

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

**Chimica Industriale**

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Membrane elettrofilate di  
miscele cheratina/PLA caricate con grafene  
ossido per il rilascio controllato di farmaci

Tesi di laurea sperimentale

**CANDIDATO**

Simone Drudi

**RELATORE**

**Chiar.mo Prof.** Loris Giorgini

**CORRELATORE**

**Dott.ssa** Annalisa Aluigi

**Dott.** Emanuele Treossi



## **Abstract**

Nell'ultimo periodo, si è sviluppato un forte interesse nella produzione di materiali a base proteica per il settore biomedicale e cosmetico, in particolare per il rilascio controllato di farmaci. In questo studio sono stati sviluppati, tramite elettrofilatura, dei materiali nanocompositi, costituiti da una matrice di cheratina, ottenuta da lana, e PLA caricata con grafene ossido e con Rodamina-B, un indicatore particolarmente usato in chimica analitica per valutare il rilascio di determinati sistemi. Tali materiali, caratterizzati morfologicamente e strutturalmente, sono stati testati *in vitro* come sistemi per il rilascio controllato di farmaci, usando la Rodamina per la maggiore facilità di rilevazione, valutando soprattutto l'influenza del grafene ossido sull'entità del rilascio. I risultati ottenuti hanno evidenziato come l'ossido di grafene influisca in maniera significativa sull'entità del rilascio, rallentando la quantità di Rodamina rilasciata nelle prime 48 ore. Studi per l'applicazione di questi materiali nell'ingegneria tissutale e nella medicina rigenerativa saranno oggetto di studi futuri.

# INDICE

## **1. INTRODUZIONE**

- 1.1 Ingegneria tissutale pag.1
- 1.2 Rilascio controllato di farmaci pag.3
- 1.3 Processo di elettrofilatura pag.6
- 1.4 Cheratina pag.10
- 1.5 Acido polilattico (PLA) pag.13
- 1.6 Grafene e grafene ossido pag.16

## **2. SCOPO DELLA TESI**

pag.20

## **3. MATERIALI E METODI**

- 3.1 Preparazione miscele di PLA e cheratina caricate con Rodamina-B pag.22
- 3.2 Preparazione miscele di PLA e cheratina caricate con Rodamina-B e GO pag.22
- 3.3 Elettrofilatura pag.22
- 3.4 Caratterizzazione morfologica delle nanofibre pag.23
- 3.5 Caratterizzazione chimico-fisica delle nanofibre pag.24
- 3.6 Studio dei rilasci di Rodamina-B dalle nanofibre pag.26

## **4. DISCUSSIONE DEI RISULTATI**

- 4.1 Caratterizzazione chimico-fisica delle nanofibre pag.28
- 4.2 Caratterizzazione meccanica delle nanofibre pag.30
- 4.3 Studio dei profili di rilascio di Rodamina-B dalle nanofibre pag.33

## **5. CONCLUSIONI**

pag.38

## **6. BIBLIOGRAFIA**

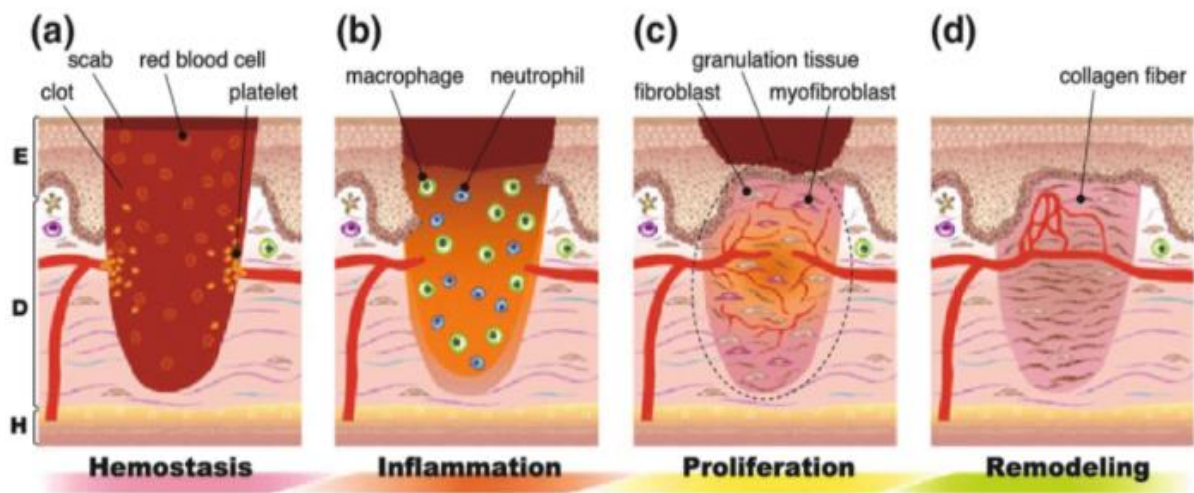
pag.40

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Ingegneria tissutale e medicina rigenerativa

