile regolare il rilascio di un determinato principio attivo, come mostrato in *Figura 7*.

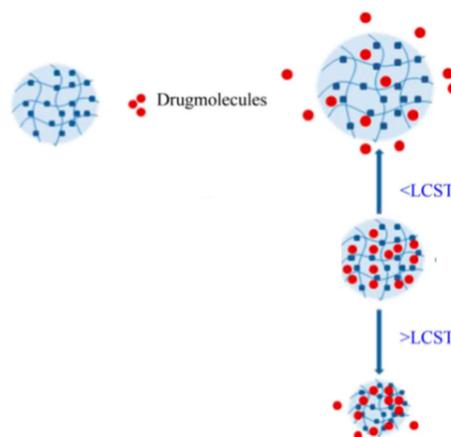


Figura 7. Drug delivery mediante un idrogel termo-sensibile

Dopo aver esaminato i tre principali metodi di formazione dei gel di alginato, è interessante vederne alcune applicazioni biomediche generali:

- *Delivery* di principi attivi: generalmente, se non si ha la formazione di un legame covalente, le piccole molecole intercalate tra le catene del polisaccaride vengono liberate in tempi brevi. Tuttavia, il rilascio non è uniforme: quelle più

esterne escono prima, le altre, che si trovano tra le ramificazioni più interne, hanno, invece, bisogno di tempi maggiori.

Esiste anche la possibilità di caricare contemporaneamente più principi attivi insieme e fare in modo che vengano rilasciati in maniera differente. Per esempio, è possibile inserire una molecola attiva (A) che non si lega in modo covalente con il polimero ed un'altra (B) che, invece, crea un legame abbastanza stabile: in questo modo, il primo principio attivo ad essere liberato è quello A, mentre B verrà rilasciato più lentamente e con un meccanismo differente.

- *Delivery* di proteine: l'alginato è un candidato eccellente per il trasporto di proteine, dal momento che esse possono essere incorporate nel suo idrogel con meccanismi semplici, che, quindi, ne minimizzano la denaturazione, ed inoltre svolge un'azione protettiva nei confronti della loro degradazione. Generalmente, si tratta di un rilascio abbastanza veloce, a causa delle naturali porosità ed idrofilicità del gel.

L'applicazione pratica sicuramente più studiata dei prodotti a base di alginato è il *wound dressing*. I materiali tradizionali, si pensi alle comuni garze, hanno per lo più una funzione di barriera protettiva: tengono la ferita asciutta mediante l'evaporazione dell'essudato, mentre prevengono l'entrata di agenti patogeni²⁶. I nuovi materiali, invece, mantengono il luogo della lesione umido ed in tal modo favoriscono una guarigione più veloce. In particolare, le medicazioni a base di alginato nella fase asciutta assorbono l'essudato della ferita per gelificare nuovamente: così, permettono di mantenere un microambiente fisiologicamente umido e minimizzano le possibilità di infezione. Inoltre, queste proprietà possono favorire la formazione del tessuto granulare e di conseguenza facilitano il processo di epitelizzazione²⁷.

I gel a base di alginato possono essere utilizzati anche per la rigenerazione dei tessuti, mediante il trasporto di proteine e/o cellule capaci di incrementarne il processo. La maggior parte delle proteine diffondono velocemente fuori, anche in assenza di degradazione del gel stesso. A differenza loro, le cellule più grandi non riescono a passare attraverso i pori dell'alginato: di conseguenza, vengono rilasciate solo quando il materiale inizia a sfaldarsi.

Un'altra applicazione riguarda lo sviluppo dei vasi sanguigni, in particolare i gel di questo polisaccaride sono stati sfruttati come veicolo di varie molecole angiogeniche. Facendo un passo indietro, la neovascolarizzazione è un processo complesso ma fondamentale, in quanto i vasi sanguigni sono fondamentali per il trasporto di sostanze nutritive a tutti i tessuti, la rimozione degli scarti metabolici e la consegna di cellule staminali, fondamentali per la crescita degli organi dell'embrione, e la riparazione delle ferite nell'adulto²⁸. Per esempio, alcuni studi hanno dimostrato che l'iniezione di questo gel direttamente in un tessuto muscolare ischemico porta ad un rilascio a lungo termine di un fattore di crescita legante l'eparina, che favorisce la nuova formazione capillare ed in questo modo permette di alleviare l'ischemia tissutale²⁹.

Infine, altre due possibili funzionalità dei gel di alginato riguardano la rigenerazione ossea, essendo in grado di trasportare fattori osteoinduttivi e cellule specifiche, e quella del collagene. Il loro vantaggio rispetto ai comuni materiali è dovuto al fatto che possono essere somministrati al paziente in maniera poco invasiva, riescono a riempire difetti di forma irregolari, si modificano facilmente con ligandi di adesione e, inoltre, permettono un rilascio controllato di fattori di induzione dei tessuti.

1.6 Vitamina C

L'acido ascorbico è un composto idrosolubile e molto instabile, in quanto è estremamente sensibile all'azione di luce, calore ed aria. Le due attività principali che svolge all'interno dell'organismo sono: quella antiossidante e la sintesi di collagene, proteina necessaria per la generazione del tessuto connettivo di pelle, legamenti ed ossa. Gli esseri umani sono tra i pochi animali che non riescono a sintetizzare da soli questa vitamina, perciò è necessario re-integrarla con la dieta o con specifici integratori. Un organismo sano, quando è completamente saturo, contiene circa 5 g di acido ascorbico, di cui: 30 mg si concentrano nelle ghiandole surrenali, 20 mg nei fluidi extracellulari ed il resto si distribuisce in tutte le cellule del corpo. Il Consiglio Nazionale di Ricerca ne raccomanda l'assunzione di 60 mg al giorno, tuttavia, questa quantità può essere estremamente variabile: infatti, ci sono alcune situazioni, come ansia ed influenza, che ne richiedono un quantitativo più elevato. La capacità dell'organismo di assorbire la vitamina C viene ridotta dal fumo, dallo stress, dalla temperatura corporea elevata, dall'eccessivo consumo di acqua e di alcol e da malattie croniche. Normalmente, la pelle ha un elevato contenuto di vitamina C, presente in

compartimenti intracellulari in concentrazione millimolare³⁰, e, essendo molto solubile, viene trasportata alle diverse cellule dell'organismo dai vasi sanguigni.

Un interessante focus può essere fatto sulle potenziali funzionalità della vitamina C a vantaggio della pelle.

L'acido ascorbico favorisce il processo di formazione del collagene ad opera dei fibroblasti: infatti, agisce da cofattore per l'enzima idrossilasi, che trasforma la prolina e la lisina nei corrispondenti derivati idrossilati, amminoacidi modificati che stabilizzano la struttura terziaria del collagene, ed inoltre promuove l'espressione dei suoi geni³¹. Il suo ruolo, quindi, è duplice: da una parte stabilizza il collagene mediante idrossilazione di alcuni amminoacidi costituenti, dall'altra stimola la produzione di mRNA di questa proteina da parte dei fibroblasti. A questo proposito, sono stati condotti numerosi studi che dimostrano una sua partecipazione anche nel processo di differenziazione dei cheratinociti, nonché in quello di sintesi e organizzazione della barriera lipidica. I meccanismi di azione non sono noti: si pensa, tuttavia, che avvengano sotto il controllo della proteina chinasi C³².

In seconda battuta, poi, la vitamina C esplica una funzione antiossidante, insieme anche ad altri componenti, come le super-ossido dismutasi e le catalasi. È particolarmente efficiente nel limitare i danni alla pelle dovuti a processi ossidativi, soprattutto se usata in tandem con la vitamina E, grazie alla capacità di potersi ossidare in maniera estremamente veloce, come mostrato in *Figura 8*:

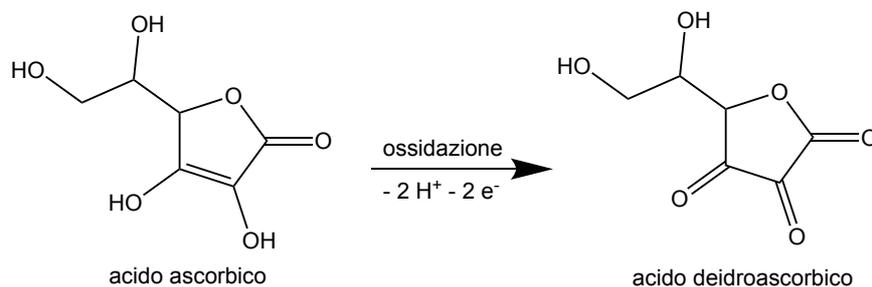


Figura 8. Meccanismo di ossidazione della Vitamina C

La protezione dalle radiazioni ultraviolette dovrebbe essere una priorità per tutti gli individui, sia per quanto riguarda il discorso dell'invecchiamento cellulare, sia perché la loro azione può portare a gravi malattie. Il danno è causato dalla produzione di specie di ossigeno reattive, che possono danneggiare i componenti della matrice

extracellulare e colpire sia la struttura che le funzioni delle cellule. L'esposizione alle radiazioni UV comporta una perdita di collagene dal derma e, di conseguenza, un deterioramento dello strato superficiale della cute. In particolare, la vitamina C previene l'apoptosi, ovvero la morte programmata, dei cheratinociti e, inoltre, accresce la sopravvivenza cellulare³³.

Per quanto riguarda il meccanismo con cui l'acido ascorbico rallenta l'invecchiamento naturale della pelle, non vi sono delle vere e proprie evidenze sperimentali che ne attestino i benefici, ma è noto cosa accade se ve ne è una carenza: un suo deficit, infatti, causa disidratazione, secchezza ed opacità³⁴.

Visto il crescente interesse dimostrato per il *wound healing*, è stato studiato l'effetto di diverse molecole sul meccanismo di guarigione e la vitamina C ha da subito richiamato l'attenzione di molti ricercatori: infatti, il suo ruolo di co-fattore e la sua attività antiossidante ne causano un coinvolgimento in molti step del processo, soprattutto per quanto riguarda la formazione del collagene, ed in secondo luogo interviene anche nella modulazione del sistema immunitario. In particolare, l'acido ascorbico favorisce la biosintesi di nuovo collagene, ma anche quella delle ceramidi, con il fine di formare uno strato lipidico resistente sull'epidermide. Infatti, questa vitamina funge da cofattore in numerosi processi enzimatici, come appunto la sintesi di collagene, che è indispensabile durante la guarigione di una lesione, ed in aggiunta contrasta la perdita di sangue.

1.7 Propoli

Dal greco pro-polis, "in difesa della città", la propoli è una resina naturale di colore giallo-marrone, utilizzata dalle api per proteggere e rinforzare l'alveare, nonché sigillare i favi in modo da evitare l'intrusione di ospiti indesiderati^{35,36}. La composizione chimica di questo materiale è complessa: infatti, contiene circa 180 differenti composti, tra cui flavonoidi, esteri fenilici dell'acido caffeico, amminoacidi e tracce di minerali, come zinco e ferro^{37,38}. In *Tabella 1* è mostrato un esempio di composizione di una propoli naturale, non preventivamente trattata³⁹.

Tabella 1. Esempio di composizione chimica della propoli

Gruppo di sostanze	Percentuale in propoli grezza (%)	Osservazioni
Idrocarburi, cere, esteri ad alto peso molecolare, eteri e chetoni, livelli elevati di acidi grassi, steroidi.	5 - 40	Provengono prevalentemente dalla cera d'api; se ne riscontrano i residui dopo la filtrazione di una soluzione alcolica.
Polifenoli: calconi, calconi diidrossi, flavononi, flavoni, flavonoli.	5 - 50	Solubili in alcol.
Acidi aromatici, esteri di acidi aromatici con alcol, terpenoidi, alcol, aldeidi, chetoni.	1 - 25 g/100 g	Generalmente solubili in alcol.
Aminoacidi, zuccheri, vitamine, sostanze minerali.	1 - 10 g/100 g	Solubili in acqua e soltanto poco solubili in alcol.

La propoli riveste la superficie interna del nido delle api, in modo tale da renderla quanto più sterile possibile. A questo proposito, una sua ulteriore applicazione è quella di “imbalsamare” eventuali organismi che le api hanno ucciso, ma che non possono portare all'esterno: così si impedisce lo sviluppo della microflora putrefattiva, sfruttando le proprietà antimicrobiche⁴⁰.

L'applicazione della propoli in medicina e cosmetica ha radici molto antiche: gli Incas, infatti, la impiegavano in caso di febbre, mentre gli Egizi la utilizzavano per la mummificazione dei faraoni. Sono stati, inoltre, trovati dei trattati russi del XII secolo che ne attestano l'efficacia nella cura di mal di gola, piaghe e, più in generale, delle ferite.

Il successo di questo prodotto naturale è dovuto alle sue numerose proprietà: antimicrobiche, antinfiammatorie, anestetiche, immunostimolanti, epatoprotettive, antitumorali, cicatrizzanti ed antiossidanti.

Nella maggior parte delle formulazioni, la propoli è contenuta come estratto idroalcolico e questo genera una serie di complicazioni, come odore-sapore pungente ed una serie di effetti dovuti all'etanolo presente⁴¹. Inoltre, una grossa problematica è rappresentata dalla scarsa solubilità, sia per quanto riguarda i processi di lavorazione, che per la concentrazione che può raggiungere nel sito danneggiato. Visto l'interesse sempre crescente nei confronti di questa resina, si sta sviluppando un numero in continuo aumento di processi industriali con il fine comune di migliorare le proprietà chimico-fisiche della propoli, senza alterarne i naturali benefici.

È interessante notare che esistono diversi tipi di questa resina, in base al tipo di flora locale, alla stagione ed alle zone di provenienza. Normalmente, la composizione è la

seguinte: 10 – 30 % cere, 50 – 55 % resine e balsami, 10 – 15 % oli essenziali e 5 % polline. Alcuni studi riportano che questi ultimi dati possono variare molto in funzione del clima, in particolare: se esso è temperato (Europa, Asia, Nord America), è favorita la crescita di piante appartenenti a determinate famiglie, da cui deriva la produzione di una propoli ricca in composti fenolici (flavonoidi), acidi aromatici e loro derivati esterificati, esteri dell'acido caffeico con alcoli a lunga catena^{39,42}; se, invece, ci si trova in zone tropicali, la concentrazione maggiore include flavonoidi, sia come quelli europei, che differenti, derivati prenilati dell'acido cumarico e dell'acetofenone, diterpeni e lignani⁴³.

Un enorme vantaggio da non sottovalutare della propoli, che è il motivo alla base della sua estrema versatilità, è la sua buona tollerabilità topica, da cui derivano rarissimi casi di allergia⁴⁴. L'effetto collaterale più frequente, sebbene classificabile come raro, è l'insorgenza di leggere dermatiti.

All'interno del variegato panorama del *wound healing*, la proprietà che sicuramente attira maggiore interesse è quella antimicrobica. Dal momento che essa è attiva in tutti i diversi tipi di resina, risulta evidente che non sia dovuta ad una singola componente, ma che sia il risultato dell'azione sinergica di più molecole, soprattutto di flavonoidi e fenoli. L'attività antibatterica viene esplicitata attraverso molteplici meccanismi d'azione⁴⁵, tra cui:

- Inibizione della divisione cellulare, così da evitare il moltiplicarsi dei batteri
- Scompaginamento della membrana citoplasmatica e della parete cellulare
- Inibizione della sintesi proteica e della RNA – polimerasi
- Inibizione enzimatica

Uno svariato numero di studi ne ha confermato il ruolo benefico nel complesso processo di guarigione delle ferite: infatti, facilita la formazione del tessuto di granulazione, stimola la rigenerazione epiteliale e regola la deposizione della matrice extracellulare. Inoltre, si pensa che potrebbe diminuire i danni alle cellule dei fibroblasti, eliminando le specie reattive di ossigeno che si trovano nell'ambiente intracellulare.

Infine, da un punto di vista applicativo e di *green chemistry*, è vantaggioso utilizzare una sostanza totalmente naturale e rinnovabile per il *wound care*.

1.8 Rilascio controllato di principi attivi

All'interno di una matrice polimerica complessa, come quella costituita da alginato e cheratina, è possibile intercalare un principio attivo: esso, poi, in determinate condizioni può migrare dall'interno verso la superficie esterna e, quindi, uscire nel mezzo di rilascio⁴⁶. Il meccanismo che regola la fuoriuscita del soluto è regolato da una serie di fattori, quali, per esempio, le caratteristiche chimico-fisiche sia sue che della matrice che lo contiene, la porosità del materiale le interazioni che si stabiliscono, la natura e la stabilità del legame. Tuttavia, si possono riconoscere tre forze principali che regolano il rilascio dei farmaci: la degradazione del sistema, la tendenza del soluto a diffondere ed il grado di rigonfiamento della matrice⁴⁷ (che, nel caso in esame, è costituita da alginato e cheratina).

In questo lavoro come principio attivo è stata scelta la vitamina C, in virtù del suo ruolo attivo nella sintesi di collagene. Generalmente, questa molecola viene assunta con la dieta o, in caso di grave carenza, con integratori per via orale. Tuttavia, una sua somministrazione per via transdermica (*trans-dermal delivery*) permette di mantenere più a lungo la concentrazione efficace di sostanza sul luogo della lesione e, inoltre, evita al paziente una serie di disagi, come l'assunzione di pillole, per esempio.

