

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Membrane elettrofilate biodegradabili a base di
PBS e Cheratina per il rilascio di farmaci ed
ingegneria tissutale

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Matteo Sforzini

RELATORE

Chiar.ma Prof.ssa Nadia Lotti

CORRELATORE

Dott.ssa Annalisa Aluigi

Dott.ssa Giulia Guidotti

Dott.ssa Michelina Soccio

Abstract	1
1. Introduzione.....	2
1.1 Materiali polimerici	2
1.2 Polimeri sintetici	4
1.2.1 Poliesteri alifatici.....	4
1.2.1.1 Sintesi	4
1.2.1.2 Peso molecolare	5
1.2.1.3 Cristallinità	7
1.2.1.4 Proprietà termo-meccaniche	7
1.2.1.5 Biodegradabilità	11
1.2.1.6 Biocompatibilità.....	14
1.2.1.7 Poliesteri alifatici ad uso biomedicale	14
1.2.1.7.1 Acido poliglicolico (PGA)	14
1.2.1.7.2 Acido polilattico (PLA).....	15
1.2.1.7.3 Acido polilattico-co-glicolico (PLGA)	17
1.2.1.7.4 Poli(ϵ -caprolattone) (PCL).....	17
1.2.1.7.5 Poli(butilene-succinato) (PBS).....	18
1.3 Polimeri naturali	20
1.3.1 Proteine	21
1.3.1.1 Cheratina	22
1.4 Miscele polimeriche.....	27
1.5 Applicazioni biomedicali	29
1.5.1 Rilascio controllato di farmaco.....	29
1.5.1.1 Meccanismi di rilascio controllato.....	32
1.5.1.2 Patch transdermiche	35
1.5.2 Ingegneria tissutale	38
1.6 Elettrofilatura.....	41

2. Scopo della tesi	45
3. Materiali e Metodi	48
3.1 Sintesi del poli(butilene succinato) PBS.....	48
3.1.1 Purificazione del poli(butilene succinato) PBS	51
3.2 Estrazione della Cheratina	52
3.3 Caratterizzazione molecolare.....	53
3.3.1 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)	53
3.3.2 Cromatografia a permeazione su gel (GPC)	57
3.4 Spettroscopia infrarossa (FTIR)	59
3.5 Elettrofilatura di scaffold PBS/Cheratina	61
3.6 Misure di miscibilità delle blend PBS/Cheratina	62
3.7 Caratterizzazione Termica	64
3.7.1 Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC).....	64
3.7.2 Analisi Termogravimetrica (TGA)	67
3.8 Caratterizzazione morfologica.....	69
3.8.1 Misure di porosità	69
3.8.2 Misure di rigonfiamento (<i>swelling</i>).....	70
3.8.3 Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM)	71
3.9 Caratterizzazione meccanica	73
3.10 Studi di degradazione enzimatica	77
3.11 Studi di biocompatibilità	77
3.12 Prove di rilascio di farmaco	78
4. Risultati e Discussione.....	80
4.1 Caratterizzazione molecolare.....	80
4.1.1 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)	80
4.1.2 Spettroscopia infrarossa (FTIR).....	82
4.2 Prove di miscibilità	83

4.3 Caratterizzazione Termica	84
4.3.1 Analisi Termogravimetrica (TGA)	84
4.3.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)	85
4.4 Caratterizzazione morfologica.....	87
4.5 Caratterizzazione meccanica	90
4.8 Studi di degradazione enzimatica	91
4.7 Studi di biocompatibilità	93
4.8 Prove di rilascio di farmaco	94
4.9 Osservazioni sull'adesione dei tappetini PBS e PBSKER5050.....	95
5. Conclusioni	96
Bibliografia.....	99

Abstract

Grazie agli sviluppi delle nanotecnologie biomedicali nell'ambito del rilascio controllato di farmaci dell'ingegneria tissutale, sta diventando sempre più concreta la possibilità di superare i principali limiti della medicina tradizionale, basata nel primo caso su somministrazioni ripetute e a livello sistemico di principio attivo, e nel secondo caso sul trapianto (con relativi problemi di rigetto e carenza di donatori) e su trattamenti farmacologici non risolutivi. Tramite lo studio dei biomateriali e delle loro proprietà è invece possibile realizzare soluzioni *ad hoc* per l'ingegneria tissutale e per il rilascio controllato e mirato di farmaco. Nel presente studio, sono stati realizzati, mediante elettrofilatura, *scaffolds* a partire da blend fisiche di poli(butilene succinato) (PBS) e cheratina, a diversa composizione. Il primo è un polimero sintetico biocompatibile e approvato dalla *Food and Drug Administration*, con buone resistenza meccanica e lavorabilità, ma tempi di degradazione piuttosto lenti, a differenza della cheratina, polimero naturale, che risulta troppo rigido e difficile da processare, ma con buoni tempi di degradazione ed un'ottima biocompatibilità. Le blend sono state sottoposte a studi di miscibilità, mentre sui tappetini elettrofilati è stata effettuata una caratterizzazione morfologica, termica e meccanica. Inoltre, in vista di possibili applicazioni nell'ambito dell'ingegneria tissutale e del rilascio controllato di farmaco, si sono svolti anche test di biodegradazione in ambiente enzimatico e prove di biocompatibilità *in vitro*, nel primo caso, e studi di rilascio di diclofenac, comune antinfiammatorio, e test di adesione alla pelle, nel secondo caso. In conclusione, ogni tipo di indagine, seppur preliminare, ha comprovato che l'unione tra il PBS e la cheratina ha dato vita a nuove miscele facilmente processabili per potenziali utilizzi in due ambiti biomedicali di particolare interesse applicativo.

1. Introduzione

1.1 Materiali polimerici

Ad oggi, i materiali polimerici sono parte integrante della quasi totalità delle attività umane. Nel linguaggio odierno rientrano sotto il termine “plastiche” non solo i comuni manufatti realizzati in questo materiale ma anche, ad esempio, gomme e fibre tessili. I primi studi sui polimeri, termine derivante dal greco *polys*(molto) *eméros* (parte), si devono al chimico francese Henri Braconnot, che nel 1811 realizzò dei composti derivati dalla cellulosa. Tuttavia, la prima vera e propria materia plastica, totalmente sintetica, venne realizzata solamente nel 1909 dal chimico belga Leo Hendrik Baekeland che inventò la bachelite, la prima resina termoindurente (Figura 1.1).



Figura 1.1: Esempio di oggetto composto interamente di bachelite

Qualche anno dopo, nel 1912, il chimico e tecnico tessile svizzero Jacques Brandenberger inventò il cellophane, e nello stesso periodo vennero sintetizzati nuovi polimeri, come ad esempio il rayon.

Nella prima metà del XX secolo venne realizzato dal chimico statunitense Roy Plunckett il poli-tetrafluoroetilene (PTFE) per via del tutto fortuita, mentre stava conducendo studi su un nuovo refrigerante a base di tetrafluoroetene gassoso.

Più in dettaglio, quando si parla di materiali polimerici, o più semplicemente di polimeri, si intendono delle macromolecole ad elevato peso molecolare, costituite da una o più unità ripetitive, legate tra loro tramite legami chimici covalenti, che formano catene composte da migliaia di molecole.

I polimeri si ottengono a partire da molecole a basso peso molecolare, i monomeri, che posseggono uno o più doppi legami o gruppi funzionali in grado di reagire tra loro, mediante varie tipologie di reazioni di polimerizzazione.

Per definire un polimero bisogna conoscere:

- La natura dell'unità ripetitiva;
- L'eventuale presenza di co-unità e la loro quantità relativa;
- La natura dei gruppi terminali;
- L'eventuale presenza di ramificazioni.

Oltre alla classica suddivisione basata sulla provenienza e natura dei polimeri (naturali o sintetici), una prima classificazione dei materiali polimerici viene generalmente effettuata sulla base della loro struttura (molecole e legami presenti). Essa permette di distinguere i polimeri lineari, che sono, essenzialmente, costituiti solo da monomeri bi-funzionali, da quelli ramificati, che invece vengono ottenuti a partire da monomeri tri- o poli-funzionali.

Nel caso in cui il polimero sia costituito da due o più monomeri, diversi tra loro, si parla di copolimero. Questi vengono suddivisi, in base alla distribuzione delle co-unità all'interno della catena macromolecolare, in:

- Statistici (o random), in cui le generiche unità co-monomeriche **A** e **B** si ripetono in modo casuale

...**AABABBBAAABABBAAABB**...

- a blocchi, in cui si alternano tra loro sequenze di un singolo monomero

...**AAABBBAAABBBAAABBB**...

- alternati, caratterizzati da una regolare alternanza dei monomeri costituenti

...**ABABABABABABABABABAB**...

- innestati, in cui catene secondarie costituite da un tipo di monomero si innestano lungo la catena principale, costituita esclusivamente dall'altro co-monomero.

B
B
...**AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA**...
B
B
B

1.2 Polimeri sintetici

1.2.1 Poliesteri alifatici

All'interno della grande famiglia dei polimeri sintetici, una classe di particolare importanza è quella dei poliesteri, i quali sono caratterizzati dalla presenza di legami esterei all'interno della loro catena macromolecolare. Essi possono essere divisi in aromatici o alifatici a seconda della presenza o meno di anelli aromatici in catena, e vengono ottenuti principalmente mediante policondensazione tra uno o più acidi carbossilici polifunzionali ed uno o più alcoli polifunzionali. La classe dei poliesteri alifatici è quella di maggior successo, importanza e diffusione industriale e commerciale in ambito biomedico; si tratta anche della classe più studiata in termini di meccanismi di degradazione e relazioni struttura-proprietà.

1.2.1.1 Sintesi

I polimeri sintetici, e dunque i poliesteri alifatici, vengono generalmente ottenuti mediante due principali tipi di reazioni, poliaddizione (meccanismo a catena) e policondensazione (meccanismo a stadi), caratterizzate da un diverso tipo di cinetica (Figura 1.2). Le prime sono innescate dalla formazione di una specie chimica attiva, detta iniziatore, a cui a mano a mano si aggiungono monomeri per dar vita alla catena polimerica, fino al raggiungimento della cosiddetta fase di terminazione della reazione; il meccanismo a stadi, invece, ha luogo generalmente tra specie chimiche aventi una simile reattività e caratterizzate da due o più estremità reattive, capaci di legarsi le une alle altre dando vita a catene sempre più lunghe.

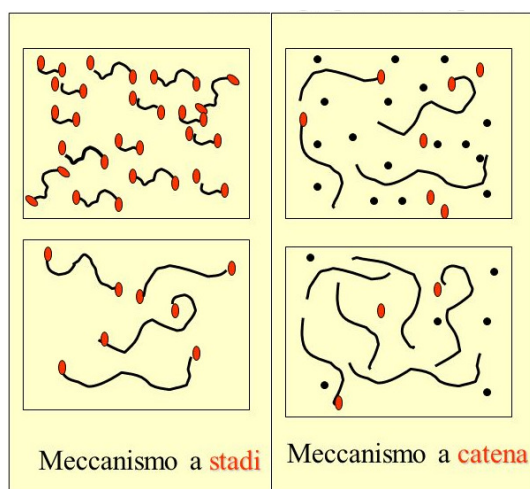


Figura 1.2: Schema dei meccanismi a stadi e a catena

Più in dettaglio, la policondensazione avviene generalmente fra due sub-unità bifunzionali, una acida(estere o acido), ed una glicolica, che reagendo tra loro danno origine a prodotti dal peso molecolare sempre più alto, con una struttura chimica differente da quella dei reagenti di partenza. Durante la reazione, si ottengono anche prodotti secondari, quali acqua (H₂O), metanolo (CH₃OH), cloruro di sodio (NaCl) oppure acido cloridrico (HCl) (Figura 1.3).

Bisogna tenere presente che materiali poli-condensati acquisiscono le loro proprietà d'impiego al raggiungimento di un peso molecolare dell'ordine di 10000-20000 Da, e chetale processo di polimerizzazione, oltre ad essere più lento rispetto alla polimerizzazione a catena, tende anche a dar luogo a materiali dal grado di polimerizzazione inferiore.

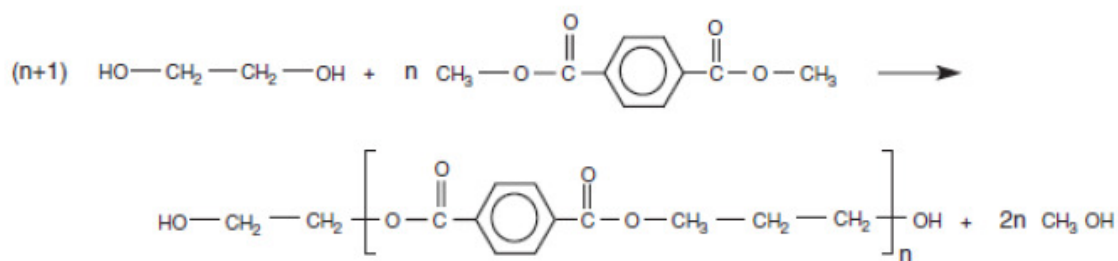


Figura 1.3: Esempio di policondensazione (sintesi del Polietilentereftalato o PET).

1.2.1.2 Peso molecolare

Una delle caratteristiche determinanti dei polimeri, nonché responsabile delle proprietà funzionali degli stessi, è il peso molecolare. Durante il processo di sintesi si formano macromolecole di lunghezza diversa, ovvero contenenti un diverso numero di unità strutturali, e quindi con un diverso peso molecolare. Allo scopo di ottenere una stima del peso molecolare complessivo si fa riferimento ad un grado di polimerizzazione medio. In particolare, possono essere utilizzate due diverse grandezze (Figura 1.4):

- Peso molecolare medio numerale (M_n), dato dal rapporto fra il peso di una data quantità di materiale ed il numero di moli presenti al suo interno:

$$M_n = \frac{\sum W_i}{\sum N_i},$$

dove i rappresenta la i -esima frazione di un campione, mentre N_i sono il numero di moli di peso molecolare M_i e massa complessiva W_i . M_n può essere espresso anche attraverso la seguente espressione:

$$M_n = \sum n_i M_i,$$

dove n_i è la frazione (numerica o molare) della specie i -esima definita come il rapporto tra le moli della specie i -esima e la somma di tutte le moli presenti nel campione:

$$n_i = N_i / \sum N_i$$

- Peso molecolare medio ponderale (M_w), dato dalla media pesata sulla massa delle macromolecole presenti:

$$M_w = \sum w_i M_i$$

dove w_i rappresenta la frazione ponderale, ottenuta dal rapporto tra il peso molecolare i -esimo e il peso totale del campione.

Il parametro che viene utilizzato per indicare l'ampiezza della distribuzione dei pesi molecolari è l'indice di polidispersità D , definito come il rapporto tra il peso molecolare medio ponderale e il peso molecolare medio numerale:

$$D = M_w / M_n,$$

Il valore limite inferiore teorico di D è 1, ma nella realtà tale valore è generalmente compreso tra 1.5 e 2.5 (nel caso di matrici polimeriche spesso è superiore a 2).

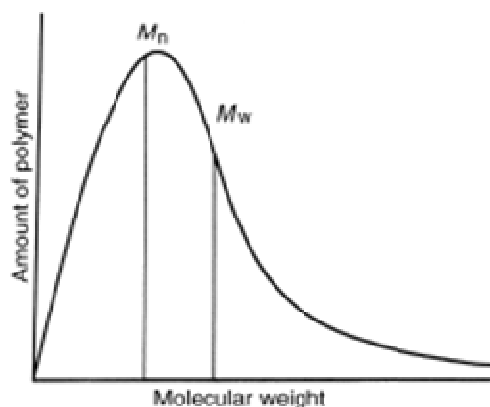


Figura 1.4: Distribuzione dei pesi molecolari all'interno di un polimero.

1.2.1.3 Cristallinità

I materiali polimerici sono costituiti spesso da due fasi distinte, una cristallina, in cui le catene sono disposte in modo ordinato nelle tre dimensioni, ed una amorfa, in cui viceversa le catene sono distribuite in modo casuale (Figura 1.5). Si definisce dunque grado di cristallinità il rapporto percentuale tra il peso di sostanza in forma cristallina ed il peso totale; questo valore per la classe dei materiali polimerici varia tra il 5 ed il 95%. Pertanto, non esistono polimeri 100% cristallini, ma al più semicristallini, in cui una percentuale variabile di materiale si trova in forma cristallina, all'interno di una componente amorfa, sempre presente.

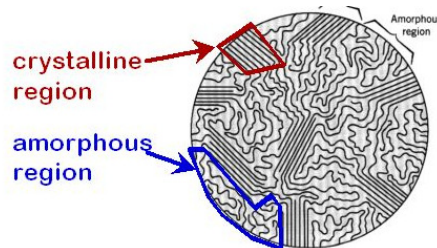


Figura 1.5: Esempio di struttura semi-cristallina.

Il grado di cristallinità di un polimero dipende da diversi fattori, tra cui la sua struttura chimica, l'eventuale presenza di ramificazioni oppure il trattamento termico a cui vengono sottoposti in fase di lavorazione. Inoltre, i polimeri a catena lineare presentano gradi di cristallinità più elevati, rispetto a quelli calcolati per i polimeri a catena ramificata o reticolati. Infine, a parità di peso molecolare, la densità di un polimero cristallino è maggiore rispetto a quella di un polimero amorfo, in quanto in una struttura cristallina le catene sono raggruppate insieme in maniera più compatta. Per quanto riguarda le proprietà meccaniche, i polimeri semicristallini sono contraddistinti da maggiore rigidità (modulo elastico più elevato) rispetto a quelli amorfi, ovvero una maggiore resistenza meccanica all'usura e a fenomeni viscoelastici quali rilassamento e *creep*.

1.2.1.4 Proprietà termo-meccaniche

I materiali polimerici possono essere classificati sulla base delle loro proprietà termo-meccaniche in:

- Termoplastici: si tratta di materiali che, se riscaldati, rammolliscono senza andare incontro a trasformazioni chimiche (caratteristica che ne permette il modellamento plastico), e si induriscono in seguito ad un successivo raffreddamento. Tale processo è reversibile all'interno di un certo range di temperature. Il comportamento termoplastico è tipico dei polimeri a catena lineare e ramificata, perché i legami che li caratterizzano sono caratterizzati da bassa resistenza termica;
- Termoindurenti: oltre un certo stadio della loro produzione, questi materiali non sono più modellabili, e anzi è proprio il calore che ne determina un indurimento irreversibile. Ciò avviene perché durante la lavorazione ha luogo una reticolazione della massa polimerica causata dal calore applicato. Sono generalmente termoindurenti i polimeri a catena reticolata.

Uno dei fattori necessari a valutare le proprietà meccaniche di un materiale è il modulo elastico (o di Young) definito, per piccole deformazioni, come il rapporto tra sforzo e deformazione. Questo valore, insieme al suo andamento nel tempo, è molto utile per poter definire se il polimero in analisi appartiene ad esempio alla famiglia delle fibre piuttosto che alle resine o alle gomme. Occorre tenere presente che il modulo elastico è fortemente influenzato dalla temperatura di applicazione, oltre che dalla struttura molecolare del polimero stesso. Infatti, analizzando le proprietà meccaniche in funzione della temperatura, è possibile notare transizioni e comportamenti differenti a seconda della natura del polimero (amorfo, semicristallino o reticolato) (Figura 1.6).

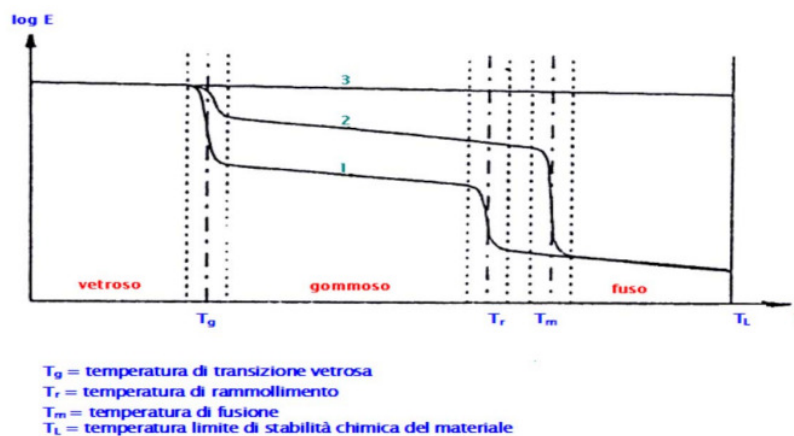


Figura 1.6: Andamento del modulo elastico in funzione della temperatura per un polimero lineare amorfo (1), parzialmente cristallino (2) e reticolato (3).

Analizzando meglio la Figura 1.6, nel caso di un materiale amorfo, si osservano tratti orizzontali, in cui le proprietà meccaniche rimangono costanti, alternati a bruschi peggioramenti delle proprietà in corrispondenza della temperatura di transizione vetrosa (T_g), ovvero la temperatura che segna il passaggio, per un materiale, dallo stato vetroso (fragile e difficilmente deformabile) a quello gommoso (minore rigidità ed elevate deformabilità e tenacità), e della temperatura di rammollimento (T_r), la quale divide il campo di proprietà di un polimero gommoso da quello di un polimero fuso liquido. Infine, oltre la temperatura limite di stabilità chimica (T_L), il polimero si degrada in seguito alla rottura dei legami chimici.

Nel caso di un materiale polimerico semicristallino, in corrispondenza della transizione vetrosa si assiste anche in questo caso ad una diminuzione del modulo elastico anche se in misura minore rispetto al caso precedente. Una diminuzione più sensibile ha luogo nel momento in cui il reticolo cristallino inizia a fondere, cioè in corrispondenza della temperatura di fusione (T_m), analoga alla T_r per i polimeri semicristallini.

Infine, nel caso di un polimero reticolato, fino al raggiungimento del limite di stabilità chimica (T_L), non si verificano significative variazioni di proprietà al variare della temperatura.

Da questa breve descrizione si può dunque notare il motivo per cui, normalmente, si parla di proprietà termo-meccaniche di un polimero in quanto queste due caratteristiche sono strettamente correlate tra loro.

Tuttavia, il modulo elastico da solo non è sufficiente a descrivere le proprietà meccaniche dei polimeri, in quanto è indicativo dell'andamento di un materiale solo nel suo tratto elastico iniziale. Solitamente, ad eccezione dei materiali fragili, che hanno un comportamento elastico fino a rottura (che avviene per piccole deformazioni), i materiali presentano un comportamento duttile, caratterizzato da un punto, detto di snervamento, in cui si ha un passaggio dal campo elastico a quello plastico, oltre il quale le deformazioni non sono più reversibili. Se poi si continua ad allungare il materiale si giunge al punto di rottura, che solitamente avviene ad allungamenti più alti rispetto a quelli calcolati per i materiali fragili.

In questo contesto un importante fattore da tenere in considerazione è la temperatura di transizione vetrosa (T_g), un dato di grande interesse tecnologico e applicativo: il suo valore incide notevolmente sul comportamento meccanico e,

quindi, sul campo di applicazione finale di un polimero. I polimeri che vengono utilizzati a temperature superiori alla loro T_g sono caratterizzati da una maggiore mobilità delle catene macromolecolari, risultando così tenaci e generalmente capaci di sopportare elevate deformazioni. Un esempio è il polibutadiene, che presenta una T_g pari a circa -90°C , e che viene utilizzato come gomma (Figura 1.7). Polimeri, invece, la cui temperatura di utilizzo è inferiore alla loro T_g risulteranno invece vetrosi, ovvero caratterizzati da una scarsa mobilità delle catene, e quindi più rigidi, fragili e difficilmente deformabili. Un esempio è il polivinilcloruro (PVC), che ha T_g pari a circa 80°C , e viene utilizzato per la realizzazione di tubature (Figura 1.7).



Figura 1.7: A sinistra tubature in PVC, a destra uno pneumatico stirene-butadiene.

In generale, dunque, a seconda delle proprietà meccaniche richieste, occorrerà conoscere lo stato del materiale alla temperatura di utilizzo. In particolare, nel caso di materiali polimerici da impiantare nel corpo umano, è opportuno verificare preventivamente che a 37°C non avvengono transizioni termiche quali la transizione vetrosa o addirittura la fusione. Infine, risulta indispensabile, sia in fase di lavorazione che in fase di utilizzo, non superare la temperatura limite di stabilità termica, per non incorrere nella degradazione del materiale.

1.2.1.5 Biodegradabilità

Per alcune applicazioni, in particolare quelle in ambito biomedicale, risulta indispensabile che i materiali utilizzati siano biocompatibili, ed in alcuni casi anche biodegradabili. Ad esempio, in caso di protesi o impianti permanenti, per i quali è previsto un lungo ciclo di vita, è opportuno utilizzare materiali non biodegradabili; viceversa, per realizzare *scaffold* per l'ingegneria tissutale oppure dispositivi per il rilascio controllato di farmaci (Figura 1.8), la biodegradabilità risulta essere una proprietà fondamentale, in quanto il materiale, per svolgere al meglio la sua funzione, dovrà degradarsi nel tempo.



Figura 1.8: A sinistra, un esempio di protesi realizzata in materiale biocompatibile ma non biodegradabile, a destra un materiale con entrambe le caratteristiche, utilizzato per rivestire compresse.

Più in dettaglio, quando si parla di biodegradazione di un materiale si intende l'alterazione chimica della sua struttura, dovuta alla rottura dei legami chimici sia della catena principale sia dei gruppi laterali, che ne influenza le caratteristiche fisiche. I prodotti finali della degradazione sono, generalmente, acqua ed anidride carbonica. Nel caso di applicazioni biomedicali si parla di bio-riassorbibilità, ovvero la capacità di un materiale di andare incontro a degradazione all'interno del corpo umano, producendo prodotti di degradazione non tossici ed in grado di essere smaltiti dall'organismo senza suscitare reazioni immunitarie.

I fattori che innescano la degradazione possono essere di varia natura:

- Chimici: rotture casuali delle catene possono dare luogo a processi di depolimerizzazione, con un meccanismo inverso rispetto a quello della polimerizzazione;
- Meccanochimici: i polimeri possono andare incontro a degradazione se sottoposti a carichi, sia statici che ciclici, con il conseguente rilascio di residui ad elevato rapporto superficie/volume, responsabili a loro volta dell'innescare di ulteriori processi degradativi;

- Sterilizzazione: sebbene sia una procedura indispensabile per inattivare i microrganismi e dunque evitare infezioni in seguito all'impianto di un dispositivo, la sterilizzazione può a volte essere responsabile della degradazione del materiale stesso. Generalmente si possono raggiungere temperature anche molto elevate (160 – 190°C nel caso di sterilizzazione a secco, 120 – 135°C nel caso di sterilizzazione umida in autoclave), spesso superiori alle temperature di rammollimento dei polimeri. Per questo motivo, per i polimeri più bassofondenti, è previsto l'uso di agenti chimici quali gas o soluzioni a bassa temperatura: questo metodo richiede tempi maggiori ed è più costoso, ma abbassa notevolmente i rischi di degradazione. Per quanto riguarda la sterilizzazione mediante radiazioni gamma, essa può essere dannosa per i materiali in quanto può provocare la rottura delle catene e la loro successiva ricombinazione casuale;
- Effetti dell'ambiente biologico: essendo un ambiente estremamente aggressivo, alcuni dispositivi, tra cui anche i polimeri, iniziano a degradarsi subito a valle dell'impianto. Le più probabili cause di deterioramento sono l'attacco ionico (in particolare dello ione OH^-) e quello dell'ossigeno disciolto.

La degradazione, poi, può avvenire a livello superficiale (nel caso della degradazione enzimatica), oppure a livello del *bulk* (degradazione idrolitica) (Figura 1.9).

Esse differiscono in relazione alla porzione di campione interessata dal fenomeno: nel primo la perdita di massa riguarda le porzioni più superficiali, in quanto la velocità di penetrazione dell'acqua è simile a quella di erosione, mentre nel secondo riguarda l'intero volume, poiché la velocità di penetrazione dell'acqua è più rapida di quella del processo erosivo. Dal punto di vista macroscopico, per quanto riguarda la degradazione idrolitica, si possono osservare due step: il primo prevede la rottura casuale di legami chimici, con conseguente diminuzione del peso molecolare del materiale e peggioramento delle proprietà meccaniche; in seguito, frammenti di catene passano in soluzione, dando luogo alla perdita di peso gravimetrico. Nel caso della degradazione enzimatica, invece, il peso molecolare e le proprietà meccaniche del *bulk* rimangono intatte, mentre si assiste alla diminuzione del peso e del volume del materiale dovuto all'attacco superficiale degli enzimi.

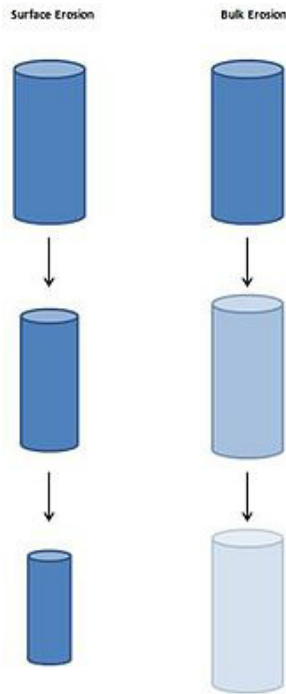


Figura 1.9: A sinistra, meccanismo di degradazione superficiale, a destra, meccanismo di degradazione idrolitica.