Malattie e infortuni, come diabete, perdite di tessuto epiteliale, traumi e bruciature rappresentano ancora oggi una sfida decisiva per la cura delle ferite; questo, infatti, è un processo complesso, costituito da 4 fasi (**Figura 1**) che si sovrappongono <sup>[1]</sup>:

- emostasi: protegge il corpo da un'eccessiva perdita di sangue e da un'aumentata esposizione alla contaminazione batterica;
- infiammazione: prepara il letto della lesione per la guarigione grazie al fenomeno dell'autolisi (operata da enzimi e leucociti), che permette di mantenere pulita la ferita da eventuali residui cellulari o detriti depositati;
- proliferazione: riempimento e chiusura del letto della ferita, grazie all'azione dei fibroblasti;
- rimodellamento: maturazione della ferita con formazione della cicatrice solida.



**Figura 1:** Fasi della cura della pelle

Alcune patologie prevedono anche trapianti di organo, che hanno come limitazione la disponibilità degli organi stessi, le possibilità di rigetto e i costi elevati delle procedure di espanto e reimpianto. In questi casi, inoltre, il soggetto sarà costretto ad assumere immunosoppressori durante il corso della sua vita, per continuare ad evitare il rigetto.

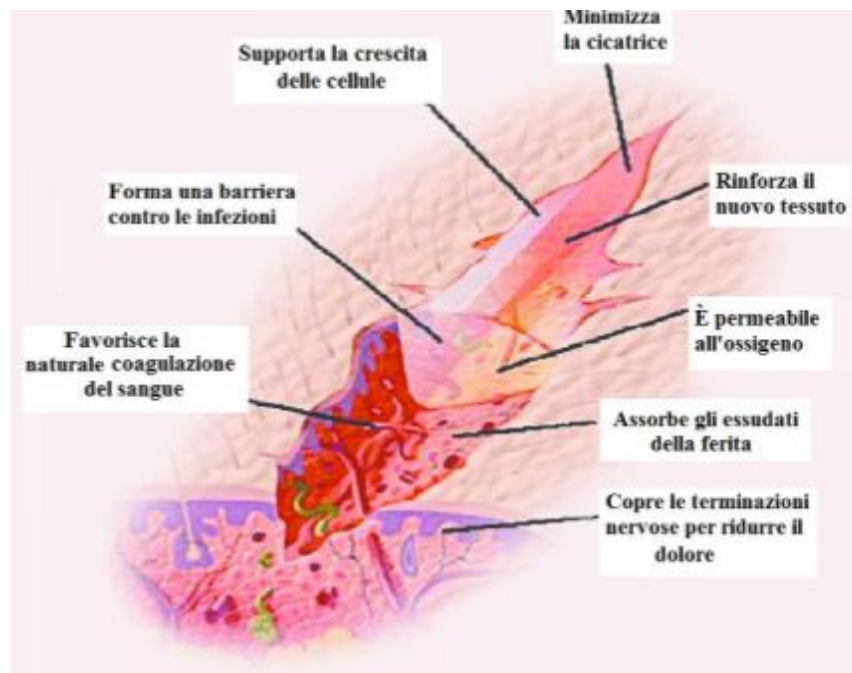
In questo quadro si inseriscono la medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale, due discipline che si pongono l'obiettivo di permettere il recupero delle funzioni di un

organo favorendo la creazione di un tessuto naturale in vivo, su di un supporto generalmente definito *scaffold*.

Questo non solo permetterà di ridurre i problemi di scarsità di organi e di rigetto, ma allo stesso tempo di ridurre i tempi di riparazione dei tessuti danneggiati, favorendo anche la formazione di cicatrici più esteticamente accettabili [2].

Numerose sono state le tipologie di materiali studiati per l'impiego come scaffold, dai materiali metallici a quelli ceramici, ma negli ultimi anni hanno ricevuto particolare attenzione i materiali polimerici, soprattutto quelli di origine naturale, a causa della loro biocompatibilità, biodegradabilità e alla loro attività biologica.

Le medicazioni variano da ferita a ferita, ma, idealmente (**Figura 2**), queste dovrebbero consentire l'assorbimento dell'eccesso di essudato, mantenere un microambiente umido e quindi essere permeabile all'umidità e all'ossigeno, non disperdere residui nella ferita che potrebbero indurre una risposta tissutale, essere impermeabile ai microrganismi, non provocare traumi alla rimozione, ridurre il dolore e fornire isolamento termico [1,2].