2. Scopo del lavoro

Lo scopo di questo lavoro di tesi è la sintesi e la caratterizzazione di un film a base di cheratina ed alginato, caricato con vitamina C e propoli, per applicazioni biomedicali, come la cura e la rimarginazione delle ferite (*wound healing*). La schematizzazione della struttura è rappresentata in *Figura 9*:

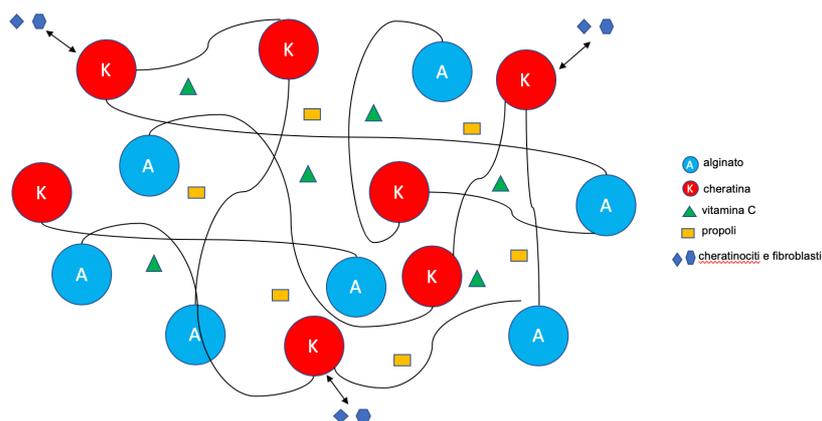


Figura 9. Struttura del film

Il materiale di partenza è la cheratina, per via della sua elevata biocompatibilità e della capacità di richiamare sulla zona lesionata cellule fondamentali al processo di guarigione, come, per esempio, cheratinociti e fibroblasti. La proteina viene legata all'alginato di sodio, in modo da migliorarne le proprietà meccaniche, altrimenti scarse: inoltre, questo polisaccaride è capace di assorbire l'essudato della ferita, permettendo il mantenimento di un microambiente umido, fondamentale per una guarigione più veloce. Per avere un film che sia stabile in soluzione acquosa, è necessario che i due componenti suddetti siano legati covalentemente: a questo proposito, durante il lavoro di tesi sono stati studiati numerosi modi per reticolare la cheratina con l'alginato. Quindi, si è proceduto con l'aggiunta dei due principi attivi. La vitamina C, in particolare, è una piccola molecola, scelta per il suo ruolo attivo nella sintesi di nuovo collagene: essa va ad intercalarsi tra le catene del film e, quando il sistema entra in contatto con la ferita, viene gradualmente rilasciata. Infine, l'ultimo componente addizionato è la propoli: una resina prodotta dalle api, scelta per l'attività antimicrobica che è in grado di esplicare.

Sulle soluzioni di cheratina e alginato è stato condotto uno studio reologico, per verificarne l'effettiva miscibilità.

Tutti i film sono stati caratterizzati da un punto di vista strutturale (morfologia, *swelling*, biodegradabilità) e, inoltre, si è studiato il rilascio della vitamina C nel tempo.

Infine, verranno avviati dei test biologici *in vitro* per verificare la biocompatibilità del materiale e l'azione dell'acido ascorbico su cellule di fibroblasti umani. Verrà anche testata l'effettiva attività antibatterica della propoli su ceppi batterici responsabili dell'infezione delle ferite.

3. Risultati e discussione

3.1 Estrazione della cheratina

Per estrarre la proteina dalla lana, proveniente da allevamenti ovini e preventivamente lavata al fine di rimuovere i grassi di lavorazione, è stata utilizzata una reazione di *solfitolisi*: essa, infatti, permette di sfruttare gli ioni metabisolfito per rompere i legami S-S tra i residui cisteinici, mantenendo allo stesso tempo inalterati i legami peptidici.

Il lavaggio della lana prevede di utilizzare un estrattore Soxhlet, mostrato in *Figura 10*, ed etere di petrolio, con il fine di rimuovere eventuali residui lipidici. Nel pallone viene inserito il solvente estraente, che viene scaldato fino ad ebollizione. I vapori salgono fino al refrigerante, condensano ed il liquido scende attraverso la lana di cui è riempito il ditale, quindi ricade nel pallone ed in questo modo allontana le impurezze lipidiche. Il processo, in continuo, dura circa un paio di ore.



Figura 10. Apparato di Soxhlet per estrazione solido-liquido in continuo

Per quanto riguarda, invece, l'estrazione della cheratina dalla lana, è stato utilizzato il metodo della solfitolisi, che prevede la reazione indicata in *Figura 11*. Questo processo ha il vantaggio di permettere l'ottenimento di frazioni di proteina ad elevato peso molecolare, ma comporta delle rese abbastanza basse, intorno al 25 – 30 %.



Figura 11. Meccanismo di solfitolisi con formazione, in ordine, di cheratina ridotta e di residui cistein-S-solfonati o Sali di Bunte

L'estrazione della cheratina avviene attraverso una reazione della durata di 24 ore tra la lana ed una soluzione preparata con le quantità di reagenti riportate in *Tabella 2*.

Tabella 2. Quantità di reagenti usati per la solfitolisi

Componente	Quantità
Lana	5,00 g
Urea (CH ₄ N ₂ O)	48,00 g
Sodio dodecil solfato (NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄)	3,00 g
Metabisolfito di sodio (Na ₂ S ₂ O ₅)	11,40 g
H ₂ O milli-Q	50,00 mL

L'urea ha il compito di rigonfiare le catene di cheratina, in modo da "sbrogliarle". A tal proposito, la lana viene tagliata in piccoli residui, così che il componente possa penetrare più facilmente. Per rendere solubile la proteina, è necessario rompere i ponti disolfuro. A questo scopo, il metabisolfito di sodio in acqua viene idrolizzato a ioni bisolfito: essi, poi, reagiscono con i legami S-S e ne provocano lo scioglimento. Il sodio dodecil solfato, invece, agisce da tensioattivo, favorendo la stabilità della soluzione acquosa di cheratina.

Il sistema viene scaldato non oltre 60°C per circa 30 minuti: il volume finale è intorno ai 100 mL, perché l'urea rigonfia molto. Si aggiunge, poi, alla lana spezzettata all'interno di un pallone con ancoretta magnetica, ed il sistema viene posto in un bagno di olio alla stessa temperatura utilizzata sopra per tutta la notte.

Per la purificazione della proteina estratta sono stati utilizzati due differenti metodi, uno standardizzato (A) ed uno sperimentale (B).

- A. La soluzione di reazione viene filtrata con filtri a porosità crescente, in particolare con porosità di 30 µm e 5 µm;
- B. Il prodotto della solfitolisi, dopo aver rimosso la frazione di lana non reagita, è stato centrifugato secondo le seguenti condizioni: 4000 rpm, 30 minuti a 4°C.

Le soluzioni ottenute dai due processi vengono messe in dialisi all'interno di membrane di acetato di cellulosa con *cutt-off* di 10-12 kDalton: in questo modo si provoca la fuoriuscita dei sali e degli altri componenti indesiderati, ma non della cheratina. L'acqua di dialisi viene cambiata un paio di volte al giorno ed il processo è da

considerarsi terminato quando la conducibilità del liquido è sotto ai 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$, dato ottenuto con un conduttimetro.

La soluzione di proteina dializzata viene congelata per almeno una notte e successivamente liofilizzata, in modo da rimuovere tutta l'acqua.

3.2 Caratterizzazione della cheratina estratta

La frazione di proteina di interesse biomedico è soltanto quella ad elevato peso molecolare, perciò, al fine di vedere la distribuzione dei pesi, è necessario procedere con una elettroforesi SDS-PAGE (Elettroforesi su Gel di Poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato).

Il protocollo Invitrogen prevede che la soluzione di cheratina da analizzare venga sciolta in un tampone contenente NuPAGE LDS Sample Buffer e NuPAGE Sample Reducing Agent, prima di caricare ciascun campione da 30 μg in ogni pozzetto.

L'analisi è stata eseguita usando la Mini-Cella Xcell SureLock (Invitrogen), sul 4-12% di gel pre-cast di poliacrilammide (Invitrogen), usando NuPAGE MES SDS Running Buffer, adatto a proteine con pesi molecolari variabili da 188 a 3 kDa.

L'analisi è stata condotta sia sulla cheratina purificata con il *metodo standardizzato* (cheratina filtrata) sia su quella centrifugata, in modo tale da osservare eventuali differenze. Come mostra la *Figura 12*, la purificazione sperimentale risulta essere efficace: infatti, la proteina centrifugata presenta un identico profilo elettroforetico rispetto a quella filtrata, mantenendo le componenti ad elevato peso molecolare (52 e 45 kDa).

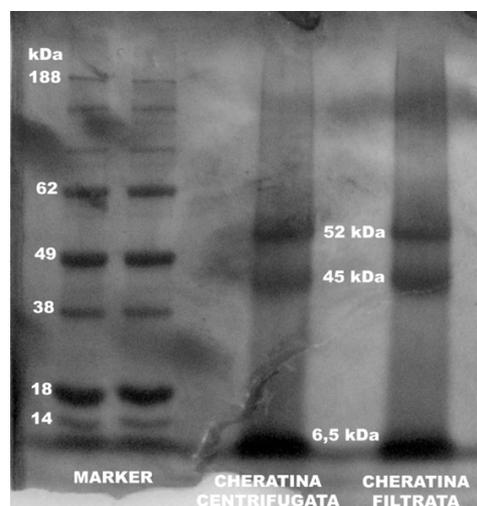


Figura 12. Pattern elettroforetico della polvere di cheratina a confronto con un marker

3.3 Preparazione dei film

Nella preparazione del film si è proceduto aggiungendo un nuovo componente alla volta, in modo da complicare gradualmente il sistema.

Il primo passaggio prevede di analizzare il quantitativo di cheratina ed alginato di sodio (d'ora in poi indicato come *alginato*, se non diversamente specificato). Si è scelto di utilizzare soluzioni al 2% in peso per entrambi i componenti: infatti, questa percentuale permette di ottenere una soluzione di alginato non troppo viscosa e facilmente maneggiabile ed è quella maggiormente utilizzata in letteratura per la preparazione di film per *casting*; inoltre, per quanto riguarda la cheratina, è una concentrazione ottimale in quanto consente una facile dissoluzione del componente. Per verificare l'effettiva miscibilità della proteina e del polisaccaride è stato condotto uno studio reologico, che ha portato ad un risultato positivo. Successivamente è stato studiato il meccanismo più efficace per formare un network polimerico stabile di cheratina ed alginato e verificarne le effettive caratteristiche.

Una volta individuato il sistema di partenza, è stata aggiunta la vitamina C, quindi il film è stato reso ulteriormente complesso aggiungendo la propoli.

3.3.1 Studio reologico delle soluzioni

Al fine di osservare le caratteristiche meccaniche delle soluzioni al 2% in peso di cheratina ed alginato, è stata condotta un'analisi reologica, che, inoltre, permette di verificare l'effettiva miscibilità dei due componenti. Per lo studio sono state preparate varie soluzioni a differente contenuto di polisaccaride e proteina, *Tabella 3*.

Tabella 3. Soluzioni per studio reologico

Soluzione	mL alginato (2% w/w)	mL cheratina (2% w/w)	% cheratina
1	7,00	0,00	0
2	0,00	7,00	100
3	1,75	5,25	75
4	3,50	3,50	50
5	5,25	1,75	25

In *Figura 13* è riportato l'andamento della viscosità in funzione dello *shear rate*, ovvero dello sforzo di taglio applicato. In un fluido newtoniano, come l'acqua, non ci sono interazioni tra le molecole ed il carico è proporzionale alla deformazione secondo un coefficiente di proporzionalità, che è appunto la viscosità. In quelli non-newtoniani,

invece, non si osserva questa proporzionalità diretta. Per studiare la miscibilità della cheratina e dell'alginato in acqua, le viscosità sperimentali, rilevate ad uno *shear rate* di 73 s^{-1} , sono state confrontate con quelle teoriche, calcolate con la regola di addizione delle miscele ideali (Figura 14), rappresentata da un'equazione logaritmica:

$$\ln(\eta_T) = \sum_i [w_i \cdot \ln(\eta_i)]$$

con w_i che rappresenta la frazione di peso del componente i , η_i è la viscosità della soluzione allo *shear rate* scelto e η_T è la viscosità teorica della miscela.

Come si osserva in Figura 14, le soluzioni presentano una deviazione positiva dalla linearità: questo attesta che vi è un'interazione tra i componenti in esame, ovvero che sono miscibili.

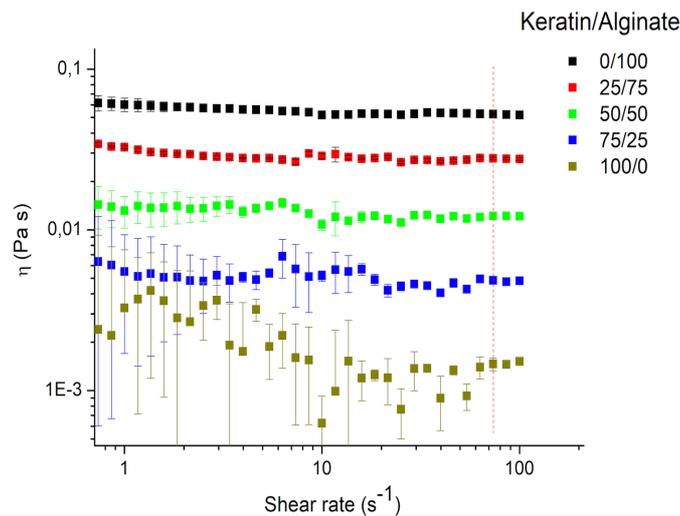


Figura 13. Studio reologico delle soluzioni al 2% di cheratina/alginato, dove la % di proteina è stata calcolata in riferimento al peso totale del polimero

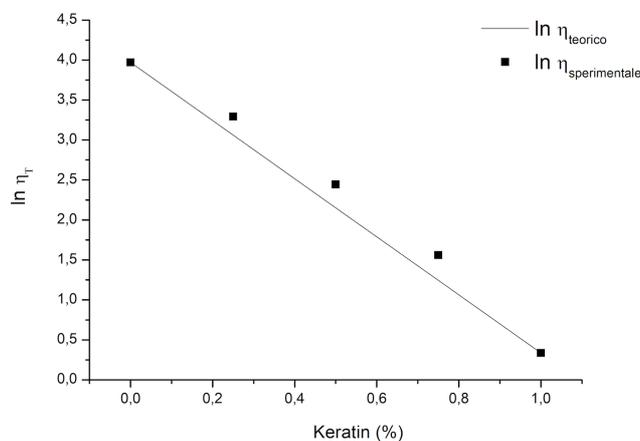


Figura 14. Confronto tra viscosità ideale e sperimentale

3.3.2 Preparazione dei film di cheratina ed alginato

I film di alginato e cheratina sono estremamente solubili in acqua, dissolvendosi in pochi secondi. Per applicazioni nel campo della riparazione tissutale occorre aumentarne la stabilità, in quanto solo un film sufficientemente resistente riesce ad esplicare la sua azione nel tempo.

Per rendere questi sistemi stabili in soluzione acquosa, è necessario che i due componenti si leghino covalentemente, sfruttando, per esempio, l'esistenza dei gruppi carbossilici dell'alginato e di quelli amminici primari presenti nella cheratina. Questi ultimi sono costituiti per lo più dai residui di lisina: infatti, anche altri amminoacidi contengono questo gruppo, ma il quello amminico della lisina, non coinvolto nel legame peptidico, è legato all'atomo di carbonio in posizione ϵ rispetto al carbossile e, di conseguenza, è più esposto e meno ingombrato stericamente, quindi più disponibile

In questo lavoro ho studiato alcuni modi per preparare un sistema insolubile in soluzione acquosa. Tutti i film sono stati ottenuti per *casting*, ovvero per evaporazione del solvente (acqua) a temperatura ambiente e per 36 ore.

Metodo 1: *crosslinking* tramite estere succinimidilico

La reazione tra un gruppo carbossilico ed un'ammina primaria è un processo che porta alla formazione di una ammido e che in natura avviene efficacemente ad opera di enzimi specifici: infatti, è alla base della creazione del legame peptidico, che tiene insieme i diversi amminoacidi di una proteina. Tuttavia, in assenza di questi catalizzatori, la sintesi dell'ammido in modo diretto è inibita dalla reazione acido-base che porta alla formazione un sale stabile. Come mostrato in *Figura 15*, l'equilibrio del processo è molto più spostato verso l'idrolisi dei reagenti, piuttosto che verso l'ammido.

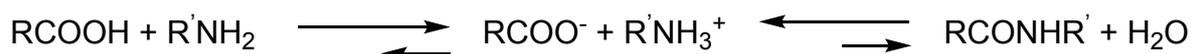


Figura 15. Equilibrio acido base ed equilibrio di idrolisi/formazione dell'ammido

Per ottenere un legame ammidico occorre, quindi, utilizzare un derivato di un acido carbossilico, solitamente un estere o un cloruro acilico.

A questo proposito vi è uno svariato numero di meccanismi che può essere utilizzato, ma generalmente si prediligono gli esteri succinimidilici: infatti, la risonanza del doppietto elettronico non condiviso sull'atomo di azoto li rende più disponibili ad un attacco nucleofilo rispetto, per esempio, a quelli alchilici. Ciò è dovuto sia al fatto che la *N*-idrossisuccinimide è un gruppo uscente migliore, sia perché il carattere elettrofilo del carbonio estereo è esaltato dall'effetto elettron-attrattore⁴⁸. Questo tipo di attivazione è vantaggiosa per due motivi: in primo luogo permette di lavorare in condizioni blande, da cui deriva un'ottima biocompatibilità del processo, ed in seconda battuta per il fatto che la purificazione del prodotto di coupling è semplice ed efficace, dal momento che la *N*-idrossisuccinimide è estremamente idrosolubile.

La preparazione degli esteri succinimidilici avviene per azione di una carbodiimide, come 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimide cloridrato (EDC), ed una *N*-idrossisuccinimide (NHS). Come mostrato in *Figura 16*, il processo prevede la formazione in un intermedio iniziale, la *O*-acilisourea, che diventa disponibile per l'attacco nucleofilo da parte dell'alcol: in tal modo vengono formati l'estere ed una isourea come sottoprodotto. A questo punto, poi, può verificarsi la reazione di coupling in presenza di una ammina.