I fattori che influenzano la degradazione, sia idrolitica che enzimatica, sono molteplici; tra i principali, occorre citare la struttura chimica, il peso molecolare e la sua distribuzione, la disposizione delle catene, il tipo di legame presente, il grado di cristallinità, la bagnabilità, le proprietà termiche, le dimensioni, la forma e la porosità del dispositivo e le caratteristiche dell'ambiente (umidità, presenza di microrganismi, pH e temperatura). Più in dettaglio, se la temperatura d'esercizio è superiore alla T_g o vicina alla temperatura di fusione del materiale, le catene risulteranno più mobili, e quindi più facilmente attaccabili; la degradazione procede poi più velocemente nelle regioni amorphe, in cui l'acqua e gli enzimi penetrano più facilmente, rispetto alle porzioni cristalline. Inoltre, a parità di grado di cristallinità, materiali contenenti cristalli piccoli e imperfetti sono più facilmente attaccabili rispetto a materiali caratterizzati da cristalli più grandi e impacchettati. I legami esterei sono quelli che vengono preferibilmente attaccati in caso di degradazione idrolitica, mentre per quanto riguarda la bagnabilità, superfici più idrofiliche favoriscono l'attacco da parte dell'acqua.

1.2.1.6 Biocompatibilità

Come già detto, la biocompatibilità è un requisito indispensabile nel caso dei materiali utilizzati in ambito biomedicale, viene intesa come la capacità di un materiale o sostanza di non innescare alcuna reazione immunitaria o effetto dannoso sulle funzioni vitali dell'organismo ospite. Essa viene testata attraverso prove *in vitro* e prove *in vivo*. I test di citotossicità indiretta e diretta e le prove di vitalità e proliferazione cellulare appartengono alla prima categoria di prove da effettuare sui materiali per cui è previsto un utilizzo in ambiente biologico. Essi prevedono che cellule vengano poste a contatto diretto o indiretto con i materiali da testare per periodi di tempo variabili, al termine dei quali viene valutata la sopravvivenza cellulare mediante opportuni saggi. In caso di esito positivo, si procede poi alle prove *in vivo*, che prevedono test, effettuati su cavie, di irritazione, emocompatibilità, carcinogenicità, genotossicità e mutagenicità, sia a breve che a lungo termine, al fine di valutare gli effetti dell'impianto a livello locale e sistemico.

1.2.1.7 Poliesteri alifatici ad uso biomedicale

1.2.1.7.1 Acido poliglicolico (PGA)

L'acido poliglicolico (PGA) è il più semplice dei poliesteri alifatici, ottenuto mediante apertura dell'anello del glicolide, un diestere ciclico composto da due unità di acido glicolico (Figura 1.10).

Si tratta di un materiale semicristallino, caratterizzato da temperatura di transizione vetrosa (T_g) nell'intervallo 35-40 °C, temperatura di fusione (T_m) nell'intervallo 225-230 °C, elevato modulo elastico ($E \approx 12.8$ GPa), elevata velocità di degradazione e bassa solubilità nella maggior parte dei solventi organici.

Grazie a queste proprietà, il PGA è stato largamente impiegato, già dagli anni '70, per la realizzazione di suture biorassorbibili, ed ampiamente studiato come materiale per *scaffold* per la rigenerazione tissutale e per realizzare dispositivi a rilascio controllato di farmaco [6].

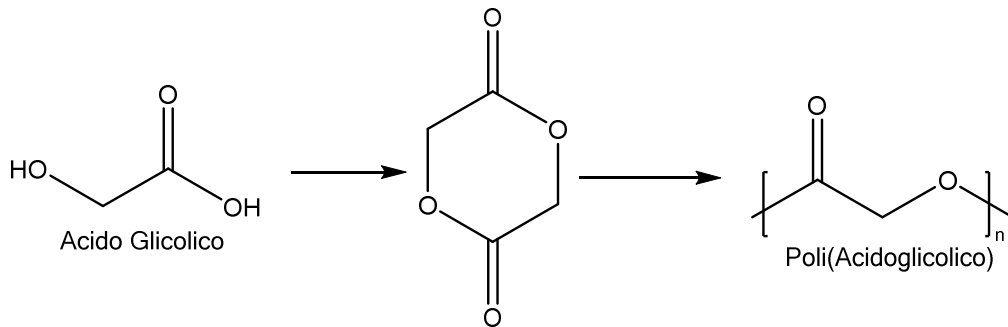


Figura 1.10 Schema di sintesi dell'acidopoliglicolico (PGA).

I principali limiti nell'utilizzo dell'acido poliglicolico sono la sua elevata sensibilità all'umidità ed il massiccio rilascio di acido glicolico durante la degradazione, che in alte concentrazioni è responsabile di una forte risposta infiammatoria.

1.2.1.8.2 Acido polilattico (PLA)

L'acido polilattico (PLA) è un poliesteri alifatico ottenuto sia mediante policondensazione dell'acido lattico sia per apertura d'anello del dimero dell'acido lattico (Figura 1.11).

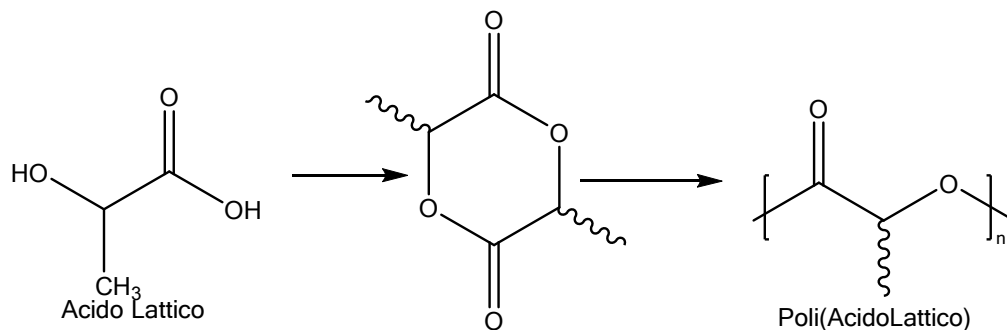


Figura 1.11 Schema di sintesi dell'acido polilattico (PLA).

L'acido lattico è una molecola chirale che esiste in natura sotto forma di due isomeri ottici: acido-L-lattico e acido-D-lattico, i quali si differenziano per il loro effetto sulla luce polarizzata. Il relativo polimero può presentarsi in diversi arrangiamenti: acido poli-L-lattico puro (PLLA), acido poli-D-lattico puro (PDLA) e acido poli-D,L-lattico (PDLLA).

Le proprietà variano a seconda dell'isomeria (Figura 1.12): polimeri ricchi di L-isomero risultano semicristallini, mentre risultano amorfi quelli contenenti più del 15% di D-isomero. Ad esempio, il PDLLA 50:50, caratterizzato da una distribuzione

random di unità L e D, è amorfo, con basso carico a rottura, elevata deformabilità e tempi di degradazione relativamente brevi, mentre il PLLA, semicristallino (le cui T_m e T_g sono comprese tra 175-178°C e 50-65°C), è caratterizzato da buona resistenza a trazione e compressione, bassa deformazione a rottura e modulo elastico tale da renderlo idoneo per applicazioni che richiedono buona resistenza ai carichi [1].

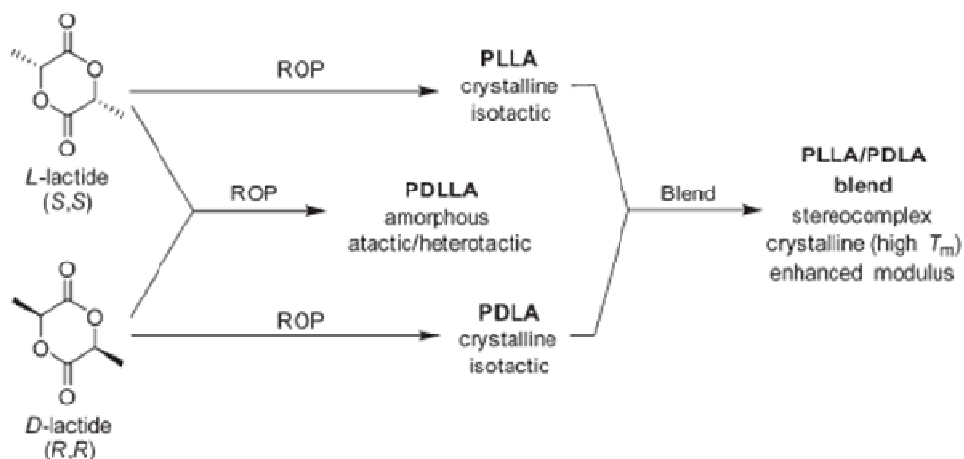


Figura 1.12: Proprietà dei polimeri derivanti dalle due diverse forme isomeriche del PLA.

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

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

1.2.1.7.3 Acido polilattico-co-glicolico (PLGA)

Al fine di espandere il range di applicazioni biomedicali dei materiali a base di PLA e PGA, sono stati sintetizzati copolimeri a base di acido glicolico (GA) e di acido lattico (LA), sia in forma L-lattico che DL-lattico.

L'acido polilattico-co-glicolico è infatti un copolimero statistico ottenuto mediante copolimerizzazione dei dimeri ciclici dell'acido glicolico e lattico (Figura 1.13). Come precedentemente descritto, il processo di degradazione del PLGA può essere modulato sulla base della sua composizione: ad esempio, il copolimero statistico PLGA costituito da quantità equimolari di acido lattico e acido glicolico presenta la più alta suscettibilità alla degradazione idrolitica (1-2 mesi).

Grazie a questa variabilità di proprietà, il PLGA ha trovato applicazioni in ambito biomedicale come materiale per fili di sutura biodegradabili multi-filamento e fili di sutura rinforzanti, *scaffold* biodegradabili per ingegneria tissutale e per il rilascio controllato di farmaci (*drug delivery*) [2].

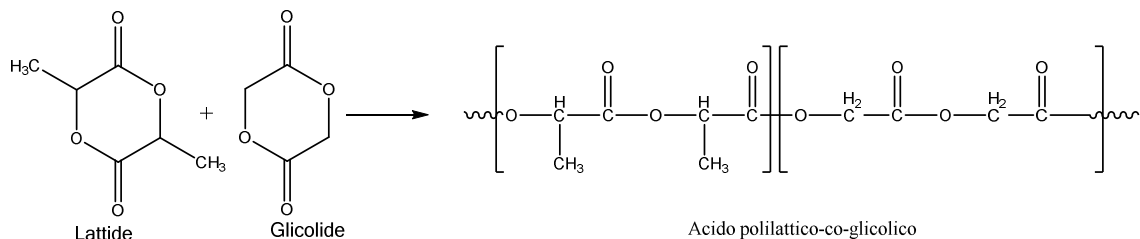


Figura 1.13: Schema di sintesi dell'acidopolilattico-co-glicolico.

1.2.1.7.4 Poli(ϵ -caprolattone) (PCL)

Il poli(ϵ -caprolattone) è un poliestere alifatico semicristallino lineare ottenuto mediante apertura dell'anello dell'estere ciclico ϵ -caprolattone (Figura 1.14).

Il PCL è stato oggetto di studio per lo sviluppo di sistemi a rilascio controllato e prolungato, suture a lunga durata e rinforzi tissutali, per via della sua bassa velocità di degradazione (circa 2 anni), la permeabilità a molteplici sostanze, e rilascio di prodotti di degradazione non dannosi per l'organismo [2].

I più lunghi tempi di degradazione rispetto a quelli del PGA e del PDLLA, hanno spinto la ricerca verso la sintesi di copolimeri a base di PCL caratterizzati da un minore grado di cristallinità, dunque più facilmente biodegradabili.

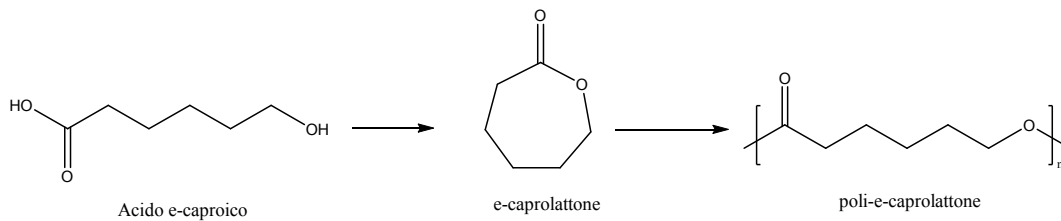


Figura 1.14: Schema di sintesi del poli(ϵ -caprolattone).

1.2.1.7.5 Poli(butilene-succinato) (PBS)

Negli ultimi anni, il poli(butilenesuccinato) o PBS ha ricevuto attenzione sempre maggiore come materiale per potenziali applicazioni in biomedicina. Si tratta di un poliestere alifatico disponibile in commercio dal 1993, oggi principalmente prodotto sotto il nome commerciale di GS PLA™ da *Mitsubishi Chemical Corporation* e Bio PBS da *PTT MCC Biochem*. Il poli(butilene succinato) viene sintetizzato a partire da acido succinico (SA), oppure dal suo estere dimetilico, il dimetilsuccinato (DMS), e 1,4-butandiolo (BD), mediante policondensazione in massa a due stadi (Figura 1.15), utilizzando un catalizzatore a base di titanio, il titanio (IV) butossido (TBT): durante il primo stadio avvengono reazioni di esterificazione (o transesterificazione nel caso si utilizzi DMS) con formazione di oligomeri a basso peso molecolare e rimozione di acqua (o metanolo), mentre il secondo viene condotto a temperatura più elevata e in condizioni di pressione ridotta, con lo scopo di rimuovere il BD in eccesso e favorire così ulteriormente le reazioni di transesterificazione. Grazie al secondo stadio si ottiene PBS ad alto peso molecolare.

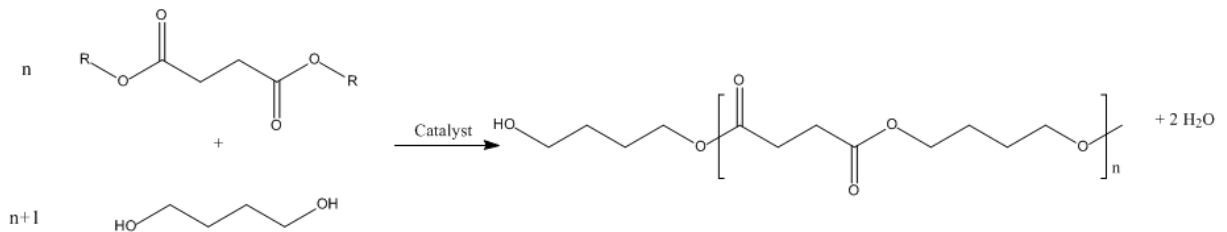


Figura 1.15: Schema di sintesi del PBS

Il PBS è un polimero semicristallino con un elevato grado di cristallinità ($X_c = 35-45\%$) e temperatura di fusione di circa $110-115^\circ\text{C}$. Essendo caratterizzato da una temperatura di transizione vetrosa (T_g) al di sotto di temperatura ambiente (intorno a

-30°C), questo materiale possiede uno tra i più ampi intervalli di lavorabilità tra i poliesteri alifatici, e può essere lavorato attraverso estrusione, stampaggio a iniezione e termoformatura.

Dal punto di vista meccanico, il PBS mostra un comportamento fragile (allungamenti a rottura inferiori al 5%), ed un'elevata rigidità (modulo elastico intorno ai 300-500 MPa), tuttavia tali difetti possono essere notevolmente migliorati inserendo in fase di sintesi piccole quantità di di isocianati (tipicamente esametilene diisocianato), usati come estensori di catena.

Tutte queste proprietà, riassunte in Tabella 1.1, unitamente al moderato costo di produzione, una semplice procedura di sintesi, già sviluppata a livello industriale, e la possibilità di partire da fonti 100% rinnovabili, hanno garantito il successo del PBS come materiale termoplastico per applicazioni nell'ambito degli imballaggi, in agricoltura per la produzione di teli per pacciamatura, nei settori elettrico e aerospaziale. Inoltre, le sue comprovate biodegradabilità e biocompatibilità (verificate attraverso esperimenti sia *in vivo* sia *in vitro*, utilizzando differenti tipi di cellulosa di origine animale sia umane [3]) e la sua recente approvazione da parte della *Food and Drug Administration*, hanno permesso lo sviluppo del PBS anche come materiale per applicazioni biomedicali, tra cui impianti, *scaffold* per l'ingegneria tissutale e sistemi a rilascio controllato.

Tabella 1.1 Proprietà del PBS sintetizzato in laboratorio confrontate con quelle di altri polimeri commerciali

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

^a M_w (g/mol).

Tuttavia, per quanto riguardale *performance* non ottimali del PBS, è doveroso menzionare una velocità di degradazione idrolitica piuttosto bassa ed una ridotta flessibilità, che potrebbero ostacolarne l'utilizzo in determinate applicazioni, quali ad esempio la realizzazione di *patch* adesivi per il rilascio controllato di farmaci.

Al fine di migliorare queste proprietà non ottimali, si adottano diversi approcci tra cui la miscelazione fisica o reattiva e la copolimerizzazione. Tali strategie permettono nello specifico di migliorare ed anche modulare la bagnabilità, il grado di cristallinità,

le proprietà meccaniche e la velocità di biodegradazione, agendo semplicemente sull'architettura molecolare e sulla natura e quantità della co-unità o del componente della *blend*. L'applicazione biomedicale più studiata dei copolimeri e delle *blend* a base di PBS è il rilascio controllato di farmaci: in questo ambito il PBS o i suoi copolimeri o le sue miscele vengono utilizzate per la realizzazione di micro e nanosfere [4]. Un'altra importante applicazione è nell'ambito dell'ingegneria tissutale, che prevede l'impiego di questi materiali sia sotto forma di film ottenuti mediante *compression moulding* o *solvent casting*, sia come *scaffold*, fabbricato mediante elettrofilatura [4,5].

1.3 Polimeri naturali

A differenza dei polimeri ottenuti per via sintetica, i polimeri di origine naturale sono macromolecole prodotte da organismi viventi, sia animali che vegetali, a partire da materie prime di origine biologica. Questa famiglia di polimeri viene generalmente suddivisa in tre classi a seconda delle unità monomeriche costituenti (Tabella 1.2):

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

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

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

I polimeri naturali, rispetto a quelli sintetici, hanno la caratteristica di essere molto simili alle macromolecole presenti nell'ambiente biologico, in quanto contengono opportune sequenze che favoriscono il riconoscimento e l'adesione cellulare.

Per questo motivo, i polimeri naturali sono caratterizzati da elevata biocompatibilità, e, nella maggior parte dei casi, non innescano risposte infiammatorie e non alterano la bioattività delle molecole con cui entrano in contatto, aspetto molto importante soprattutto nel caso in cui tali materiali vengano utilizzati per realizzare dispositivi per il rilascio di farmaci o altre sostanze. Un ulteriore interessante aspetto è la possibilità, mediante opportuni processi di reticolazione, di controllare la velocità di degradazione di tali polimeri.

Di contro, i polimeri di origine naturale mostrano alcuni svantaggi in termini di proprietà non omogenee e strettamente dipendenti non solo dalla specie, ma anche dallo specifico tessuto di provenienza [6]. Inoltre, i polimeri di origine animale sono facilmente soggetti a contaminazione batterica, e richiedono diversi processi di purificazione e decellularizzazione prima del loro impiego, al fine di eliminare agenti patogeni e cellule che potrebbero innescare risposte immunitarie avverse nell'organismo ospite. Tali processi sono particolarmente aggressivi, e dunque potrebbero alterare e persino compromettere le caratteristiche del materiale, vanificandone l'impiego.

La maggior parte dei polimeri naturali utilizzati in biomedicina trova applicazione negli ambiti di rilascio controllato di farmaci, nella realizzazione di biosensori, di fibre per la sutura delle ferite, di *scaffold* per l'ingegneria tissutale e di agenti gelificanti o emulsionanti.

1.3.1 Proteine

Le proteine sono macromolecole biologiche costituite da sequenze di amminoacidi legati l'uno all'altro da un legame peptidico, cioè un legame tra il gruppo amminico di un amminoacido e del gruppo carbossilico dell'amminoacido adiacente, creato attraverso una reazione di condensazione con perdita di una molecola di acqua.

All'interno degli organismi viventi le proteine svolgono diverse funzioni, come ad esempio la catalisi delle reazioni metaboliche, la risposta a stimoli ed il trasporto di molecole, sia all'interno che all'esterno delle cellule.

Le proteine differiscono tra loro sulla base della sequenza di amminoacidi, che di solito si traduce in una struttura tridimensionale specifica che ne determina la funzione. Tra le proteine più importanti utilizzate in applicazioni biomedicali occorre

menzionare il collagene, l'elastina e la cheratina. Di quest'ultima si tratterà più ampiamente nel paragrafo successivo.

- Il collagene è la proteina più abbondante presente all'interno del corpo umano, nonché il principale costituente di legamenti, cartilagini, tendini, ossa e pelle; svolge inoltre una funzione strutturale in tessuti come i vasi sanguigni. È stato ampiamente studiato per la sua biocompatibilità, resistenza meccanica e degradabilità in ambiente enzimatico. Inizialmente venne impiegato come materiale per suture (anche se l'insorgenza di risposte infiammatorie e di infezioni nell'organismo ospite ne hanno limitato fortemente l'impiego) e per la realizzazione di dispositivi a rilascio locale di antibiotici, DNA, RNA e proteine. Recenti applicazioni come sigillante emostatico ne sfruttano invece l'elevata trombogenicità. La sua natura fibrosa gli conferisce una buona integrità strutturale, caratteristica che lo ha reso un potenziale candidato per quelle applicazioni in ingegneria tissutale che richiedono elevata resistenza ai carichi, come ad esempio la ricostruzione di ossa, tendini, legamenti e cartilagini, ma anche della pelle.
- L'elastina è un polimero insolubile ed altamente elastico composto da molecole di tropoelastina, il principale costituente del tessuto vascolare e polmonare, ed anche il responsabile della loro contrazione. Dal momento che l'elastina non attiva le piastrine, essa potrebbe risultare un ottimo materiale per *graft* vascolari. Tuttavia, la sua insolubilità e la capacità di innescare una risposta immunitaria, ne riducono fortemente l'uso.

1.3.1.1 Cheratina

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

Quest'ultimo aspetto è molto importante dal punto di vista ambientale ed economico, in quanto vi è la possibilità di valorizzare questo tipo di sottoprodotti, presenti in ingenti quantitativi (l'Unione Europa produce 30'000 ton/anno di lana non tessile, di

cui 20'000 solo in Italia) e di difficile smaltimento: la lana, infatti, risulta inefficace come combustibile, in quanto possiede un *Limiting Oxygen Index* (LOI) pari a 25, ed il processo di incenerimento è inquinante a causa dell'elevato contenuto di zolfo (3-4% in peso) [7].

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

- α -cheratina: costituita da α -eliche intrecciate fra loro (Figura 1.16) e ricca di amminoacidi solforati, tra cui la cisteina, di natura neutra o lievemente basica. Le α -eliche si assemblano fra loro per formare strutture complesse, dette protofilamenti, i quali, a loro volta, si associano per formare la protofibrilla. Le varie catene polipeptidiche sono legate tra loro prevalentemente attraverso ponti disolfuro;

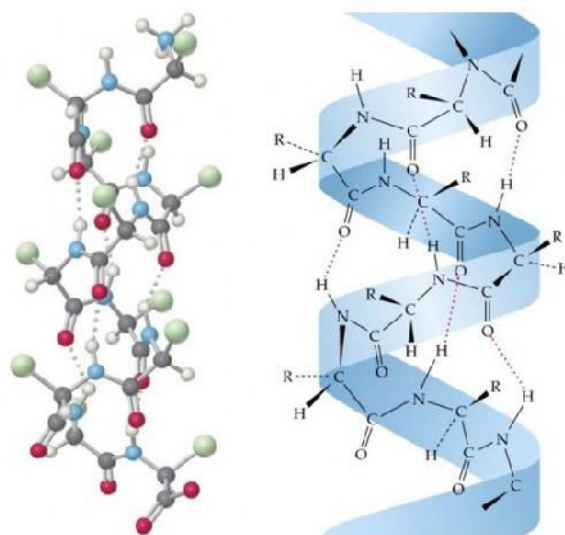


Figura 1.16: Struttura a α -elica della cheratina.

- β -cheratina: presenta una struttura a foglietto β piatto e leggermente pieghettato in cui sono presenti diverse sub-unità tenute insieme e stabilizzate da ponti disolfuro (Figura 1.17). Questa configurazione risulta lievemente acida;

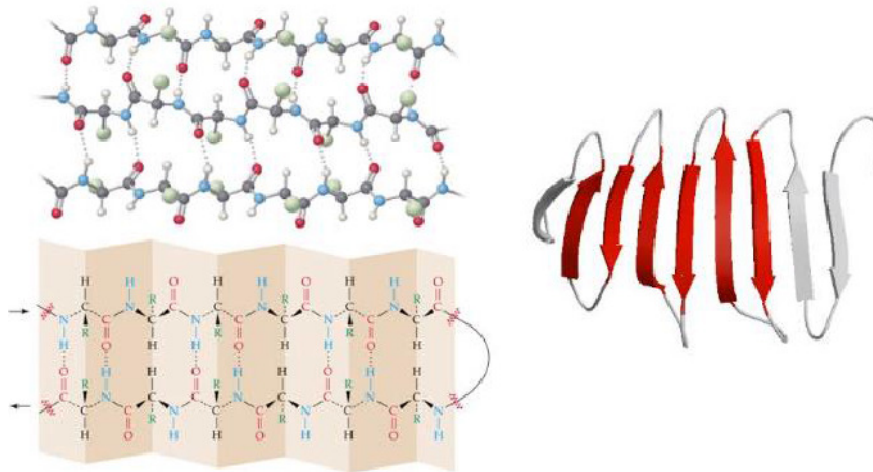


Figura 1.17: Struttura a β -foglietto della cheratina.

- *Random coil*: configurazione disordinata, nella quale sono presenti sia strutture α -elica, sia strutture β -foglietto (Figura 1.18).



Figura 1.18: Struttura random coil della cheratina.

Come già detto, queste tre configurazioni sono caratterizzate dalla presenza di un elevato numero di ponti disolfuro (Figura 1.19), che danno origine ad una struttura tridimensionale compatta, responsabile della grande stabilità chimica e della scarsa

solubilità di questa proteina, nonché di altre proprietà meccaniche, chimiche e termiche che la distinguono da altre proteine, come il collagene.

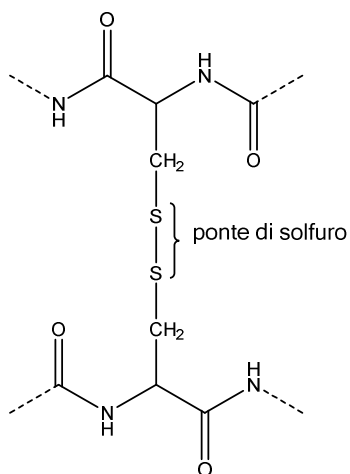


Figura 1.19: Struttura chimica della cheratina in cui viene evidenziato il ponte disolfuro.

Già nel XVI secolo la cheratina veniva usata per scopi medici, come testimoniato dai ritrovamenti di una cenere ottenuta da capelli pirolizzati utilizzata come coagulante per la guarigione delle ferite [8].

Il crescente interesse nei confronti di questa proteina ha reso possibile lo sviluppo, nel corso dei secoli, di vari processi di estrazione (da corna di animali, lana e capelli), sia di tipo ossidativo che riduttivo, che hanno portato all'utilizzo della cheratina, a partire dai primi anni del '900, come polvere per la realizzazione di cosmetici, materiali compositi e rivestimenti di farmaci. Ulteriori sviluppi nei processi di estrazione, separazione e caratterizzazione hanno portato ad una crescita esponenziale dell'utilizzo di questa proteina e dei suoi derivati, in forma di polveri, gel, film, *coating*, fibre e schiume anche per applicazioni biomedicali per via della loro capacità di assemblarsi in strutture tridimensionali porose e fibrose, ed alle ottime proprietà emostatiche e di supporto alla proliferazione cellulare: per esempio, la cheratina proveniente dalla lana e dai capelli possiede sequenze leucina-acido aspartico-valina (LDV) e acido glutammico-acido aspartico-serina (EDS), in grado di favorire l'adesione cellulare [9,10].

Diversi studi, poi, si sono focalizzati sullo studio della cheratina come materiale per la realizzazione di nanoparticelle per il rilascio controllato di numerosi farmaci, tra cui antitumorali, come doxorubicina, [11,12] e antibatterici quali la clorexidina [13].