**Figura 2:** Rappresentazione del supporto ideale

Risulta quindi evidente che un aspetto fondamentale da tenere in considerazione nella progettazione dello scaffold è costituito dalla sua morfologia. Per avere una buona resistenza meccanica e adesione sulla ferita e fungere da promotore della crescita

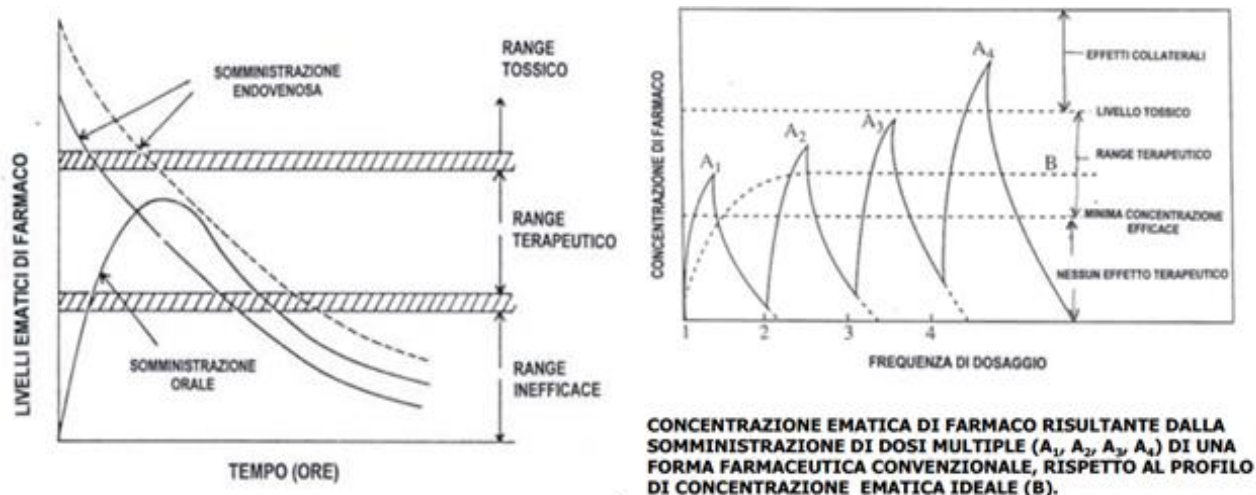
cellulare gli scaffolds necessitano infatti di una certa porosità, e in particolare di una determinata dimensione dei pori, che permetta sia lo scambio di nutrienti e rifiuti delle cellule con l'ambiente esterno, sia la penetrazione, l'adesione e la proliferazione delle cellule stesse nello scaffold.

Per questo motivo, ad oggi, tra i materiali più studiati per la progettazione di scaffold da impiegare nell'ingegneria tissutale ci sono gli idrogel, le spugne e le nanofibre polimeriche prodotte a partire da polimeri di origine naturale. Questi infatti sono caratterizzati dall'aver, oltre alle caratteristiche del polimero di cui sono fatte, una notevole area superficiale, in grado di favorire l'adesione alla ferita e il contatto con le cellule, una corretta porosità, che le rende degli ottimi scaffold e che consente inoltre di funzionalizzarli per permettere il rilascio controllato di farmaci e, nel caso delle nanofibre, anche una notevole resistenza meccanica, che costituisce invece uno dei principali problemi degli altri scaffold <sup>[4]</sup>.

## **1.2 Rilascio controllato di farmaci**

La somministrazione dei farmaci costituisce un momento fondamentale nel percorso di cura o di guarigione da una malattia, per questo motivo essa deve essere eseguita nel modo possibilmente più congeniale al paziente e che gli permetta di subire, qualora presenti, il minor quantitativo di effetti collaterali possibile.

Quando si somministra un farmaco nella cosiddetta *forma tradizionale*, si ottengono livelli di quel farmaco nel sangue che solo per breve tempo raggiungono il range terapeutico, di conseguenza quel farmaco avrà un'azione di breve durata. A questo inconveniente si può però ovviare eseguendo una *terapia multidose*, che consiste nella somministrazione ripetuta ad intervalli regolari nel tempo di dosi del farmaco (**Figura 3**). I problemi di questo approccio sono però molteplici, da quelli di natura clinica, come la presenza di profili ematici di farmaco non idonei che possono indurre resistenza al farmaco stesso o addirittura diventare pericolosi per la salute del paziente, a quelli di natura umana, legate alla scarsa osservanza dei pazienti alle prescrizioni mediche, chiamata compliance del paziente.