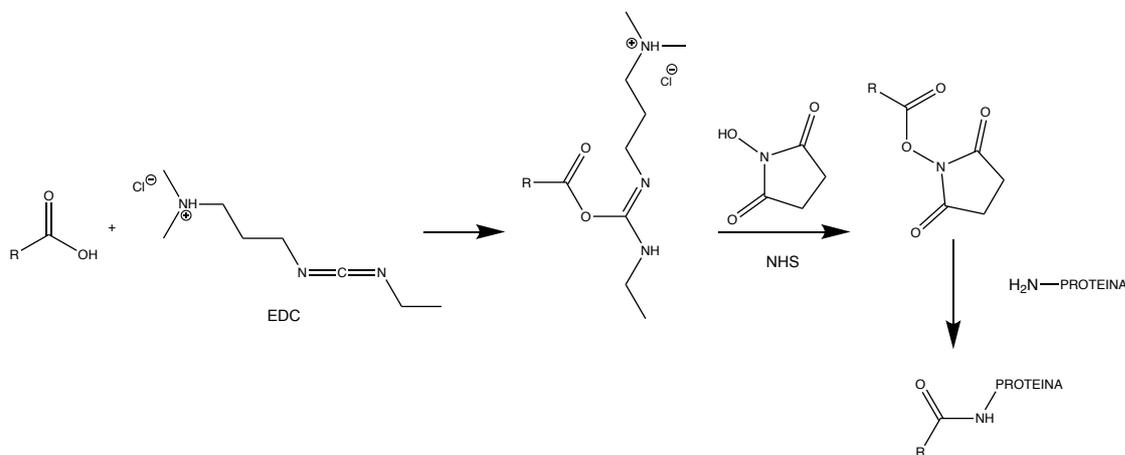


Figura 16. Meccanismo di crosslinking attraverso la formazione di un estere succinimidilico

In letteratura sono presenti numerose pubblicazioni, che riportano diverse condizioni di reazione, sia per quanto riguarda il rapporto EDC/NHS, che la temperatura ed il tempo di attivazione dell'acido carbossilico, nonché i diversi tempi e le modalità per la reazione di *crosslinking* tra l'acido attivato dell'alginato e la cheratina.

Sono state condotte svariate prove, variando i parametri suddetti, come riportato in *Tabella 4*. Le concentrazioni di reagenti sono state calcolate rispetto alla quantità di alginato, considerando di utilizzare una soluzione al 2% w/w, in rapporto 1:1 con la cheratina.

Tabella 4. Condizioni studiate per il crosslinking con EDC e NHS

Prova	EDC (%)	NHS (%)	Tempo reazione
1 ^{49,50}	20	10	Attivazione: <i>overnight</i> <i>Crosslinking</i> : in agitazione magnetica 24 h
2	20	10	Attivazione: 2 h in agitazione magnetica <i>Crosslinking</i> : vortex ¹ pochi secondi
3	20	10	Attivazione: <i>overnight</i> <i>Crosslinking</i> : vortex pochi secondi
4a	20	10	Attivazione: 15 minuti <i>Crosslinking</i> : agitatore rotante <i>overnight</i>
4b	40	60	
4c ⁵¹	60	40	
5a	67	34	Attivazione: 15 minuti <i>Crosslinking</i> : agitatore rotante <i>overnight</i>
5b	135	200	
5c	200	135	
6a	67	34	Attivazione: 15 minuti
6b			<i>Crosslinking</i> : agitatore rotante <i>overnight</i>

Inizialmente, l'attenzione è stata posta in particolare sui tempi di reazione, sia per quanto riguarda l'attivazione dell'alginato ad opera di EDC e NHS, sia per il *crosslinking*.

La prova 1, in accordo con quanto riportato in letteratura^{50,51}, è stata condotta in presenza di un tampone MES al 20% in peso. Tuttavia, è possibile che il pH vada ad alterare la cheratina, provocandone la denaturazione. Per quanto riguarda, invece, le tempistiche utilizzate nel tentativo 4, si è fatto riferimento ai tempi di attivazione

¹ Il vortex è stato utilizzato solo per miscelare insieme i due componenti, ma il vero e proprio crosslinking avviene durante il processo di casting

dell'alginato riportati nei protocolli. I film ottenuti nelle prove 1 – 4a, tuttavia, una volta in acqua sono risultati solubili in tempi molto brevi, nell'ordine dei secondi.

Sempre seguendo la letteratura abbiamo variato la concentrazione dei reagenti EDC e NHS, modificando il rapporto dei due agenti attivatori nei confronti dei gruppi carbossilici. Per quanto riguarda le tempistiche, sono state adottate quelle riportate sui protocolli. Le prove 4b e 4c⁵¹ hanno nuovamente portato ad un risultato inconcludente: i film ottenuti, infatti, in acqua non mantengono la loro struttura.

La prova 5a ha dato risultati interessanti: infatti, ha permesso di ottenere un film stabile in soluzione acquosa per oltre 15 giorni, indice dell'avvenuto *crosslinking* tra alginato e cheratina.

Sono stati pertanto preparati diversi film, mantenendo le stesse condizioni della prova 5a, per cercare di ripetere il medesimo risultato, ma ciò non si è più verificato. La prova 6a è stata condotta con i tempi e le concentrazioni della 5a, e la soluzione è stata purificata dai sottoprodotti della reazione tramite un processo di dialisi, quindi è stato preparato il film per *casting*, ma anche questo è risultato essere solubile in acqua.

Una possibile spiegazione del fatto per cui la reazione di attivazione dell'alginato da parte di EDC e NHS non porta ad ottenere film resistenti in soluzione acquosa, è da attribuire alla formazione di un prodotto indesiderato molto stabile⁵², la *N*-acilurea, che si forma al posto dell'ammide. Il meccanismo ipotizzato è mostrato in *Figura 17*:

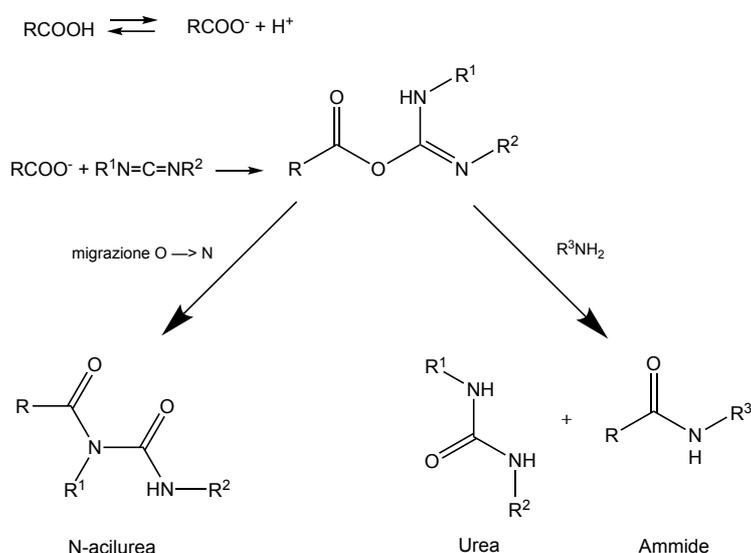


Figura 17. Reazione che porta alla formazione del sottoprodotto stabile

Dal momento che la reazione di attivazione dell'alginato con estere succinimidilico e successivo *crosslinking* con la cheratina non è riproducibile, sono stati cercati metodi alternativi per effettuare la reticolazione ed ottenere film stabili in ambiente acquoso.

Metodo 2: Ossidazione dell'alginato con periodato di sodio

Un altro metodo riportato in letteratura per legare l'alginato alle proteine è quello di ossidarlo ad aldeide. La reazione tra i gruppi aldeidici dell'alginato ossidato ed i residui amminici presenti nelle proteine permette di ottenere un prodotto reticolato⁵³.

L'agente utilizzato per modificare l'alginato è il periodato di sodio, che ossida le unità monosaccaridiche costituenti il polimero, formando dialdedi come mostrato in *Figura 18*. Affinché la reazione proceda, è necessario che nella molecola riducente vi siano due -OH vicinali, preferibilmente orientati nello stesso modo: nell'alginato, invece, sono presenti, ma uno è assiale e l'altro equatoriale, motivo per cui il processo potrebbe richiedere più tempo del dovuto ed essere più difficoltoso. La quantità di periodato non deve essere troppo abbondante, per evitare che vada a rompere la catena in diversi punti, e si calcola rispetto al numero di unità ripetitive presenti nel campione. È fondamentale che tutto il processo sia condotto al buio, dal momento che l'agente ossidante è estremamente sensibile alla radiazione luminosa.

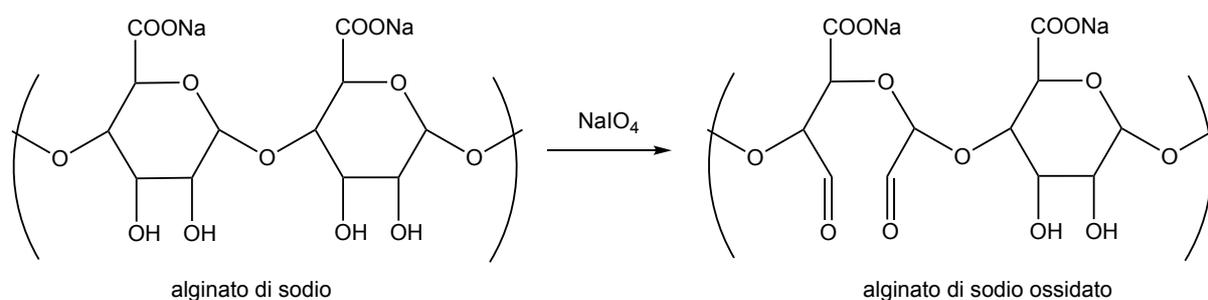


Figura 18. Reazione di ossidazione dell'alginato

L'alginato di sodio è stato sciolto in acqua e posto a reagire con diverse quantità di periodato di sodio per un tempo che varia dalle 3 alle 48 ore. Sono state condotte numerose prove, cambiando i tempi di reazione e le concentrazioni, come riportato in *Tabella 5*. Terminata la reazione, è necessario procedere con la purificazione: essa è stata effettuata facendo sgocciolare la soluzione in un dato quantitativo di etanolo (100 mL di alcol ogni 25 di soluzione). La miscela ottenuta è stata posta per almeno 2 ore sotto agitazione magnetica molto vigorosa. Il prodotto, una polvere molto appiccicosa

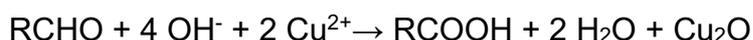
ed impossibile da filtrare, è stato centrifugato (10000 rpm, 30 minuti, 4°C) e successivamente è stato posto sottovuoto in modo da eliminare il solvente residuo, dando, infine, un solido con aspetto di una polvere di colore giallo chiaro.

In *Tabella 5* sono state riportate le condizioni utilizzate nelle numerose prove di ossidazione, condotte variando i tempi di reazione e le concentrazioni.

Tabella 5. Condizioni studiate per l'ossidazione dell'alginato e risultati del test di Benedict

Prova	NaO ₄ (%)	Tempo di reazione	Risultato del Saggio di Benedict
1	3	4	Verde
2	3	12	Verde
3	3	48	Verde
4	15	12	Verde
5 ⁵⁴	30	24	Verde + ppt

Per valutare l'incremento del numero di gruppi aldeidici nella struttura dell'alginato, è stato utilizzato il *Saggio di Benedict*, un'analisi colorimetrica di veloce esecuzione. Il colorante contiene ioni Cu(II) complessati con ioni citrato in una soluzione basica di carbonato di sodio ed ha un'intensa colorazione blu. In presenza di aldeidi avviene la reazione di ossido-riduzione:



Con semireazione di riduzione dello ione Cu(II):



e la semireazione di ossidazione dell'aldeide:



Il quantitativo di gruppi aldeidici viene valutato in base ad una variazione di colore, in particolare dal blu all'arancione, della soluzione. Vi è una scala empirica che permette di ricondurre la colorazione della soluzione alla concentrazione di -CHO, come è possibile osservare in *Figura 19*.

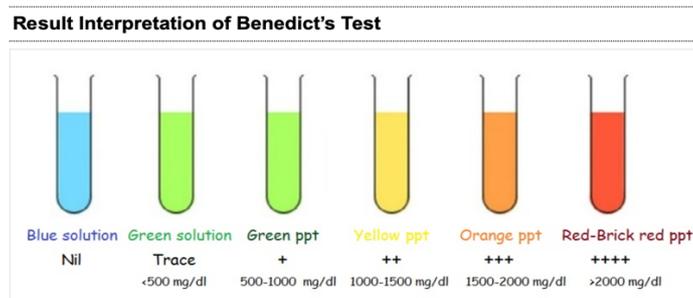


Figura 19. Variazioni di colore empiriche del test di Benedict

L'alginato ossidato con il periodato delle diverse prove è stato trattato con 2 mL di reattivo di Benedict, quindi si è scaldato a bagnomaria fino ad ebollizione e si è osservata la variazione di colore. Per tutte le prove si è visto un colore verde che indica la presenza di aldeidi in tracce, solo in un caso (prova 5) era presente anche un precipitato che indicava una presenza maggiore di aldeidi (Tabella 5)

Come testimoniato dal test di Benedict, il processo di ossidazione dell'alginato non è efficiente quanto desiderato, poiché la quantità di aldeidi che si riesce ad ottenere non è sufficiente per il *crosslinking*.

L'alginato ottenuto nelle diverse prove di ossidazione è stato comunque utilizzato per preparare film con la cheratina, al fine di vedere se una blanda ossidazione del polisaccaride sia sufficiente per creare legami covalenti con i gruppi amminici della proteina e stabilizzare il film ottenuto in acqua. Sono state preparate soluzioni al 2% di sodio alginato ossidato e sono state miscelate con soluzioni al 2% di cheratina, procedendo alla preparazione del film per evaporazione lenta dell'acqua a temperatura ambiente per 36 ore. I film ottenuti non sono risultati stabili in acqua, ad indicare che i due componenti non riescono a creare un numero sufficiente di legami.

Metodo 3: Reazione di Maillard

È chiamata anche "*reazione di doratura*" e si tratta di un complesso processo non enzimatico, che prevede la condensazione tra un composto carbonilico, in particolare uno zucchero riducente, ed una ammina, di solito appartenente ad una proteina⁵⁵. Il suo vantaggio è che non richiede l'aggiunta di ulteriori reagenti, oltre ai due sopracitati, ed avviene spontaneamente in condizioni controllate di tempo, temperatura, pH ed umidità⁵⁶. La Maillard trova applicazione in numerosi contesti, dall'alimentazione alla sintesi chimica, ed è influenzata da una serie di fattori, quali:

- Tipologia e quantità dei reagenti, che non devono essere in soluzione troppo diluita
- Presenza di acqua, motivo per cui è preferibile lavorare in condizioni di umidità controllata
- Tempo, temperatura e pH

Il processo può essere diviso in tre *step*, di cui gli ultimi due presentano un alto grado di complessità, perciò non se ne conosce l'esatto meccanismo. Uno schema dello sviluppo della Maillard si può osservare in *Figura 20*:

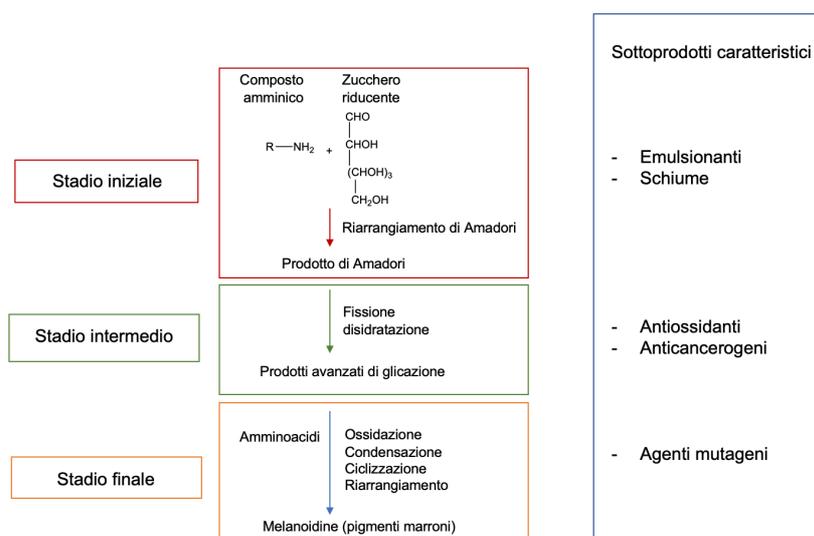


Figura 20. Schema reazione di Maillard

Nel caso in esame, la reazione è stata utilizzata per reticolare insieme i due componenti, al fine di creare un film stabile in acqua. Tuttavia, il meccanismo non ha portato al risultato desiderato ed il prodotto così ottenuto non sembra differire in maniera apprezzabile da quello proveniente dalla semplice miscelazione. Probabilmente, il motivo è da ricercare nella struttura complessa dell'alginato, che risulta essere molto stabile. Un altro problema può essere rappresentato dalla temperatura e dal pH: infatti, a causa dell'instabilità della cheratina, il *range* in cui questi parametri possono essere variati è molto limitato, altrimenti si rischia la flocculazione della proteina. In particolare, è preferibile che il pH rimanga quanto più possibile vicino alla neutralità e la temperatura non deve superare i 60 °C.

In *Tabella 6* sono state elencate alcune condizioni utilizzate per effettuare la reazione di Maillard di interesse tra l'alginato di sodio e la cheratina. Nel tentativo di lavorare in

condizioni controllate di umidità, la navicella di plastica contenente la soluzione di reazione è stata posta in un essiccatore contenente una soluzione satura di KCl, dopodiché il sistema è stato inserito all'interno della stufa.

Tabella 6. Condizioni studiate per la reazione di Maillard

Tentativo	Temperatura (°C)	Tempo (ore h)
1	40	24
2	60	12
3	60	24

I film ottenuti per *casting* della soluzione di reazione, tuttavia, non sono risultati stabili in acqua, probabilmente perché il grado *crosslinking* tra i due componenti non è sufficiente.