In letteratura si trovano esempi anche di miscele tra cheratina ed altri materiali, naturali o sintetici, realizzate allo scopo di migliorare alcune proprietà della cheratina stessa, come l'eccessiva fragilità (che ne limita fortemente la lavorabilità), e la troppo rapida degradazione *in vivo* (che avviene in meno di una settimana in ambiente biologico, un tempo troppo breve per applicazioni, ad esempio, nell'ambito dell'ingegneria tissutale) [14,15], senza inficiarne la biocompatibilità. Ad esempio, mediante la combinazione con glicerolo, è stato possibile ottenere film flessibili, biocompatibili e biodegradabili. L'aggiunta di chitosano, invece, ha permesso di ottenere film resistenti dalle elevate proprietà antibatteriche.

L'introduzione di idrotalciti, solidi lamellari in grado di stabilizzare il principio attivo incapsulato, modulandone allo stesso tempo il rilascio, ha permesso la realizzazione di film ibridi per il rilascio controllato di diclofenac, un comune farmaco antinfiammatorio [15].

Per quanto riguarda la combinazione con polimeri sintetici, sono stati realizzati film a base di una blend tra cheratina e poli(etilen ossido) (PEO): tale polimero è in grado di stabilizzare la struttura β della cheratina, rendendo possibile la realizzazione di membrane per rilascio controllato di farmaci, oltre che di *scaffold* nel campo dell'ingegneria tissutale [16].

Sono state realizzate anche membrane porose a base di cheratina, che simulano lo strato corneo umano, con lo scopo di studiare la permeabilità di piccole molecole attraverso la pelle [17].

Alla luce di queste promettenti ricerche, nel presente lavoro di Tesi verranno preparate e studiate *blend* di cheratina e il poli(butilene succinato) a diversa composizione.

1.4 Miscele polimeriche

Anche se generalmente è possibile conferire ad un materiale polimerico le caratteristiche richieste intervenendo sulla sua struttura molecolare, mediante copolimerizzazione, questa via non è sempre percorribile, sia per ragioni dovute alla struttura chimica dei polimeri in esame, sia per ragioni economiche, che limitano il numero potenziale dei polimeri commerciali. In questo senso le miscele (*blends*) polimeriche costituiscono una vincente strategia alternativa, in quanto permettono di realizzare un prodotto *ad hoc* e al tempo stesso contenere drasticamente i costi. Una *blend* polimerica viene definita come la combinazione fisica di due o più polimeri diversi in cui ciascuno svolge un'azione ben precisa. La maggior parte delle *blend* polimeriche è costituita da sistemi eterofasici, per ragioni termodinamiche implicite nella stessa struttura molecolare dei polimeri: infatti, le condizioni termodinamiche per la miscelazione presuppongono una variazione negativa dell'energia libera, condizione non facile da realizzare a causa del basso contributo del termine entropico e dell'elevato valore elevato del termine entalpico. Occorre poi tenere conto, oltre all'eterogeneità di fase, altri importanti parametri quali, ad esempio, la morfologia e l'adesione tra le fasi.

In base alla natura dell'additivo aggiunto, si parla di:

- *Compounds*, in cui al polimero sono addizionate sostanze a basso peso molecolare;
- *Blends*, in cui il polimero è miscelato con un componente macromolecolare di diversa natura;
- *Compositi*, in cui al polimero sono aggiunti riempitivi rinforzanti di tipo particellare o fibroso (come ad esempio fibre di vetro e di carbonio).

Tra questi, le *blend* polimeriche sono risultate quelle di maggiore interesse applicativo poiché, come già accennato, a partire da polimeri già esistenti è possibile ottenere materiali con caratteristiche modulabili in relazione al tipo di utilizzo richiesto, semplicemente variando la composizione e/o i componenti della miscela, senza dover ricorrere alla sintesi di nuovi monomeri o a nuovi processi di polimerizzazione.

In base al tipo di costituenti e al loro stato d'aggregazione, le miscele polimeriche possono essere suddivise in:

- Miscibili, ovvero omogenee a livello molecolare (sistema monofasico), caratterizzate da un valore negativo dell'energia libera di miscelazione, con proprietà variabili in maniera direttamente proporzionale alla frazione volumetrica del componente aggiunto. Sono quelle preferibili dal punto di vista tecnologico.
- Immiscibili, cioè separate in due fasi eterogenee a bassa adesione interfacciale. Di solito il componente in maggiore quantità costituisce la matrice, l'altro la fase dispersa. Data la totale incompatibilità fra i due polimeri di partenza, le proprietà della miscela risulteranno inferiori rispetto a quelle estrapolabili per relazione lineare fra i componenti puri.
- Compatibili, ovvero miscele immiscibili ma che mostrano una certa adesione interfacciale tra le due fasi, dovuta a forti interazioni esistenti tra i componenti. In questo caso le proprietà fisiche risultano uniformi in tutto il materiale.
- Compatibilizzate (o leghe polimeriche), cioè miscele immiscibili che, grazie all'azione di un agente compatibilizzante, hanno subito modifiche delle proprietà all'interfaccia delle fasi. In questo modo è possibile ottenere sistemi dalla morfologia stabile e con proprietà superiori rispetto a quelle del sistema costituito dai componenti puri.

Per valutare la miscibilità di due sostanze polimeriche amorphe o parzialmente cristalline solitamente si analizza la temperatura di transizione vetrosa (T_g) della miscela: infatti, se il sistema è miscibile si nota una sola T_g che solitamente varia al variare della composizione. Viceversa, nel caso di sistemi immiscibili, si osservano due diverse T_g , che possono discostarsi da quelle dei componenti puri a seconda del grado di compatibilità. Anche se la T_g è utilizzata come criterio generale per valutare la miscibilità, essa fornisce in realtà solo una misura del grado di dispersione delle fasi: più sono disperse, più le rispettive T_g si avvicinano fino a sovrapporsi quando le dimensioni dei domini sono inferiori al micron. Nel caso di sistemi polimerici, oltre alla T_g , occorre tenere conto anche degli effetti sulla temperatura di fusione e sulla cristallizzazione dei componenti cristallizzabili. Inoltre, per quanto riguarda le variazioni di proprietà meccaniche, esse possono essere imputabili al cosiddetto *chain entanglement*, un fenomeno di interazione e concatenazione reciproca delle catene polimeriche: all'aumentare della lunghezza delle catene polimeriche, cresce la probabilità ed il grado d'*entanglement*.

1.5 Applicazioni biomedicali

1.5.1 Rilascio controllato di farmaco

Negli ultimi anni, parallelamente allo sviluppo di nuovi farmaci sempre più specifici e all'avanguardia, è aumentata anche la necessità di disporre di sistemi di rilascio del principio attivo che operino in modo controllato e puntuale, e preferibilmente capaci di rispondere direttamente agli stimoli patologici.

La realizzazione di dispositivi a rilascio controllato rappresenta infatti una valida e vincente alternativa al rilascio convenzionale, in quanto permette di superarne alcuni limiti imprescindibili. Ad esempio, uno dei principali problemi che vengono riscontrati in seguito alla somministrazione di una singola dose di un farmaco veicolato in una forma farmaceutica convenzionale, è la breve durata dell'azione del farmaco stesso, con livelli ematici di farmaco che rientrano nel range terapeutico solo per tempi brevi. Inoltre, la distribuzione del farmaco all'interno del corpo avviene in maniera indiscriminata ed incontrollata attraverso la circolazione sanguigna: la quantità desiderata di farmaco non è quindi sempre in grado di raggiungere i siti recettoriali specifici localizzati nelle cellule bersaglio [18]. Convenzionalmente, tale problema viene ovviato tramite l'incremento del dosaggio, rischiando il superamento della soglia massima oltre la quale i livelli di farmaco risultano tossici per il paziente (Figura 1.20).

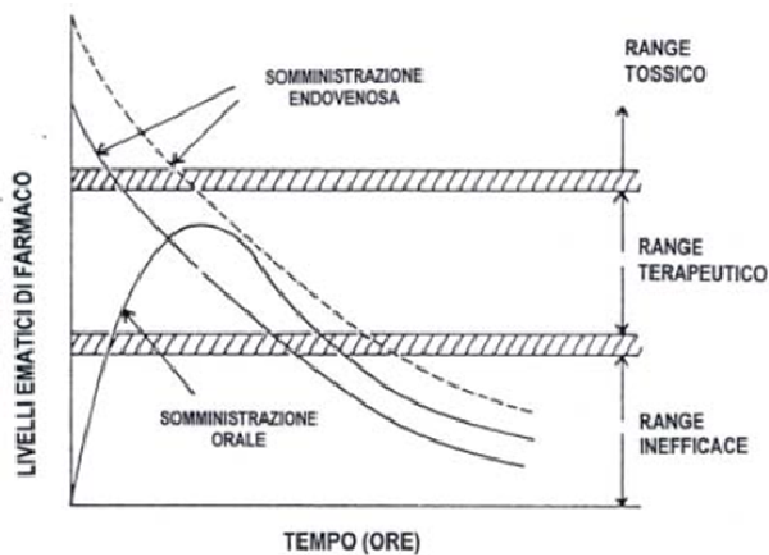


Figura 1.20: Confronto fra due modalità di somministrazione convenzionale di farmaci, orale ed endovenosa.

Nel caso in cui, invece, il farmaco somministrato abbia una breve emivita, la medicina tradizionale prevede la somministrazione ripetuta ad intervalli regolari, la cosiddetta terapia multidose. Tale modalità comporta un andamento della concentrazione del farmaco nel plasma di tipo pulsatile, con indesiderate punte di massimo, anche oltre i limiti di tossicità, e gole di minimo al di sotto del livello ottimale di efficacia (Figura 1.21).

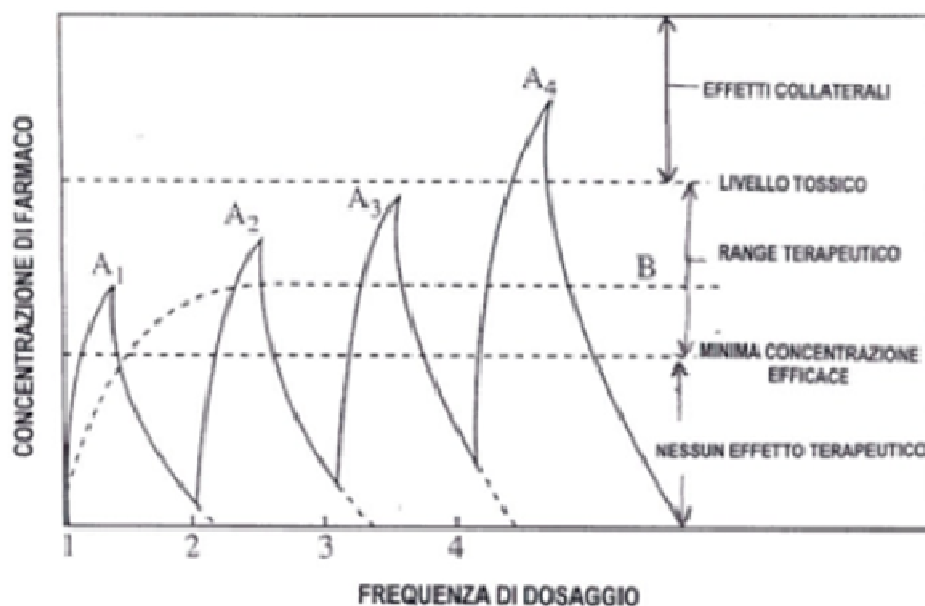


Figura 1.21: Concentrazione ematica di farmaco risultante dalla somministrazione di dosi multiple (A1, A2, A3, A4) rispetto al profilo di concentrazione ematica ideale (B).

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

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

La natura dei farmaci utilizzabili per la realizzazione di questi sistemi è vasta, e comprende chemioterapici, immunosoppressori, agenti antiinfiammatori, antibiotici, oppiacei, steroidi, ormoni, anestetici, vaccini, ecc.

Come si può dedurre, i vantaggi del rilascio controllato sono molteplici; tra i più importanti figurano:

- Mantenimento nel tempo dell'azione del farmaco e maggiore efficacia della terapia: viene conservata, per l'intera durata dell'intervallo terapeuticamente utile, la concentrazione desiderata all'interno dell'organismo e si riducono, allo stesso tempo, gli effetti collaterali associati ad un modello cinetico del tipo "dente di sega" caratteristico delle terapie multidose (Figura 1.22);
- Riduzione della quantità di farmaco somministrata;
- Riduzione del numero delle somministrazioni giornaliere di farmaco;
- Aumento della *compliance* del paziente;
- Creazione di condizioni riproducibili, prevedibili e controllabili di rilascio per periodi di tempo più o meno lunghi.

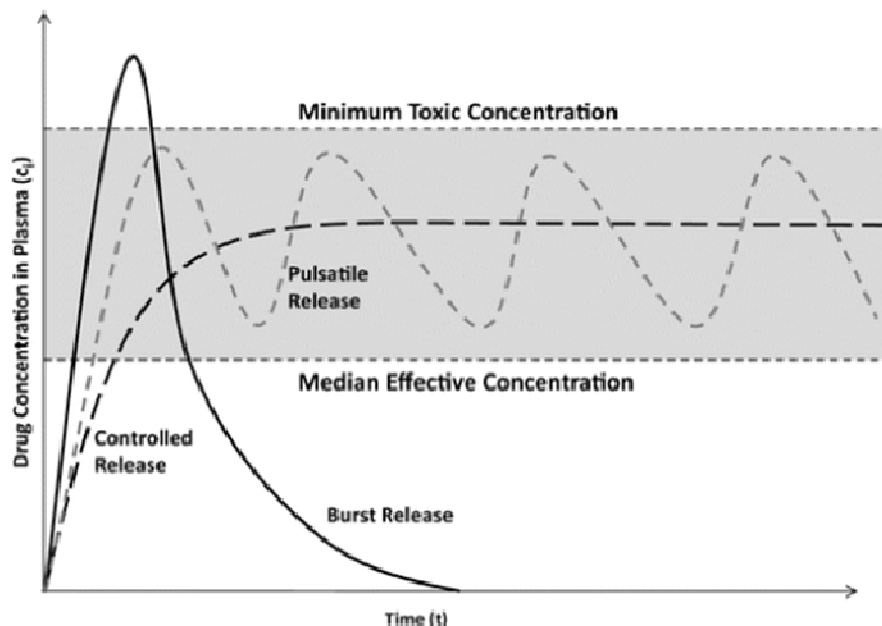


Figura 1.22: Andamento della concentrazione del farmaco nei tessuti dopo l'assunzione secondo la tecnica tradizionale e mediante rilascio controllato.

Il successo di questi dispositivi è testimoniato anche dai dati di mercato: secondo studi effettuati dalla *Controlled Drug Release Society*, i volumi di mercato dei dispositivi a rilascio controllato, che nel 2018 ammontavano a circa 205 miliardi di dollari, sono previsti in aumento fino ad una stima di circa 226 miliardi di dollari nel 2020 (Figura 1.23).

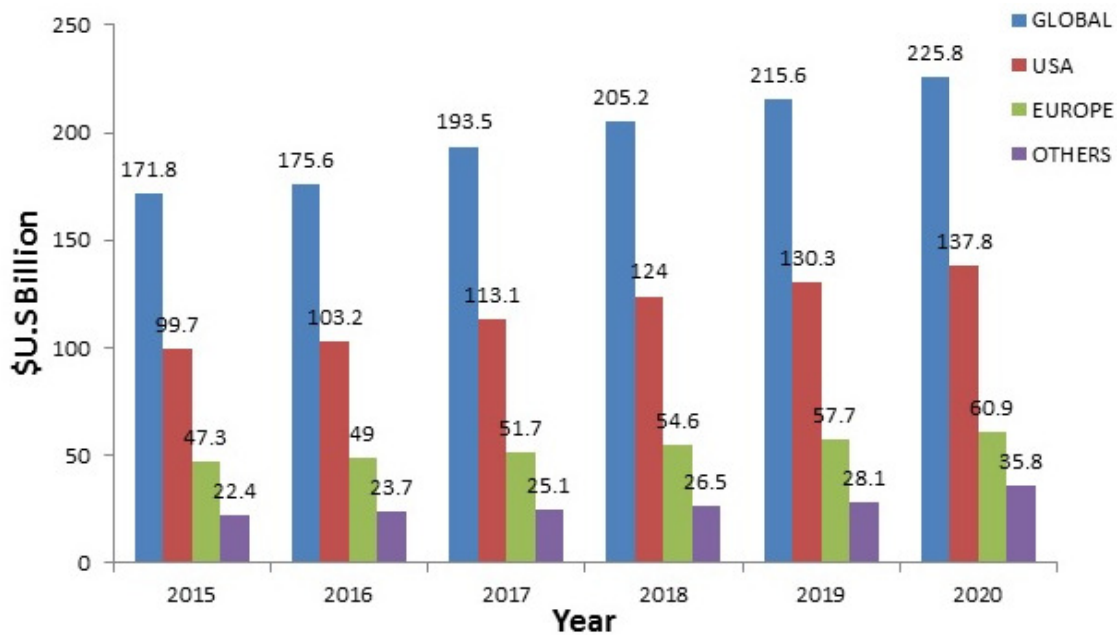


Figura 1.23: Mercato globale dei dispositivi a rilascio controllato (2015-2020).

1.5.1.1 Meccanismi di rilascio controllato

Per poter realizzare un sistema a rilascio controllato il più idoneo possibile alla specifica applicazione, è necessario considerare tutti i fattori che possono influenzare il meccanismo di rilascio stesso, tra cui: la tipologia del farmaco, la quantità da somministrare, il sito di azione, la durata della terapia e la stabilità delle molecole coinvolte. È quindi importante che i sistemi a rilascio controllato forniscano un ampio intervallo di utilizzo e che presentino diverse cinetiche di rilascio, le quali soddisfino le necessità di somministrazione indeterminati intervalli di tempo, nei tessuti interessati. È possibile individuare cinque diversi profili di rilascio, mostrati in Figura 1.24, di cui i primi due sono quelli più utilizzati:

- Profilo I: rilascio convenzionale, con un ritardo iniziale e velocità non costante, che diminuisce nel tempo;
- Profilo II: rilascio di ordine zero caratterizzato da un gradino con salita rapida e successivo mantenimento nel tempo del livello ottimale in termini di effetti terapeutici;
- Profilo III: rilascio ritardato seguito da rilascio costante, utile nel caso di principi attivi che devono svolgere la loro azione durante la notte;

- Profilo IV: rilascio a impulsi ritardato. Valido per un'azione notturna o per il rilascio di ormoni, la cui somministrazione deve essere effettuata una singola volta e non gradualmente;
- Profilo V: rilascio a impulsi periodico, utilizzato per somministrazioni a distanze temporali costanti e modulabili.

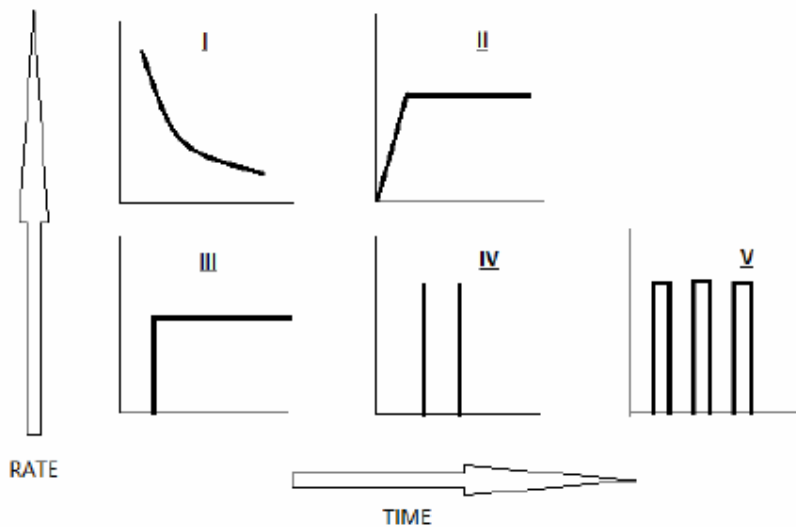


Figura 1.24: Principali profili di rilascio.

I sistemi utilizzati per il rilascio controllato di farmaci possono essere infine classificati a seconda del meccanismo di rilascio (Figura 1.25):

1. Sistemi a diffusione controllata: sistemi che sfruttano il meccanismo di diffusione del farmaco attraverso il polimero, il quale andrà incontro a degradazione una volta che il farmaco è stato completamente rilasciato. Si può avere un rilascio per diffusione da strutture di tipo matrice e di tipo serbatoio (reservoir). Nel caso di sistemi matriciali, il farmaco è dissolto uniformemente in una matrice polimerica e il rilascio segue una cinetica del primo ordine, con un alto tasso di diffusione all'inizio ed una successiva decrescita con l'aumento del percorso di diffusione e con la diminuzione dell'area della matrice; nel caso di sistemi a reservoir, costituiti da un nucleo interno di farmaco circondato da una membrana polimerica, il trasporto avviene tipicamente secondo cinetiche di ordine zero, con velocità costante nel tempo, finché il farmaco si trova in alta concentrazione all'interno della membrana.

2. Sistemi controllati chimicamente: il rilascio si verifica in ambiente acquoso, dove il polimero si degrada secondo un processo idrolitico o enzimatico, che coinvolge il *bulk* o la superficie. Questa caratteristica, da una parte evita la necessità di una rimozione chirurgica del dispositivo, ma dall'altra richiede che i prodotti della degradazione non provochino reazioni tossiche o cancerogene, situazione non sempre facile da ottenere. I sistemi controllati chimicamente si dividono in sistemi bioerodibili e sistemi a catena pendente. Nei primi, il principio attivo è dissolto all'interno del dispositivo, e fuoriesce solo in seguito all'azione erosiva esercitata dall'acqua sul dispositivo stesso. Nei secondi, invece, il principio attivo è legato chimicamente al polimero e viene rilasciato mediante una scissione idrolitica o enzimatica, con velocità proporzionale a quella con cui i legami vengono rotti dall'azione dell'acqua o delle proteine.
3. Sistemi attivati dal solvente: questo tipo di meccanismo coinvolge principalmente gli idrogeli, costituiti da un reticolo compatto che funge da matrice e intrappola al suo interno il principio attivo. Quando tali macromolecole entrano in contatto con un solvente compatibile termodinamicamente, come ad esempio l'acqua, le catene polimeriche si rilassano e l'idrogel si rigonfia, permettendo un flusso di solvente verso l'interno e la diffusione del farmaco verso l'esterno.
4. Sistemi a rilascio modulato: in questo caso, il rilascio viene controllato da stimoli esterni, quali la temperatura, il pH, campi elettrici o magnetici, radiazioni elettromagnetiche o raggi UV.

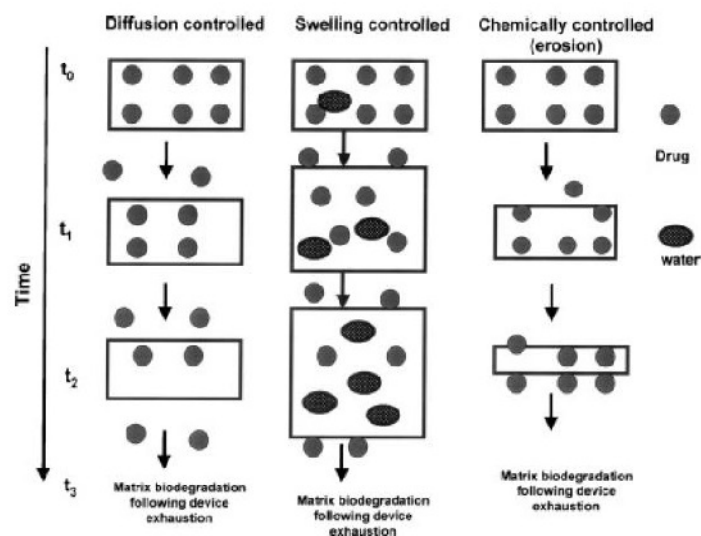


Figura 1.25: Rappresentazione schematica di alcuni meccanismi di rilascio.

1.5.1.2 Patch transdermiche

Tra i principali dispositivi a rilascio controllato, occorre menzionare film, stent, micro- e nanoparticelle ma soprattutto *patch* transdermiche. Con il termine *patch* transdermica si indica una membrana adesiva medicata posizionata sulla pelle che consente il rilascio di uno specifico farmaco attraverso la pelle stessa.

Il primo sistema transdermico, commercializzato con il nome *TransdermScop*(Baxter), approvato dalla *Food Drug Administration* nel 1979, venne impiegato per la prevenzione di nausea e vomito associati ai viaggi, in particolare quelli in mare.

In senso generale, la definizione “sistema transdermico per il rilascio di farmaci”(TDDS) include tutte le formulazioni volte al rilascio di farmaco in modo continuo attraverso la pelle, per il trattamento o la prevenzione di disturbi locali o sistemici [19]. Il rilascio del farmaco per via transdermica rappresenta una valida alternativa alle tradizionali tecniche di somministrazione, come quella orale o endovenosa attraverso iniezioni o infusioni, in quanto permette di evitare numerosi problemi legati a queste ultime, quali il primo stadio del metabolismo epatico, la digestione enzimatica, l'idrolisi del farmaco in ambiente acido ed irritazioni gastrointestinali (nel caso di somministrazione orale), oltre al rischio di trasmissione di malattie attraverso il sangue (nel caso di somministrazione endovenosa).

Inoltre, poiché si tratta di sistemi non invasivi che non provocano dolore, con bassi costi e con effetto sia locale che sistemico a seconda del tipo di principio attivo incapsulato, si aumenta notevolmente anche la *compliance* del paziente, rispetto ai casi di somministrazione tradizionale. Inoltre, il rilascio transdermico, nella maggior parte dei casi, richiede un dosaggio inferiore rispetto a quello previsto per una somministrazione orale.

Esistono comunque degli svantaggi legati all'utilizzo di tali dispositivi, rappresentati dalla possibile irritazione cutanea e dalla difficoltà di rilascio di alcuni principi attivi, soprattutto nel caso di pazienti con un basso flusso ematico. Occorre poi tenere conto che il farmaco deve poter superare lo strato corneo, ovvero la barriera più esterna della pelle, che funge da difesa contro gli agenti esterni; questo strato, essendo altamente idrofobico, rappresenta un notevole ostacolo alla diffusione di farmaci idrofilici. In più, nel caso in cui un farmaco riesca ad attraversare liberamente lo strato corneo, è possibile che vada incontro ad una degradazione precoce dovuta agli enzimi epidermici [19,20].

Alla luce di tali problematiche, negli ultimi anni sono stati sviluppati sistemi sempre più performanti, che vengono suddivisi in tre categorie, o “generazioni” (Figura 1.26).

- La *prima generazione* di *patch* transdermiche ha avuto lo scopo di perfezionare la formulazione del farmaco in termini di proprietà fisico chimiche (quali elevato coefficiente di partizione e basso peso molecolare) al fine di renderne massima la sua diffusione attraverso la pelle;
- La *seconda generazione* ha riguardato il miglioramento della permeabilità del farmaco attraverso attivatori chimici e stimolazioni esterne, come il calore o l'elettricità, al fine di favorirne il passaggio attraverso gli strati epidermici;
- La *terza generazione*, infine, ha sperimentato metodi che distruggono microscopicamente l'epidermide per facilitare il rilascio del farmaco; ad esempio l'ablazione a radiofrequenza, gli ultrasuoni e il laser, possono distruggere a livello locale lo strato corneo favorendo la penetrazione del farmaco attraverso la barriera danneggiata, mentre l'utilizzo di microaghi, i quali possono perforare lo strato più esterno della pelle, preservando il derma, consente di ridurre il percorso del farmaco fino a livello della circolazione sanguigna.

Recentemente è stata studiata anche una quarta generazione di *patch* transdermiche, nata per far fronte alla diffusione della medicina personalizzata (terapie studiate *ad hoc* che prevedono un preciso controllo del dosaggio del farmaco e della durata del rilascio in relazione alle specifiche condizioni del paziente): in questo caso è necessario poter disporre di sistemi in grado non solo di controllare il rilascio ma di inviare anche un *feedback* sullo stato del farmaco stesso. Questa quarta generazione riguarda dispositivi indossabili, sensori e attuatori, in grado di monitorare in modo preciso gli indicatori chiave del trattamento della malattia ed i potenziali effetti collaterali del rilascio del farmaco; in questo modo è possibile decidere in tempo reale la quantità appropriata di farmaco da rilasciare [20].