**Figura 3:** Profili ematici del farmaco nella somministrazione tradizionale e nella terapia multidose.

Per cercare di limitare questi problemi sono stati sviluppati numerosi sistemi per il *rilascio controllato di farmaci* in grado di regolare, a seconda dello scopo, la velocità, il tempo o addirittura lo spazio di rilascio (nell'ultimo caso si parla di *targeting*, per fare arrivare il farmaco solo nel sito di azione del farmaco). I possibili vantaggi legati a questa tecnica di somministrazione risultano quindi essere molteplici:

- Mantenimento di un livello ematico ottimale di farmaco nel periodo terapeuticamente utile;
- Riduzione importante degli effetti collaterali;
- Maggiore efficacia della terapia;
- Riduzione della quantità di farmaco somministrata e allo stesso tempo del numero di somministrazioni giornaliere di farmaco, facilitando così il paziente nel percorso di terapia;
- Vantaggi economici alle aziende che possono così riformulare e riproporre farmaci noti.

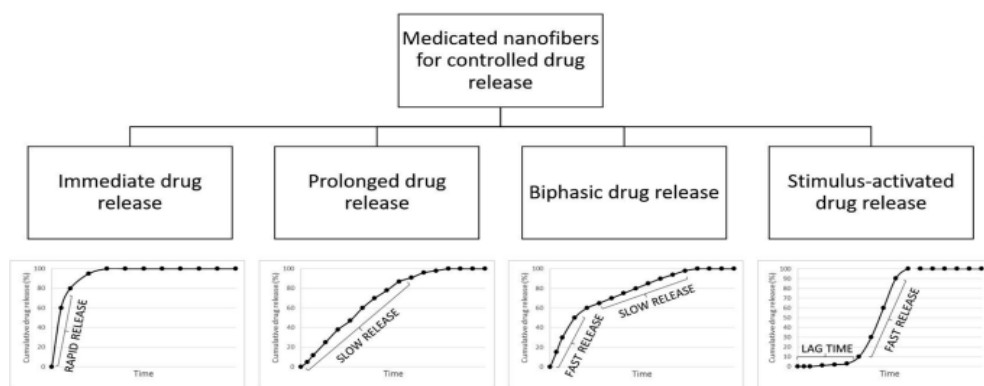
Con il rilascio controllato si intende quindi quel processo per cui il farmaco (o il principio attivo, dato che la tecnica di rilascio controllato viene applicata anche in altri ambiti, come in agricoltura) migra dalla parte più centrale agli stati sempre più esterni della matrice, che nella maggior parte dei casi è di natura polimerica, fino a raggiungere il mezzo di rilascio.

Pur essendo un processo apparentemente semplice, in realtà il rilascio controllato dipende da numerosi fattori tra loro interconnessi, come le caratteristiche strutturali del

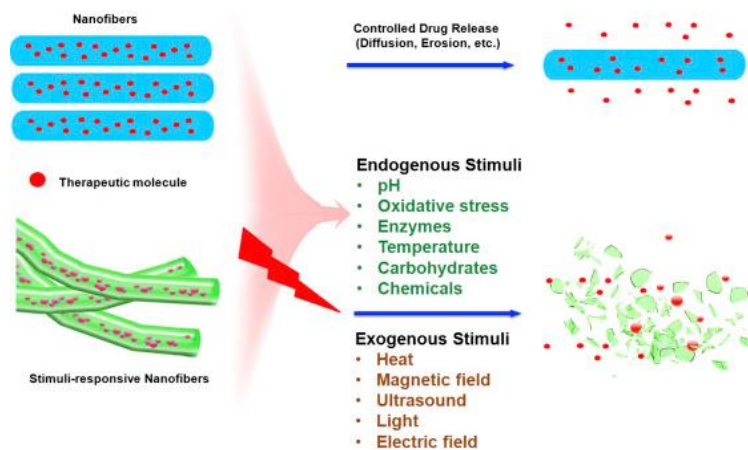


materiale e le proprietà chimico-fisiche dei principi attivi utilizzati e dell'ambiente di reazione, e ciò crea una complessità intrinseca da non sottovalutare nella progettazione del sistema stesso [5].

Diversi sono stati i sistemi studiati negli anni per il rilascio controllato di farmaci, dalle nanoparticelle alla microincapsulazione del farmaco, agli idrogeli, ma particolare attenzione hanno attirato i sistemi di rilascio basati sulle nanofibre, in quanto possono essere progettate per mostrare numerose cinetiche di rilascio (**Figura 4**), ma anche diversi metodi di rilascio, dall'erosione della matrice al rilascio dovuto stimoli chimico-fisici esterni (**Figura 5**) [6].