Metodo 4: Reazione con calcio cloruro e glutaraldeide

L'idea alla base di questo metodo è quella di creare un film stabile attraverso l'utilizzo dei due più comuni agenti reticolanti, rispettivamente, dell'alginato e della cheratina. In tal modo si crea un film resistente in acqua, grazie al fatto che le catene di polisaccaride e proteina, dopo essere state stabilizzate separatamente, si possono intercalare insieme, formando interazioni forti.

Studi precedenti condotti dal gruppo di ricerca, hanno dimostrato che il rapporto ottimale tra le quantità di glutaraldeide (soluzione al 25%) e cheratina è 1 μ L per mg di campione. La reazione tra i due componenti è estremamente veloce: infatti, bastano pochi minuti per avere un alto grado di *crosslinking*. Il processo che avviene è mostrato in *Figura 21*.

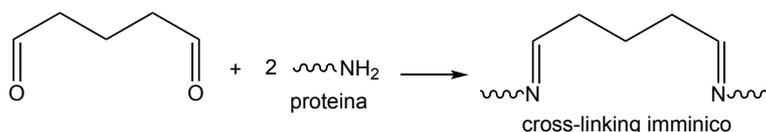


Figura 21. Crosslinking della cheratina per reazione con aldeide glutarica

Invece, per quanto riguarda l'alginato si ricorre ad un processo noto come *gelificazione*. Il nome deriva dal fatto che il polisaccaride in contatto con una soluzione di un catione divalente (Ca²⁺, Ba²⁺, Zn²⁺) è capace di formare un *network* tridimensionale, caratterizzato dal fatto di poter assorbire un elevato quantitativo di

acqua, ma di non essere solubile in essa. Questi idrogel hanno numerose applicazioni, sia in campo biomedico, che alimentare, per esempio, perciò sono note varie tecnologie per sintetizzarli. Come anticipato nell'introduzione, i cationi possono interagire soltanto con i gruppi G delle catene polimeriche dell'alginato, e di conseguenza la sua composizione è determinante per la riuscita del processo. Come mostrato in *Figura 22*, il *crosslinking* si ha per associazione ionica delle diverse catene del polisaccaride. L'alginato di sodio è formato da lunghe catene con Na^+ posto ai lati: quando la molecola entra in contatto con il cloruro di calcio, il sodio viene sostituito dal calcio, che ha una valenza doppia, consentendo l'unione in una doppia catena.

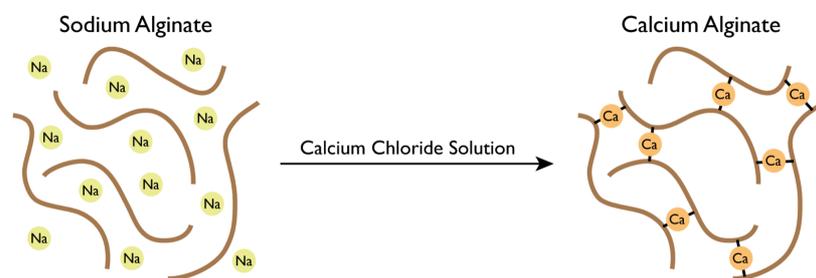


Figura 22. Rappresentazione schematica del processo di crosslinking dell'alginato di sodio per scambio cationico con ioni Ca^{2+}

Il calcio cloruro è estremamente solubile, non è tossico e permette una gelificazione praticamente istantanea. Questa ultima proprietà, talvolta, può rappresentare un problema, perché in tal modo il processo non è controllato e si possono avere delle disomogeneità tra una zona e l'altra. Un'altra caratteristica estremamente importante è che il *crosslinking* con il Ca^{2+} rende l'alginato, che altrimenti non lo sarebbe²⁵.

Per la sintesi del film a base dei quattro componenti elencati sopra sono stati necessari diversi tentativi, in particolare le criticità maggiori sono rappresentate dalla reazione estremamente veloce tra la soluzione di catione ed il polisaccaride, la difficoltà di solubilizzazione di quest'ultimo e la facilità di flocculazione della cheratina in ambiente ionico ed a temperatura leggermente superiore rispetto a quella ambiente.

Si è scelto di preparare una soluzione di CaCl_2 , in cui si fa sciogliere un quantitativo di cheratina, tale che la sua concentrazione sia al 2% w/w; quindi, si procede con l'aggiunta della soluzione di alginato sodico, sempre al 2% w/w. Questo interagisce immediatamente con gli ioni Ca^{2+} presenti in soluzione formando un *network* con inglobata la cheratina: ciò si riscontra visivamente, grazie ad un aumento della

viscosità della soluzione. Infine, si aggiunge la glutaraldeide che reagisce con i gruppi amminici dei residui amminoacidici della proteina, formando immine.

L'alternativa può eventualmente essere quella di preparare separatamente i componenti con i rispettivi agenti reticolanti ed unirli solo in un secondo momento. Questo metodo, tuttavia, non è stato applicato, perché l'obiettivo è quello di avere delle catene di proteina e polisaccaride intercalate a vicenda, oltre che tra loro stesse.

Per quanto riguarda la quantità di CaCl_2 , è stato utilizzato quanto riportato in letteratura⁵⁷, ovvero il 3% in peso rispetto all'alginato. È stato fatto anche un tentativo di raddoppiare questo valore, ma la gelificazione avviene troppo velocemente e si formano degli agglomerati di idrogel all'interno della soluzione, che non si riescono più a solubilizzare.

I componenti vengono mescolati utilizzando un agitatore magnetico, ma, prima di preparare il film, è necessario sonicare la soluzione in modo tale da eliminare le bolle di aria.

I film ottenuti con questo metodo hanno mostrato una buona stabilità in acqua.

3.3.3 Preparazione dei film caricati con la vitamina C

La vitamina C è un composto altamente solubile in acqua (330 g/L), ma ha il grande svantaggio di essere sensibile alla luce, perciò la sintesi del film caricato con essa deve essere condotta al buio. Lo scopo è quello di inserire questa piccola molecola all'interno delle catene intercalate di proteina e polisaccaride: in tal modo si crea un sistema in grado di liberare in modo controllato il principio attivo. Sono stati studiati due metodi di sintesi per *casting* (Tabella 7), che differiscono semplicemente per l'ordine di aggiunta dei componenti, ma gli studi di rilascio hanno dimostrato che il risultato che si ottiene è il medesimo: infatti, non sono state mostrate differenze significative tra la quantità di principio attivo rilasciata dal film ottenuto con il metodo A piuttosto che con il B. Quest'ultimo è stato provato per timore che la glutaraldeide, aggiunta per ultima in quello A, potesse reagire anche con i gruppi ossidrilici della vitamina C impedendone il rilascio.

Tabella 7. Metodi di preparazione del per caricato con vitamina C

Metodo	Ordine di aggiunta dei componenti
A	<ol style="list-style-type: none"> 1. CaCl₂ al 3% w/w rispetto ad Alg 2. Soluzione di Cheratina al 2% w/w 3. Vitamina C al 20% rispetto a Ker 4. Soluzione di Alg al 2% w/w 5. Soluzione di glutaraldeide al 25% w/w
B	<ol style="list-style-type: none"> 1. CaCl₂ al 3% w/w rispetto ad Alg 2. Soluzione di Cheratina al 2% w/w 3. Soluzione di Alg al 2% w/w 4. Soluzione di glutaraldeide al 25% w/w 5. Vitamina C al 20% rispetto a Ker

3.3.4 Preparazione dei film caricati con la vitamina C e la propoli

Dopo aver determinato la sintesi migliore per aggiungere l'acido ascorbico al *network* di cheratina ed alginato, il sistema è stato *complicato* ulteriormente mediante l'aggiunta della propoli. Questa resina, disponibile sotto forma di polvere di colore scuro, si scioglie con qualche difficoltà in acqua, così è necessario scaldare leggermente la soluzione per poterla mescolare con gli altri componenti. L'idea è quella di intercalarla all'interno delle catene polimeriche, così come è stato fatto per la vitamina C.

Dal momento che i due metodi, visti nel paragrafo precedente per la sintesi del film contenente l'acido ascorbico, portano al medesimo risultato, è stato adottato quello A per comodità, in quanto permette una miscelazione più veloce. La quantità di propoli aggiunta è pari all'1,3% rispetto ai mg presenti di cheratina.

L'ordine con cui i diversi elementi sono stati aggiunti e le rispettive quantità sono mostrati in *Tabella 8*.

Tabella 8. Preparazione del sistema finale

Componente	Quantità
Calcio cloruro	3% rispetto ad Alg
Cheratina	Soluzione al 2% w/w
Vitamina C	20% rispetto a Ker
Propoli	1,3% rispetto a Ker
Alginato	Soluzione al 2% w/w
Glutaraldeide	1µL per mg di Ker

3.4 Caratterizzazione dei film

3.4.1 Caratteristiche morfologiche interne e superficiali

In *Figura 23* sono mostrati i film ottenuti a partire da soluzioni al 2% in peso, sia di alginato che di cheratina. Quello costituito solo dalla proteina è estremamente fragile, mentre quello di alginato è rigido e difficile da piegare.



Figura 23. Film di sola cheratina, solo alginato e miscela in rapporto 1:1 di proteina e polisaccaride

Il film della miscela dei due, quindi dove i componenti non sono legati covalentemente, invece, ha delle proprietà intermedie: l'aspetto non più bianco deriva dalla presenza del polisaccaride, così come anche la sua plasticità, mentre la cheratina lo rende più maneggevole, meno rigido.

Vi è una cospicua differenza tra il film di alginato e cheratina ottenuto dalla semplice miscelazione e quello che, invece, proviene dalla soluzione contenente anche i due agenti *crosslinkanti*. Come è possibile osservare in *Figura 24*, l'aspetto dei film è diverso già ad occhio nudo, ma le differenze riguardano anche altri aspetti, come: la resistenza in acqua, la plasticità e la resistenza meccanica, tutte proprietà che vengono incrementate dalla formazione dei legami che rendono più stabile ed insolubile il film. Inoltre, si osserva un cambiamento di colore: il film a destra appare giallognolo per la presenza della glutaraldeide.



Figura 24. Differenza tra film ottenuto dalla sola miscelazione (sinistra) e dopo reazione di crosslinking (destra)

La vitamina C fornisce una maggiore omogeneità al film (*Figura 25*), ma lo rende maggiormente fragile, perciò più sensibile agli impatti.



Figura 25. Film di cheratina, alginato, Ca^{2+} , glutaraldeide e vitamina C

La stabilità in acqua del composto rimane invariata: esso, infatti, rigonfia molto, ma la sua struttura di base rimane comunque visibile. Visto il meccanismo con cui l'acido ascorbico viene rilasciato dal film, è stato ipotizzato che una parte di esso penetri all'interno delle catene *crosslinkate*, mentre la quantità restante vada a porsi più esternamente: è proprio quest'ultima che viene rilasciata per prima.

La presenza della propoli non altera particolarmente le proprietà meccaniche del film, pur rendendolo meno fragile, ma ne influenza l'aspetto (*Figura 26*): infatti, dona una colorazione più scura e sulla superficie del materiale si possono distinguere le sue particelle.



Figura 26. Film di cheratina, alginato, Ca^{2+} , glutaraldeide, vitamina C e propoli

La stabilità in acqua del composto rimane invariata.

3.4.2 Analisi SEM

Per osservare l'aspetto della superficie dei film ed il loro spessore, è stata condotta un'analisi al SEM (Microscopio Elettronico a Scansione), che ha permesso di evidenziare le differenze tra i diversi film preparati.

Come mostrato in *Figura 27*, il campione contenente soltanto la cheratina e l'alginato presenta una superficie uniforme (a) ed uno spessore di 107,9 μm (b). Il film appare perfettamente omogeneo, a dimostrazione del fatto che non vi è alcuna separazione di fase: infatti, i due componenti sono miscibili, come confermato dallo studio reologico.

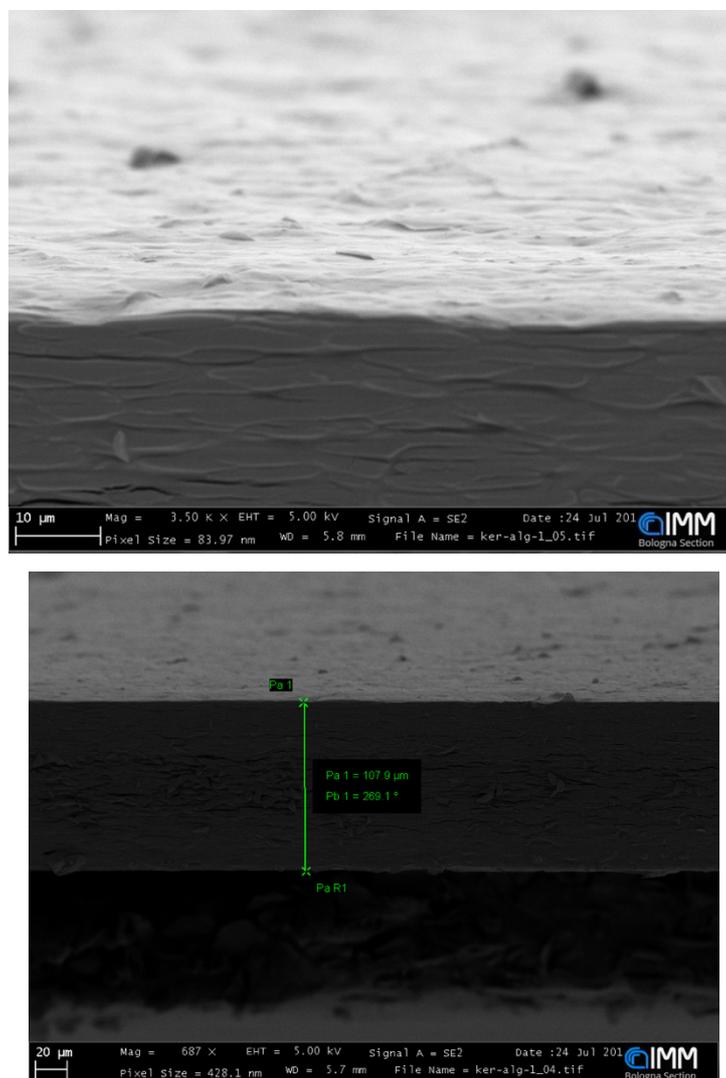


Figura 27. Immagini SEM relative al film ker/alg: (a) focus sulla morfologia superficiale, (b) spessore

L'aggiunta della vitamina C non causa cambiamenti significativi nell'aspetto superficiale del film, che appare ancora omogeneo (*Figura 28*). Essa, tuttavia, provoca

una maggior compattamento del campione, visibile dal fatto che lo spessore di quest'ultimo appare, seppur di poco, inferiore ($91,14 \mu\text{m}$).

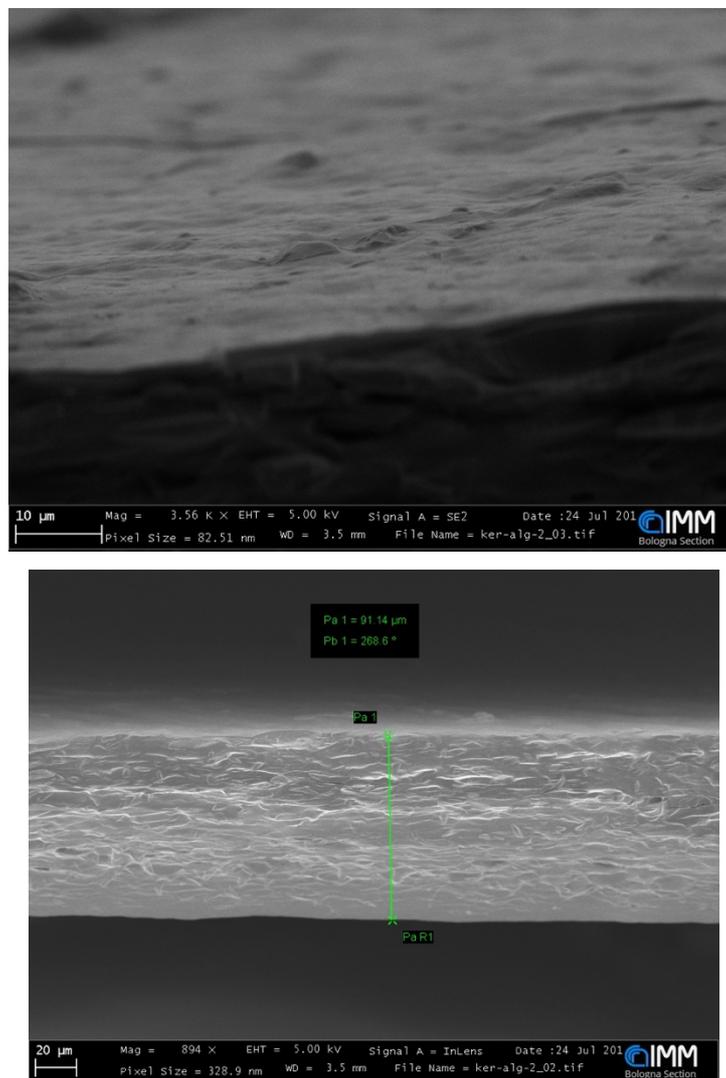


Figura 28. Immagini SEM relative al film ker/alg/vit C

Il sistema finito, come mostrato in *Figura 29*, presenta uno spessore quasi intermedio rispetto a quello dei due casi precedenti ($98,44 \mu\text{m}$): sembrerebbe, infatti, che la vitamina C compatti la struttura, mentre la propoli ne provochi un leggero rilassamento. La morfologia superficiale, invece, non presenta sostanziali differenze rispetto ai film precedenti.