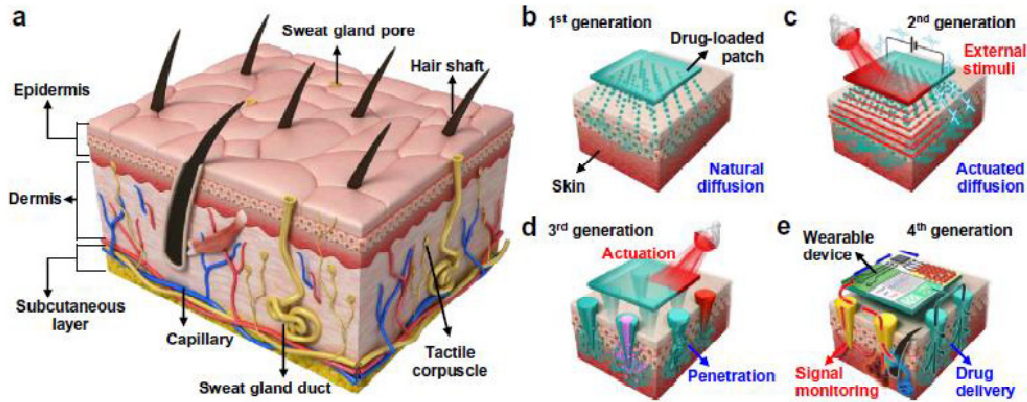


Figura 1.26: (a) Illustrazione schematica della pelle umana. (b-e) Schematizzazione delle generazioni dei patch transdermici.

I polimeri utilizzati per la realizzazione di *patch* transdermici hanno svariate funzioni tra cui: la formazione della matrice, il controllo della velocità di rilascio del farmaco, garantire una efficace pressione adesiva e fornire supporto strutturale e protettivo [21].

In base al loro design, le *patch* transdermiche possono essere suddivise in tre categorie principali (Figura 1.27):

- *Reservoir patch*: questo tipo di sistema presenta un serbatoio (reservoir), fra lo strato più esterno e la membrana permeabile. All'interno è presente il farmaco, tipicamente sotto forma di liquido, che viene rilasciato da una membrana. Questo tipo di *patch* presenta vantaggi in termini di flessibilità e di un buon controllo della velocità di rilascio; tuttavia, l'intero design è piuttosto complicato da realizzare.
- *Matrix patch*: questo tipo di *patch* è composto da una matrice semi-solida sulla quale viene caricato il farmaco, uno strato adesivo esterno ed una membrana attraverso la quale diffonde il farmaco. Sebbene questo modello abbia una struttura più semplice rispetto a quella del reservoir *patch*, richiede comunque la realizzazione e l'assemblaggio di due parti distinte, la matrice contenente il farmaco e lo strato adesivo.
- *Drug-in-adhesive patch*: questo tipo rappresenta la forma più semplice e più sviluppata delle *patch* transdermiche comunemente realizzate. Sono composte da una matrice adesiva contenente il farmaco, una membrana esterna impermeabile e una membrana interna attraverso la quale viene rilasciato il farmaco. In questo caso, il materiale polimerico utilizzato nella

realizzazione della matrice viene sciolto in soluzione, alla quale viene aggiunto in un secondo momento il principio attivo da rilasciare [22].

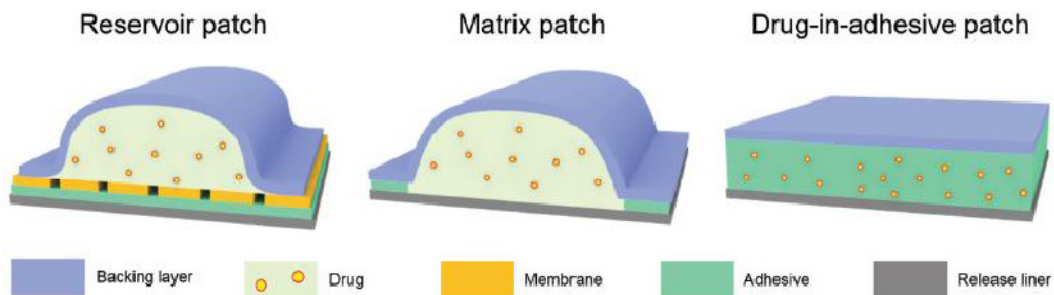


Figura 1.27: Illustrazione schematica dei tre differenti tipi di *patch* transdermiche.

1.5.2 Ingegneria tissutale

Con il termine “ingegneria tissutale” si intende una branca multidisciplinare dell’ingegneria che convoglia tutte le tecnologie volte alla ricostruzione *in vitro* di tessuti o organi.

Il termine venne ufficialmente introdotto durante il primo *Tissue Engineering Symposium* (California, 1998), per indicare “l'applicazione dei principi e dei metodi dell'ingegneria e delle scienze della vita per comprendere a fondo la relazione che esiste tra struttura e funzione nei tessuti viventi normali e patologici, per lo sviluppo di sostituti biologici che possano ripristinare, mantenere e migliorare la funzione tissutale”. È chiaro dunque come tale disciplina unisca competenze chimiche, biologiche, mediche e ingegneristiche, e si basi sostanzialmente su tre elementi, che costituiscono la cosiddetta “triade”: le cellule staminali, i fattori di crescita e gli scaffold, ovvero matrici tridimensionali e biocompatibili, dalle opportune caratteristiche chimiche, meccaniche e fisiche.

Più in dettaglio, quando si parla di cellule staminali si intendono le cellule progenitrici degli organi e dei tessuti degli esseri viventi; esse si trovano in uno stato indifferenziato, ovvero non hanno ancora assunto una specifica tipologia e funzione, ma possono specializzarsi e differenziarsi in cellule di particolari tessuti e organi se poste in determinate condizioni o messe a contatto con opportuni fattori di crescita. Questi ultimi sono molecole segnale specifiche per ciascun tipo di tessuto, e possono essere di diversa natura, come ad esempio molecole bioattive o proteine

morfogeniche per promuovere ed accelerare il processo di differenziamento e proliferazione cellulare.

Infine, gli *scaffold*, ovvero i supporti meccanici, hanno lo scopo di ospitare, supportare e promuovere l'adesione, l'accrescimento e il differenziamento delle cellule che su di essi vengono impiantate [23]. Gli *scaffold* ben performanti devono soddisfare cinque requisiti fondamentali:

- Proprietà meccaniche simili a quelli del tessuto naturale sostituito;
- Forme e dimensioni variabili e ingegnerizzabili a seconda delle diverse destinazioni d'uso;
- Velocità di degradazione e di riassorbimento modulabili e compatibili con la velocità di rigenerazione tissutale;
- Superficie chimicamente e morfologicamente idonea sia all'adesione e alla proliferazione cellulare, sia alla progressiva erosione a cui andrà incontro;
- Elevata porosità interconnessa. La dimensione dei pori deve essere sufficientemente elevata da permettere il passaggio delle sostanze nutritive e l'eliminazione dei cataboliti di scarto.

Inoltre, i biomateriali impiegati per la realizzazione degli scaffold devono essere a loro volta biocompatibili e biodegradabili, con idonee proprietà meccaniche, tali da favorire l'adesione, la proliferazione e la mobilitazione delle cellule e infine né trombogenici né immunogenici.

La procedura che porta alla realizzazione di un nuovo tessuto è costituita da una sequenza di passaggi (Figura 1.28): isolamento delle cellule dall'ambiente biologico naturale, espansione delle colture in vitro, semina su *scaffold*, ed infine impianto dello *scaffold* stesso all'interno del corpo del paziente.

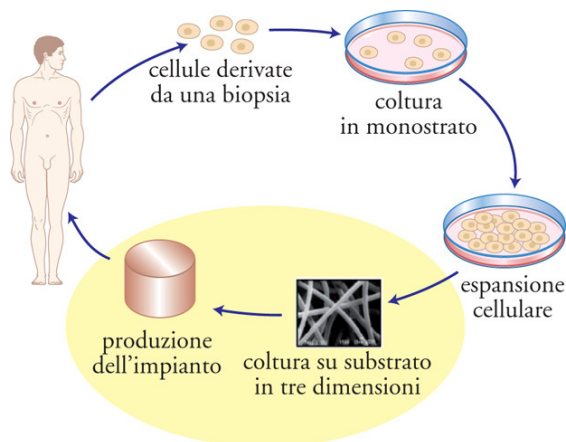


Figura 1.28 Ciclo rappresentativo dell'ingegneria tissutale.

Se inizialmente l'ingegneria tissutale era volta alla realizzazione di tessuti e organi artificiali che riproducessero fedelmente quelli naturali nella forma e nelle funzioni, oggi questa disciplina ha subito una notevole evoluzione. Il nuovo obiettivo, infatti, è di unire le potenzialità del trapianto di cellule viventi con la tecnologia degli organi artificiali, per la realizzazione di strutture funzionali: i tessuti ingegnerizzati, in caso di successo, sono in grado di integrarsi completamente con quelli del paziente, apportando in tal modo un contributo specifico e duraturo alla cura dello stato patologico, senza richiedere debilitanti, costosi e spesso inefficaci trattamenti farmacologici o addirittura rischiosi interventi chirurgici per il trapianto.

Per quanto riguarda i diversi tipi di tessuti artificiali ingegnerizzati, se ne possono distinguere tre classi principali:

- Sistemi per il trattamento di ulcere croniche o ustioni, quali ad esempio gli equivalenti della cute (o "pelle artificiale");
- Sistemi per la rigenerazione della cartilagine o del tessuto osseo;
- Impianti per la sostituzione di sistemi metabolici, quali il pancreas ed il fegato artificiale, oppure impianti per il sistema nervoso centrale atti a rilasciare molecole bioattive e fattori di accrescimento in siti specifici, come ad esempio i dispositivi per il trattamento dei morbi di Parkinson e di Alzheimer.

Anche in questo caso, i dati di mercato riportati dalla *BCC Research* confermano come l'ingegneria tissutale stia diventando un'alternativa sempre più valida agli approcci tradizionali: se nel 2015 il mercato globale di questa disciplina è stato valutato intorno ai 27 miliardi di dollari, si prevede raggiunga i 135 miliardi nel 2024 (Figura 1.29).

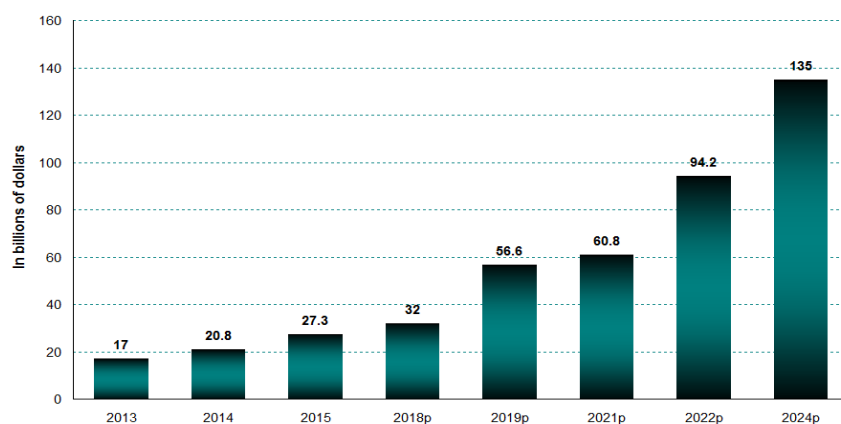


Figura 1.29: Mercato globale dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa nel periodo 2013-2024.

1.6 Elettrofilatura

L'elettrofilatura può essere considerata una delle tecniche di maggior successo per la realizzazione di membrane porose, sia per il rilascio di farmaci che per la realizzazione di *scaffold* per l'ingegneria tissutale. Mediante elettrofilatura è possibile ottenere tappetini costituiti da fibre continue di dimensioni micro e nanometriche interconnesse tra loro e dall'elevato rapporto superficie/volume. In base alle dimensioni delle fibre, è inoltre possibile modulare la porosità e la dimensione dei pori stessi: questo consente di realizzare un supporto efficace e *ad hoc* sia per quanto riguarda l'incapsulamento ed il rilascio di principi attivi, sia per quanto concerne l'adesione e la proliferazione cellulare, semplicemente variando alcuni parametri del processo [24].

La strumentazione è costituita da tre elementi principali, come illustrato in Figura 1.30:

- Una siringa che contiene la soluzione di polimero disciolto in un solvente;
- Un generatore di alta tensione (10-50 kV) che, mediante l'ago metallico della siringa, carica positivamente il polimero;
- Un collettore metallico con messa a terra, da cui il polimero viene attratto;

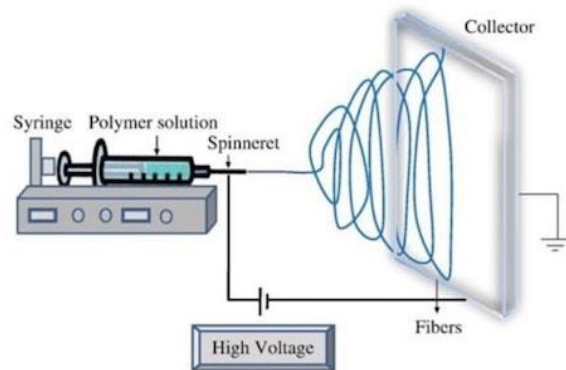


Figura 1.30: Schema del processo di elettrofilatura.

Un fattore chiave del processo è la soluzione in quanto ha la duplice funzione di sciogliere il materiale e condurre lo stesso verso il collettore. In questa fase è opportuno valutare alcune caratteristiche del solvente, quali volatilità, tensione di vapore, tensione superficiale e punto di evaporazione, responsabili della morfologia della fibra.

Quando il fluido polimerico viene sottoposto ad una differenza di potenziale, in corrispondenza della punta dell'ago, subisce un aumento della sua carica

superficiale e, una volta raggiunto un valore di tensione critica, l'accumulo di cariche uguali nella soluzione genera una forza auto-repulsiva maggiore della tensione superficiale della soluzione stessa. Questo provoca l'eruzione della soluzione, con la formazione di un getto polimerico nel verso del campo elettrico esterno, che termina sul collettore, solitamente collegato a terra, in prossimità del quale la carica viene rilasciata. Sul collettore le fibre polimeriche solidificano in seguito all'evaporazione del solvente.

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

1. Parametri di processo:

- i) Tensione applicata: questo valore, variabile in funzione dei diversi sistemi polimero/solvente ed influenzato anche dalla distanza tra ago e collettore, deve essere tale da permettere la formazione di un getto continuo, dalla punta dell'ago fino al collettore;
- ii) Distanza ago-collettore: deve essere abbastanza elevata da consentire l'evaporazione del solvente, ma allo stesso tempo non eccessiva, per non compromettere il percorso del getto e la morfologia finale della fibra stessa;
- iii) Velocità del flusso: vengono solitamente scelte velocità piuttosto basse, in quanto una portata elevata genera pori di dimensioni elevate, ma può causare anche una granulosità indesiderata delle fibre, dovuta all'incapacità del solvente di evaporare prima di raggiungere il collettore;
- iv) Tipo di collettore: i più comuni sono costituiti da piastre di alluminio, ma vengono impiegati anche fogli di carta o tessuti conduttivi, oppure bagni di non solventi. Inoltre, è preferibile scegliere un collettore fisso, se si desiderano fibre disposte in maniera casuale, oppure mobile, qualora si necessiti di fibre orientate.

2. Parametri della soluzione:

- i) Concentrazione: in generale, la concentrazione della soluzione polimerica è direttamente proporzionale al diametro della fibra. Dunque, se la concentrazione è troppo bassa si otterranno tappetini costituiti da un insieme di fibre e granelli, viceversa se troppo alta diventa impossibile mantenere un flusso costante a livello della punta dell'ago) (Figura 1.31);

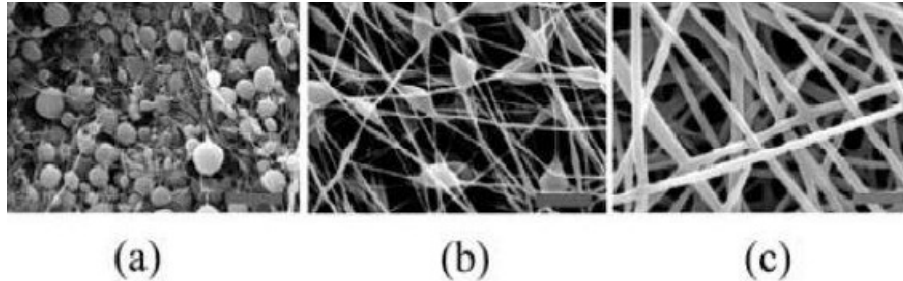


Figura 1.31: Effetto dell'aumento della concentrazione (da sinistra verso destra) di una soluzione di acido polilattico-co-glicolico sulla morfologia delle fibre ottenute.

- ii) Peso molecolare: influisce sulle caratteristiche morfologiche della fibra, poiché riflette il numero di legami tra le catene polimeriche in soluzione. In particolare, al crescere del peso molecolare aumenta il diametro finale della fibra;
- iii) Viscosità: analogamente alla concentrazione, deve essere compresa tra un certo range di valori. Infatti, se troppo bassa non consente di ottenere fibre continue, viceversa, se troppo alta, limita notevolmente la processabilità del materiale;
- iv) Tensione superficiale: influisce sul diametro e sulla granulosità delle fibre, ma anche sul valore della tensione critica in corrispondenza del quale ha inizio il processo di filatura. In generale, riducendo la tensione superficiale è possibile ottenere fibre prive di granuli ed operare con campi elettrici inferiori;
- v) Conducibilità: gli ioni presenti nella soluzione polimerica incidono in maniera significativa sulle dimensioni e sull'uniformità delle fibre. Infatti, all'aumentare di tale parametro si verifica un significativo aumento del diametro della fibra; al contrario, una conducibilità troppo bassa causa una forza elettrica insufficiente, che non consente l'elongazione del getto e la

formazione di una fibra uniforme, con la conseguente formazione di granuli.

3. Parametri ambientali

- i) Temperatura: può influenzare il diametro della fibra in quanto modifica la viscosità del getto polimerico. Solitamente, a temperature più alte si registrano valori di viscosità più bassi e viceversa;
- ii) Umidità: se presente in percentuali eccessive può impedire l'evaporazione del solvente, andando ad influire sulla morfologia delle fibre; viceversa, un tasso di umidità troppo basso provoca un eccessivo aumento della velocità di evaporazione, rendendo quindi impossibile il processo di elettrofilatura.

2. Scopo della tesi

Le recenti scoperte nell'ambito dell'ingegneria biomedica hanno permesso di superare diversi limiti legati alle metodologie tradizionali di trattamento delle patologie, raggiungendo soluzioni sempre più all'avanguardia. La somministrazione di farmaci in maniera controllata e modulata da una parte, allo scopo di limitare gli effetti collaterali e di migliorare l'efficienza terapeutica, e la rigenerazione tissutale dall'altra, vista come alternativa a metodi più tradizionali e spesso non risolutivi come il trapianto ed il trattamento farmacologico, rientrano fra gli ambiti di ricerca maggiormente interessati.

Ad oggi, i biopolimeri di origine naturale sono oggetto di indagini approfondite come materiali per la fabbricazione di cerotti medicati per ferite, dispositivi per la crescita cellulare e sistemi di rilascio di farmaci, grazie alla loro biodegradabilità e biocompatibilità. Tra essi, la cheratina, proteina ampiamente presente nel corpo umano e disponibile, a bassi costi, a partire da materie prime quali lana non utilizzabile per la filatura, piume, scarti di lavorazioni tessili, si è rivelata un materiale particolarmente promettente in questo senso. Infatti, tale polimero risulta essere altamente biocompatibile, biodegradabile, in grado di supportare l'adesione a la crescita cellulare grazie alla presenza di sequenze specifiche RGD (Arg-Gly-Asp) e LDV (Leu-Asp-Val), e, grazie alla sua natura sia idrofilica che idrofobica, può essere legata a diverse molecole, tra cui principi attivi e farmaci, senza alterarne la bioattività. Nonostante quindi possa potenzialmente essere un ottimo materiale per l'ingegneria tissutale ed il rilascio controllato di farmaco, due tra le applicazioni di maggiore avanguardia in biomedicina, la cheratina è caratterizzata da scarsa processabilità, dovuta alla sua fragilità, e dunque da proprietà meccaniche non idonee, e da una elevata velocità di degradazione, che ne riducono fortemente il campo di applicazione.

Al fine di migliorare le caratteristiche non adeguate, mantenendo quelle già ottimali, una strada percorribile è quella di miscelare la cheratina con un altro materiale, caratterizzato da facile lavorabilità e buone proprietà meccaniche. A tale proposito, i polimeri sintetici, ed in particolare i poliesteri alifatici, si sono rivelati una classe di materiali di rilevante interesse: studi presenti in letteratura hanno evidenziato come rispetto ad altri biomateriali godano di una maggior biocompatibilità, di bassi coefficienti di attrito, di una facile processabilità e lavorabilità anche in forme e

strutture complesse. Inoltre, possono essere modificati chimicamente e/o fisicamente in superficie e possono immobilizzare cellule o altre biomolecole. Tra i poliesteri alifatici di maggiore successo, il poli(butilene succinato) o PBS, recentemente approvato dalla *Food and Drug Administration* e già presente in commercio per altre applicazioni, sta riscuotendo un forte interesse anche per applicazioni biomedicali, grazie alla sua biocompatibilità, stabilità termica e una temperatura di fusione (circa 115 °C) fra le più alte tra i poliesteri alifatici policondensati.

Lo scopo del presente lavoro di Tesi, svolto presso il Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali dell'Università di Bologna e presso i laboratori ISOF del CNR di Bologna, è la progettazione, sviluppo e caratterizzazione di *blenda* diversa composizione a base di cheratina e PBS, per applicazioni in ambito di rilascio controllato di farmaco e ingegneria tissutale. Da questi miscele sono stati realizzati tappetini, tramite elettrofilatura, caratterizzati da una struttura altamente porosa con pori interconnessi, in grado, a seconda dell'applicazione richiesta, sia di incapsulare farmaco al suo interno, sia di favorire l'adesione e la proliferazione cellulare

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

- Sintesi tramite policondensazione in massa a due stadi del PBS e sua caratterizzazione molecolare tramite NMR e GPC.
- Estrazione della cheratina dalla lana ovina.
- Preparazione di tre *blend* fisiche di PBS e Cheratina, con rapporti in peso di 75:25, 50:50, 25:75.
- Studio di miscibilità, tramite reometro, delle diverse *blend*.
- Realizzazione di *patch*, tramite elettrofilatura, a partire dalle *blend* (e dal PBS puro, utilizzato come riferimento).
- Caratterizzazione morfologica (analisi SEM, valutazione di porosità e di grado di rigonfiamento), termica (DSC e TGA) e meccanica (prove a trazione) dei tappetini ottenuti.
- Test di degradazione enzimatica dei tappetini.

- Analisi della cinetica di rilascio del farmaco, svolto sul tappetino di PBS puro e su quello ottenuto a partire dalla miscela 50:50 precedentemente caricati con diclofenac, comune antinfiammatorio.
- Studi di biocompatibilità, mediante test di vitalità cellulare, svolti sul tappetino di PBS puro e quello con composizione 50:50.
- Analisi dei risultati ottenuti ed estrapolazioni di correlazione struttura-proprietà.

3. Materiali e Metodi

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

3.1 Sintesi del poli(butilene succinato) PBS

Il poli(butilene succinato) è stato sintetizzato attraverso una reazione di policondensazione in massa a due stadi a partire da dimetil succinato (DMS), l'estere dell'acido succinico, e 1,4-butandiolo (BD).

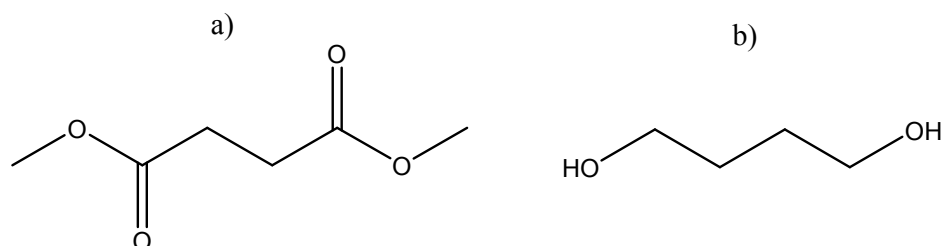


Figura 3.1 Strutture chimiche dei due monomeri utilizzati per la sintesi del PBS: a) dimetil succinato; b) 1,4-butandiolo.

Il procedimento seguito per effettuare la sintesi è il seguente:

1. Partendo dai pesi molecolari delle due sub-unità di interesse, si calcola il peso molecolare dell'unità ripetitiva che si desidera ottenere: tale valore è ottenuto sottraendo dai pesi molecolari dei due monomeri di partenza il peso molecolare del gruppo uscente, in questo caso metanolo.

$$PM_{DMS} = 146,14 \text{ g/mol}$$

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

$$PM_{BD} = 90,12 \text{ g/mol}$$

$$PM \text{ del gruppo terminale } OH = 17 \text{ g/mol}$$

$$PM \text{ dell'unità ripetitiva} = 146,14 - 2 \cdot (15) + 90,12 - 2 \cdot (17) = 172,26 \text{ g/mol}$$

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

Ad esempio, nel presente lavoro di Tesi, in cui la quantità finale di PBS era di 35 g, si è proceduto al calcolo del numero di moli di PBS, dividendo la quantità in grammi da ottenere per il peso molecolare dell'unità ripetitiva, precedentemente calcolato:

$$n^{\circ} \text{ moli PBS} = \frac{35 \text{ g}}{172.26 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 0.20318 \text{ mol}$$

Sapendo che i due reagenti reagiscono in proporzione 1:1, 1 mole di PBS si sintetizza facendo reagire 1 mole di DMS con 1 mole di BD. Nel caso in esame, dunque, sono necessarie 0.20318 moli di DMS e altrettante di BD. Tuttavia, si lavora con un leggero eccesso di glicole per facilitare la miscelazione dei due monomeri e favorire le reazioni di trans-esterificazione.

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

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

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

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

La strumentazione per la sintesi si compone di un reattore in vetro a tre colli, inserito all'interno di un bagno di sali inorganici che ha il compito di mantenere il sistema in temperatura, un agitatore meccanico dotato di estensimetri per la misura del *torque*, ed una pompa da vuoto (Figura 3.2).

Il reattore a tre colli viene a sua volta collegato all'agitatore meccanico, per mantenere il sistema in agitazione costante di 100rpm, ad un flusso di azoto, necessario per mantenere l'atmosfera inerte, e ad una trappola, necessaria per raccogliere il metanolo prodotto in seguito alle reazioni di transesterificazione tra le unità monomeriche acida e glicolica.

Come già detto, il poli(butilene succinato) è stato ottenuto mediante policondensazione in massa a due stadi. Più in dettaglio, durante il primo stadio, condotto alla temperatura di 180°C, si verificano le reazioni di transesterificazione, grazie alle quali si formano oligomeri a basso peso molecolare, e la contemporanea distillazione del metanolo, raccolto nella trappola.

Nel secondo stadio, che ha inizio quando almeno il 90% del metanolo teorico viene distillato, avvengono altre reazioni di transesterificazione tra gli oligomeri precedentemente ottenuti, con la formazione di catene polimeriche ad elevato peso molecolare. Durante questa fase, la temperatura viene aumentata gradualmente fino al raggiungimento di 230 °C. Inoltre, si aumenta gradualmente il vuoto, fino al raggiungimento di circa $6 \cdot 10^{-2}$ mbar, al fine di eliminare il glicole in eccesso e spostare dunque l'equilibrio di reazione verso i prodotti. Durante questo stadio, è possibile osservare un graduale aumento del *torque*, dovuto all'aumento della viscosità del polimero, ovvero del suo peso molecolare.

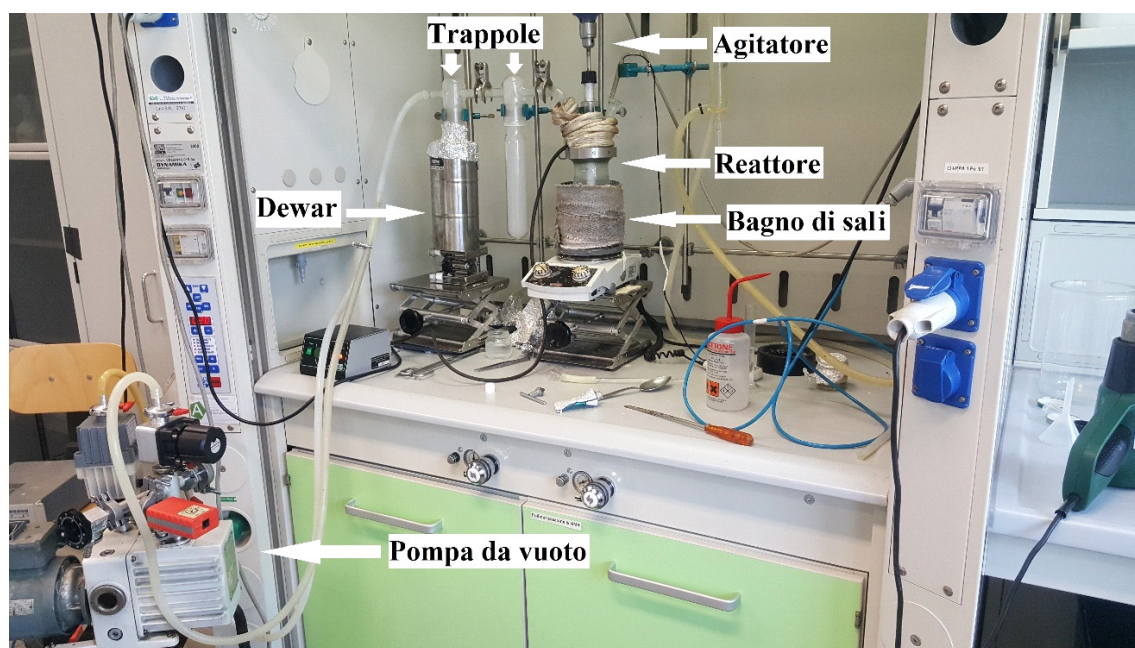


Figura 3.2: Strumentazione utilizzata per la sintesi

3.1.1 Purificazione del poli(butilene succinato) PBS

Al fine di eliminare eventuali monomeri non reagiti e prodotti di reazione a basso peso molecolare lineari e/o ciclici, il PBS ottenuto ha subito un processo di purificazione: il polimero è stato sciolto in una piccola quantità di cloroformio, fino ad ottenerne la completa solubilizzazione. La soluzione è stata poi fatta sgocciolare in un becher contenente metanolo in largo eccesso, un comune non solvente. A contatto con il metanolo, il PBS solidifica istantaneamente, precipitando sul fondo, mentre le componenti a basso peso (catalizzatore, oligomeri, ...) rimangono sospese in metanolo, che diventa visibilmente più opaco col procedere della purificazione (Figura 3.3).