**Figura 4:** cinetiche e profili di rilascio tipici dei sistemi costituiti da nanofibre.



**Figura 5:** diversi possibili meccanismi di rilascio controllato delle nanofibre polimeriche.

Tra i vari sistemi di rilascio basati sulle nanofibre, particolare attenzione viene riservata oggi alla somministrazione per via transdermica, la quale prevede il passaggio per diffusione del farmaco da una benda o da un cerotto attraverso la pelle del paziente (**Figura 6**). La predilezione per questi sistemi di rilascio è da ricercare nei numerosi vantaggi che comportano: da quelli comuni a tutti i sistemi di rilascio controllato, come

il miglioramento della compliance del paziente, dovuta alla natura non invasiva e soprattutto non dolorosa del trattamento, ai vantaggi più specifici, come un maggiore controllo sui tempi di rilascio del farmaco e la possibilità di evitare le interazioni del farmaco con cibo, enzimi o altri farmaci assumibili per via orale [7,8].

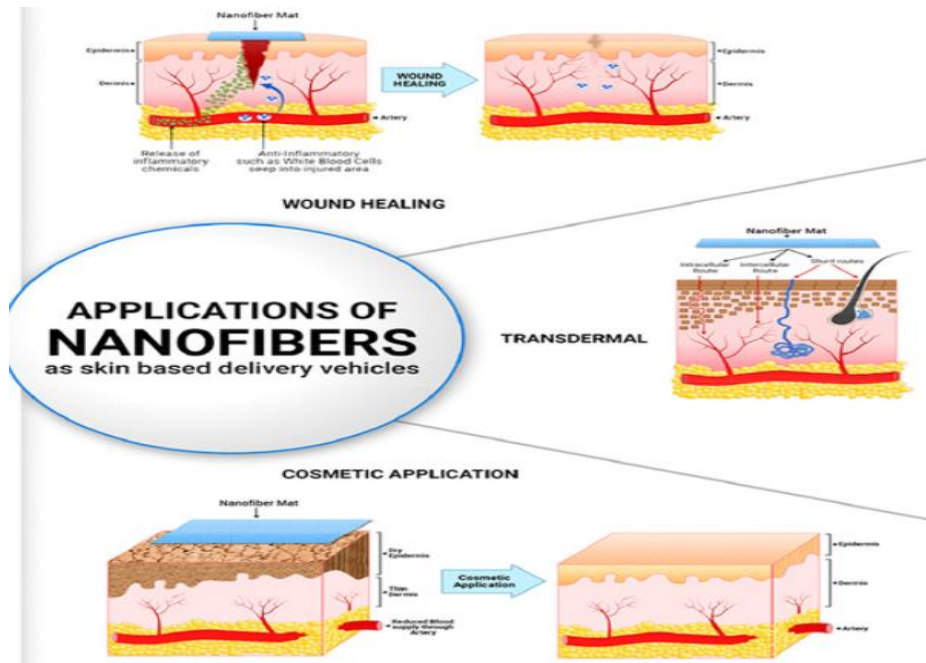


Figura 6: applicazioni delle nanofibre per rilascio transdermico

### 1.3 Processo di elettrofilatura

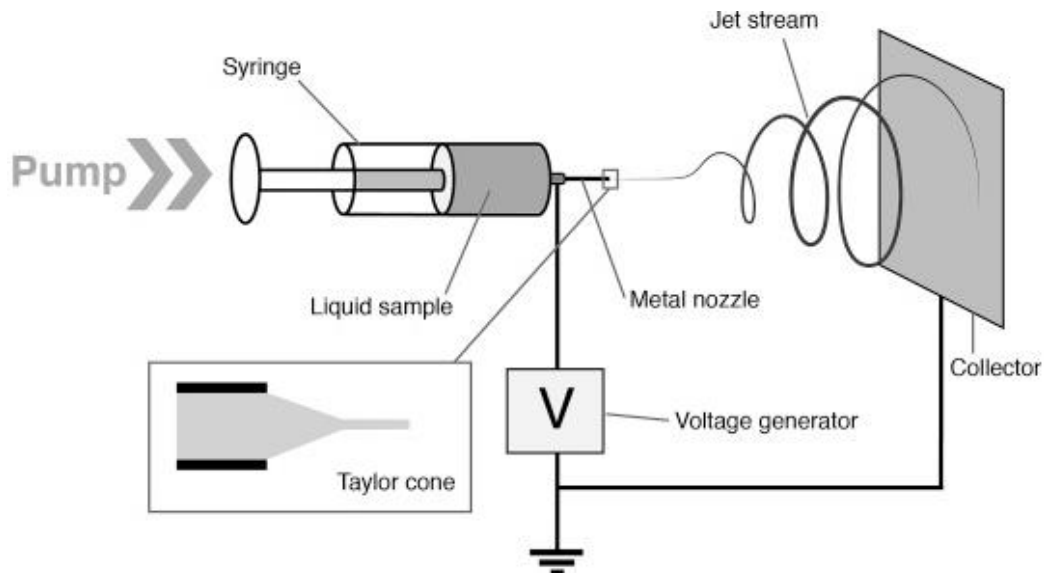
L'elettrofilatura (in inglese electrospinning) è una delle tecniche più utilizzate per la produzione di filamenti nanometrici, comunemente chiamati nanofibre; queste vengono generate mediante applicazione di un potente campo elettrostatico ad un campione fluido, che può essere sia un polimero in soluzione che un polimero fuso [9].