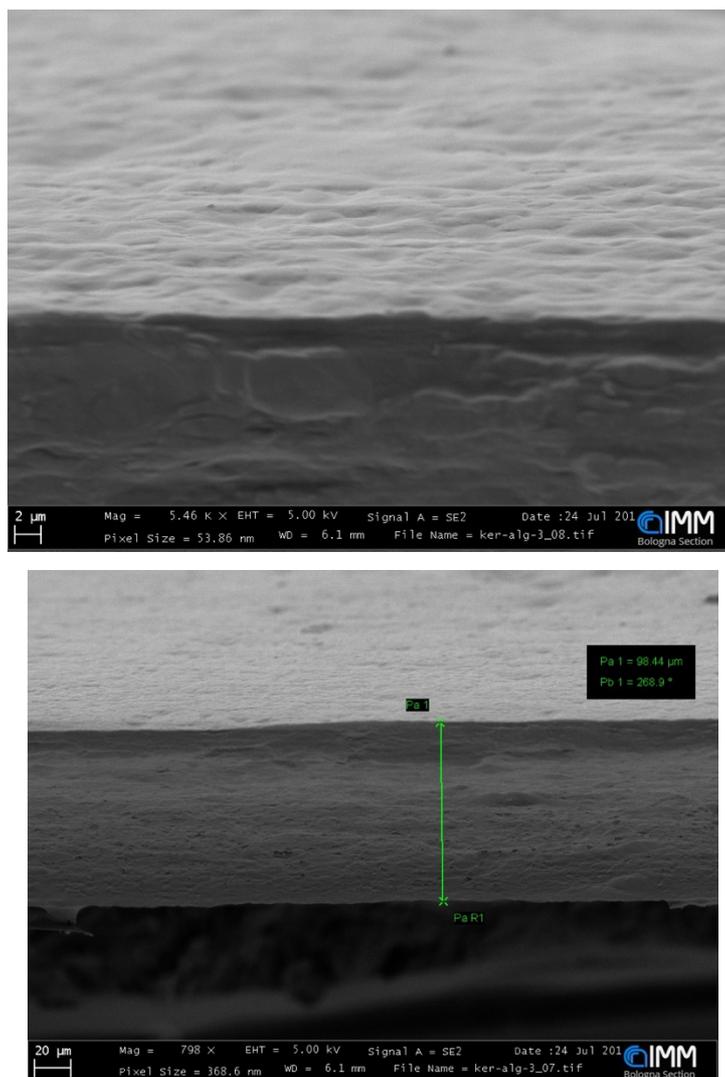


Figura 29. Immagini SEM relative al film ker/alg/vit C/prop

Dall'analisi condotta al SEM sui tre tipi di film studiati, si può concludere che l'aggiunta dei due principi attivi non comporta variazioni consistenti sulla morfologia superficiale del campione. L'unica differenza riscontrabile riguarda lo spessore, che appare essere inferiore in presenza di vitamina C ed aumenta leggermente quando si addiziona anche la propoli. Tuttavia, ulteriori caratterizzazioni hanno dimostrato che le proprietà intrinseche del film non subiscono variazioni.

3.4.3 Analisi TGA

L'analisi termogravimetrica è stata effettuata per vedere la stabilità termica dei film e l'effetto della miscelazione dei due componenti. Si lavora in atmosfera inerte di N₂, partendo da una temperatura di 30°C fino a 900°C. La velocità di scansione è di 10 gradi al minuto ed il campionamento viene fatto ogni 0,5 secondi. Lo strumento misura

la variazione di peso del campione all'aumentare della temperatura, dal momento che è dotato internamente di una bilancia estremamente precisa, con una sensibilità di circa 10^{-6} . Sono stati registrati i termogrammi dei film di cheratina, alginato e della miscela equimolare dei due, come riportato in *Figura 30* ed in *Figura 31*.

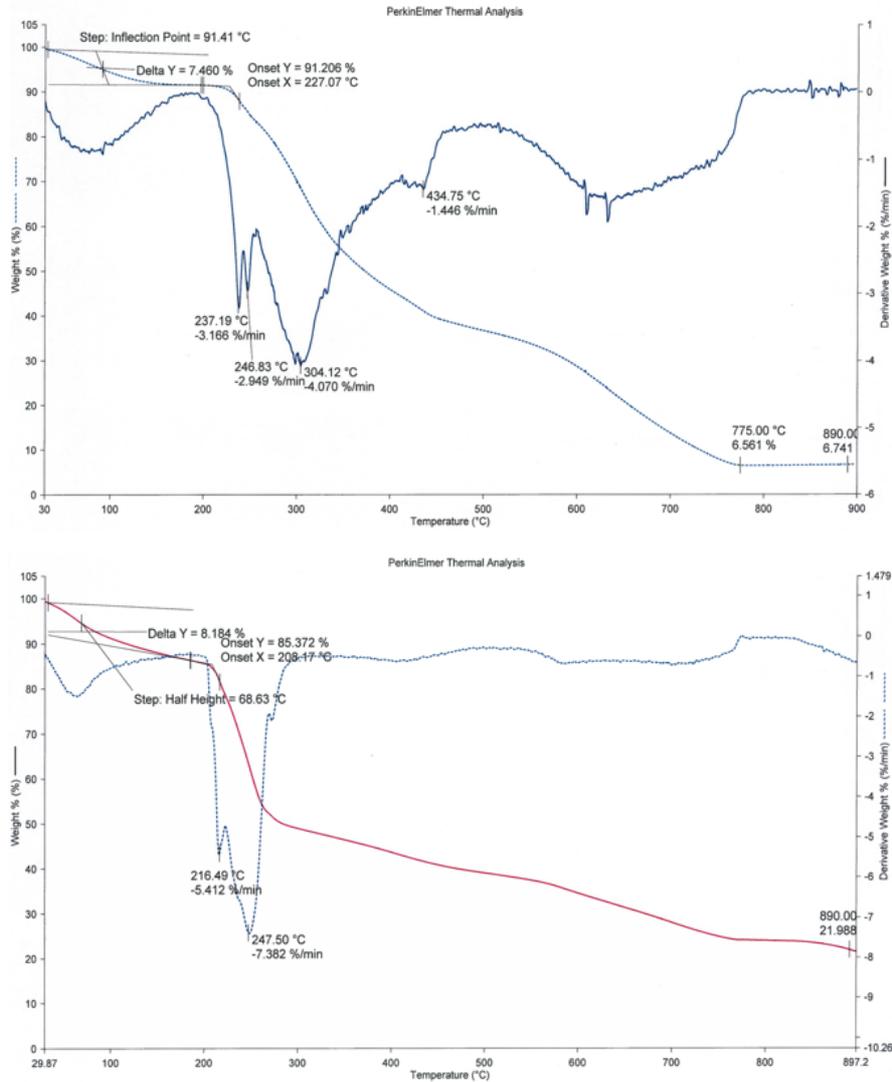


Figura 30. Termogrammi di cheratina (a) e di alginato di sodio (b)

Il termogramma in alto è quello relativo alla proteina: essa si degrada velocemente, arrivando alla fine ad avere una perdita percentuale in peso pari al 6,741%. In b, invece, si osserva che la percentuale finale è il 21,988% e la degradazione appare essere ancora più veloce.

Il primo lieve *scalino* che si osserva all'inizio dell'analisi è dovuto all'umidità del film, perciò è causato dalla perdita di acqua.

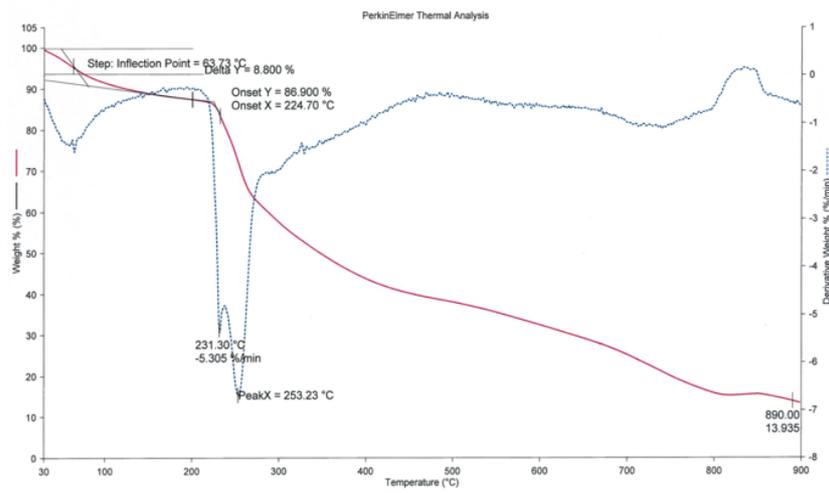
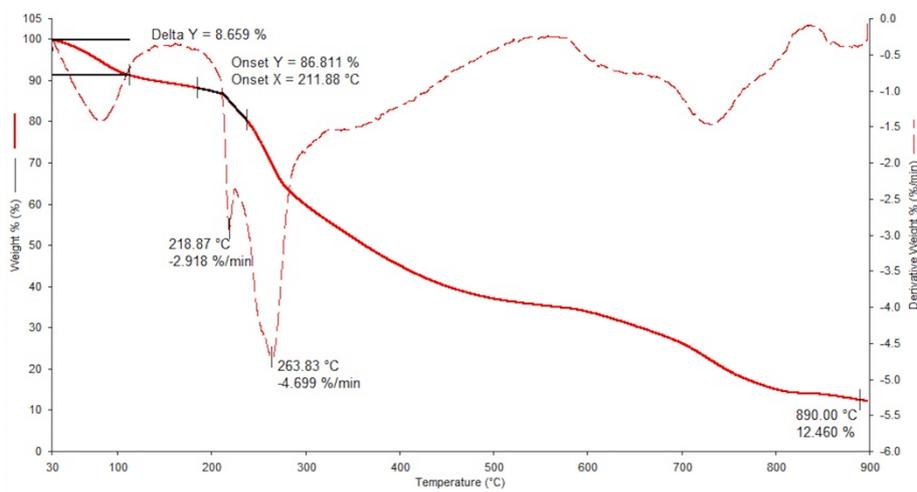


Figura 31. Termogramma della miscela (c)

Nel termogramma c vi è riportata la degradazione termica del film costituito dalla miscela di proteina e polisaccaride, che presenta una degradazione percentuale pari al 13,935%, circa intermedia tra quelle dei componenti singoli. Alla luce di questi dati, si può concludere che l'analisi TGA ha confermato la miscibilità dei due componenti, come riportato nello studio reologico.

Come si osserva in Figura 32, l'analisi termogravimetrica è stata condotta anche sul film cheratina/alginato reticolati con cloruro di calcio e glutaraldeide (d), su quello contenente anche la vitamina C (e) ed infine sul sistema con entrambi i principi attivi (f). Il campione (d) rispetto al (c) presenta una perdita percentuale in peso finale leggermente inferiore, che potrebbe essere dovuta ad una stabilizzazione del sistema da parte dei due agenti reticolanti.



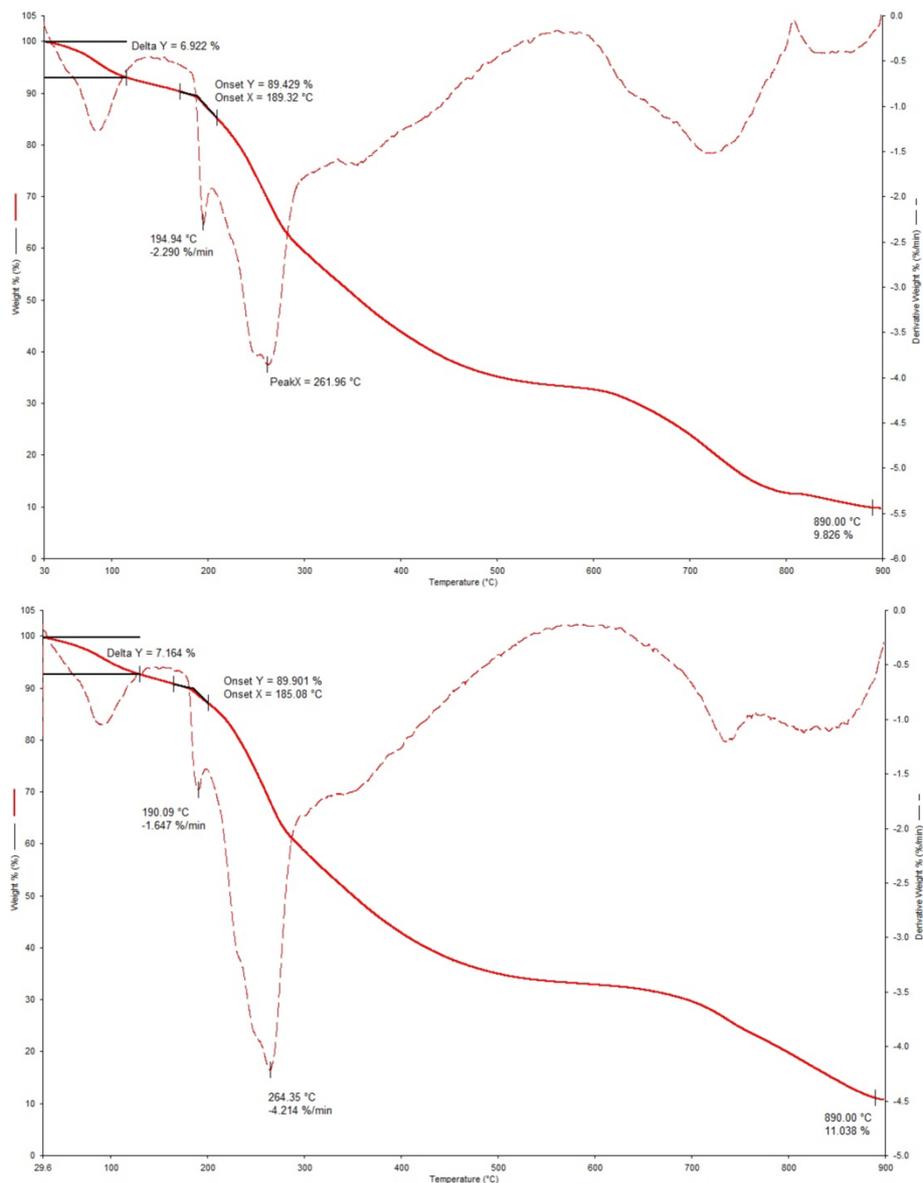


Figura 32. Termogrammi: (d) *ker/alg/Ca²⁺/GA*, (e) *ker/alg/Ca²⁺/GA/vit C*, (f) *ker/alg/Ca²⁺/GA/vit C/prop*

Da questi termogrammi è possibile concludere che la vitamina C provoca una leggera stabilizzazione del sistema: infatti, la perdita percentuale in peso totale diminuisce in sua presenza. Inoltre, questo dato sembrerebbe essere confermato anche dal SEM, dal momento che il film con acido ascorbico è più compatto rispetto agli altri due. La propoli, invece, si può ipotizzare che provochi una leggera diminuzione della stabilità termica del campione: la perdita percentuale in peso, infatti, passa da 9,826 % a 11,038 %. Anche in questo caso il dato ottenuto è in accordo con l'analisi SEM.

3.4.4 Analisi FTIR-ATR

Per indagare la composizione chimica dei diversi film e per avere informazioni sul metodo di interazione a livello molecolare dei componenti, è stata utilizzata la spettroscopia infrarossa in riflettanza totale attenuata.

In *Figura 33* sono riportati gli spettri dei film di sola cheratina, solo alginato e della miscela dei due con l'aggiunta degli agenti reticolanti, ovvero glutaraldeide e cloruro di calcio.

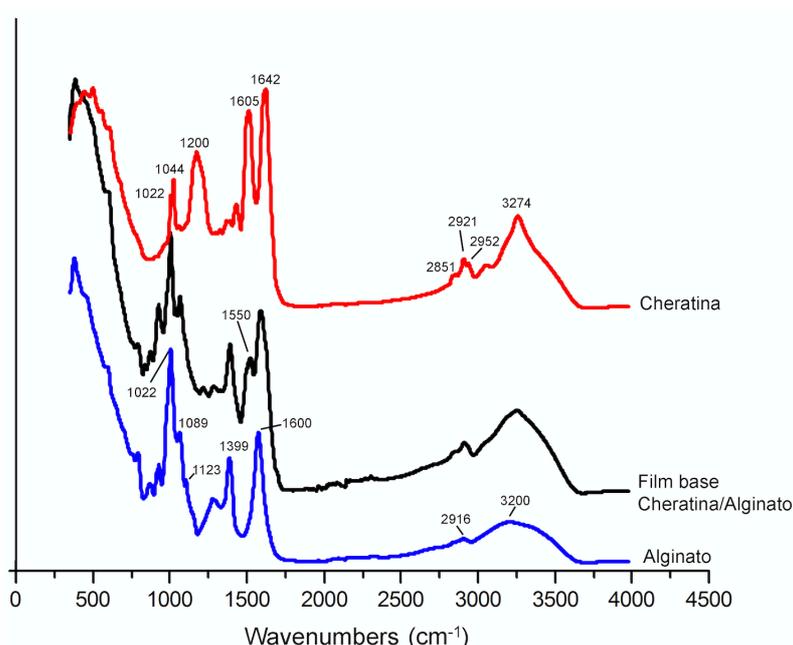


Figura 33. Spettri ATR dei film a base di cheratina, alginato, ker/alg/GA/Ca

Lo spettro del film di cheratina, rappresentato in rosso, presenta le caratteristiche bande di assorbimento di questo polimero, che sono associate ai legami peptidici. Il segnale a 3274 cm⁻¹ è dovuto alla banda dell'ammide A, prodotta dallo stretching N-H; a 1642 cm⁻¹ cade la banda relativa allo stretching del legame C=O dell'ammide I; l'ammide II, invece, è riconoscibile dalle vibrazioni di stretching C-N e bending N-H a circa 1605 cm⁻¹; infine, l'ammide III è rappresentata dalla banda a 1200 cm⁻¹, dovuta allo stretching C-N e al bending sul piano di N-H, con in parte un contributo da parte dello stretching dei legami C-C e del bending dei C=O⁵⁸. I picchi lievemente pronunciati a 2851, 2921 e 2952 cm⁻¹ sono caratteristici delle vibrazioni simmetriche ed asimmetriche dei gruppi CH₃ e di quelli CH₂. I segnali di poca intensità a 1044 e 1022 cm⁻¹ sono dovuti allo stretching dei residui cistein-S-solfonati, che sono prodotti durante la reazione di solfitolisi⁵⁹.