Successivamente, il polimero precipitato, di colore bianco (Figura 3.4), è stato filtrato e lasciato a riposo a temperatura ambiente in essiccatore, al fine di permettere l'evaporazione di metanolo e cloroformio residui eventualmente presenti.



Figura 3.3: Strumentazione utilizzata per la purificazione



Figura 3.4: PBS purificato.

3.2 Estrazione della Cheratina

Il processo di estrazione della cheratina a partire da lana ovina si svolge nell'arco di una settimana. Il primo giorno viene preparata la soluzione necessaria a sciogliere la lana grezza (precedentemente lavata). Per estrarre cheratina da 15g di lana si utilizza una soluzione di 300mL composta da:

- Sodio-dodecil-solfato (SDS) = 9g
- Sodio metabisolfito (mBS) = 34.2g
- Urea = 144g

Ai tre componenti vengono poi aggiunti 150mL di acqua milliQ, e la soluzione così ottenuta viene lasciata in agitazione per 3 ore a 50°C, in modo da permettere ai sali di sciogliersi completamente. La lana viene dunque completamente immersa nella soluzione e lasciata per una notte in agitazione a 70°C.

Il secondo giorno la soluzione viene filtrata, al fine di eliminare i residui di lana, dalla consistenza gelatinosa. La filtrazione viene effettuata prima con un filtro Büchner, poi con un filtro a porosità 2 ed infine con uno a porosità 4, cercando di limitare il più possibile la formazione di schiuma, dovuta alla presenza del tensioattivo SDS.

A questo punto la soluzione viene sottoposta a dialisi, al fine di eliminare tutti i sali residui ed ottenere una soluzione contenente principalmente acqua e cheratina: i tubi da dialisi vengono immersi in vasche riempite con acqua milliQ, la quale nei tre giorni successivi viene cambiata ogni 4 ore circa, in modo da velocizzare il processo, fino a che la conducibilità dell'acqua stessa non scende sotto i 5 μ S, indice che la dialisi è arrivata a compimento. A questo punto la soluzione viene versata in vaschette abbastanza grandi in modo tale da ottenere, al termine dell'evaporazione, un film sottile, che verrà posto una notte in congelatore ed in seguito in liofilizzatore per altri due giorni, fino ad ottenere la cheratina pura. La resa del processo è stata circa del 50%.

3.3 Caratterizzazione molecolare

3.3.1 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)

La Risonanza Magnetica Nucleare è una tecnica utilizzata per analizzare la struttura chimica dei materiali. Il sistema diagnostico utilizzato si compone di un elettromagnete che genera un campo magnetico stabile ed omogeneo, un emettitore di onde radio, un ricevitore ed una apparecchiatura con il compito di variare la frequenza della radiazione emessa. Il principio di funzionamento sfrutta la capacità che hanno i nuclei di alcuni atomi di generare un campo magnetico in seguito alla rotazione intorno al proprio asse, se sottoposti a un campo magnetico esterno. Tale rotazione, o spin, è legata ad un momento di spin (I) rispetto al centro del proprio nucleo, definito come:

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

In cui: n è il numero quantico principale e h la costante di Planck.

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

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

in cui γ è il rapporto giromagnetico.

Inoltre, il momento magnetico nucleare μ , in seguito all'allineamento del nucleo, non rimane fermo ma continua ad oscillare attorno alla direzione del campo magnetico esterno B , compiendo un moto di precessione, simile a quello di una trottola (Figura 3.5).

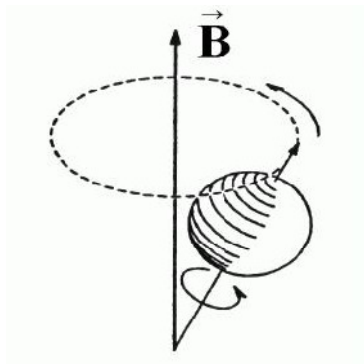


Figura 3.5: Moto di precessione dei momenti magnetici.

Quando i nuclei di atomi con spin non intero vengono sottoposti ad un campo magnetico esterno, la loro rotazione si sincronizza, e gli assi di rotazione si dispongono lungo le linee di flusso del campo magnetico. Ad esempio, per un nucleo con spin $\frac{1}{2}$, gli orientamenti possibili sono due: uno parallelo al campo ($m = +\frac{1}{2}$) e uno antiparallelo ($m = -\frac{1}{2}$) (Figura 3.6). Gli atomi che tipicamente vengono utilizzati sono ^1H e ^{13}C , che hanno spin $\frac{1}{2}$.

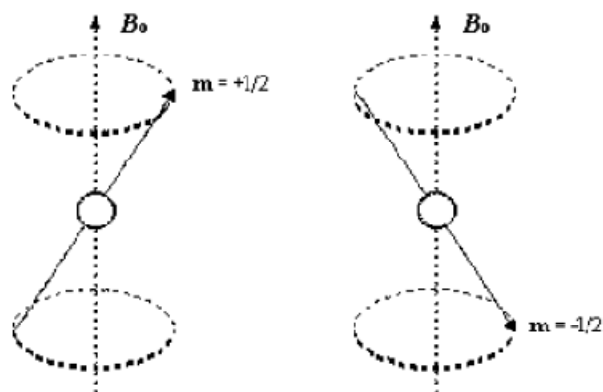


Figura 3.6: Possibili orientamenti dei nuclei con spin $\frac{1}{2}$ in presenza di campo magnetico.

In base a queste due possibili disposizioni, i nuclei si troveranno anche su due livelli energetici differenti: quelli orientati in senso parallelo avranno minore energia mentre gli altri avranno maggiore energia (Figura 3.7).

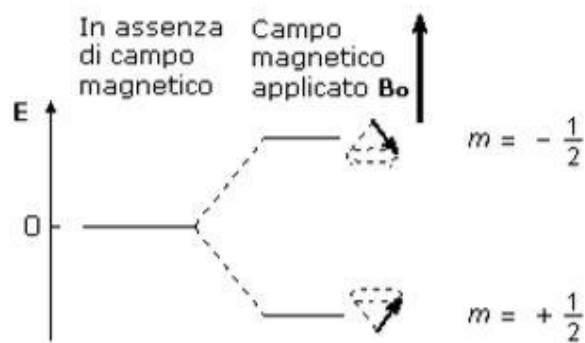


Figura 3.7: Energia ed orientamento dei nuclei in presenza di un campo magnetico esterno.

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

$$\Delta E = 2 \cdot \vec{\mu} \cdot \vec{B} \rightarrow h \cdot \nu$$

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

Tuttavia, essa risulta essere molto piccola; di conseguenza, la popolazione di nuclei sui due livelli energetici è molto simile, ad eccezione di una leggera prevalenza per lo stato a minor energia; tuttavia il segnale NMR è possibile proprio grazie a questa piccola differenza. Per cui, se viene applicato un secondo campo magnetico B_1 orientato perpendicolarmente a quello già presente, il vettore campo magnetico complessivo ed il vettore magnetizzazione si defletteranno dall'asse del campo B di un certo angolo, detto angolo di nutazione o di precessione. Questo fenomeno avviene soltanto se B_1 possiede una frequenza specifica, detta frequenza di Larmor, che dipende dalla specie atomica in esame e dal campo B , pari a:

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

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

Il segnale viene generato secondo il metodo ad impulso, in cui gli impulsi sono generati e ricevuti da un sistema di bobine magnetiche secondo una sequenza ben precisa, detta FID (*Free Induction Decay*). In questo modo gli spin inclinano il proprio vettore di magnetizzazione di 90° rispetto alla verticale; una volta terminato l'impulso, i nuclei iniziano a cedere rapidamente energia per ritornare alla posizione iniziale, generando così un segnale che si smorza velocemente nel tempo. Se questo segnale viene espresso in funzione della frequenza, invece che del tempo, si ottiene lo spettro NMR relativo alla sostanza in esame (Figura 3.8), costituito da un insieme di picchi collocati a specifiche frequenze.

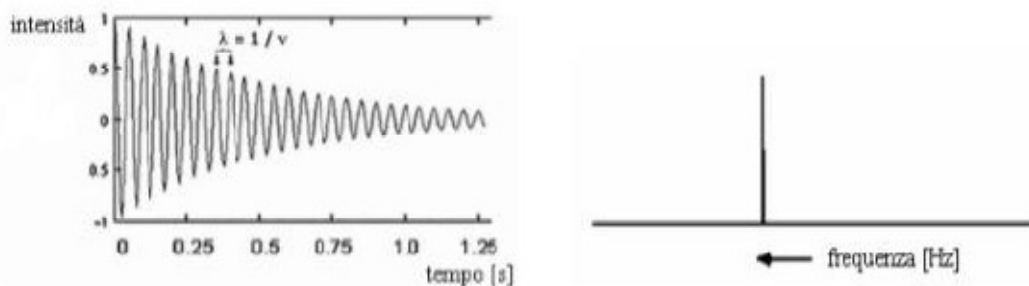


Figura 3.8: Grafico FID e relativo spettro NMR.

ad una frequenza più bassa, rispetto ai nuclei situati in intorni poveri di elettroni. Lo spostamento risultante nel segnale NMR per un dato nucleo è detto spostamento chimico, o *chemical shift*, ed è funzione dell'intorno chimico che circonda l'atomo in esame: in generale, protoni o carboni adiacenti ad atomi elettronegativi risultano schermati e, di conseguenza, avvertono un campo magnetico applicato più intenso, subiscono transizioni a frequenze maggiori, e, nello spettro, si trovano ad un *chimica shift* più alto. Il *chemical shift* assoluto risulta tanto maggiore quanto è più intenso il campo applicato; questo significa che strumenti diversi fornirebbero spostamenti chimici assoluti diversi in rapporto all'intensità del loro campo magnetico. Per questo motivo, si preferisce considerare lo spostamento chimico relativo δ , definito come:

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

Dove ν è la frequenza di risonanza dell'atomo in esame, mentre ν_r è la frequenza di risonanza del tetrametilsilano (TMS), un nucleo di riferimento. Tipicamente, per l'atomo ^1H e per gran parte delle molecole organiche, δ è compreso nell'intervallo fra 0 e 10 ppm.

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

a cui corrisponde, si ottengono valori perfettamente confrontabili con quelli dati dalla formula chimica del polimero analizzato.

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

3.3.2 Cromatografia a permeazione su gel (GPC)

La cromatografia a permeazione di gel (o *gel permeation chromatography*, GPC) è una tecnica di separazione fisica utilizzata per la determinazione dei pesi molecolari dei materiali polimerici.

Si tratta un metodo di separazione fisica in cui le macromolecole vengono frazionate e divise in base alle loro dimensioni. Si basa sul principio per cui una soluzione polimerica viene eluita attraverso una o più colonne caratterizzate, al loro interno, da porosità di diverse dimensioni (in genere realizzate con polimeri con alto grado di reticolazione, come ad esempio polistirene reticolato con divinilbenzene).

Lo strumento è composto da una pompa volumetrica, una colonna cromatografica ed un rivelatore, che per i poliesteri alifatici è generalmente ad indice di rifrazione (Figura 3.9).

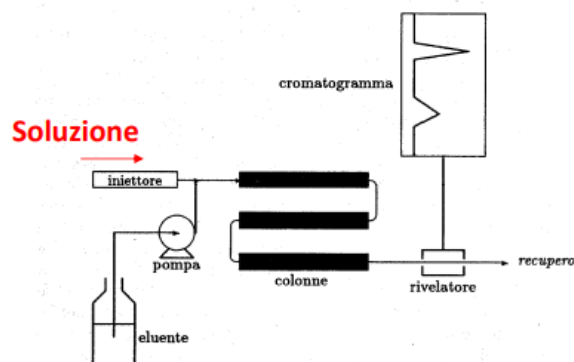


Figura 3.9: Schema funzionamento di una GPC.

Durante la scansione, è necessario far circolare un solvente con portata volumetrica costante. Lo stesso solvente sarà anche quello utilizzato per preparare le soluzioni dell'analita da iniettare. Una volta iniettate, le particelle i cui volumi idrodinamici sono

più grandi delle dimensioni dei pori attraversano la colonna più rapidamente, negli interstizi tra i grani, mentre le più piccole sono in grado di entrare nei pori, ed il loro passaggio attraverso la colonna viene quindi ritardato (Figura 3.10).

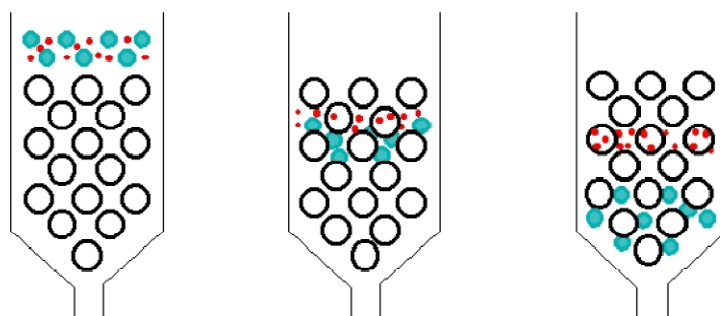


Figura 3.10: Esempio del percorso svolto dalle particelle all'interno della colonna

La soluzione viene analizzata non appena fuoriesce dalla colonna, tramite un sensore che fornisce, istante per istante, un segnale la cui intensità è proporzionale alla concentrazione del soluto (Figura 3.11); il grafico risultante prende il nome di cromatogramma. Questo riporta l'andamento dell'intensità del segnale in funzione del tempo. Per convertire i tempi in pesi molecolari, è necessario fare riferimento alle curve di taratura, ottenute analizzando campioni standard di peso molecolare noto.

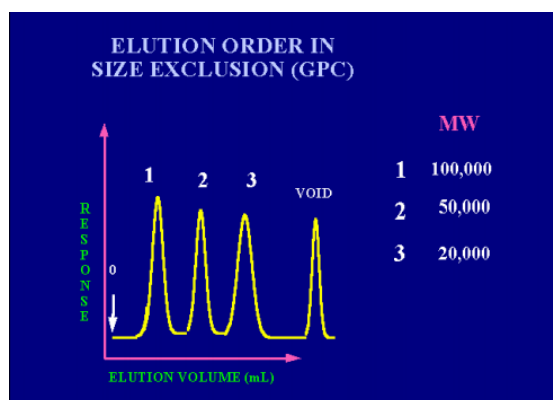


Figura 3.11: Esempio di cromatogramma

Il cromatografo utilizzato per il presente lavoro di Tesi è composto da due colonne disposte in serie: la prima è una PLgelMiniMIX-A (20 μm con dimensioni di 250x4.6 mm) seguita da una seconda colonna TOSOHTSKgel SuperMultipore HZ-M (4 μm con dimensioni 150x4.6 mm).

I cromatogrammi sono stati registrati ed elaborati con il software Agilent GPC/SEC versione A.02.01. Come eluente è stato utilizzato cloroformio, con flusso in colonna pari a 0.2 ml/min, al quale viene aggiunto toluene (2 μl /20 ml) come riferimento.

3.4 Spettroscopia infrarossa (FTIR)

La spettroscopia infrarossa IR è una tecnica spettroscopica che si basa sull'interazione fra una radiazione elettromagnetica e la materia, generalmente utilizzata in chimica analitica ed in chimica fisica per la caratterizzazione dei materiali e lo studio dei legami chimici.

Si tratta di una spettroscopia di vibrazione, dal momento che quando una molecola viene investita da una radiazione infrarossa con frequenza compresa fra 10000 e 100 cm^{-1} , a causa dell'energia ceduta dalla radiazione passa da uno stato vibrazionale fondamentale ad uno eccitato. Tale energia può essere di stiramento (*stretching*), se la vibrazione avviene lungo l'asse di legame, con conseguente variazione della distanza di legame, oppure di piegamento (*bending*), che si verifica in corrispondenza di variazioni dell'angolo di legame, sia lungo il piano su cui giace il legame stesso, sia fuori da tale piano.

La condizione necessaria affinché una radiazione infrarossa possa originare una transizione vibrazionale consiste nel verificarsi di un cambiamento del momento di dipolo elettrico all'interno della molecola. Quindi molecole omoatomiche come N_2 o O_2 non sono attive all'infrarosso, mentre molecole quali la CO_2 possono entrare in risonanza con la radiazione solamente grazie alle vibrazioni asimmetriche che producono un momento di dipolo istantaneo.

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

Infine, è possibile analizzare lo spettro in termini di trasmittanza percentuale, ovvero analizzando i fotoni infrarossi non assorbiti dalla molecola, oppure, viceversa, in funzione dell'assorbanza.

Generalmente, lo spettro IR si può suddividere in due diverse zone (Figura 3.12):

- *Zona dei gruppi funzionali*, che si estende da 3800 a 1300 cm^{-1} e comprende bande dovute sia a stiramenti (nel range 3800 a 1500 cm^{-1}) che a

deformazioni (nel range 3800 a 1300 cm^{-1}) di legami singoli, doppi e tripli, ad esempio i legami N-H, O-H, C-H, C=C, C=O, N=O, ecc...;

- *Zona delle impronte digitali*, da 1300 a 500 cm^{-1} , che deve il suo nome al fatto che le varie deformazioni, interagendo fra loro, si combinano dando luogo ad una serie di bande che costituiscono una sorta di impronta digitale della molecola;

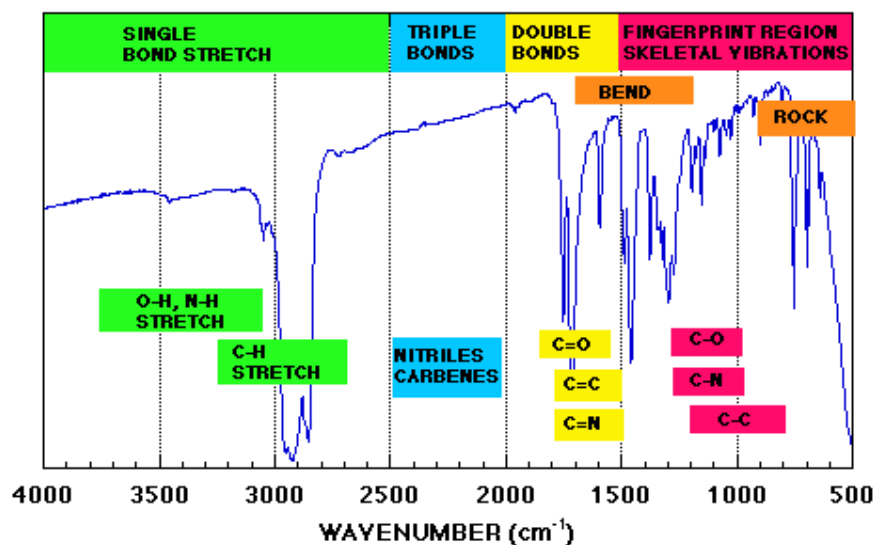


Figura 3.12: Esempio di spettro IR in trasmittanza.

Dallo spettro infrarosso è possibile trarre utili informazioni per il riconoscimento di una molecola incognita. A tal proposito, al fine di associare un legame a un dato numero d'onda, si utilizzano apposite tavole riportate in bibliografia o librerie elettroniche incluse nel software della strumentazione.

Per il seguente lavoro di Tesi è stato utilizzato uno spettrometro IR PerkinElmer (Spectrum One). Gli spettri sono stati acquisiti con la tecnica della riflettanza totale attenuata (ATR), nella regione 4000-600 cm^{-1} , 32 scansioni, risoluzione di 4 cm^{-1} .

3.5 Elettrofilatura di scaffold PBS/Cheratina

Per la realizzazione degli *scaffold* oggetto del presente lavoro di Tesi, è stato utilizzato uno strumento, illustrato in Figura 3.13, costituito da un generatore di tensione ad alto voltaggio ($\pm 30\text{KV}$, 5mA) SVH150, AlintelPowerElectronics (Italia), una siringa dotata di ago di diametro variabile tra 0.2 e 1.5 mm, contenente la soluzione polimerica da elettrofilare, una pompa per infusione KDS200, KD ScientificInc. (USA) che ha il compito di spingere lo stantuffo della siringa ad una velocità costante, ed un collettore metallico in acciaio inossidabile, collegato a terra, su cui vengono depositate le nanofibre che costituiscono il tappetino elettrofilato.



Figura 3.13: Strumentazione utilizzata per elettrofilatura.

Più in dettaglio, per quanto riguarda la soluzione di solo omopolimero, 600 mg di PBS purificato sono stati disciolti in 4 ml di esafluoro-isopropanolo, così da ottenere una soluzione al 15% peso/volume; una volta che il polimero è risultato completamente disciolto, la soluzione è stata caricata all'interno della siringa con ago dal diametro di 0.8 mm, posta poi sul portacampione a una distanza di 15 cm dal collettore. È stata poi messa in funzione la pompa per infusione, impostando il flusso a 0.03 ml/min ed applicato un campo magnetico di 20 kV. Lo stesso procedimento è stato ripetuto per le blend a base di PBS e cheratina: in questo caso le diverse quantità di PBS e cheratina sono state disciolte separatamente, ciascuna in una

quantità di esafluoro-isopropanolo tale da mantenere fissa la concentrazione del 15% peso/volume; le due soluzioni così ottenute sono state unite ed agitate insieme al fine di ottenere una soluzione omogenea, la quale poi è stata elettrofilata nelle medesime condizioni sopra descritte. Per quanto riguarda i tappetini contenenti diclofenac, tale principio attivo è stato aggiunto, in concentrazione pari a 35 mg/mL, al solvente utilizzato poi per sciogliere le due componenti della blend, che è stata elettrofilata secondo il procedimento sopra descritto. La quantità di diclofenac è stata scelta al fine di ottenere tappetini contenenti una quantità di principio attivo pari a 230 µg di diclofenac per mg di polimero.

Tali procedure, della durata complessiva di circa 40 minuti ciascuna, hanno permesso di ottenere tappetini di dimensione 15x15 cm.

3.6 Misure di miscibilità delle blend PBS/Cheratina

Le soluzioni ottenute mediante il procedimento descritto nel paragrafo precedente sono state utilizzate anche per la misura del grado di miscibilità delle due componenti della blend. Per far ciò, in primo luogo è stata calcolata la viscosità delle soluzioni mediante un reometro Anton Paar MCR 102, dotato di un dispositivo per il controllo della temperatura (PDT 200/56/1, Peltier) impostato alla temperatura di 25 °C, utilizzando una geometria di tipo piatto-cono (Figura XX) e velocità di deformazione controllata.

Utilizzo questo tipo di geometria il valore del gradiente di scorrimento γ , ad ogni raggio r , è dato dal rapporto tra la velocità del piatto in movimento Ω e la distanza tra i piatti h :

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

dove α è l'angolo del cono.

Questa equazione sottintende che il gradiente di scorrimento è uniforme in tutto il campione. Ciò rende quindi possibile il calcolo della viscosità, considerando che essa è il rapporto tra lo sforzo tangenziale ed il gradiente di scorrimento, secondo la seguente formula:

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

dove v/h è il gradiente di scorrimento e F/A lo sforzo tangenziale. Quest'ultimo, anch'esso uniforme, può essere scritto anche come:

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

Dove M è il momento di coppia e R il raggio del piatto.

In definitiva, a partire dalle espressioni sopra riportate, l'equazione del reometro cono-piatto diventa:

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

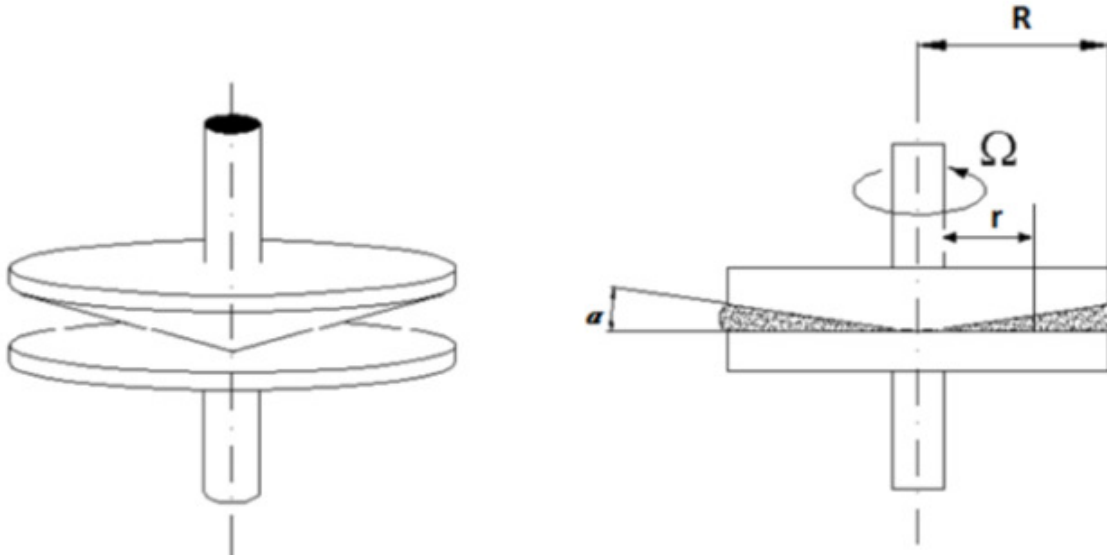


Figura 3.14: Schema del reometro cono-piatto

I valori di viscosità così ottenuti sono stati poi confrontati con quelli teorici, calcolati applicando la seguente equazione

$$\ln \eta_t = \sum w_i \ln \eta_i$$

dove w_i e η_i sono rispettivamente le frazioni ponderali e le viscosità della i -esima componente, e η_t è la viscosità totale della blend.

3.7 Caratterizzazione Termica

3.7.1 Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC)

La calorimetria a scansione differenziale o DSC (*differential scanning calorimetry*) è una delle indagini termiche maggiormente utilizzate per ottenere informazioni legate alle proprietà termodinamiche di un materiale.

Il principio di base consiste nel riscaldare o raffreddare in maniera controllata il materiale di interesse, misurando la differenza di flusso termico tra il campione in esame e quello di riferimento mentre i due sono vincolati ad una temperatura variabile definita da un programma prestabilito.

La strumentazione è costituita da due piatti dedicati all'alloggiamento di altrettante capsule, l'una contenente il campione, l'altra il riferimento, costituito da una capsula vuota (Figura 3.15).

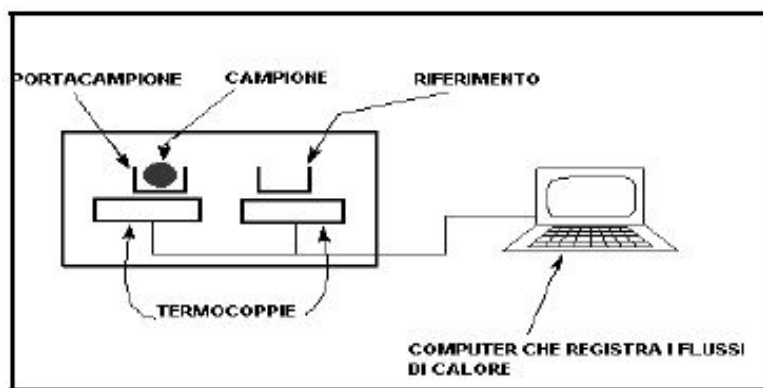


Figura 3.15: Schema degli alloggiamenti della DSC.

Gli alloggiamenti costituiscono dei microcalorimetri, mantenuti in atmosfera inerte con un flusso continuo ed uniforme di azoto.

Il flusso di calore viene regolato e controllato tramite un computer, in modo tale che le due celle siano sottoposte in ogni istante al medesimo programma termico. Quando avvengono delle transizioni nel materiale, e quindi il crogiuolo contenente il campione si trova ad una temperatura diversa rispetto al riferimento, viene immediatamente fornita energia al microcalorimetro, in modo da riportare il campione e il riferimento alla stessa temperatura. Queste variazioni sono registrate dal software e risultano essere il vero e proprio segnale DSC.