L'impianto per l'elettrofilatura è costituito da:

- una *siringa*, caricata con il fluido polimerico e con un ago metallico di diametro variabile in base al sistema da elettrofilare;
- un *generatore di alto voltaggio*, utilizzato per polarizzare la soluzione polimerica;
- un *collettore metallico* delle nanofibre che può avere diverse geometrie e può essere statico oppure in movimento (i più comuni sono piani statici o cilindri rotanti che permettono una raccolta più ordinata delle nanofibre [10];

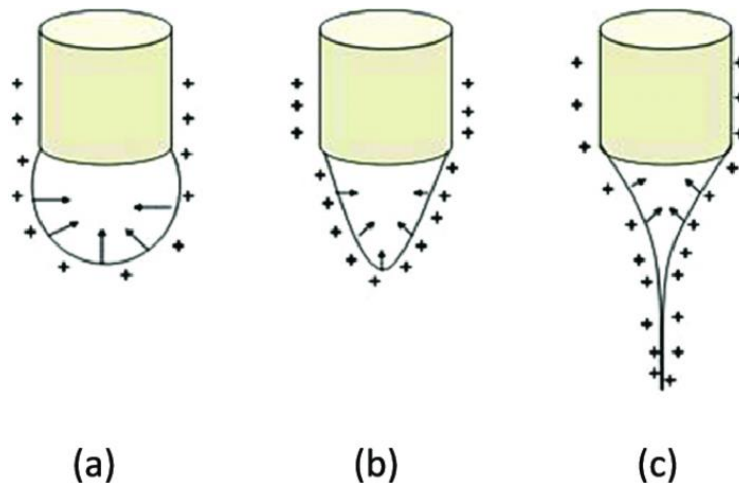
- una *pompa volumetrica*, che regola il flusso di fluido polimerico uscente dall'ago durante il processo.

Un tipico apparato per l'elettrofilatura è schematizzato in **Figura 7**, ma esistono anche impianti organizzati in verticale <sup>[11]</sup>.



**Figura 7:** Schema strumentale di un impianto per l'elettrofilatura

Il processo inizia grazie alla pressione della pompa, che fa fuoriuscire la prima goccia di soluzione polimerica dalla punta dell'ago. A questo punto entra in gioco la sorgente di elevato voltaggio, la quale promuove la formazione di una differenza di potenziale tra il collettore e l'ago metallico per cui la carica elettrica sopraggiunge fino alla goccia di soluzione polimerica. Se il campo elettrico dovesse risultare poco intenso allora la goccia di soluzione manterrebbe la propria forma sferica e cadrebbe tal quale in forma liquida. Quando invece viene applicato un voltaggio sufficientemente potente, le cariche sulla goccia, solitamente positive, risentono maggiormente delle forze di repulsione, le quali si oppongono alla tensione superficiale della goccia stessa. Raggiunto il voltaggio critico, le forze di repulsione elettrostatica sovrastano la tensione superficiale e ciò provoca un allungamento della goccia di soluzione polimerica, la quale assume una caratteristica forma conica, denominata cono di Taylor <sup>[12]</sup>, dal quale parte un getto diretto al collettore di carica opposta (**Figura 8**).



**Figura 8:** Formazione del cono di Taylor

Le cariche repulsive presenti sul getto fanno sì che questo si muova come fosse una frusta, compiendo rapide rotazioni a spirale (whipping) che causano uno stiramento delle catene macromolecolari presenti nel getto. Il whipping fa sì che il getto si allunghi e che diminuisca il suo diametro, favorendo indirettamente l'evaporazione del solvente e la formazione delle nanofibre <sup>[13]</sup>, le quali vanno a depositarsi in maniera casuale sul collettore producendo una membrana con struttura di tessuto non tessuto.