Lo spettro dell'alginato, in blu, presenta un picco molto allargato con un massimo a circa 3200 cm^{-1} , dovuto allo stretching dei legami O-H, ed una banda poco accentuata a 2916 cm^{-1} , caratteristica dello stretching del legame C-H. Vi sono, poi, due bande strette ed intense a 1600 e 1399 cm^{-1} , imputabili entrambi allo stretching asimmetrico dei gruppi COO^- . Infine, vi è una banda frastagliata dove si riconoscono tre segnali a 1123 , 1089 , 1022 cm^{-1} , dovuti rispettivamente allo stretching del legame C-C, a quello C-O ed allo stretching del gruppo C-O-C⁶⁰.

Il film costituito da cheratina, alginato, glutaraldeide e calcio cloruro (in nero) presenta sostanzialmente due differenze rispetto allo spettro dei due componenti puri: innanzitutto si osserva la comparsa di un picco a 1550 cm^{-1} , caratteristico della formazione del legame con la glutaraldeide; in secondo luogo, poi, la banda larga con il massimo a 3200 cm^{-1} diventa di maggiore intensità e più stretta, sintomo di un incremento nei legami intramolecolari⁶⁰.

In *Figura 34* sono riportati gli spettri relativi al film di base (nero) e quelli caricati con i due principi attivi, in verde quello contenente soltanto la vitamina C, in viola quello a cui viene aggiunta anche la propoli.

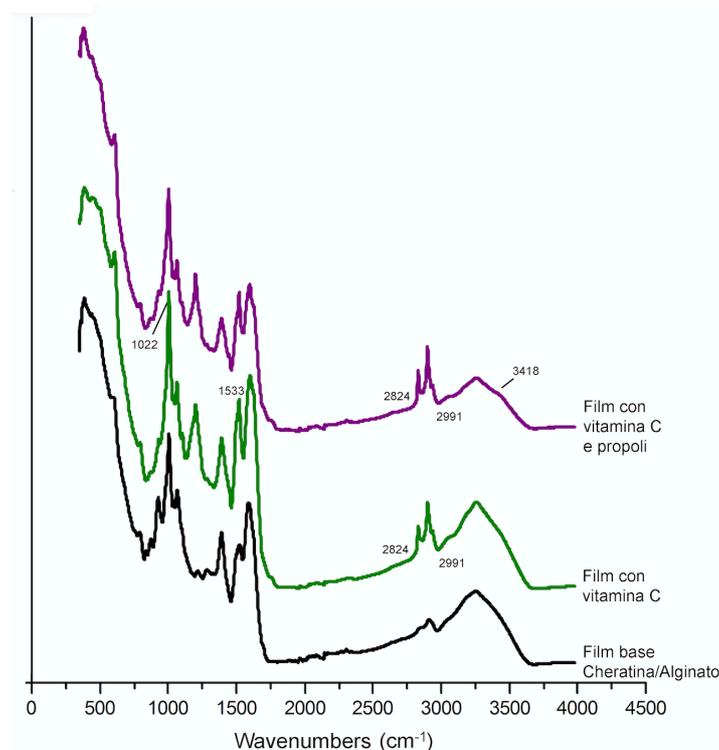


Figura 34. Spettri ATR dei film compositi

Nello spettro verde si possono riconoscere i caratteristici segnali dell'acido ascorbico: in particolare, si tratta dei due picchi stretti ed alti a 1533 e 1022 cm^{-1} , il primo è caratteristico del gruppo C=O, mentre il secondo è da attribuire alla presenza dell'eossido⁶¹.

Dal momento che la propoli è costituita da un insieme di componenti, è difficile individuarne uno spettro caratteristico, e, di conseguenza, non si possono attribuire segnali con certezza. Numerose pubblicazioni, ne riportano, tuttavia, alcune caratteristiche comuni, come la lieve spalla a 3418 cm^{-1} presente nello spettro in viola. Il segnale frastagliato compreso tra 2824 e 2991 cm^{-1} è particolarmente interessante: esso, infatti, compare nel film contenente solo la vitamina C ed è attribuibile al suo glicoside, ma nello spettro dove è presente anche la propoli esso aumenta in intensità, il che trova una spiegazione nel fatto che in quella zona cadano numerosi segnali relativi a questo componente.

3.4.5 Prove di *swelling* e biodegradazione

Queste due caratterizzazioni sono state condotte esclusivamente sul film costituito soltanto da alginato e cheratina, in modo da studiare le caratteristiche intrinseche della matrice in esame.

Lo *swelling*, ovvero la capacità di assorbire fluidi, è una proprietà importante per un materiale progettato per l'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa, in quanto favorisce l'adesione e la proliferazione cellulare, insieme anche alla porosità⁶². Dal momento che il film in acqua si rigonfia enormemente, è stato progettato un sistema apposito per misurare la quantità di acqua che è in grado di assorbire: i risultati hanno confermato quanto riportato in letteratura⁶³, ovvero che, grazie alla presenza dell'alginato, il rapporto di *swelling* percentuale è circa pari a $(4,2 \pm 0,3) \%$.

La biodegradabilità è una proprietà di elevato interesse per un film sintetizzato per il *wound healing*, sia perché velocizza il rilascio del principio attivo, sia per il fatto che, non dovendo essere rimosso dal luogo della lesione, facilita la formazione dello strato di tessuto di granulazione. Dal momento che i tempi di guarigione di una normale ferita sono di circa 15 giorni, è necessario che un materiale adibito a questa funzione rimanga stabile per almeno due settimane. In *Figura 35* è riportato l'andamento della

biodegradabilità in funzione del tempo: come si può osservare, il film è totalmente biodegradabile in 20 giorni.

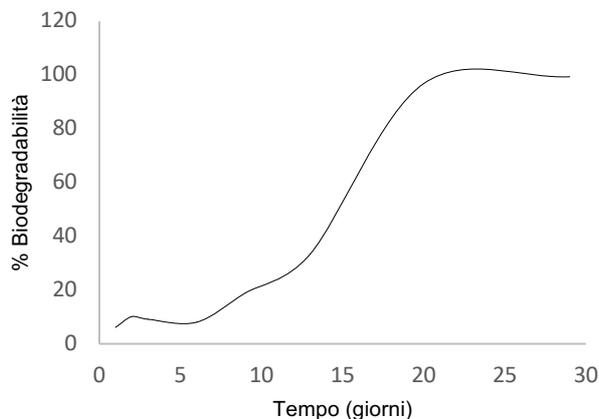


Figura 35. Biodegradabilità del film crosslinkato di alginato e cheratina

3.4.6 Prove di rilascio della vitamina C

Lo studio del rilascio di acido ascorbico è problematico, perché la molecola è fortemente instabile sia agli attacchi chimici che agli agenti naturali, come temperatura e luce. Sono stati seguiti due metodi per studiarne il rilascio dal film.

3.4.6.1 Metodo spettrofotometrico diretto

L'acido ascorbico presenta un massimo di assorbimento a circa 266 nm: in questa zona nessun altro componente dovrebbe disturbare il segnale di risposta.

La concentrazione di vitamina C rilasciata dal film nel tempo viene determinata mediante la misura della sua assorbanza a 266 nm ed estrapolata mediante una retta di taratura opportunamente costruita (valore dell'assorbanza a 266 nm per diverse soluzioni a concentrazione nota di vitamina C).

Un quarto di film del peso di 40 mg è stato inserito dentro una membrana di cellulosa per dialisi (cut-off 10-12kDalton), in modo che la cheratina rimanga confinata all'interno, mentre la vitamina C, molecola di piccole dimensioni, esca. Il sistema è stato inserito in una vial con qualche mL di acqua e, ad intervalli prestabiliti, sono stati prelevati 100 μ L per condurre l'analisi UV ed altrettanti ne sono stati re-inseriti (sink condition). Dai 100 μ L se ne prelevano 10 μ L, si diluiscono ad 1 mL e si analizzano con lo spettrofotometro Uv-Vis.

Le analisi effettuate non hanno portato ad ottenere valori affidabili a causa di un'elevata variabilità di questi. Il motivo potrebbe essere legato a rilasci di peptidi più corti che assorbono intorno a 266 nm, alterando il dato. Inoltre, si osserva anche la degradazione della vitamina C nel corso dell'analisi con cambiamento dello spettro di assorbimento.

3.4.6.2 Metodo colorimetrico

Per ovviare alle problematiche descritte per il metodo spettrofotometrico, si è optato per procedere con una determinazione indiretta della vitamina C, sfruttando la sua proprietà antiossidante. In particolare, è stato utilizzato il colorante DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazile), un radicale libero stabile. La vitamina C è in grado di trasferire un atomo di idrogeno al radicale formando la corrispondente idrazina. La reazione comporta un cambio di colore dal porpora del DPPH al giallo pallido dell'idrazina DPPH-H, che può essere monitorato spettrofotometricamente attraverso la diminuzione del massimo di assorbimento del colorante a 523 nm (*Figura 36*). L'entità della decolorazione è proporzionale alla quantità di vitamina C liberata presente nella soluzione.

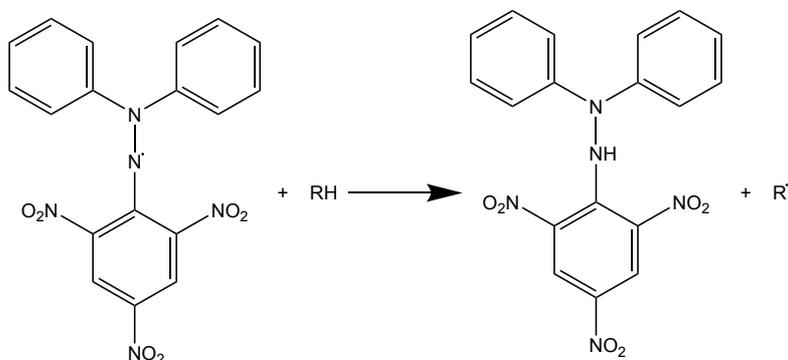


Figura 36. Reazione tra DPPH e vitamina C (RH)

Per quanto riguarda la strumentazione utilizzata, è stato sviluppato un sistema particolare (*Figura 37*), in cui il film, inserito nella membrana di cellulosa, è stato posto in un filtro che richiama il funzionamento della *Cella di Franz*.



Figura 37. Filtro da siringa chiuso (in alto), aperto (sinistra), posizionamento del film (destra)

Alla base dell'idea di sviluppare un sistema di questo genere, vi è il tentativo di riprodurre quanto avviene effettivamente sul luogo della lesione: infatti, la cella così costruita permette di fare entrare in contatto con il film solo una piccola parte di liquido (1 mL), proprio come avviene da un punto di vista pratico con l'essudato della ferita.

Per correlare la risposta ottenuta dall'analisi con la concentrazione di acido ascorbico, è stato utilizzato il metodo della retta di calibrazione (Figura 38), costruita aggiungendo alla soluzione di colorante quantità note di principio attivo.

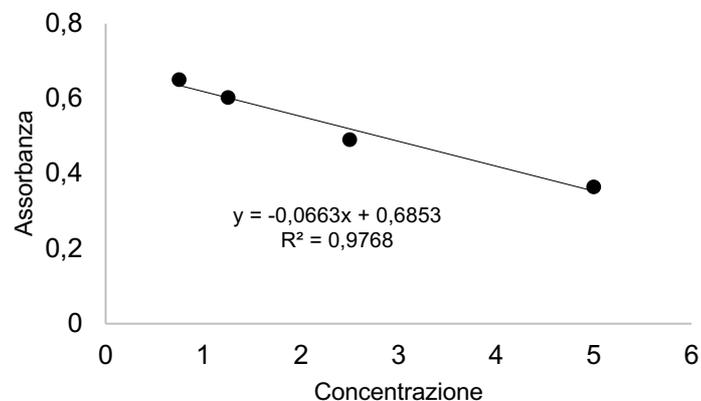


Figura 38. Curva di calibrazione

Il profilo di rilascio del principio attivo, *Figura 39*, mostra che in 24 ore viene liberato circa il 40% della vitamina C caricata sul film. In particolare, nei primi 60 minuti si raggiunge praticamente il massimo rilascio: infatti, a tempi superiori la percentuale di acido ascorbico rilasciato rimane pressoché costante, raggiungendo un plateau, ed il processo diventa decisamente più lento.

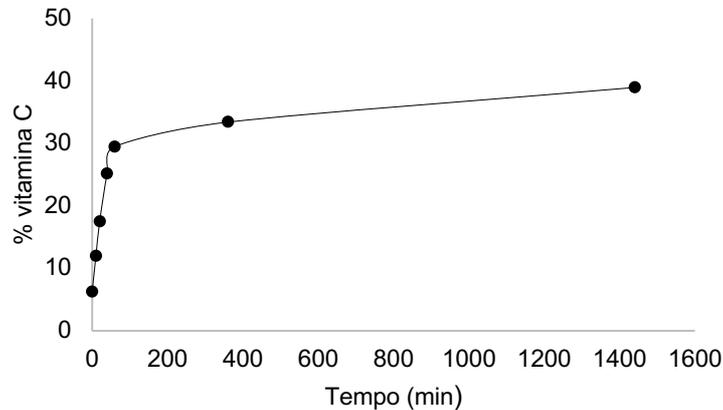


Figura 39. Profilo di rilascio acido ascorbico

È ipotizzabile che la quantità di vitamina C liberata subito sia quella che, durante la formazione del film, non si è intercalata fortemente tra le catene polimeriche di alginato e cheratina, perciò viene trattenuta meno all'interno della struttura. Il rilascio, poi, diviene più lento, perché è ostacolato dal fatto che l'acido ascorbico, intrappolato nella rete polimerica, deve migrare verso l'esterno.

Inoltre, vi potrebbe essere un legame importante tra la biodegradabilità del film ed il rilascio. È stato osservato che il sistema degrada completamente in ambiente fisiologico: sfaldandosi, è possibile che favorisca la fuoriuscita del principio attivo, incastrato tra le macro-catene. In questo caso, dal momento che il film per il *wound healing* non viene mai rimosso dalla ferita, esso rilascerebbe vitamina C per tutto il suo tempo di vita, permettendone un costante rinnovo.

4. Conclusioni e sviluppi futuri

Questo lavoro di tesi si è concentrato sulla sintesi di un sistema semplice (cheratina ed alginato), che è stato via via reso più complesso attraverso l'aggiunta di due principi attivi (vitamina C e propoli). L'idea alla base di questo progetto è quella di creare dei film totalmente biodegradabili e stabili in ambiente biologico, che possano fornire una soluzione per particolari casi di lesioni gravi, come per esempio le ustioni.

Il punto di partenza è stata la sintesi di un film di proteina e polisaccaride, che fosse stabile in acqua. Per ottenere questa proprietà è necessario che i due componenti siano legati insieme in modo covalente, motivo per cui si è proceduto con un *crosslinking*. Dal momento che è parso decisamente complesso creare un legame stabile tra cheratina ed alginato, si è proceduto creando un film costituito da una rete polimerica interpenetrata (IPN Interpenetrating polymer network), ossia da due polimeri (alginato e cheratina) reticolati in miscela tra loro.

Quindi, è stata addizionata la vitamina C, con lo scopo di favorire la rigenerazione del collagene durante il processo di guarigione. Infine, si è aggiunta la propoli, in virtù della sua azione antibatterica. In *Figura 40* è possibile osservare una schematizzazione del sistema ottenuto:

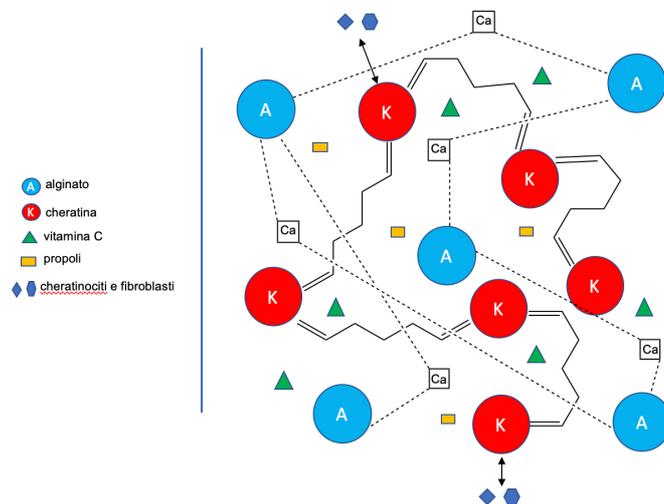


Figura 40. Struttura del film finale

I quattro componenti che vanno a formare il sistema finale, svolgono un'azione benefica sulle proprietà degli altri: l'alginato, infatti, accresce le proprietà meccaniche della cheratina, che a sua volta è un elemento fondamentale per il *wound healing*;

l'acido ascorbico dona una maggiore omogeneità al film e favorisce lo sviluppo di nuovo collagene, e la propoli lo aiuta a scongiurare l'instaurarsi di eventuali infezioni.

Sono in corso dei *test in vitro* su fibroblasti umani, per verificare l'azione della vitamina C sulla produzione di collagene e per confermare la biocompatibilità del sistema cheratina/alginato.

Inoltre, verranno eseguiti anche dei test microbiologici *in vitro* su patogeni responsabili di possibili infezioni delle lesioni cutanee, per verificare l'azione della propoli come antimicrobico.