Con questo tipo di analisi si possono valutare le temperature di transizione vetrosa, di fusione, di cristallizzazione ed i calori associati a tali transizioni. Più in dettaglio, la temperatura di transizione vetrosa (T_g) si manifesta come una variazione endotermica della linea di base ed il suo valore è determinato in corrispondenza della metà della variazione di calore specifico associata alla transizione (Figura 3.16).

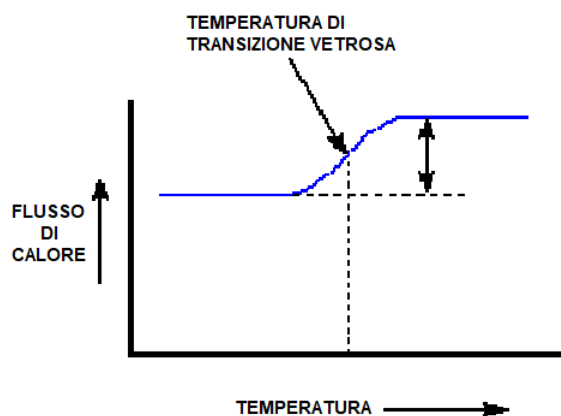


Figura 3.16: Calcolo della T_g .

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

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

dove dT/dt è la velocità di scansione.

Per quanto riguarda invece il fenomeno della fusione, esso si presenta nel tracciato come un picco endotermico; la temperatura di fusione (T_m) corrisponde all'ascissa di tale picco, mentre l'area sottesa rappresenta il calore di fusione ΔH_m , che sarà tanto più grande quanto più alto è il grado di cristallinità del materiale (Figura 3.17). Il rapporto tra quest'ultima grandezza e il calore di fusione del polimero completamente cristallino costituisce il grado di cristallinità del materiale.

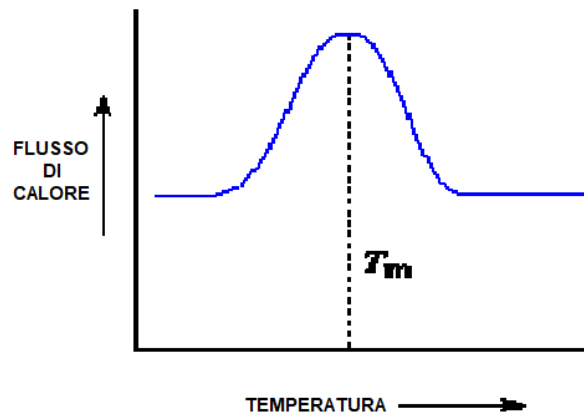


Figura 3.17: Calcolo della T_m .

Le misure DSC sono state ottenute con un DCS6 Perkin-Elmer equipaggiato di accessori per il raffreddamento a temperature minori di 0 °C e calibrato con standard ad elevata purezza. La capsula campione è stata riempita con circa 10 mg di materiale e, insieme alla capsula di riferimento lasciata vuota, è stata sottoposta al seguente programma termico:

- prima scansione: riscaldamento da -70°C a 380°C a velocità di 20°C/min, mantenimento a 200 °C per 4 minuti
- raffreddamento rapido (velocità di 100 °C/min) fino a -70°C e mantenimento a -70 °C per 15 minuti;
- seconda scansione: riscaldamento in condizioni di temperatura e velocità analoghe alla prima scansione.

Un esempio di curve DSC è riportato in Figura 3.18.

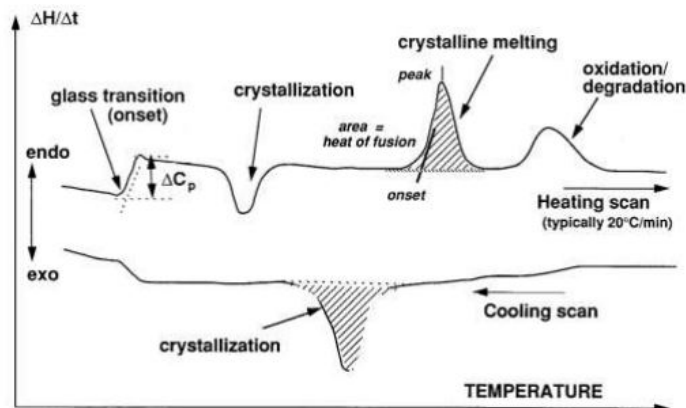


Figura 3.18: Esempio di curve DSC.

3.7.2 Analisi Termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica è una tecnica da cui è possibile ricavare informazioni sulla stabilità termica del campione, sulla sua cinetica di decomposizione e sul suo comportamento durante determinati processi termici.

Tali informazioni sono di fondamentale importanza per definire il valore di temperatura che non deve essere oltrepassato durante la lavorazione del polimero, al fine di non incorrere nella sua degradazione.

Il principio di funzionamento consiste nel riscaldamento controllato del campione, in presenza di gas di diverso tipo (aria, O₂, N₂), e nella valutazione della sua progressiva perdita di peso in funzione dell'aumento di temperatura. I cambiamenti di peso sono dovuti a perdite di sostanze volatili in seguito a processi fisici o chimici che modificano la natura del composto: nel caso dei polimeri, i prodotti di decomposizione più comuni saranno, generalmente, anidride carbonica e acqua.

La strumentazione è composta da una bilancia analitica (dalla portata in genere compresa tra 5 e 20 mg), un forno in grado di riscaldare il campione a velocità controllata, un sistema di gas di spurgo per assicurare un'atmosfera inerte e da un elaboratore per il controllo dello strumento, l'acquisizione e la visualizzazione dei dati (Figura 3.19).

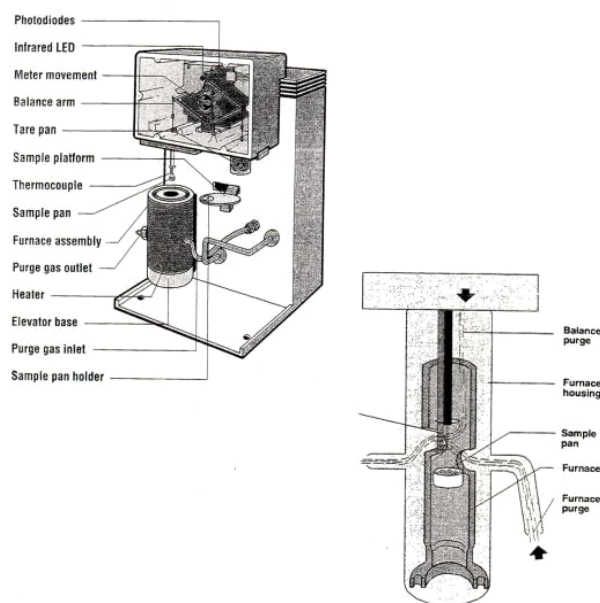


Figura 3.19: Strumentazione per TGA.

Da un termogramma è possibile ricavare:

- T_{onset} : temperatura in corrispondenza della quale inizia il processo di degradazione;
- T_{max} : temperatura alla quale si rileva la massima velocità di perdita di peso.

Le curve TGA sono state ottenute usando la bilancia termo gravimetrica PerkinElmer TGA 4000, in atmosfera di azoto partendo da circa 5 mg di campione. La velocità di riscaldamento impostata è di $+10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e la temperatura varia nell'intervallo $[40-800^{\circ}\text{C}]$. Esempi di termogrammi di materiali polimerici sono riportati in Figura 3.20.

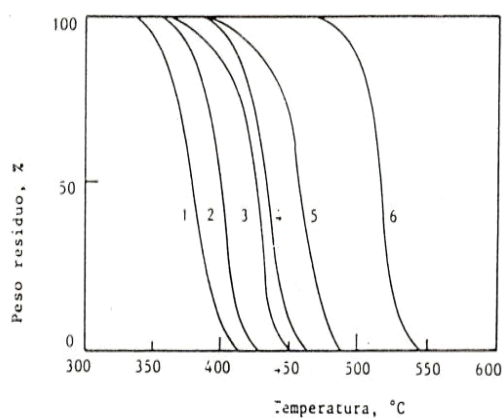


Figura 3.20: Curve termogravimetriche di: 1) poliisobutilene, 2) polistirene, 3) poli-5-fenilpentene, 4) polipropilene, 5) polietilene, 6) politetrafluoroetilene (velocità di riscaldamento: $100^{\circ}\text{C}/\text{h}$).

3.8 Caratterizzazione morfologica

3.8.1 Misure di porosità

La possibilità di disporre di materiali altamente porosi è fondamentale nella realizzazione di dispositivi per applicazioni biomedicali: ad esempio, una matrice porosa permette un efficace incapsulamento di un farmaco ed il suo successivo rilascio, mentre per applicazioni in ingegneria tissutale un substrato caratterizzato da elevata porosità contribuisce ad una migliore adesione cellulare, oltre a garantire un efficace passaggio di sostanze nutrienti attraverso il costruito.

Nel presente lavoro di Tesi, le prove di porosità sono state condotte su tappetini elettrofilati di forma quadrata, aventi dimensioni di 1 cm². In particolare, assumendo che le fibre possano essere considerate dei cilindri di infinita lunghezza, l'area superficiale specifica (SSA) può essere calcolata con la seguente equazione:

$$SSA = 4/\rho D$$

dove D (cm) è il diametro medio delle nanofibre e ρ (g/cm³) è la densità del tappetino nanofibroso. A sua volta, la densità è stata calcolata sulla base della differenza di peso del tappetino misurata sia in aria che in dodecano, secondo la seguente equazione:

$$\rho = \frac{m_1 \times \rho_D}{(m_1 - m_2)}$$

dove m_1 è la massa del campione in aria, m_2 quella in dodecano e ρ_D la densità del dodecano stesso.

Infine, la porosità (ϵ) del tappetino è stata calcolata come segue:

$$\epsilon = \frac{V_{TOT} - V}{V_{TOT}} \times 100$$

In cui V_{TOT} rappresenta il volume del tappetino calcolato a partire dall'area e dallo spessore del tappetino stesso, e V il volume reale, ottenuto dividendo la massa del campione misurata in aria per la densità.

3.8.2 Misure di rigonfiamento (*swelling*)

Il rigonfiamento dei polimeri (*swelling*) è un fenomeno chimico che consiste nell'aumento del volume di un materiale, che può verificarsi, ad esempio, durante il processo di estrusione, allo sbocco della filiera, oppure sciogliendo il materiale in un solvente.

Ad esempio, quando un polimero viene sciolto in una soluzione, si generano delle forze tra i segmenti della catena ed il solvente. Esse sono di entità differente rispetto alle forze che i tratti della macromolecola sperimentavano quando si trovavano nel *bulk*. Tali interazioni dipendono dalla natura del polimero, del solvente e della temperatura.

Il grado di rigonfiamento (o *swelling*) può essere quantificato come:

- Il rapporto tra il volume del campione in stato rigonfio e il volume allo stato secco.
- Il rapporto tra il peso del campione rigonfio e quello del campione secco

Il fenomeno del rigonfiamento dei polimeri in soluzione è alla base della produzione di gel e idrogel, e più in generale per realizzare sistemi per il rilascio di farmaci; la determinazione di tale parametro è di particolare importanza, poiché da esso dipendono: il coefficiente di diffusione di un soluto attraverso l'idrogel, le proprietà e la mobilità di superficie, le proprietà ottiche (caso delle lenti a contatto) e meccaniche.

Nel presente lavoro di Tesi, i campioni utilizzati per gli studi di rigonfiamento sono stati prima essiccati per una notte a 40 °C e poi pesati. Successivamente sono stati immersi in tampone fosfato (pH 7.4), mantenuti in incubazione a 37 °C fino al raggiungimento di un peso costante, e quindi pesati, ponendo particolare attenzione ad eliminare il liquido superficiale mediante carta da filtro.

Il rapporto di rigonfiamento (*swelling ratio*) è stato calcolato mediante la seguente formula:

$$Swelling\ Ratio = \frac{w_w - w_D}{w_D}$$

Dove w_w e w_D rappresentano, rispettivamente, il peso del campione imbevuto e del campione asciutto.

3.8.3 Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM)

Tramite la microscopia elettronica a scansione (SEM) è possibile analizzare e studiare la morfologia superficiale di un campione.

La peculiarità dei microscopi elettronici rispetto a quelli ottici è l'utilizzo di radiazioni provenienti da elettroni, anziché da fotoni luminosi, i quali sono caratterizzati da una lunghezza d'onda minore; in questo modo si possono ottenere immagini con risoluzione molto più alta, ciò permette l'osservazione di dettagli dalle dimensioni anche inferiori al nanometro.

La struttura del sistema SEM è illustrata in Figura 3.21: è presente innanzitutto un generatore di elettroni, detto cannone elettronico, nel quale un filamento in tungsteno, portato ad un elevato potenziale, si riscalda per effetto Joule liberando elettroni, che vengono a loro volta accelerati verso il basso. Al fine di focalizzare gli elettroni verso il basso, evitando che si disperdano in diverse direzioni, vengono poste delle lenti collimatrici che assicurano la convergenza sul campione. È inoltre presente un sistema di quattro bobine di scansione, il quale fa scorrere il fascio su tutta la superficie del campione, inviando contemporaneamente al sistema esterno di elaborazione il segnale corrispondente al fascio incidente su ogni porzione di superficie del campione. Altre quattro bobine di correzione servono per omogeneizzare il campo magnetico e mantenerne, con un sistema di controllo in retroazione, la simmetria cilindrica. Prima e dopo tali bobine, il fascio incontra una serie di lenti collimatrici, che servono a focalizzare il fascio stesso e ad aumentare la luminosità finale dell'immagine. L'interno del tubo elettronico appena descritto, è posto, tramite apposite pompe da vuoto, a pressioni molto basse (10^{-4} mmHg). Il fascio di elettroni investe il campione, posto su un supporto mobile, per poi colpire una serie di lenti che lo proiettano su un primo schermo fluorescente, che converte il segnale elettronico in luce visibile, generando così la cosiddetta immagine intermedia, ed in seguito su un secondo schermo, dal quale si ottiene l'immagine finale all'ingrandimento desiderato, visualizzabile su uno schermo digitale.

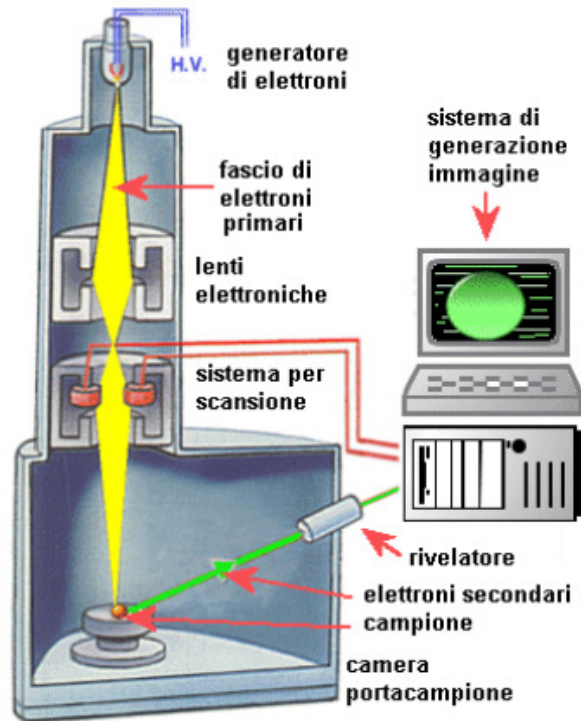


Figura 3.21: Struttura del SEM.

Per quanto riguarda la preparazione dei campioni, la procedura generale è la seguente: il campione viene montato su un apposito supporto (*stub*) di materiale conduttore (in genere alluminio) e incollato con un materiale adesivo (pasta di argento o nastro biadesivo di grafite). Nel caso di materiali non conduttori, essi vengono sottoposti ad un processo di ricoprimento con un sottile strato di materiale conduttore (metallizzazione dei campioni).

Lo strumento utilizzato per l'analisi è un microscopio Zeiss EVO LS LaB6. Le immagini SEM sono state acquisite utilizzando un voltaggio di 5 kV ed una distanza di lavoro di 5 mm, su campioni metallizzati con oro collegato a massa, allo scopo di scaricare l'eventuale deposito superficiale di elettroni sul campione, che lo renderebbe invisibile al microscopio. L'analisi d'immagine è stata effettuata con il software GIMP 2.8 (*GNU Image Manipulation Program*). La distribuzione dei diametri delle fibre elettrofilate è stata calcolata misurando il diametro di 150 fibre per ogni campione analizzato.

3.9 Caratterizzazione meccanica

Le misure di resistenza meccanica permettono di studiare il comportamento dei materiali in presenza di sollecitazioni meccaniche di diverso tipo. In particolar modo, quando si vuole indagare la resistenza di un materiale alla trazione, vengono eseguite prove tensili.

Le proprietà meccaniche di un materiale si deducono dal grafico sforzo-deformazione (o grafico σ - ε), in cui viene registrata la tensione esercitata sul materiale in funzione della deformazione subita. Più precisamente, si definisce lo sforzo σ come il rapporto tra il carico applicato in direzione normale (N) e l'area della sezione del provino resistente a riposo (A):

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

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

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

La strumentazione con cui si effettuano tali prove è costituita da un dinamometro schematizzabile in alcuni sottocomponenti (Figura 3.22):

- Una base rigida con aggancio rigido;
- Due aste laterali di sostegno;
- Una traversa orizzontale con aggancio superiore che può spostarsi verticalmente lungo le barre laterali;
- Un attuatore meccanico che controlla il moto della struttura superiore;
- Un pannello di controllo;
- Un visualizzatore a video.



Figura 3.22: Strumentazione per prove meccaniche a trazione.

Un tipico andamento, nel caso di materiali polimerici, è riportato in Figura 3.23.

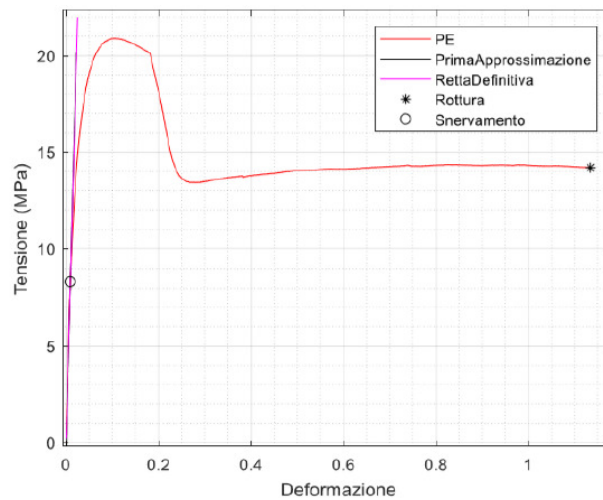


Figura 3.23: Esempio di diagramma σ - ϵ per un polimero duttile (polietilene).

È possibile individuare, su tale grafico, due regioni distinte: il campo elastico e quello plastico, al superamento del punto di snervamento (o *yielding*). Il punto finale della curva coincide con il momento in cui il materiale si rompe.

Il campo elastico è contraddistinto da un tratto lineare, approssimabile ad una retta. Tensione e deformazione sono direttamente proporzionali, ed il fattore di proporzionalità che li lega è il modulo elastico (E) o modulo di Young, in accordo con la legge di Hooke:

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

Se il materiale viene deformato all'interno della zona lineare, non presenterà nessun tipo di deformazione irreversibile al termine dell'applicazione del carico; questa condizione si verifica se il valore di tensione applicata rimane al di sotto di un determinato valore limite, chiamato limite di snervamento. Oltre tale punto, il materiale manifesta una deformazione plastica irreversibile che cresce all'aumentare del carico applicato, causata dallo scorrimento dei piani reticolari all'interno del materiale. Se si scarica il provino una volta che è stato snervato, il grafico percorrerà a ritroso una retta parallela al tratto lineare, che parte dal punto di rilascio del carico; l'intersezione tra tale retta e l'asse delle ascisse è la deformazione residua, che ci dà informazioni su quanto il materiale si è snervato.

Oltre il punto di snervamento, si entra nella regione plastica, caratterizzata da una grande deformazione per piccoli incrementi di tensione. In questa zona, il provino manifesta un restringimento della sua sezione all'aumentare dello sforzo applicato (Figura 3.24). All'aumentare del carico, si giungerà infine al punto di rottura.

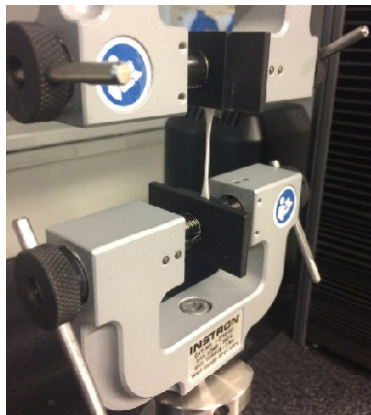


Figura 3.24: Restringimento della sezione trasversale di un campione sottoposto a trazione.

Naturalmente questa descrizione è applicabile ai soli materiali duttili, poiché i materiali fragili sono caratterizzati da un unico tratto rettilineo, che termina nel punto di rottura.

Studiando l'area sottesa all'intero grafico, è possibile ricavare anche il valore della tenacità, che coincide con l'energia necessaria per portare a rottura il materiale o, in altre parole, l'energia che il campione assorbe prima di rompersi.

Occorre tenere presente che i dati ottenuti, oltre ad essere funzione del materiale utilizzato nel test, risentono anche delle condizioni ambientali, quali temperatura e umidità, e delle condizioni sperimentali, come velocità di scorrimento, forma e dimensione dei provini.

Le prove meccaniche sono state condotte utilizzando un dinamometro Instron 4465 con cella di carico di 10 KN. Lo strumento è costituito da una struttura rigida di base e una traversa mobile posta nella parte superiore. A partire dagli *scaffold* polimerici, sono state ottenute striscioline rettangolari dalle dimensioni di 5x50 mm, il cui spessore è stato misurato in tre punti diversi per mezzo di un micrometro (Mitutoyo): lo spessore utilizzato ai fini dell'analisi è stato ottenuto operando una media sulle tre misure. I provini sono stati dunque fissati per mezzo di agganci, in maniera tale da presentare un tratto utile di 20 mm, e l'applicazione del carico è avvenuta tramite il movimento verso l'alto della struttura superiore (Figura 3.25); il valore della tensione applicata viene misurato direttamente dalla cella di carico, mentre l'allungamento è stato determinato sulla base della distanza percorsa dalla traversa mobile. Tali prove sono state condotte a temperatura ambiente, su 6 provini diversi, con velocità pari a 10 mm/min. Il modulo elastico, calcolato dalla pendenza del tratto iniziale della curva sforzo-deformazione ottenuta, è stato riportato come valore medio \pm deviazione standard delle 6 prove.



Figura 3.25: Esempio di prova a trazione su un campione di PBS elettrofilato.

3.10 Studi di degradazione enzimatica

Al fine di studiare il comportamento dei polimeri oggetto della presente Tesi in condizioni fisiologiche, ed in particolare la loro velocità di degradazione, sono state condotte delle prove di degradazione enzimatica, il cui scopo è quello di simulare l'attacco che il materiale potrebbe ricevere all'interno del corpo umano.

Gli esperimenti di degradazione enzimatica sono stati condotti in condizioni di temperatura e pH fisiologici, su porzioni di *scaffold* di circa 10 mg dei campioni: PBS, PBS75KER25, PBS50KER50e PBS25KER75 in presenza di tripsina. L'enzima è stato aggiunto ad una soluzione tampone (pH 7.4) in concentrazione pari a 500µg/ml. I campioni sono stati inizialmente pesati e inseriti in provette contenenti una quantità di soluzione acquosa tamponata tale che all'interno di ogni provetta fosse presente una quantità di tripsina pari a 2.5µg/mg di campione. Sono stati poi mantenuti ad una temperatura costante di 37 °C per periodi di tempo variabili, fino ad un massimo di tre settimane, provvedendo a cambiare la soluzione enzimatica quotidianamente, per garantire la piena attività dell'enzima.

Periodicamente i campioni sono stati rimossi in triplicato dalla soluzione, lavati con acqua distillata, centrifugati e lasciati ad asciugare fino al raggiungimento di un peso costante.

Il peso residuo percentuale è stato calcolato attraverso la seguente equazione:

$$m_{res}(\%) = 100 - \left(\frac{m_{in} - m}{m_{in}} \cdot 100 \right)$$

Dove m è il peso del campione misurato dopo il processo di degradazione mentre m_{in} è il peso iniziale.

3.11 Studi di biocompatibilità

La biocompatibilità, intesa come capacità di un materiale di indurre una reazione favorevole per una specifica applicazione, è una grandezza difficilmente misurabile, che spesso viene stabilita mediante verifica di una soddisfacente prestazione clinica. Tenendo presente che la biocompatibilità è strettamente legata all'interazione tra materiali e sistema vivente, è necessario definire procedure, incentrate sulla risposta del materiale e dell'organismo ospite, che possano essere di supporto nella scelta e nella progettazione di un dispositivo destinato ad una data applicazione clinica.

Per quanto riguarda lo studio di biocompatibilità effettuato nel presente lavoro di Tesi, gli esperimenti di vitalità cellulare sono stati condotti su fibroblasti provenienti da embrione di topo (NIH-3T3/GFP). Le cellule NIH-3T3/GFP sono state coltivate in condizioni standard in un terreno composto da DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) a cui è stato aggiunto siero fetale bovino (FBS) in quantità pari al 10% v/v, 2mM di L-glutamina, 0.1 mM di amminoacidi non essenziali (NEAA) MEM, 100 U/mL di penicillina e 100 U/mL di streptomicina, all'interno di un incubatore impostato a 37 °C e con una percentuale di CO₂ pari al 5%.

Le cellule sono state seminate su pezzetti di *scaffold* di solo PBS e della blend PBS50KER, scelta come campione rappresentativo delle diverse miscele per via della sua composizione intermedia, all'interno di multi-well contenenti 24 pozzetti ciascuna, con una densità pari a 10⁵ cellule/cm². Per determinare il numero di cellule vive adese ad ogni tipo di materiale, si è utilizzata resazurina, aggiunta direttamente al medium di coltura in quantità pari al 10% del terreno totale presente in ciascun pozzetto. Dopo un periodo di incubazione di 4 ore a 37 °C ed in presenza del 5% di CO₂, aliquote di ciascun campione sono state prelevate e trasferite in piastre da 96 pozzetti per le misure in fluorescenza ($\lambda = 560 - 590$ nm) (ThermoScientificVarioskan Flash Multimode Reader). Nelle analisi sono stati inclusi anche un controllo negativo, costituito da solo terreno di coltura senza cellule, in modo da determinare il segnale di background, ed un controllo positivo, dato da resazurina in assenza di cellule.

3.12 Prove di rilascio di farmaco

Gli studi di diffusione *in vitro* di diclofenac sono stati condotti utilizzando il dispositivo *Vertical Diffusion Cells* (VDC Franz-type). Questo dispositivo, che serve a mimare il rilascio di un principio attivo attraverso la pelle, è costituito da un supporto per il campione da testare e da una camera di diffusione, dal volume di 7ml, contenente il mezzo recettore, nel caso in esame tampone fosfato a pH 7.4. Le due parti sono separate da una membrana attraverso cui avviene la diffusione e che serve a contenere il campione in esame. Per questo tipo di prove è stata utilizzata la membrana Strat-MTM, costituita da tre strati polimerici che creano una struttura porosa con un gradiente di porosità e diffusività attraverso la membrana. La struttura porosa è impregnata di una miscela brevettata di lipidi sintetici, che conferisce proprietà simili a quelle della pelle. Durante tutto l'esperimento la camera di

diffusione viene mantenuta alla temperatura costante di 32 °C (prossima alla temperatura della pelle), con un'agitazione di 600 rpm.

I cerotti realizzati con PBS e con la blend PBS50KER50 (anche in questo caso la composizione intermedia è stata scelta come blend di riferimento) contenenti diclofenac sono stati opportunamente tagliati per coprire completamente l'area di diffusione della membrana, pari a 1.766 cm². A intervalli di tempo predeterminati (6 e 8 h), aliquote di volume pari a 0.2 ml sono state prelevate dal mezzo recettore e sostituite con un volume uguale di tampone fresco. Il contenuto di diclofenac in ciascuna aliquota è stato poi analizzato mediante HPLC.

Per l'analisi HPLC è stata utilizzata una miscela di tampone fosfato pH 2 e acetonitrile (rapporto 50:50) come fase mobile, con una portata di 1 ml / min in un Agilent Poroshell 120 EC-C18, 100x4,6 mm, 2,7 µm colonna (Agilent, USA). Il volume di iniezione è stato di 20 µL e il rilevamento è stato effettuato a 276 nm (lampada UV) mantenendo il sistema di analisi a temperatura ambiente.