Uno dei principali vantaggi dell'elettrofilatura consiste nel fatto che la morfologia, il diametro e la porosità delle nanofibre dipendono da un numero molto elevato di parametri, che possono essere modificati per ottenere nanofibre con proprietà differenti in funzione delle applicazioni per cui vengono progettate. I parametri determinanti per la morfologia delle nanofibre, divisi tra caratteristiche della soluzione polimerica, di processo e ambientali, sono riportati nella **Tabella 1** <sup>[14]</sup>.

Electrospinning parameters	Value	Effects on	
		Fiber diameter	Fiber morphology
<b>Process parameters</b>			
Flow rate	↑	↑	Beaded and thick fiber. High flow rates produced fibers that are not completely dried
Needle-to-collector distance	↓	↓	Beaded fiber if the distance is too short or long. Formation of thick fibers
Applied voltage	↑	↓	Beaded fibers
Needle inner diameter	↑	↑	Beaded fibers
<b>Solution parameters</b>			
Polymer molecular weight	↑	↓ such as viscosity, type of the polymer, concentration	Less bead formation. Smooth fiber
Polymer concentration	↑	↑ (within a range)	Bead formation after a certain concentration
Polymer solubility	↑		
Solution viscosity	↑	↑ (within a range)	Lower bead formation
Solution conductivity	↑	↓ but broad distribution in diameter	Bead-free fibers
Solvent dielectric constant	↑	↓	Lower bead formation
Solvent volatility	↑	↑	Pore formation
Surface tension	↑	↓	Jet is more likely to break up into droplets generating beaded fibers
<b>Other parameters</b>			
Humidity	↑	↓	Beaded fibers and pores formation
Temperature	↑	↓	
Collector type			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Smoother fibers resulted from metal collectors; more porous fiber structure was obtained using porous collectors</li> <li>• Aligned fibers were obtained using a conductive frame, rotating drum, or a wheel-like bobbin collector</li> </ul>

↑, Increase; ↓, decrease; †, depends on other variables.

**Tabella 1:** Parametri determinanti diametro e morfologia delle nanofibre.

La riduzione del diametro delle fibre polimeriche a dimensioni nanometriche porta alla comparsa di numerose caratteristiche di interesse, quali l'elevata porosità, un elevato rapporto volume/superficie (può addirittura diventare di tre ordini di grandezza superiore rispetto al micro) ed una spiccata abilità di mimare al meglio le strutture biologiche, come la matrice extracellulare di ossa e pelle, proprietà che ne permettono un valido uso come scaffold nell'ingegneria tissutale, ma anche come sistema utile per i drug delivery. Per poterne aumentare ulteriormente le proprietà meccaniche, invece, si può pensare di caricarle con composti di diversa natura, creando così dei nanocompositi, materiali molto studiati negli ultimi anni per la loro versatilità.

## 1.4 Cheratina

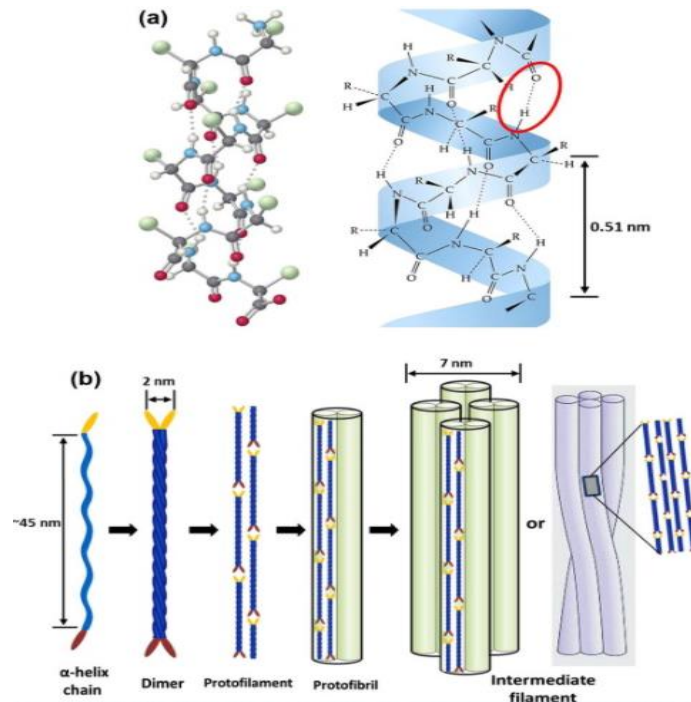
Negli ultimi anni lo sviluppo di materiali basati sulle proteine, soprattutto per il rilascio di farmaci e la produzione di nanofibre elettrofilate, ha ricevuto una sempre maggiore attenzione. Rispetto infatti alla controparte sintetica, le proteine vengono preferite per la loro solubilità in acqua, la biocompatibilità, la biodegradabilità, la non-tossicità, la capacità di favorire l'adesione e la proliferazione delle cellule <sup>[15]</sup>. Di particolare importanza risulta oggi la possibilità di ricavare questi polimeri partendo da sorgenti rinnovabili, valorizzando così sottoprodotti di scarto spesso anche di difficile smaltimento dal punto di vista sia economico che ambientale.