5. Parte sperimentale

5.1 Estrazione della cheratina dalla lana

La lana (5,0 g), proveniente dal lanificio Cariaggi (Cagli, PU), viene preventivamente lavata con etere di petrolio, per eliminare eventuali grassi presenti, utilizzando un estrattore Soxhlet. Quindi, viene tagliata ed inserita in un pallone insieme a 100 mL della soluzione di estrazione, il cui pH è assolutamente necessario che sia neutro, in modo da non denaturare la proteina. Quest'ultima viene ottenuta sciogliendo 48,0 g di urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), 3,0 g di sodio dodecil solfato ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$) e 11,4 g di metabisolfito di sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) in 50 mL di H_2O milli-Q. Per solubilizzare questi componenti è necessario scaldare la miscela a circa 60°C ; dato che, nel momento in cui viene aggiunta, l'urea sottrae calore alla soluzione, sulla piastra riscaldante è preferibile impostare una temperatura maggiore. Quando tutti i solidi si sono sciolti, sono fondamentali due accorgimenti: infatti, bisogna verificare che il volume finale della soluzione sia di 100 mL, in caso contrario si procede con l'aggiunta di ulteriore H_2O milli-Q, e controllare che il pH sia neutro. Il sistema, costituito da lana e soluzione di estrazione, viene lasciato sotto leggera agitazione magnetica, per evitare l'infeltrimento delle fibre di lana, in bagno di olio a 60°C per tutta la notte. Il giorno seguente la miscela di reazione viene filtrata con un semplice colino, in modo da rimuovere la lana non reagita, e successivamente con due filtri, a porosità $30\ \mu\text{m}$ e $5\ \mu\text{m}$ sotto pressione. Infine, viene messa in dialisi per tre giorni: a questo proposito, si utilizzano membrane di acetato di cellulosa con *cut-off* di 12-14 kDa, il sistema viene mantenuto a temperatura ambiente e l'acqua milli-Q cambiata tre/quattro volte al giorno. Per verificare l'avvenuta purificazione, è necessario controllare periodicamente la conducibilità del liquido di dialisi: il processo si può ritenere concluso quando il valore di quest'ultima è al di sotto dei $5\ \mu\text{S}/\text{cm}$. Quindi, la soluzione viene messa in congelatore per almeno una notte e liofilizzata, per rimuovere le frazioni di H_2O ancora presenti.

Visto che il processo di filtrazione della soluzione risulta uno step difficoltoso, a causa dell'intasamento dei filtri, è stato messo a punto un metodo alternativo, che consiste nel centrifugare la soluzione ottenuta per 30 minuti a 4°C e 4000 rpm. In tal modo le componenti istologiche delle fibre di lana si depositano sul fondo della capsula e nel surnatante rimane la cheratina nella soluzione denaturante di estrazione. L'unico

accorgimento che è necessario adottare è di non lasciare troppo a lungo la cheratina a questa temperatura, per evitare la sua flocculazione. Dopo essere stata centrifugata, la soluzione viene messa in dialisi, come descritto sopra.

5.2 Caratterizzazione della cheratina estratta

La cheratina ottenuta con entrambi i metodi è stata caratterizzata con elettroforesi SDS-PAGE (Elettroforesi su Gel di Poliaccrilammide in presenza di sodio dodecil solfato), al fine di vedere la distribuzione dei pesi molecolari. L'analisi è stata eseguita con la Mini-Cella Xcell SureLock (Invitrogen), sul 4-12% di gel pre-cast di poliaccrilammide (Invitrogen), utilizzando NuPAGE MES SDS Running Buffer, appunto adatto a proteine aventi pesi molecolari compresi tra 3 e 188 kDa.

Per condurre l'analisi è stato seguito il protocollo Invitrogen: la soluzione di cheratina è stata sciolta in un tampone costituito da NuPAGE LDS Sample Buffer e NuPAGE Sample Reducing Agent, in modo da caricarne 30 µg in ogni pozzetto.

5.3 Preparazione dei film di alginato e cheratina

I film sono stati preparati per casting, ovvero per evaporazione del solvente (acqua milli-Q) a temperatura ambiente e per 36 ore, di una soluzione equimolare, costituita da cheratina ed alginato di sodio entrambi al 2% w/w.

A questo proposito 0,06 g di cheratina si disciolgono in 1,5 mL di H₂O milli-Q e la stessa quantità di alginato viene solubilizzata nel medesimo quantitativo di solvente. Le due soluzioni ottenute vengono miscelate insieme, in modo tale che la concentrazione totale finale in peso dei due componenti sia pari al 2%. I 3 mL ottenuti si inseriscono in un supporto di plastica a base quadrata con 3 cm di lato e 0,5 cm di spessore; quindi, si lascia evaporare il solvente.

Sono state eseguite numerose prove, al fine di trovare il metodo migliore per ottenere film stabili in soluzione acquosa.

5.3.1 Studio reologico

Sono state analizzate 5 diverse soluzioni cheratina/alginato a concentrazione crescente di proteina (0% - 25% - 50% - 75% - 100%), al fine di verificare l'effettiva miscibilità dei due componenti.

Lo studio è stato condotto effettuando misure di viscosità dipendenti dalla velocità di taglio con un reometro Anton Paar MCR 102, dotato di un dispositivo di controllo della temperatura Peltier PDT 200/56/1, impostato a $25 (\pm 0,1) ^\circ\text{C}$, utilizzando una geometria a piatto-cono (diametro 75 mm, angolo di 1° e troncamento di $45 \mu\text{m}$), in modalità di taglio controllata. La velocità di taglio è stata aumentata in modo logaritmico da 1 a 1000 s^{-1} . I dati sono stati acquisiti ed elaborati con il software RheoCompassTM (Anton Paar GmbH).

5.3.2 Preparazione dei film per *crosslinking* tramite estere succinimidilico

Indipendentemente dal rapporto EDC/NHS/alginato e dal tempo di reazione, il metodo utilizzato prevede una iniziale solubilizzazione completa in acqua dell'alginato e della cheratina in modo da ottenere una soluzione al 2% in peso per entrambi e solo successivamente vengono aggiunti gli altri due reagenti. Per quanto riguarda il primo passaggio è preferibile usare un agitatore magnetico con ancoretta, che permette una miscelazione più efficiente, visto che il polisaccaride è scarsamente solubile. Nel periodo di reazione tra l'alginato, la cheratina, l'EDC e l'NHS, invece, l'agitatore rotante risulta essere la scelta migliore: infatti, ruotando lentamente permette alle catene di *crosslinkarsi* più fortemente.

Una quantità pari a 0,06 g di alginato di sodio viene disciolta in 1,5 mL di H₂O milli-Q, scaldando leggermente il vial in modo da facilitarne la dissoluzione. Parallelamente, in 0,5 mL di solvente si solubilizzano 0,04 g di EDC e 0,02 g di NHS (prova 6, *Tabella 4*). Quindi, le due soluzioni vengono unite e si fanno reagire insieme per 15 minuti. Nel frattempo, 0,06 g di cheratina vengono disciolti in 1 mL ed aggiunti alla soluzione di alginato attivato. L'ancoretta magnetica viene rimossa, ed i componenti vengono lasciati all'interno dell'agitatore rotante *overnight*. Il giorno seguente, i 3 mL si versano all'interno della navicella di plastica a base quadrata e si lascia evaporare il solvente per 36 ore a temperatura ambiente.

Per verificare che il *crosslinking* sia effettivamente avvenuto, una frazione di film (0,04 g) viene immersa in 4 mL di acqua e si osserva il suo comportamento: se il campione mantiene la sua struttura, significa che la reazione è avvenuta correttamente, in caso contrario può essere che o non sia avvenuta, oppure che il grado di reticolazione sia troppo basso.

5.3.3 Preparazione dei film per ossidazione dell'alginato

Si disciogliono 0,50 g di alginato di sodio in 24 mL di H₂O milli-Q, per velocizzare il processo è necessario scaldare leggermente la miscela. Contemporaneamente, un vial contenente 1 mL di solvente viene protetto con un foglio di alluminio e vi si sciolgono dentro 0,16 g di periodato di sodio, componente estremamente solubile. Il rapporto periodato/alginato è calcolato rispetto al peso dell'unità ripetitiva del polisaccaride e le percentuali scelte sono quelle maggiormente utilizzate in letteratura⁶⁴.

Le due soluzioni vengono unite in un pallone coperto di alluminio: il volume finale è di 25 mL, di modo che la concentrazione di polisaccaride sia pari al 2% w/w. Terminato il tempo di ossidazione (*Tabella 5*), si procede con la purificazione facendo sgocciolare con una pipetta di Pasteur la soluzione di reazione in 100 mL di etanolo al 25%. Durante questa procedura, è necessario mantenere un'agitazione magnetica molto vigorosa e la beuta deve essere sempre protetta dalla luce. Il sistema così formato deve essere lasciato almeno per un paio di ore sotto agitazione, fino all'ottenimento di una polvere appiccicosa. Essa viene centrifugata per 30 minuti a 10000 rpm e 4°C, in modo da favorire la precipitazione dell'alginato ossidato. Il prodotto, infine, viene messo sottovuoto per qualche tempo per favorire l'evaporazione dell'eventuale solvente rimasto.

Per la preparazione del film, si disciogliono 0,06 g di alginato di sodio ossidato in 1,5 mL di H₂O milli-Q, scaldando leggermente il vial. In un altro contenitore di solubilizzano 0,06 g di cheratina nello stesso quantitativo di solvente. Le due soluzioni vengono miscelate insieme, poi i 3 mL ottenuti si inseriscono nel supporto di plastica e si lascia evaporare il solvente, come riportato sopra.

Per osservare l'effettivo *crosslinking* tra i due componenti, un frammento di film, dal peso di circa 0,04 g, è posto in 4 mL di acqua, come descritto precedentemente.

5.3.3.1 Caratterizzazione dell'alginato ossidato

Il test di Benedict è un metodo rapido ed efficace per determinare il quantitativo di aldeidi presenti in un campione.

Per l'esecuzione del saggio, 0,02 mg di alginato ossidato si sciolgono in 1 mL di H₂O milli-Q e vi si aggiungono 0,5 mL di reattivo di Benedict. Quindi, si scalda fino ad ebollizione e si osserva l'eventuale variazione di colore.

Se la soluzione rimane blu, significa che il quantitativo di aldeidi presenti nel campione non è significativo; invece, man mano che la loro concentrazione aumenta, le variazioni sono: verde, verde con precipitato, giallo, arancione e rosso.

5.3.4 Preparazione dei film con reazione di Maillard

Questo metodo consiste nel provocare il *crosslinking* tra uno zucchero riducente, qual è appunto l'alginato, ed una ammina per semplice riscaldamento.

Per la preparazione del film 0,06 g di cheratina si disciolgono in 1,5 mL di H₂O milli-Q e la stessa quantità di alginato viene solubilizzata nel medesimo quantitativo di solvente. Le due soluzioni ottenute vengono miscelate insieme, in modo tale che la concentrazione totale finale in peso dei due componenti sia pari al 2%. I 3 mL finali si inseriscono in un supporto di plastica a base quadrata con 3 cm di lato e 0,5 cm di spessore. La navicella si ripone all'interno di un essiccatore, contenente una soluzione satura di KCl (200 g di sale in 80 mL di H₂O), ed il sistema viene posto in stufa a 60°C.

Per vedere se la reazione di Maillard ha permesso di ottenere un film stabile, se ne prende un quarto (circa 0,04 g) e lo si mette in 4 mL di acqua, come descritto negli altri metodi analizzati.

5.3.5 Preparazione dei film con glutaraldeide e cloruro di calcio

Prima del *casting* vengono aggiunti i due agenti reticolanti, il calcio cloruro per il polisaccaride e la glutaraldeide per la cheratina. Al fine di creare un *network* in cui le catene dei due polimeri siano intercalate, si è deciso di procedere nel seguente modo: in 1,5 mL di H₂O milli-Q si sciolgono 0,18 mg di CaCl₂ (che corrispondono al 3% in peso rispetto alla quantità di polisaccaride), quindi vi si aggiungono 0,06 g di cheratina. È consigliabile non mantenere troppo elevata l'agitazione magnetica, per evitare la formazione di un quantitativo eccessivo di bolle. In un vial a parte si inseriscono altri 1,5 mL di solvente e, scaldando leggermente, vi si sciolgono 0,06 g di alginato. Quando entrambe le soluzioni appaiono omogenee, quella di polisaccaride viene aggiunta alla prima. Per evitare che l'alginato reagisca istantaneamente con gli ioni Ca²⁺, è necessario che l'aggiunta avvenga velocemente e mantenendo un'agitazione magnetica molto vigorosa. Si lascia il sistema in agitazione per circa 30 minuti, quindi si procede con l'aggiunta goccia a goccia di 60 µL di glutaraldeide. Quando tutti i

componenti sono stati addizionati, si lasciano reagire per 60 minuti. Poi, il vial contenente la soluzione viene messo nel sonicatore (Elma S-40, Elmasonic) in modalità *degas* per 5 minuti, al fine di rimuovere le piccole bolle di aria presenti: infatti, il materiale utilizzato per formare il film non deve presentare elementi che ne diminuiscano l'omogeneità. Questo strumento rischia di innalzare notevolmente la temperatura del campione, perciò è bene che il vial non rimanga troppo a lungo al suo interno.

La soluzione finale (3 mL), infine, viene posta a *filmare* all'interno di un contenitore di plastica con geometria quadrata a temperatura ambiente per 36 ore.

5.4 Preparazione dei film caricati con la vitamina C

La sintesi di questi film caricati è la medesima riportata sopra, con la differenza che, prima di aggiungere il polisaccaride, si addiziona il principio attivo.

In 1,5 mL di H₂O milli-Q si sciolgono 0,18 mg di CaCl₂ (che corrisponde al 3% in peso rispetto alla quantità di polisaccaride), quindi vi si aggiungono 0,06 g di cheratina. Una volta che la proteina si è sciolta completamente, si fanno sciogliere nella soluzione 0,012 g di vitamina C (20% w/w rispetto alla proteina⁶⁵). In un altro vial si disciolgono 0,06 g di alginato in 1,5 mL di solvente. Le due soluzioni vengono quindi unite e si lascia il sistema in agitazione per 30 minuti. Poi, si procede con l'aggiunta goccia a goccia di 60 µL di glutaraldeide e si attendono 60 minuti. Dopo aver eliminato le bolle di aria presenti, seguendo la procedura riportata nel paragrafo precedente, si inseriscono i 3 mL di soluzione all'interno della navicella e si attende che il film si formi per evaporazione del solvente.

5.5 Preparazione dei film caricati con la vitamina C e la propoli

La preparazione di questi film differisce da quella riportata sopra per l'aggiunta della propoli, che avviene contemporaneamente a quella di vitamina C. Quindi, dopo la solubilizzazione dell'acido ascorbico, alla soluzione di cheratina e CaCl₂ si addizionano 0,68 mg di propoli (1,3% w/w rispetto alla proteina⁶⁶). Questo principio attivo è poco solubile, perciò richiede un tempo maggiore per sciogliersi completamente ed un leggero riscaldamento della soluzione. Dopo l'aggiunta di tutti i componenti e l'eliminazione delle bolle di aria, si può procedere come riportato sopra.

5.6 Caratterizzazione dei film

Sono state condotte numerose analisi sui film ottenuti in base alle diverse composizioni.

Gli spettri ad infrarossi sono stati acquisiti mediante la tecnica in riflettanza totale attenuata (ATR), con un interferometro Bruker Vertex 70 dotato di un accessorio Platinum ATR a riflessione in cristallo di diamante, nella regione tra 4000 e 400 cm^{-1} , con 100 scansioni ed una risoluzione di 4 cm^{-1} .

Per quanto riguarda lo studio dello spessore e la rugosità del film è stato utilizzato il SEM, per il primo dato è necessario immergere prima il film in azoto liquido e poi spezzarlo. È stato utilizzato un Microscopio Elettronico a Scansione Zeiss EVO LS 10 LaB7, strumento con voltaggio di accelerazione di 5 kV e distanza di lavoro di 5 mm. I campioni sono stati montati su provini con superficie bioadesiva e ricoperti con uno strato d'oro per un minuto prima di condurre l'analisi, in modo da *metallizzare* la superficie e renderla conduttiva.

5.7 Analisi TGA

Per studiare le proprietà termiche di tutti i film, è stata condotta un'analisi termogravimetrica (TGA). Questo metodo si basa sulla misura della variazione in peso del campione, dal momento che la macchina è dotata di una bilancia interna estremamente sensibile. In particolare, l'esperimento è stato condotto in atmosfera inerte di N_2 , in modo da evitare eventuali interferenze da parte dell'ossigeno atmosferico, e la degradazione termica del campione è stata studiata nel range 30 – 900 °C. La velocità di scansione è di 10 °C al minuto, con un campionamento ogni 0,5 secondi.

5.8 Prova di *swelling*

Il film costituito solo dai componenti principali (cheratina, alginato, glutaraldeide e cloruro di calcio) viene essiccato in stufa per qualche ora a 40°C, in modo da eliminare l'acqua presente, e successivamente pesato. Dal momento che le proprietà meccaniche del film bagnato sono molto scadenti, è stato elaborato un particolare metodo per poterlo pesare: infatti, il campione viene adagiato su una navicella traforata

per poterlo tirare fuori dal liquido senza che si sfaldi e così si pesa direttamente il sistema.

Da un punto di vista operativo, il campione con il supporto, preventivamente pesati, viene posto in qualche mL (circa 12 mL) di acqua milli-Q a 37 °C e lasciato in questo modo per un giorno. Infine, viene pesato.

Il rapporto di swelling si calcola come:

$$S_w = \frac{\text{peso umido} - \text{peso secco}}{\text{peso secco}}$$

5.9 Prove di degradazione *in vitro*

Questa caratterizzazione, allo stesso modo di quella precedente, è condotta soltanto sul film di base, contenente cheratina, alginato ed i due agenti crosslinkanti. La biodegradabilità è una proprietà importante per un materiale destinato al *wound healing*, in quanto permette un suo totale assorbimento nel tempo nel luogo della ferita. Lo studio è stato condotto in triplicato, in modo da avere un risultato riproducibile.