La quantità di diclofenac rilasciato (AR, µg/cm²) è stata calcolata mediante le seguenti equazioni:

$$AR_{t_1} = \frac{C_{t_1} * 1000 * V_c}{A_o}$$
$$AR_{t_n} = \frac{C_{t_n} * 1000 * V_c}{A_o} + (AR_{t_{n-1}} * \frac{V_s}{V_c})$$

dove C_t(mg/ml) rappresenta la concentrazione di diclofenac calcolata al generico tempo t, V_c (ml) il volume della camera di diffusione, A_o(cm²) l'area superficiale del campione e V_s(0.2 ml) il volume dell'aliquota prelevata.

4. Risultati e Discussione

A temperatura ambiente, il poli(butilene succinato) PBS si presenta come solido semicristallino di colore giallo chiaro (Figura 4.1). La leggera colorazione è dovuta alla presenza del catalizzatore (TBT). Infatti, dopo purificazione, lo stesso materiale diventa bianco assumendo una forma a “fiocchi”. Lo *scaffold* ottenuto per elettrofilatura si presenta come un solido poroso bianco e piuttosto flessibile, così come i tappetini di PBSKER7525, PBSKER5050 e PBSKER2575 ottenuti miscelando il PBS e la cheratina in varie percentuali (rispettivamente 75:25, 50:50 e 25:75 in peso). Ciò che differenzia i tappetini elettrofilati ottenuti a partire dalle diverse miscele è la differente fragilità. Per quanto riguarda la cheratina (KER), essa si presenta come una polvere bianca altamente cristallina, da cui non è stato possibile ottenere un tappetino mediante elettrofilatura. Il materiale risulta infatti estremamente fragile e rigido e dunque non processabile.



Figura 4.1. PBS appena scaricato dal reattore.

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

4.1 Caratterizzazione molecolare

4.1.1 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)

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

Lo spettro mostra, infatti, oltre ai segnali del solvente a δ 7.25 ppm e del riferimento a δ 0 ppm, i segnali caratteristici del PBS: a δ 4.19 ppm e a δ 1.70 ppm sono registrati i segnali dei protoni metilenici della sub-unità glicolica, rispettivamente *b* (tripletto) e *c* (multipletto), mentre a δ 2.61 ppm si trova il singoletto assegnabile agli idrogeni della sub-unità acida, *a*.

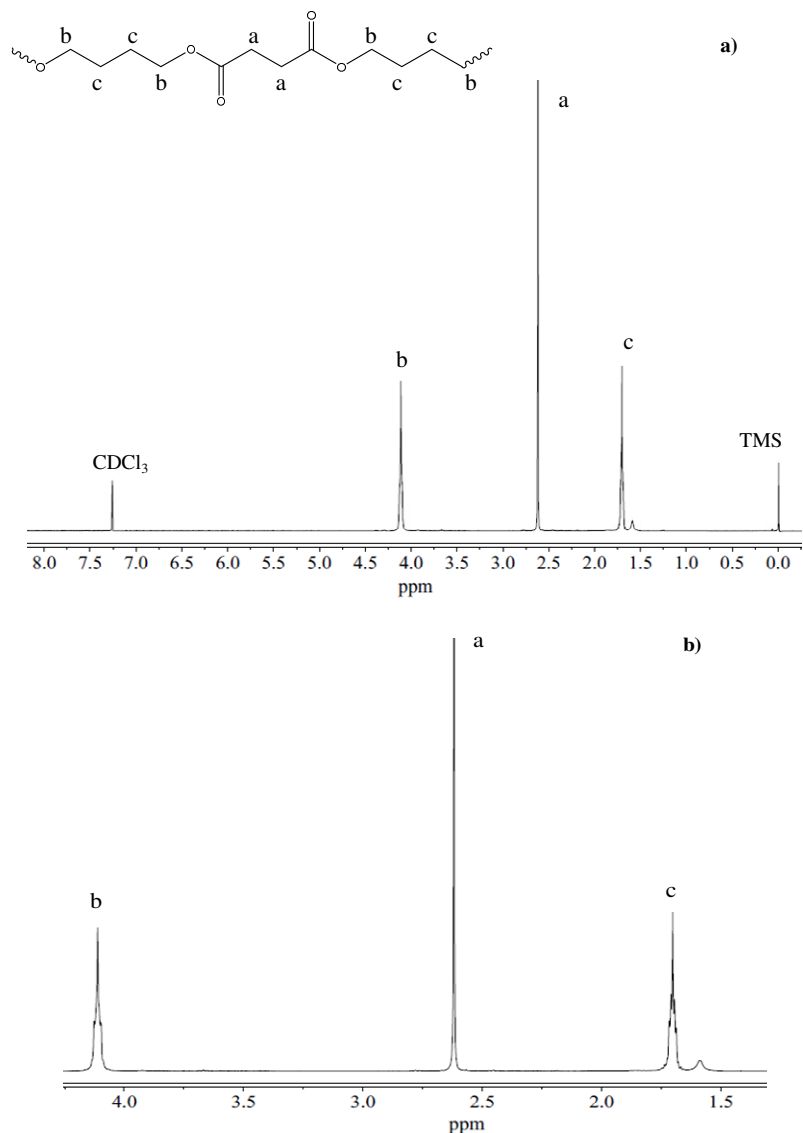


Figura 4.2: a) Spettro ¹H-NMR del PBS con attribuzione dei picchi; b) Ingrandimento della regione compresa tra 1 e 4.5 ppm.

Dalla misura di peso molecolare effettuata tramite GPC sul campione PBS, è emerso come il materiale sintetizzato sia caratterizzato da un peso molecolare elevato ($M_n = 50000$ g/mol) e da un indice di polidispersità *D* caratteristico dei poliesteri ottenuti per policondensazione in massa ($D = 2.1$) ad indicare un buon controllo del processo di sintesi.

4.1.2 Spettroscopia infrarossa (FTIR)

Gli spettri ottenuti (analizzati in trasmittanza percentuale T%) mediante spettroscopia infrarossa (FTIR) sui campioni elettrofilati sono riportati in Figura 4.3. Per quanto riguarda la cheratina, il relativo spettro mostra alcuni picchi caratteristici: quello dell'ammide A (3280 cm^{-1}) associato alle vibrazioni di *stretching* dei legami N-H, e quelli delle ammidi I e II, rispettivamente a 1640 cm^{-1} e 1520 cm^{-1} , legati alle vibrazioni di *stretching* dei due legami C=O e C-H. Per quanto riguarda il PBS, invece, il picco particolarmente accentuato collocato a 1713 cm^{-1} è attribuibile allo *stretching* del legame C=O dell'estere carbonilico, mentre il picco a 1150 cm^{-1} è dovuto alle vibrazioni di *stretching* del legame C-O-C. Inoltre, i picchi a 2946 cm^{-1} and 2860 cm^{-1} possono essere assegnati alle vibrazioni dei C-H lungo il piano in cui si trovano le catene di PBS. Se si osservano gli spettri delle varie miscele, si può notare come siano presenti i picchi tipici di entrambi i polimeri di riferimento, con intensità variabile in funzione della composizione della blend: ad esempio, i picchi a 3280 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} e 1520 cm^{-1} , associati alla presenza di cheratina, sono molto ben visibili nei tappetini ottenuti a partire dalle miscele PBSKER2575 e PBSKER5050, mentre nel tappetino PBSKER7525, più ricco in PBS, è possibile individuare più facilmente i picchi relativi a quest'ultimo, in particolare quelli a 1713 cm^{-1} e 1150 cm^{-1} .

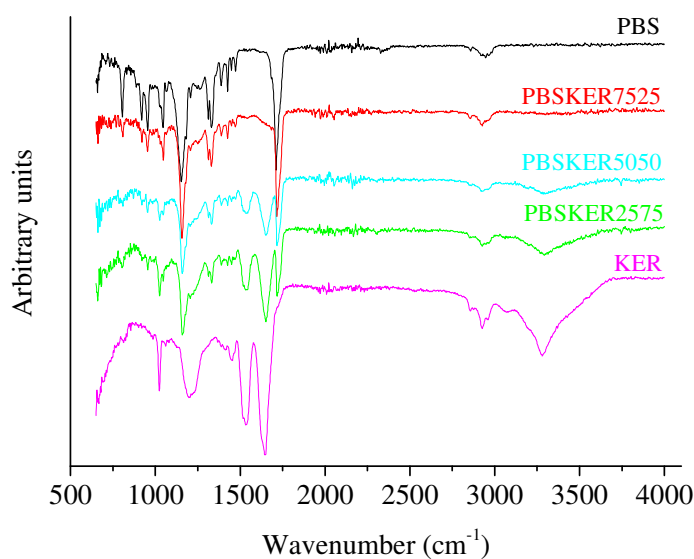


Figura 4.3: Spettri FTIR dei tappetini elettrofilati ottenuti a partire da PBS, cheratina e relative blend.

4.2 Prove di miscibilità

Come mostrato in Figura 4.4a, la soluzione ottenuta a partire da solo PBS in esafluoro-isopropanolo risulta omogenea, trasparente e di colore giallo chiaro, mentre le soluzioni ottenute a partire dalle blend, indipendentemente dalla loro composizione, sono opache e di colore bianco (Figura 4.4b); nonostante ciò, le fibre di cheratina sembrano ben disperse, in quanto non sono visibili agglomerati all'interno delle soluzioni.

Al fine di valutare il grado di miscibilità delle diverse soluzioni, i valori di viscosità ottenuti da misure reologiche sono stati comparati con quelli teorici, secondo la procedura descritta nel Paragrafo 3.6.

Come si può osservare in Figura 4.4c, che riporta il valore della viscosità in funzione della frazione di cheratina presente, le misure sperimentali mostrano una deviazione negativa rispetto ai valori teorici, ad indicare la presenza di fenomeni repulsivi tra cheratina e PBS che limitano fortemente la miscibilità tra le soluzioni.

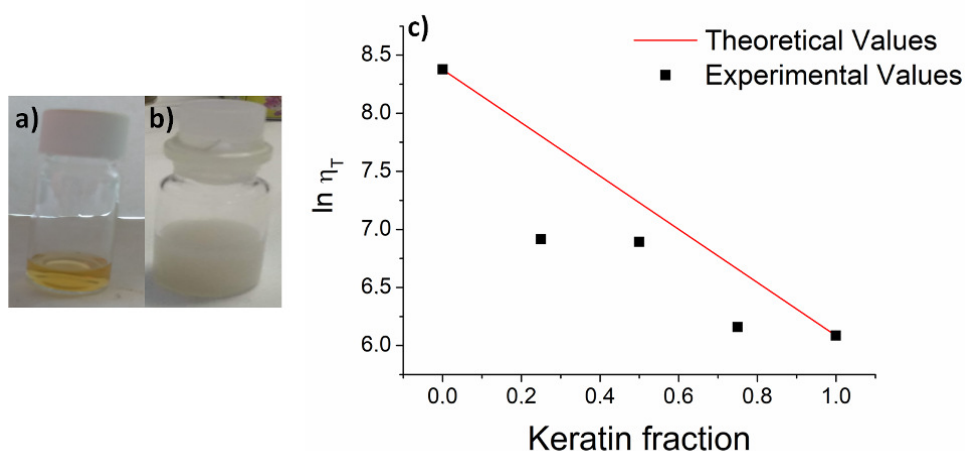


Figura 4.4: Soluzioni ottenute a partire da solo PBS (a) e da PBS con cheratina (b); confronto tra i valori di viscosità sperimentali e quelli teorici di soluzioni contenenti diversa percentuale di cheratina (shear rate: 86 s^{-1}).

Occorre comunque tenere presente, che, nonostante i risultati sopra riportati indichino una limitata compatibilità tra i due polimeri oggetto del presente studio, è stato comunque possibile ottenere delle membrane elettrofilate in grado di autosostenersi e caratterizzate da buona processabilità, contrariamente a quanto ottenuto a partire dalla sola cheratina.

4.3 Caratterizzazione Termica

La caratterizzazione termica dei materiali elettrofilati è stata condotta mediante analisi termogravimetrica (TGA) e calorimetria a scansione differenziale (DSC).

4.3.1 Analisi Termogravimetrica (TGA)

Le curve TGA dei tappetini studiati, PBS, KER e relative miscele (PBSKER7525, PBSKER5050 e PBSKER2575) sono riportate in Figura 4.5, mentre le temperature corrispondenti all'inizio della degradazione e alla velocità di massima perdita di peso sono raccolte in Tabella 4.1.

Il PBS puro risulta il materiale termicamente più stabile, mentre la cheratina pura il meno stabile. Più in dettaglio, la curva TGA della cheratina presenta tre step, il primo si manifesta a partire da 63°C, il secondo da 213 °C, l'ultimo da 244 °C. Le prime due perdite di peso sono dovute all'acqua legata alla cheratina mediante:

- Interazioni fisiche ($T_{id} \approx 63^{\circ}\text{C}$)
- Legami a idrogeno ($T_{id} \approx 213^{\circ}\text{C}$).

L'ultimo step è invece ascrivibile al vero e proprio processo di degradazione della proteina. Nel caso del PBS, invece, la perdita di peso avviene in un unico stadio, e si verifica a temperature più elevate rispetto alla cheratina pura (T_{id} e T_{max} rispettivamente pari a 363 e 398 °C). Le miscele presentano stabilità intermedie, coerentemente con la loro composizione: si può infatti notare che la miscela PBSKER7525, più ricca in PBS, mostra una stabilità termica simile all'omopolimero PBS, con perdita di peso in due step e T_{max} pari a 394 °C, la più elevata tra le blend (Tabella 4.1). Viceversa, le due blend più ricche in cheratina (PBSKER5050 e PBSKER2575) presentano un profilo di degradazione a tre step, simile a quello della cheratina pura, nonostante siano caratterizzate, rispetto ad essa, da una T_{max} più elevata (379 e 364 °C vs. 324 °C), ad indicare come la presenza di PBS, anche in basse percentuali in peso, contribuisca a migliorare la stabilità termica delle blend.

Per quanto riguarda il peso residuo, esso è praticamente nullo nel caso del PBS, mentre per la cheratina si attesta intorno al 20%. Anche in questo caso i campioni delle miscele si collocano in posizioni intermedie, a seconda della percentuale di cheratina contenuta.

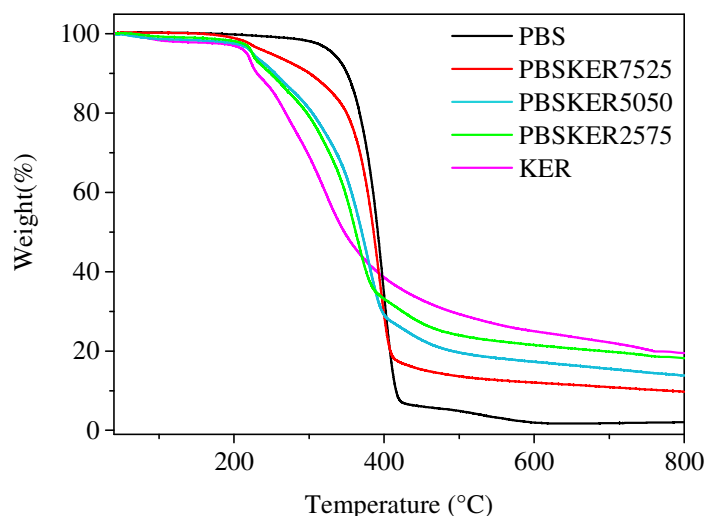


Figura 4.5: Curve termogravimetriche dei vari campioni (PBS, KER e miscele PBSKER7525, PBSKER5050 e PBSKER2575).

Tabella 4.1: dati di caratterizzazione termica (TGA e DSC) dei materiali elettrofilati.

Campioni	T_{id} °C	T_{max} °C	I scan						II scan			
			T_g °C	ΔC_p J/g°C	T_d °C	T_m °C	ΔH_d J/g	ΔH_m J/g	T_g °C	ΔC_p J/g°C	T_m °C	ΔH_m J/g
PBS	363	398	-32	0.193	-	114	-	64	-32	0.251	114	53
PBSKER7525	205 353	394	-32	0.201	62 220	112	40 7	44	-32	0.224	110	42
PBSKER5050	64 212 309	379	-30	0.125	68 226	111	71 19	27	-30	0.160	110	19
PBSKER2575	64 214 295	364	-31	0.146	72 227	110	90 26	21	-31	0.151	109	14
KER	63 213 244	324	-	-	88 226 269	-	229 48 16	-	-	-	-	-

4.3.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

I campioni elettrofilati sono stati poi sottoposti ad analisi calorimetrica. I dati relativi alle curve calorimetriche di prima e seconda scansione sono riportati in Tabella 4.1, mentre i tracciati DSC di prima e seconda scansione sono mostrati in Figura 4.6.

In prima scansione (Figura 4.6a), il campione PBS risulta semicristallino: la corrispondente curva calorimetrica è infatti caratterizzata da una variazione endotermica della linea di base associata alla transizione vetrosa, caratteristica della

porzione amorfa del materiale, al di sotto di temperatura ambiente ($T_g = -32^\circ\text{C}$), seguita da un picco endotermico a più alta temperatura, relativo alla fusione della porzione cristallina presente nel materiale ($T_m = 114^\circ\text{C}$).

La curva DSC della cheratina pura presenta invece tre picchi endotermici di diversa intensità e forma: il primo, molto allargato e centrato intorno a 88°C , è legato all'evaporazione dell'acqua legata alla proteina, il secondo, di minore intensità, a 226°C , è dovuto alla denaturazione delle strutture secondarie (principalmente α -eliche), mentre il terzo, a più alta temperatura ($T_d = 269^\circ\text{C}$) è imputabile al processo di degradazione, in accordo con i dati ottenuti dall'analisi TGA (Tabella 4.1). Per quanto concerne i tappetini contenenti sia PBS che cheratina, il corrispondente tracciato DSC mostra sia i fenomeni endotermici caratteristici della cheratina (T_d), ad eccezione del picco a più alta temperatura, che le transizioni tipiche del PBS (T_g e T_m), con intensità variabile in funzione della composizione della miscela.

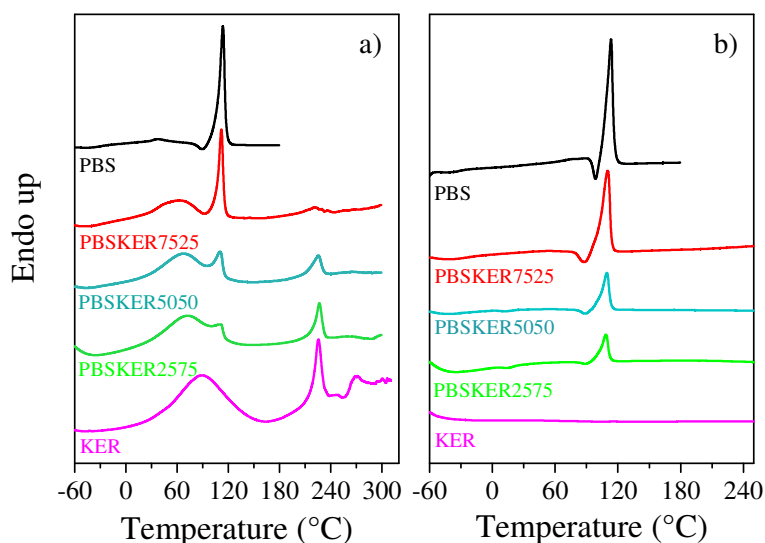


Figura 4.6: Curve DSC dei tappetini a base di PBS, cheratina e relative miscele: a) I scan (20 °C/min); b) Il scan (20 °C/min) dopo rapido raffreddamento dal fuso.

I campioni sono stati anche sottoposti a una seconda scansione calorimetrica dopo rapido raffreddamento “*quenching*” dal fuso (Figura 4.6b). Per quanto riguarda la sola cheratina, il profilo DSC risulta piatto, in quanto durante la prima scansione la proteina è stata degradata in maniera irreversibile. Dalle curve DSC del PBS e delle miscele, invece, si evidenzia un comportamento simile a quello osservato in prima scansione per il PBS (in corrispondenza dei picchi della cheratina, anche in questo caso, la linea di base non presenta alcuna variazione, a causa dei processi di degradazione intersorsi): dopo la variazione endotermica della linea di base,

associata alla transizione vetrosa, è possibile notare un intenso picco, legato alla fusione dei cristalli di PBS. Tale picco indica che per questi campioni, nelle condizioni sperimentali adottate, la velocità di raffreddamento dello strumento è risultata inferiore alla velocità di cristallizzazione del PBS.

4.4 Caratterizzazione morfologica

Al fine di caratterizzare dal punto di vista morfologico i tappetini ottenuti per elettrofilatura sono state effettuate analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM), prove di rigonfiamento e misure di porosità. La Figura 4.7 riporta le immagini SEM di tutti i tappetini elettrofilati, con relativa distribuzione delle dimensioni delle fibre. Come già precedentemente sottolineato, nonostante l'immiscibilità dei due componenti della blend, è stato possibile realizzare tappetini elettrofilati omogenei, caratterizzati da fibre cilindriche lisce, prive di difetti e orientate in maniera casuale. L'assenza di *beads* e difetti indica la buona messa a punto del processo: lo sviluppo della fase cristallina durante l'evaporazione del solvente permette di evitare la formazione di agglomerati conferendo alle fibre solidità strutturale. Nel caso del PBS, la membrana è un intreccio di filamenti di dimensioni piuttosto diverse, variabili nel range 150-900 nm, probabilmente a causa di fenomeni di *jet-splitting*, che partono dal getto primario e causano getti secondari di dimensioni inferiori. Nel tappetino PBSKER7525 la dimensione delle fibre varia nel range 100-750 nm: la distribuzione risulta dunque piuttosto ampia, come nel caso del PBS, anche se le dimensioni dei diametri sono leggermente minori. Per quanto riguarda invece le fibre ottenute dalla blend PBSKER5050, esse sono caratterizzate da diametri di dimensioni minori rispetto ai due casi precedenti, e con una distribuzione più stretta (la dimensione delle nanofibre è compresa tra 40 e 450 nm). Infine, la membrana ottenuta a partire dalla blend PBSKER2575, più ricca in cheratina, mostra una distribuzione delle fibre piuttosto ampia, variabile nel range 150 - 650 nm, con diametri simili a quelli ottenuti per il tappetino PBSKER7525. Se si analizza questo trend in funzione delle proprietà reologiche delle relative soluzioni (Figura 4.4), sembra che diametri minori e con una distribuzione più stretta siano più facili da ottenere nel caso in cui il comportamento reologico della soluzione di partenza si avvicini a quello ideale, ovvero nel caso PBSKER5050, blend caratterizzata da una minore repulsione di interfase tra i due polimeri.

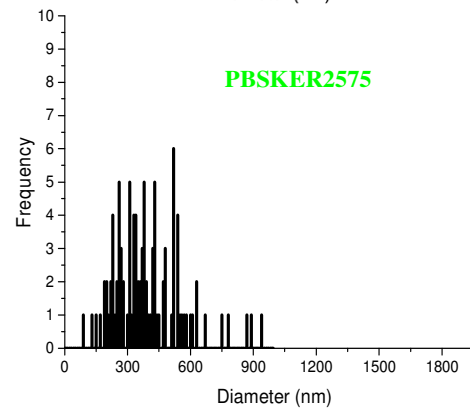
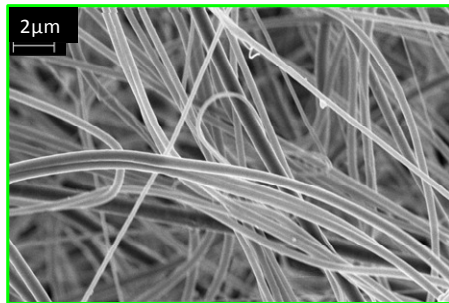
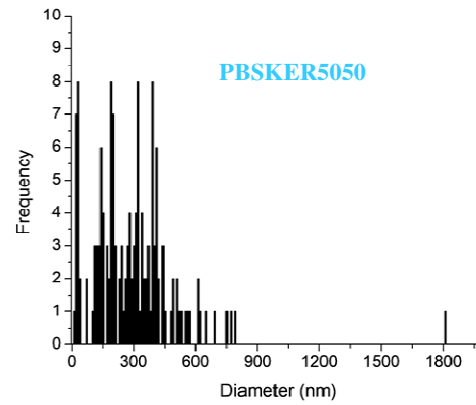
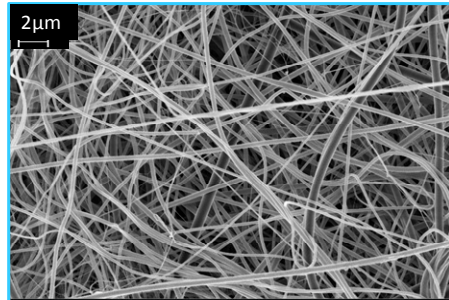
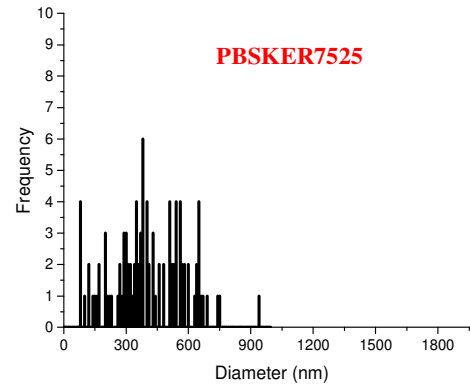
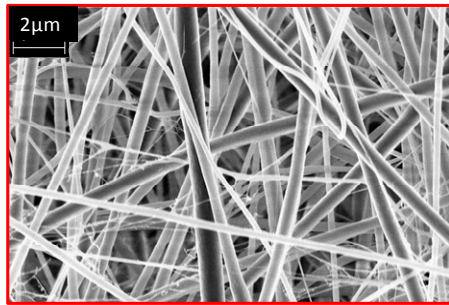
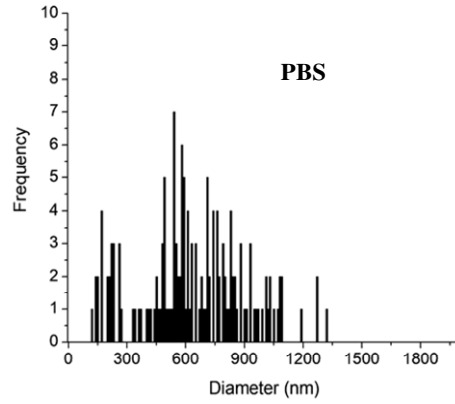
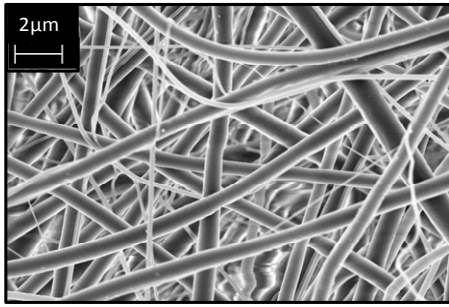


Figura 4.7. Immagini SEM dei tappetini elettrofilati e relativa distribuzione delle dimensioni delle fibre.

Per quanto riguarda la porosità %, i relativi valori, calcolati su tutti i tappetini in esame e ottenuti secondo le equazioni riportate nel Paragrafo 3.8.1, sono riportati in Tabella 4.2, insieme ai valori di viscosità (calcolati alla *shear rate* di 86 s^{-1}), diametro e spessore medio e *specific surface area* (SSA), utili per il calcolo della porosità stessa.

I tappetini nanofibrosi di solo cheratina e PBS, rispetto a quelli di solo PBS, hanno una porosità significativamente maggiore. Questo perché tali tappetini sono caratterizzati da nanofibre più fini.

Tabella 4.2: Valori di viscosità, diametro e spessore medi, SSA, porosità, peso secco e umido e *swelling ratio* dei tappetini a base di PBS e delle diverse miscele PBSKER7525, PBSKER5050 e PBSKER2575.

Campione	Viscosità (86s^{-1}) (Pa s)	Diametro (nm)	Spessore (μm)	SSA (m^2/g)	Porosità (%)	Peso secco W_d (g)	Peso umido W_w (g)	<i>Swelling Ratio</i>
PBS	4.3	640	150	1.3 ± 0.4	73 ± 7	0.0096	0.07238	6.5
PBSKER7525	1,1	412	125	1.1 ± 0.3	94 ± 3	0.0047	0.04783	9.2
PBSKER5050	1	290	65	8 ± 3	90 ± 2	0.0039	0.05651	13.5
PBSKER2575	0,47	408	65	2.4 ± 1.1	94 ± 6	0.003	0.10968	35.6

I valori di grado di rigonfiamento (*swelling ratio*), calcolati secondo la procedura descritta nel Paragrafo 3.8.2, sono riportati in Tabella 4.2.

Come si può facilmente notare dai dati, a contenuti più alti di cheratina nella miscela, corrisponde un maggiore grado di rigonfiamento del materiale. Si passa infatti da un valore di 6.5 del PBS puro al 35.6, cinque volte maggiore, della miscela più ricca in cheratina. Questo comportamento è attribuibile sia alla maggiore porosità e dunque alla maggiore area superficiale delle blend più ricche in cheratina, sia alla natura altamente polare della cheratina stessa, che favorisce la formazione di complessi stabili con le molecole d'acqua. L'introduzione di PBS non va dunque a peggiorare la proprietà della cheratina di rigonfiarsi. Tale caratteristica risulta di estrema importanza per applicazioni in ambito biomedico, ad esempio per il rilascio controllato di farmaco, oppure per l'assorbimento di essudati nel caso di bende per il wound healing.

4.5 Caratterizzazione meccanica

Le misure meccaniche *stress-strain* sono state eseguite su striscioline di *scaffold* di forma 50 x 5 x 0.1 mm, allungando un provino di forma rettangolare a velocità costante, e misurando la variazione dello sforzo in funzione della deformazione. Sono stati sottoposti a trazione solo i campioni PBS, PBSKER7525 e PBSKER5050 perché, come già detto, la cheratina è risultata troppo rigida e fragile per poter essere elettrofilata, mentre la miscela più ricca in cheratina, nonostante sia stato possibile ottenere un tappetino elettrofilato, è risultata troppo fragile per poter effettuare le prove con gli strumenti in dotazione.

In Figura 4.8 sono rappresentate le curve sforzo-deformazione, mentre in Tabella 4.3 sono raccolti i valori di modulo elastico (E), di sforzo a rottura (σ_b) e deformazione a rottura (ϵ_b).

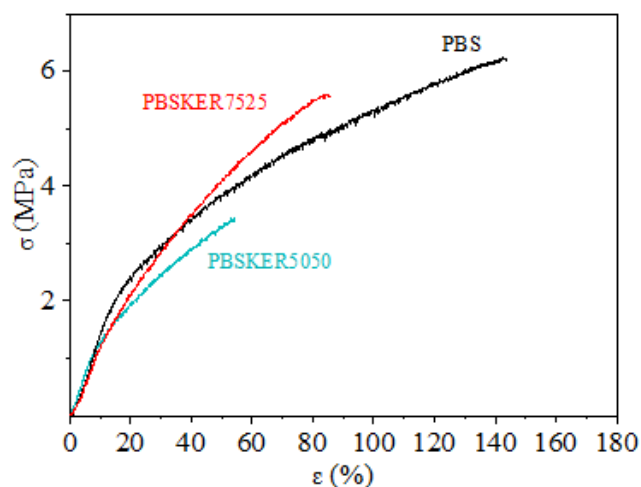


Figura 4.8: Grafico sforzo-deformazione dei campioni elettrofilati a partire da PBS, PBSKER7525 e PBSKER5050.

Tabella 4.3. Dati di caratterizzazione meccanica dei campioni elettrofilati a partire da PBS, PBSKER7525 e PBS50KER50.

Campioni	E (MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)
PBS	20 \pm 3	6 \pm 0.7	151 \pm 7
PBSKER7525	16 \pm 2	5 \pm 1	90 \pm 7
PBSKER5050	17 \pm 2	4 \pm 0.4	54 \pm 10

Come si può notare (Figura 4.8 e Tabella 4.3), i campioni analizzati mostrano valori di modulo elastico (E) e tensione a rottura (σ_b) comparabili, a conferma del fatto che è stato possibile ottenere un nuovo materiale a base di cheratina processabile, con rigidità molto simile a quella dell'omopolimero PBS e decisamente inferiore a quella

della cheratina. Per quanto riguarda l'allungamento a rottura, invece, esso risulta maggiore nel caso dello *scaffold* realizzato in solo PBS (151 vs. 90% e 54%, ovvero circa il 50% in più della miscela 75:25 e tre volte maggiore della miscela 50:50). Negli *scaffold* ottenuti miscelando PBS e cheratina il minore allungamento a rottura può essere ascritto alla presenza di due fasi difficilmente miscibili con interazioni di interfase di tipo repulsivo (Figura 4.4), che tendono a separarsi se sottoposte a sforzi di tipo meccanico. Occorre inoltre tenere presente che la cheratina è caratterizzata da una deformazione a rottura praticamente nulla.

4.8 Studi di degradazione enzimatica

L'omopolimero di riferimento PBS e tutte le blend sono stati sottoposti a esperimenti di degradazione enzimatica in condizioni fisiologiche (temperatura 37°C e pH 7.4), in presenza di tripsina. Tali esperimenti sono stati condotti al fine di valutare la tempistica di degradazione di questi materiali in previsione di un loro potenziale utilizzo come biomateriali all'interno dell'organismo. Lo studio del processo di degradazione ha previsto di sottoporre ogni campione incubato a misure di perdita di peso gravimetrico ad intervalli predeterminati, per un tempo complessivo di 21 giorni. I test sono stati condotti in triplicato. In Figura 4.9 sono riportati gli andamenti dei pesi residui percentuali dei quattro campioni in funzione dei giorni di permanenza in soluzione tampone contenente l'enzima.

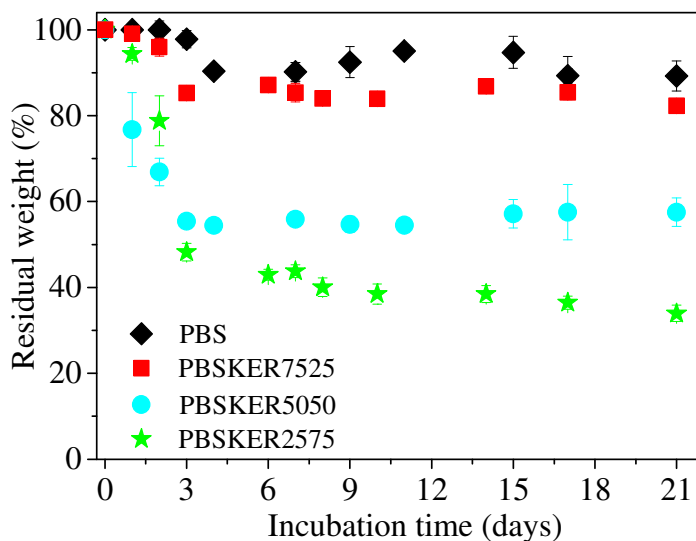


Figura 4.9. Peso residuo percentuale dei campioni PBS e delle miscele in funzione del tempo di incubazione.

Come si può notare, per il PBS la perdita di peso gravimetrico è molto limitata all'interno della finestra temporale esplorata ($\approx 8\%$): tale risultato è imputabile all'elevato grado di cristallinità e di perfezione dei cristalli, all'elevata temperatura di fusione, decisamente superiore a quella a cui sono stati condotti i test, ed infine all'idrofobicità del PBS.

Al contrario, le miscele presentano un andamento molto diverso da quello dell'omopolimero PBS: in particolare già dopo soli tre giorni di incubazione, si osserva una graduale diminuzione del peso gravimetrico, che raggiunge un valore pari a $\approx 85\%$ per quanto riguarda la miscela PBSKER7525, a $\approx 55\%$ per quanto riguarda la miscela PBSKER5050 e di $\approx 50\%$ per la miscela PBSKER2575. Dopo questa prima fase, la velocità di perdita di peso sembra raggiungere un valore di plateau, dal momento che per i restanti giorni il peso residuo rimane praticamente costante, ad eccezione del campione PBSKER2575, in cui si verifica un'ulteriore perdita di peso, per un totale di circa 65% . Tale risultato è coerente con la degradazione, da parte dell'enzima, della cheratina presente all'interno dei campioni, la quale in effetti degrada completamente entro tre giorni nelle medesime condizioni sperimentali (dati precedentemente ottenuti e non mostrati). Nel caso della blend PBSKER2575, l'ulteriore perdita di peso successiva al terzo giorno di incubazione può essere attribuita al passaggio in soluzione di catene di PBS, a seguito della degradazione della componente cheratinica, di maggior peso. Infine, il peso gravimetrico residuo è in accordo con la quantità di poli(butilene succinato) presente nelle blend.

4.7 Studi di biocompatibilità

I test di compatibilità *in vitro* sono stati condotti sull'omopolimero PBS e la blend PBSKER5050, che è stata scelta come campione rappresentativo delle tre composizioni. I campioni sono stati sottoposti a test di vitalità cellulare utilizzando come linea cellulare una popolazione di fibroblasti provenienti da embrione di topo (NIH-3T3/GFP), secondo la procedura descritta nel Paragrafo 3.11.

In Figura 4.10 è riportato l'andamento della crescita cellulare sui due materiali oggetto del presente studio, preventivamente sterilizzati, espresso come vitalità cellulare %. I dati sono rappresentati come percentuale di sopravvivenza rispetto alle stesse cellule cresciute su plastica per coltura cellulare a due diversi tempi di incubazione: 24 e 48 ore.

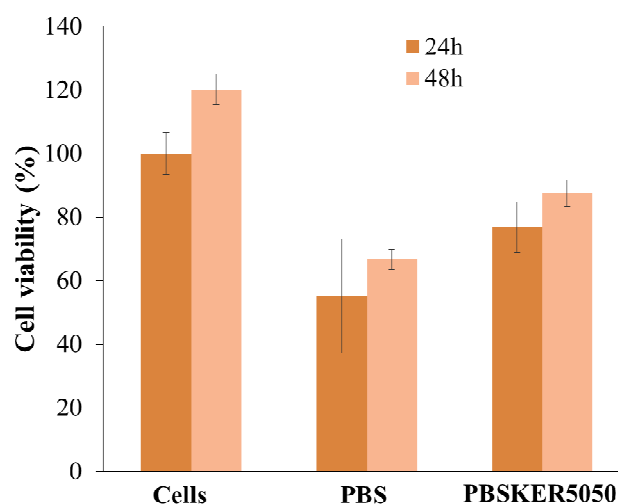


Figura 4.10. Dati di vitalità cellulare sui campioni PBS e PBSKER5050 valutata dopo 24 e 48 ore di incubazione. Cellule coltivate su plastica per coltura cellulare (Cells) costituiscono il riferimento.

Dopo 24 ore di incubazione, è possibile osservare una buona adesione cellulare sia per il PBS che per la miscela PBSKER5050, benché per quest'ultima la percentuale di adesione sia più elevata. I dati di proliferazione ottenuti a 48 ore presentano il medesimo trend, con valori di vitalità compresi tra il 67 e l'87%. Tali valori sono minori rispetto a quelli osservati per il controllo (120%), probabilmente a causa di alcuni parametri geometrici (dimensione dei pori e delle fibre) e chimici (chimica superficiale e idrofilicità) che possono influire negativamente sia sull'adesione che sulla proliferazione.

Da questi dati preliminari si evince comunque come entrambi i materiali siano in grado di supportare la crescita cellulare, risultando ottimi candidati per applicazioni in ambito di ingegneria tissutale: la presenza di PBS, poliestere alifatico sintetico biocompatibile, non ha dunque alterato la già ottima biocompatibilità della cheratina.

4.8 Prove di rilascio di farmaco

Per quanto riguarda i test di rilascio di diclofenac, essi sono stati condotti utilizzando una membrana sintetica (Strat-M™) che mimi il comportamento della cute. L'uso di pelli di origine naturale, infatti, comporta problemi legati ai notevoli costi, alla limitata disponibilità di materiale, nonché a seri problemi etici.

Anche in questo caso sono stati analizzati tappetini realizzati a partire dall'omopolimero PBS e dalla miscela PBSKER5050, caricati con diclofenac (23% in peso rispetto al peso del tappetino), noto antinfiammatorio comunemente utilizzato per il trattamento degli stati infiammatori sistemici e muscolari.

In Figura 4.11 è mostrato il rilascio cumulativo di diclofenac per unità di superficie ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) dai due tappetini in esame, dopo 6 e 8 ore.

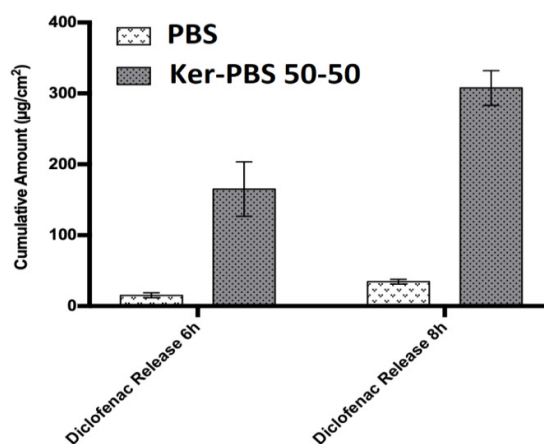


Figura 4.11. Rilascio cumulativo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) di diclofenac dai tappetini a base di PBS e di PBSKER5050 dopo 6 e 8 ore. La barra di errore rappresenta il valore medio \pm la deviazione standard.

Come si può notare, la presenza di cheratina migliora l'efficienza di rilascio dei tappetini: infatti, il campione PBSKER5050 presenta un rilascio di circa 10 volte superiore rispetto al PBS, per entrambi gli intervalli di tempo analizzati (165.2 ± 38.3 vs. $15.3 \pm 3.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ dopo 6 ore e 307.8 ± 24.4 vs. $34.5 \pm 3.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ dopo 8 ore). Tale risultato può essere spiegato sulla base dell'effetto sinergico sia dei

fenomeni repulsivi, che avvengono a pH fisiologico, tra cheratina e diclofenac, entrambi carichi negativamente, sia sulla maggiore area superficiale del tappetino realizzato a partire dalla blend, che favoriscono la diffusione del farmaco dalla matrice. Inoltre, occorre tenere presente che la cheratina, in condizioni fisiologiche, risulta completamente degradata nel giro di tre giorni; di conseguenza, già dopo poche ore, a causa del processo degradativo potrebbero crearsi ulteriori canali preferenziali attraverso i quali il farmaco può essere rilasciato più facilmente.

4.9 Osservazioni sull'adesione dei tappetini PBS e PBSKER5050

Tenendo presente che uno degli scopi della presente Tesi è quello di realizzare patch per il rilascio di farmaco per via transdermica, sono stati condotti test di adesione dei due tappetini PBS e PBSKER5050 su pelle umida, dopo diversi tempi di applicazione. Sin da subito (Figura 4.12a), è stato possibile osservare che il tappetino di solo PBS aderisce con più difficoltà rispetto a quello contenente cheratina. L'adesione è stata verificata anche dopo 90 minuti dall'applicazione (Figura 4.12b), e si è potuto notare come le due *patch* mostrino un comportamento completamente diverso: mentre il cerotto di PBS comincia a staccarsi, in quanto più secco, quello relativo alla blend PBSKER5050 rimane adeso e ben idratato. Infine, dopo 3 ore, il cerotto di PBS risulta completamente staccato, mentre quello realizzato con la blend rimane ancora adeso alla pelle (Figura 4.12c). Tale risultato rappresenta un'ulteriore riprova di come il tappetino ottenuto dalla miscela PBSKER5050 sia migliorativo rispetto a quello di solo PBS per questo tipo di applicazione.

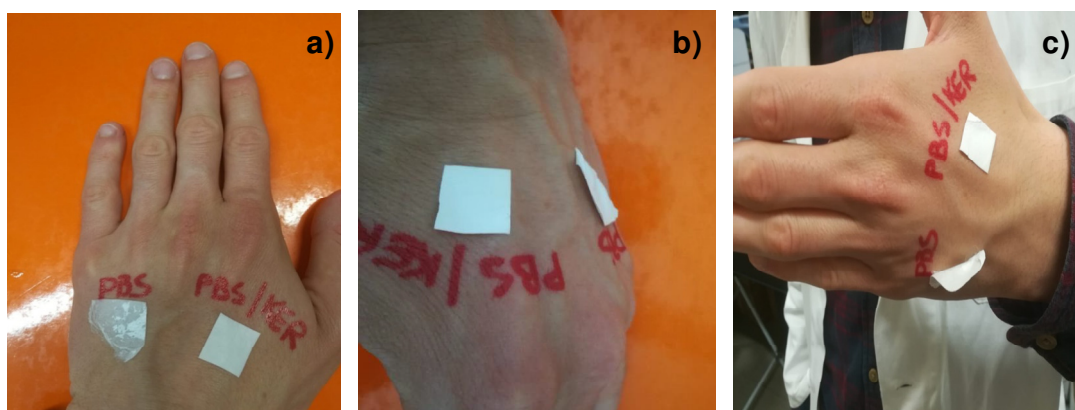


Figura 4.12 Valutazione dell'adesione dei tappetini PBS e PBSKER5050: a) t_0 ; b) dopo 90 minuti; c) dopo 3 ore dall'applicazione su cute bagnata.

5. Conclusioni

I recenti studi dell'ingegneria biomedica nel campo dei biomateriali naturali e sintetici hanno reso possibile la realizzazione di nuovi dispositivi altamente performanti, sia nel campo del rilascio controllato di farmaci, sia nell'ambito dell'ingegneria tissutale, come confermato dalle numerose ricerche in ambito accademico e dai dati di mercato, in continua e vertiginosa crescita. Infatti, dall'analisi di questi, si può notare come i due settori sopra menzionati diventeranno, nei prossimi anni, i principali ambiti di investimento per quanto riguarda il vastissimo mondo delle tecnologie per l'ingegneria biomedica.

Infatti, nell'ambito del cosiddetto *controlled drug release*, l'impiego di nanotecnologie ha permesso di ottenere rilasci di tipo modulato direttamente nel sito in cui è richiesta la terapia, evitando sovradosaggi e somministrazioni ripetute, tipici dei sistemi a rilascio convenzionale, e garantendo così una maggiore efficacia della cura. Tra i nuovi dispositivi ingegnerizzati figurano micro- e nanoparticelle iniettabili e *patch* transdermiche. Inoltre, nel caso dell'ingegneria tissutale, la possibilità di coltivare cellule staminali in opportune strutture tridimensionali, gli *scaffold*, potrebbe condurre al superamento dei due principali problemi nella medicina del trapianto: il rigetto e la carenza di donatori compatibili.

In questo scenario, assumono importanza sempre maggiore i biomateriali polimerici. Tra quelli sintetici, una delle classi di maggior successo in biomedicina è quella dei poliesteri alifatici, per via di alcune particolari caratteristiche come biocompatibilità, biodegradabilità, facile lavorabilità, compatibilità meccanica con il sito di applicazione e la possibilità di effettuare modifiche superficiali, permettendo il controllo sia della farmaco-cinetica sia dell'adesione cellulare. Per citarne alcuni, oltre all'acido polilattico (PLA), all'acido poliglicolico (PGA), al poli(ϵ -caprolattone) (PCL) ed ai loro copolimeri, più recentemente è stato approvato dalla *Food and Drug Administration* il poli(butilene succinato) (PBS).

Tra i polimeri naturali, invece, la cheratina è uno di quelli maggiormente investigati, in quanto altamente biocompatibile, biodegradabile e con caratteristiche tali sia da potersi legare a diversi principi attivi senza alterarne la bioattività, sia da favorire il legame con le cellule tramite opportune sequenze di adesione. A causa però delle sue scarse proprietà meccaniche, dell'elevata rigidità e fragilità, con conseguenti

limitazioni sulla sua processabilità, il suo campo di applicazione, potenzialmente vastissimo, risulta fortemente limitato.

Nel presente lavoro di Tesi, il PBS è stato mescolato con la cheratina in varie quantità, ed è stata valutata la miscibilità in funzione della composizione, che si è rivelata inferiore al comportamento ideale. A partire dalle suddette miscele, poi, mediante elettrofilatura, sono stati ottenuti tappetini porosi costituiti da fibre nanometriche interconnesse, per la realizzazione di cerotti adesivi nell'ambito del rilascio controllato di farmaco o come *scaffold* per l'ingegneria tissutale. Nonostante la scarsa miscibilità dei due polimeri, l'unione di PBS e cheratina ha permesso di migliorare, da un lato, le proprietà meccaniche della cheratina, rendendola processabile in tappetini in grado di autosostenersi e con proprietà meccaniche simili a quelle del PBS, e contemporaneamente mantenere la stabilità termica di quest'ultimo, caratteristica necessaria per una buona processabilità.

Inoltre, l'analisi morfologica delle fibre, effettuata mediante microscopia a scansione elettronica (SEM), ha evidenziato che il tappetino di PBS è costituito da fibre di dimensioni maggiori, mentre i tappetini ottenuti dalle blend sono formati da fibre più piccole. In particolare, il campione contenente la stessa quantità di PBS e cheratina si è rivelato quello in cui i diametri delle fibre sono minori e con una distribuzione più stretta, probabilmente perché in questo caso il comportamento reologico della miscela di partenza si avvicina di più a quello ideale. Inoltre, le prove di rigonfiamento (*swelling*), hanno evidenziato che campioni più ricchi in cheratina sono in grado di incrementare maggiormente il loro volume, compatibilmente con l'elevata polarità della proteina. Anche gli studi di degradazione enzimatica hanno evidenziato un andamento compatibile con la quantità di cheratina presente: la presenza di PBS, dunque, non è andata ad inficiare la buona biodegradabilità della proteina e al tempo stesso ha permesso di ottenere cinetiche di degradazione modulabili.

Per verificare la potenzialità di questi nuovi tappetini per il rilascio controllato, alla miscela equimolare è stato aggiunto diclofenac, un comune antinfiammatorio, incorporato all'interno della struttura fibrosa della *patch*, e sul tappetino così ottenuto è stato studiato il rilascio di principio attivo in condizioni fisiologiche a diversi tempi. Dai risultati ottenuti è stato possibile osservare come la presenza di cheratina abbia notevolmente migliorato il profilo di rilascio, con un aumento della quantità di principio attivo rilasciato (rispetto ad un tappetino di solo PBS, utilizzato come riferimento) di circa dieci volte. Inoltre, sono stati condotti test di adesione empirici a

diversi tempi, i quali hanno confermato le migliori prestazioni della blend ibrida, sia in termini di adesione che di idratazione.

Sugli stessi tappetini sono state condotte anche prove di biocompatibilità, in particolare test *in vitro* di vitalità e proliferazione cellulare: dai dati ottenuti si evince come entrambi i materiali siano in grado di supportare la crescita cellulare, risultando ottimi candidati per applicazioni in ambito di ingegneria tissutale; la presenza di PBS non ha dunque alterato la già ottima biocompatibilità della cheratina.

In conclusione, i risultati ottenuti sono decisamente positivi perché gli obiettivi del progetto sono stati pienamente raggiunti: le proprietà scadenti della cheratina sono state nettamente migliorate senza andare a detrimento di quelle buone per il tipo di applicazione prevista. Peraltro, agendo semplicemente sulla composizione della miscela, è possibile modulare le proprietà del materiale finale.

Tali risultati seppure estremamente incoraggianti, si possono ancora considerare preliminari, aprendo la strada ad interessanti sviluppi futuri, soprattutto per quanto riguarda i possibili profili di rilascio. Infine, le prove di biocompatibilità *in vitro* condotte nel presente lavoro di ricerca sono preliminari: occorre completarle con prove *in vivo* e *trials* clinici per valutare il reale utilizzo in medicina rigenerativa di questi nuovi biomateriali.

Considerati i promettenti risultati ottenuti nel presente studio, al fine di utilizzare le miscele in ambiti diversi dal biomedicale, ad esempio nell'imballaggio, l'ottenimento di cheratina termoplastica, ovvero lavorabile in fuso, rappresenterebbe un enorme passo in avanti ai fini di una industrializzazione del processo e di applicazioni su larga scala.

Bibliografia

[1] Astrid J. R. Lasprilla, Guillermo A. R. Martinez, Betânia H. Lunelli, André L. Jardini, Rubens Maciel Filho, Poly-lactic synthesis for application in biomedical devices – A review, *Biotechnology Advances*, 2012, 30, 312-3128.

[2] Ruairi P. Brannigan, Andrew P. Dove, Synthesis, properties and biomedical applications of hydrolytically degradable materials based on aliphatic polyesters and polycarbonates, *Biomaterials Science*, 2017, 5, 9-21.

[3] Matteo Gigli, Martina Fabbri, Nadia Lotti, Rita Gamberini, Bianca Rimini, Andrea Munari, Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review, *European Polymer Journal*, 2016, 75, 431-460.

[4] Martina Fabbri, Giulia Guidotti, Michelina Soccio, Nadia Lotti, Marco Govoni, Emanuele Giordano, Massimo Gazzano, Rita Gamberini, Bianca Rimini, Andrea Munari, Novel biocompatible PBS-based random copolymers containing PEG-like sequence for biomedical applications: From drug delivery to tissue engineering, *Polymer Degradation and Stability*, 2018, 153, 53–62.

[5] Martina Fabbri, Michelina Soccio, Matteo Gigli, Giulia Guidotti, Rita Gamberini, Massimo Gazzano, Valentina Siracusa, Bianca Rimini, Nadia Lotti, Andrea Munari, Design of fully aliphatic multiblock poly(ester urethane)s displaying thermoplastic elastomeric properties, *Polymer*, 2016, 83, 154–161.

[6] Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons, *An Introduction to Materials in Medicine 2nd Edition*, Elsevier Academic Press, 2004.

[7] Claudia Ferroni, Giovanna Sotgiu, Anna Sagnella, Greta Varchi, Andrea Guerrini, Demetra Giuri, Eleonora Polo, Viviana Teresa Orlandi, Emanuela Marras, Marzia Gariboldi, Elena Monti, Annalisa Aluigi, Wool Keratin 3D Scaffolds with Light-Triggered Antimicrobial Activity, *Biomacromolecules*, 2016, 17, 9, 2882-2890.

- [8] Jillian G. Rouse, Mark E. Van Dyke, A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications, *Materials*, 2010, 3, 999–1014.
- [9] Kelsey G. DeFrates, Robert Moore, Julia Borgesi, Guowei Lin, Thomas Mulderig, Vince Beachley, Xiao Hu, Protein-based fiber materials in medicine: a review, *Nanomaterials*, 2018,8, 457.
- [10] Balaji Srinivasan, Ramadhar Kumar, Kirubanandan Shanmugam, Uma Tiruchirapalli Sivagnam, Neelakanta Pully Reddy, Praveen Kumar Sehgal, Porous Keratin scaffold promising biomaterial for tissue engineering and drug delivery, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2009, 92, 5-12.
- [11] Yanmei Li, XuelianZhi, Jiantao Lin, Xin You, Jiang Yuan, Preparation and characterization of DOX loaded keratin nanoparticles for pH/GSH dual responsive release, *Material Science and Engineering C*, 2017, 73, 189-197.
- [12] Annalisa Aluigi, Marco Ballestri, Andrea Guerrini, Giovanna Sotgiu, Claudia Ferroni, Franco Corticelli, Marzia Bruna Gariboldi, Elena Monti, Greta Varchi, Organic solvent-freepreparation of keratin nanoparticles as doxorubicin carriers for antitumor activity, *Material Science and Engineering C*, 2018, 90, 476-484.
- [13] X. Zhi, Y. Wang, P. Li, J. Yuan, J. Shen, Preparation of keratin/chlorhexidine complex nanoparticles for long-term and dual stimuli-responsive release, *RSC Advances*, 2015, 5, 82334.
- [14] Xiang Mi, Helan Xu, Yiqi Yang, Submicron amino acid particles reinforced 100% keratin biomedical films with enhanced wet properties via interfacial strengthening, *Colloidsand Surfaces B: Biointerfaces*, 2019, 177, 33–40.
- [15] Tamara Posati, Demetra Giuri, Morena Nocchetti, Anna Sagnella, Marzia Gariboldi, Claudia Ferroni, Giovanna Sotgiu, Greta Varchi, Roberto Zamboni, Annalisa Aluigi, Keratin hydroxycalcites hybrid films for drug delivery applications, *European Polymer Journal*, 2018,105, 177–185.

- [16] Annalisa Aluigi, Claudia Vineis, Alessio Varesano, Giorgio Mazzucchetti, Franco Ferrero, Claudio Tonin, Structure and properties of keratin/PEO blend nanofibers, *European Polymer Journal*, 2008, 44, 2465-2475.
- [17] Francesca Selmin, Francesco Cilurzo, A. Aluigi, Silvia Franzè, Paola Minghetti, Regenerated keratin membrane to match the *in vitro* drug diffusion through human epidermis, *Results in Pharma Sciences* 2, 2012, 2, 72-78.
- [18] Mary Caldorera-Moore, Nicholas A. Peppas, Micro and nanotechnologies for intelligent and responsive biomaterial-based medical systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009,61, 1391-1401.
- [19] Sajid Ali, Maryam Shabbir, Nabeel Shahid, The structure of skin and transdermal drug delivery system, *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2015, 8, 103-109.
- [20] Hyunjae Lee, Changyeong Song, Seungmin, Baik, Dokyoon Kim, Taeghwan Hyeon, Dae-Hyeong Kim, Device-assisted transdermal drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2018, 127, 35-45.
- [21] Othman A. Al Hanbali, Haji Muhammad Shoaib Khan, Muhammad Sarfraz, Mosab Arafat, Shakeel Ijaz, Abdul Hameed, Transdermal patches: Design and current approaches to painless drug delivery, *Acta Pharmaceutica*, 2019, 69, 197-215.
- [22] Insol Hwang, Hong Nam Kim, Minho Seong, Sang-Hyeon Lee, Minsu Kang, Hoon Yoi et al., Multifunctional smart skin adhesive patches for Advanced Health Care, 2018, 7,1800275.
- [23] F. J. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials today*, 2011, 14(3), 88-95.

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