Da un punto di vista operativo, la degradazione del campione viene calcolata misurandone la massa dopo la sua permanenza a contatto con una soluzione di proteasi XIV (Proteasi dallo *Streptomyces griseus*, tipo XIV, Sigma) con una concentrazione pari a 0,5 mg/mL, in PBS a pH 7,4. Un film viene spezzettato in ottavi e ciascuna di queste frazioni (dal peso di 0,02 g) è stata inserita all'interno di diverse provette Eppendorf, aggiungendo poi un quantitativo di soluzione di proteasi pari a 2,5 µg per ogni mg di campione. I sistemi ottenuti vengono inseriti in un agitatore rotante, posto all'interno di una camera a riscaldamento controllato, a 37 °C. A determinati intervalli di tempo, le Eppendorf vengono ritirate e si procede con alcuni lavaggi con acetone, in modo da eliminare la soluzione di enzima e le frazioni provenienti dalla degradazione del film. Per fare ciò, 300 µL di acetone vengono inseriti nella Eppendorf, si agita leggermente e si preleva il surnatante; si ripete il lavaggio per tre volte. Dopo di che le Eppendorf vengono messe in stufa per una notte, in modo da favorire l'evaporazione dell'acetone, ed il campione viene nuovamente pesato: così si ricava la differenza in peso tra il film prima del processo di biodegradazione enzimatico e dopo. La formula utilizzata per estrapolare i risultati è:

$$\% D = \frac{\text{peso iniziale} - \text{peso finale}}{\text{peso iniziale}} \cdot 100$$

5.10 Rilasci vitamina C

L'acido ascorbico è un componente estremamente sensibile alle condizioni atmosferiche, soprattutto per quanto riguarda la temperatura e la luce. In questo lavoro sono stati utilizzati due metodi, entrambi si servono di uno spettrofotometro Cary 100 (Agilent).

5.10.1 Metodo spettrofotometrico diretto

Un frammento di film del peso di 0,04 g viene messo all'interno di una membrana di cellulosa per dialisi con *cut-off* di 10 – 12 kDa, tale per cui le molecole di elevate dimensioni vengono trattenute, mentre quelle più piccole, come appunto la vitamina C, escono. Lo studio è condotto in *sink condition*: l'involucro contenente il campione è inserito in un vial contenente 6 mL di H₂O, poi, ad intervalli determinati di tempo, si prelevano 100 µL ed altrettanti di acqua vengono re-inseriti. Della quantità prelevata se ne prendono 10 µL e li si diluisce fino ad 1 mL, quindi si procede con la determinazione. Il campione, poi, viene sottoposto ad analisi con lo spettrofotometro, andando ad indagare l'intensità del massimo di assorbimento a circa 266 nm. Per ricavare la concentrazione di vitamina C viene utilizzato il metodo della retta di calibrazione, costruita a partire da soluzioni a concentrazione nota di principio attivo. In particolare, partendo da una soluzione madre (10 mg in 100 mL di H₂O milli-Q), vengono usate le seguenti concentrazioni: 5 – 2,5 – 1,25 e 0,75 µg/mL.

5.10.2 Metodo colorimetrico

Si tratta di una determinazione indiretta, che sfrutta la variazione di colore di una molecola in virtù dell'attività antiossidante dell'acido ascorbico. Come colorante si usa il DPPH: esso è un radicale libero stabile, che viene trasformato nella sua forma non-radicalica attraverso la reazione con la vitamina C. Quello che si va a studiare è l'intensità del massimo di assorbimento a circa 523 nm.

Nel tentativo di mimare quanto più possibile le condizioni fisiologiche di una ferita, abbiamo preferito non lavorare in *sink condition*, ma utilizzare una strumentazione simile alla *Cella di Franz*. Un quarto di film (circa 0,04 g), sempre all'interno della

membrana di acetato di cellulosa, è inserito in un filtro per siringhe in acciaio e, ad intervalli determinati di tempo, viene fatto passare 1 mL di H₂O attraverso il sistema, in modo da bagnare il film, che in tal modo libera il principio attivo. Quindi, il liquido uscito dal filtro viene raccolto e di esso se ne prelevano 10 µL, che sono poi diluiti fino ad 1 mL. Questo passaggio è fondamentale, perché se la soluzione è troppo concentrata, il segnale cade fuori dalla linearità. Poi, vengono prelevati 200 µL di questo prodotto e mescolati con 300 µL della soluzione di colorante, preparata sciogliendone 4 mg in 100 mL di metanolo. Il sistema così formato viene mantenuto al buio per 30 minuti, dopodiché si procede con l'analisi. È possibile constatare la presenza di vitamina C già ad occhio nudo: infatti, la soluzione di DPPH è viola intenso, mentre, man mano che avviene la reazione, si decolora sempre di più fino a divenire gialla. Anche in questo caso, come sopra, per correlare il dato ottenuto con la concentrazione effettiva di principio attivo viene usata una retta di calibrazione: quest'ultima è ottenuta aggiungendo al DPPH soluzioni a concentrazione nota di vitamina C (5 – 2,5 – 1,25 e 0,75 µg/mL). La retta, tuttavia, ha un valore di R² abbastanza basso, probabilmente ciò è dovuto all'instabilità della molecola. Il procedimento adottato, sia per quanto riguarda la determinazione dell'acido ascorbico che la costruzione della retta di calibrazione, è quello maggiormente riportato in letteratura⁶⁷.

Questo metodo colorimetrico, inoltre, è stato utilizzato anche per verificare che non vi siano differenze sostanziali tra i due metodi di preparazione del film, che differiscono soltanto per l'ordine di aggiunta dei componenti: infatti, i profili di rilascio sono i medesimi.

Bibliografia

- ¹ Dati dal sito www.aiuc.it dell'associazione italiana ulcere cutanee (ultimo accesso in data 2/09/2019).
- ² Siddiqui A.R., Bernstein J.M., *Chronic wound infection: Facts and controversies. Clin. Dermatol.* (2010); 28: 519 – 526.
- ³ Zahedi P., Rezaeian I., Ranaei-Siadat S.O., Jafari S.H., Supaphol P., *A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. Polym. Adv. Technol.* (2010); 21: 77 – 95.
- ⁴ Jeffcoate W.J., Price P., Harding K.G., *Wound healing and treatments for people with diabetic foot ulcers. Diabetes Metab. Res. Rev.* (2004); 20 (Suppl.): S78-89.
- ⁵ Calosso A., *Le lesioni cutanee, Carrocci, Roma* (2004).
- ⁶ Eming S.A., Krieg T., Davidson K.M., *Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanism. J. Invest. Dermatol.* (2007); 127: 514 – 525.
- ⁷ Velnar T., Bailey T., Smrkolj V., *The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. SAGE Journals* (2009); 37: 1528 – 1524.
- ⁸ Pool J.G., *Normal hemostatic mechanisms: a review. Am. J. Med. Technol.* (1977); 43: 776 – 780.
- ⁹ Robson M.C., Steed D.L., Franz M.G., *Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. Curr. Probl. Surg.* (2001); 38: 72 – 140.
- ¹⁰ Broughton G., Janis J.E., Attinger C.E., *The basic science of wound healing. Plast. Reconstr. Surg.* (2006); 117 (7 Suppl): 12S – 34S.
- ¹¹ Lawrence W.T., *Physiology of the acute wound. Clin. Plast. Surg.* (1998); 25: 321 – 340.

¹² Hunt T.K., Hopf H., Hussain Z., *Physiology of wound healing. Ads. Skin Wound Care* (2000); 13: 6 – 11.

¹³ Velnar T., Bailey T., Smrkolj V., *The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. SAGE Journals* (2009); 37: 1524 – 1528.

¹⁴ Hart J., *Inflammation. 1: its role in the healing of acute wounds. J. Wound Care* (2002); 11: 205 – 209.

¹⁵ Samuels P., Tan A.K., *Fetal scarless wound healing. J. Otolaryngol.* (1999); 28: 296 – 302.

¹⁶ Ramasastry S.S., *Acute wounds. Clin. Plast. Surg.* (2005); 32: 195 – 208.

¹⁷ Hunt T.K., *The physiology of wound healing. Ann. Emerg. Med.* (1998); 17: 1265 – 1273.

¹⁸ Dowling L. M., Crewther W. G., Parry D. A. D., *Secondary Structure of Component 8c-1 of α -keratin. Biochem. J.* (1986); 236: 705 – 712.

¹⁹ Church, J.S., Corino, G. L., Woodhead A. L., *The analysis of Merino wool cuticle and cortical cells by Fourier transform Raman spectroscopy. Biopolymers* (1997); 42: 7 – 12.

²⁰ Dickerson M.B., Sierra A.A., Bedford N.M, *Keratin-based antimicrobial textiles, films, and nanofibers. J. Mater. Chem. B.* (2013); 1: 5505 – 5515.

²¹ Tachibana A., Furuta Y., Takeshima H., Tanabe T., Yamauchi K., *Fabrication of wool keratin sponge scaffolds for long-term cell cultivation. J. Biochemical* (2002); 93: 165 – 170.

²² Khan F., Ahmad S.R., *Polysaccharides and their derivatives for versatile tissue engineering application. Macromol Biosci.* (2013); 13 (4): 395 – 421.

-
- ²³ Bravo L., *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutri. Rev.* (1998); 56: 317 – 333.
- ²⁴ Maia Campos P.M.B.G., de Melo M.O., de Camargo Junior F.B., *Effects of Polysaccharide-Based Formulations on Human Skin. In: Ramawat K., Mérillon JM. J. Polysaccharides* (2014); 1 – 18.
- ²⁵ Al-Shamkhani A., Duncan R., *Radioiodination of alginate via covalently bound tyrosinamide allows monitoring of its fate in vivo. J. Bioact. Compat. Polym.* (1995); 10: 4 – 13.
- ²⁶ Boateng J.S., Matthews K.H., Stevens H.N.E., Eccleston G.M., *Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. J. Pharm. Sci.* (2008); 97: 2892 – 2923.
- ²⁷ Lee K. Y., Mooney D. J., *Alginate: Properties and biomedical applications, Prog. Polym. Sci.* (2012); 37: 106 – 126.
- ²⁸ Carmeliet P., *Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature* (2005); 438: 932 – 936.
- ²⁹ Lee K.Y., Peters M.C., Mooney D.J., *Comparison of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in SCID mice. J. Control. Release* (2003); 87: 49 – 56.
- ³⁰ McArdle F., Rhodes L.E., Parslew R., Jack C.I., Friedmann P.S., Jackson M.J., *UVR-induced oxidative stress in human skin in vivo: Effects of oral vitamin C supplementation. Free Radic. Biol. Med.* (2002); 33: 1355 – 1362.
- ³¹ Hinek A., Kim H.J., Wang Y., Wang A., Mitts T.F., *Sodium L-ascorbate enhances elastic fibers deposition by fibroblasts from normal and pathologic human skin. J. Dermatol. Sci.* (2014); 75: 173 – 182.
- ³² Duarte T.L., Cooke M.S., Jones G.D., *Gene expression profiling reveals new protective roles for vitamin C in human skin cells. Free Radic. Biol. Med.* (2009); 46: 78 – 87.

-
- ³³ Savini I., Catani M.V., Rossi A., Duranti G., Melino G., Avigliano L., *Characterization of keratinocyte differentiation induced by ascorbic acid: Protein kinase C involvement and vitamin C homeostasis. J. Investig. Dermatol.* (2002); 118: 372 – 379.
- ³⁴ Ellinger S., Stehle P., *Efficacy of vitamin supplementation in situations with wound healing disorders: Results from clinical intervention studies. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* (2009); 12: 588 – 595.
- ³⁵ Ghisalberti E.L., *Propolis: a review. Bee Wld.* (1978); 60: 59 – 84.
- ³⁶ Bankova V., *Recent trends and important developments in propolis research. Evid. Based Complement Alternat. Med.* (2005); 2: 29 – 32.
- ³⁷ Burdock G.A., *Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. Food Chem. Toxicol.* (1998); 347 – 363.
- ³⁸ Russo A., Longo R., Vanella A., *Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galagin. Fitoterapia* (2002); 73: S21 – 29.
- ³⁹ Marcucci M.C., *Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie* (1995); 26 (2): 83 – 99.
- ⁴⁰ Ghisalberti E.L., *Propolis: a review. Bee Wld.* (1978); 60: 59 – 84.
- ⁴¹ Burdock G.A., *Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. Food Chem. Toxicol.* (1998); 36: 347 – 363.
- ⁴² Christov R., Bankova V., Hegazi A., Abd El Hady F., Popov S., *Chemical composition of Egyptian propolis. Z. Naturforsch.* (1998); 53: 197 – 200.
- ⁴³ Martos I., Ferreres F., Yao L., D'Arcy B., Caffin N., Tomas-Barberan F.A., *Flavonoids in monospecific eucalyptus honeys from Australia. J. Agric. Food Chem.* (2000); 48: 4744 – 4748.

-
- ⁴⁴ Walgrave S.E., Warshaw E.M., Glesne L.A., *Allergic contact dermatitis from propolis. Dermatitis* (2005); 16: 209 – 215.
- ⁴⁵ De Vecchi E., Drago L., *Propolis antimicrobial activity: what's new?. Infez. Med.* (2007); 1: 7 – 15.
- ⁴⁶ Langer R., *New methods of drug delivery. Sci.* (1990); 249: 1527 – 1533.
- ⁴⁷ Arifin D.Y., Lee L.Y., Wang C.H., *Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. Adv. Drug. Deliv. Rev.* (2006); 58: 1274 – 1325.
- ⁴⁸ Montalbetti C.A.G.N., Falque V., *Amide bond formation and peptide coupling. Tetrahedron* (2005); 61: 10827 – 10852.
- ⁴⁹ Wang Y., Wang X., Shi J., Zhu R., Zhang J., Zhang R., Ma D., Hou Y., Lin F., Yang J., Mizuno M., *A biomimetic silk fibroin/sodium alginate composite scaffold for soft tissue engineering. Sci.* (2016); 6: 3947 – 3977.
- ⁵⁰ Hartrianti P., Nguyen L.T.H., Johannes J., Chou S.M., Zhu P., Tan N.S., Tang M.B.Y., Ng K.W., *Fabrication and characterization of a novel crosslinked human keratin-alginate sponge. J. Tissue Eng. Regen. Med.* (2017); 11: 2590 – 2602.
- ⁵¹ Foox M., Raz-Pasteur A., Berdicevsky I., Krivoy N., Zilberman M., *In vitro microbial inhibition, bonding strength, and cellular response to novel gelatin–alginate antibiotic-releasing soft tissue adhesives. Polym. Adv. Technol.* (2014); 25: 516 – 524.
- ⁵² Kuo J.W., Swann D.A., Prestwich G.D., *Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides. Bioconjugate Chem.* (1991); 24: 232 – 241.
- ⁵³ Bajpai S.K., Bajpai M., Shah F.F., *Alginate dialdehyde (AD)-crosslinked casein films: synthesis, characterization and water absorption behavior. Des. Monomers Polym.* (2016); 406 – 419.

-
- ⁵⁴ Ding W., Zhou J., Zeng Y., Wang Y., Shi B., *Preparation of oxidized sodium alginate with different molecular weights and its application for crosslinking collagen fiber. Carbohydr. Polym.* (2017); 157: 1650 – 1656.
- ⁵⁵ Hwang I.G., Kim H.Y., Woo K.S., Lee J., Jeong H.S., *Biological activities of Maillard reaction products (MRPs) in a sugar–amino acid model system. Food Chem.* (2011); 26: 221 – 227.
- ⁵⁶ Oliver C.M., Melton L.D., Stanley R.A., *Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: A review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2006); 46: 337 – 350.
- ⁵⁷ Rhim J., *Physical and mechanical properties of water-resistant sodium alginate films. Lebensm. -Wiss. U. – Technol.* (2004); 37: 323 – 330.
- ⁵⁸ Kreplak L., Doucet J., Dumas P., Briki F., *New aspects of the alpha-helix to beta-sheet transition in stretched hard alpha-keratin fibers. Biophys. J.* (2004); 87: 640 – 647.
- ⁵⁹ Erra P., Gomez N., Dolcet L.M., Julia M.R., Lewis D.M., Willoughby J.H., *Keratins extracted from Merino wool and Brown Alpaca fibers: Thermal, mechanical and biological properties of PLLA based biocomposites. Text. Res. J.* (1997); 67: 397 – 401.
- ⁶⁰ Sartori C., Finch D.S., Ralph B., *Determination of the cation content of alginate thin films by FTi.r. spectroscopy. Polymer* (1997); 38: 43 – 45.
- ⁶¹ Bunaciu A.A., Bacalum E., Aboul-Enein H.Y., Udristioiu G.E., *FT-IR spectrophotometric analysis of ascorbic acid and biotin and their pharmaceutical formulations. Anal. Lett.* (2009); 42: 1321 – 1327.
- ⁶² Enrione J., Osorio F., López D., Weinstein-Opppenheimer C., Fuentes M.A., Ceriani R., Brown D.I., Albornoz F., Sánchez E., Villalobos P., *Designing a gelatin/chitosan/hyaluronic acid biopolymer using a thermophysical approach for use in tissue engineering. Electron. J. Biotechnol.* (2010); 13: 101 – 110.

⁶³ Bajpai S.K., Sharma S., *Investigation of swelling/degradation behavior of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions. React. Funct. Polym.* (2004); 59: 129 – 140.

⁶⁴ Balakrishnan B., Lesieur S., Labarre D., Jayakrishnan A., *Periodate oxidation of sodium alginate in water and in ethanol-water mixture: a comparative study. Carbohydr. Res.* (2005); 340(7): 1425 – 1429.

⁶⁵ DePhillipo N.N., Aman S.Z., Kennedy I.M., Begley J.P., Moatshe G., Robert F. LaPrade R.F., *Efficacy of vitamin C supplementation on collagen synthesis and oxidative stress after musculoskeletal injuries: a systematic review. Orthop. J. Sports Med.* (2018); 6: 10 – 25.

⁶⁶ Araújo G. K., Souza S. J., Silva M. V., Yamashita F., Gonçalves O.H., Leimann F.V., Shirai M.A., *Physical, antimicrobial and antioxidant properties of starch-based film containing ethanolic propolis extract. Int. J. Food Sci. Technol.* (2015); 50: 2080 – 2087.

⁶⁷ Khaton M., Islam E., Islam R., Rahman A.A., Alam K., Khondkar P., Rashid M., Parvin S., *Estimation of total phenol and in vitro antioxidant activity of Albizia procera leaves. BMC Res. Notes* (2013); 6: 121 – 125.