Numerose sono state finora le proteine naturali considerate per questi scopi, come collagene, elastina, fibroina, etc., ma, tra queste, un notevole interesse è stato concentrato sulla cheratina, a causa delle sue proprietà biologiche e chimico-fisiche. La cheratina è la più abbondante proteina fibrosa non alimentare presente in natura, risultando infatti il maggior componente di unghie, capelli, lana e corna di mammiferi, così come piume di uccelli ed epidermide di rettili. La cheratina può essere estratta facilmente da rifiuti e sottoprodotti a basso costo, come la lana grezza di tosa (di bassa qualità) non filabile per le sue pessime proprietà fisiche o i sottoprodotti dell'industria tessile della lana o dell'industria della carne.

Dal punto di vista ambientale, la valorizzazione di questi sottoprodotti costituisce un aspetto molto importante, considerandone il loro grande quantitativo e le difficoltà che si incontrano durante il loro processo di smaltimento: l'Unione Europea è il secondo produttore (dopo l'Asia) di lana non tessile, con una produzione stimata di 200.000 tonnellate/anno, a cui l'Italia contribuisce con 20.000 tonnellate/anno; inoltre la lana è inefficace come combustibile (possiede un Limiting Oxygen Index, LOI, vicino a 25 e una temperatura di iniezione di circa 600 °C) e il processo di incenerimento è inquinante a causa del contenuto di zolfo elevato rispetto alle altre fibre naturali (3-4% in peso) <sup>[16,17]</sup>.

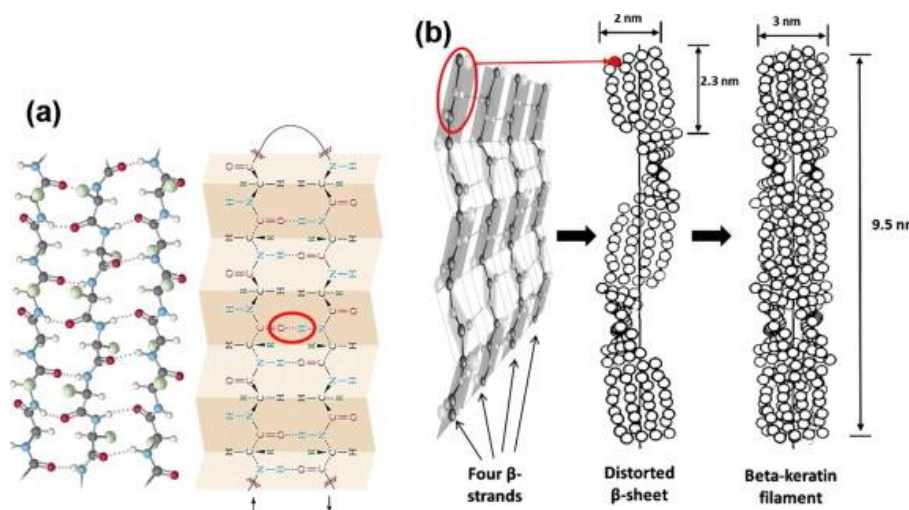
Dal punto di vista molecolare, la cheratina è una proteina strutturale e come tale presenta una struttura primaria, secondaria e terziaria. A livello di struttura secondaria la cheratina può presentare tre differenti conformazioni:

- $\alpha$ -Cheratina (**Figura 10**), in cui il filamento proteico, con un range di peso molecolare da 40 a 70 kDa, è costituito da  $\alpha$ -eliche intrecciate, è debolmente basica e presenta un basso contenuto di amminoacidi solforosi (1,5-2 % in peso), soprattutto in forma di legami disolfuro tra le cisteine (presente in gran parte nei tessuti morbidi, come lana e pelle);



**Figura 10:** struttura  $\alpha$ -Cheratina

- $\beta$ -Cheratina (**Figura 11**), in cui il filamento proteico invece è costituito da catene con struttura a foglietto-  $\beta$ , è ricco di glicina e alanina ed è leggermente acida (presente per lo più nei tessuti duri, come piume, squame o unghie);



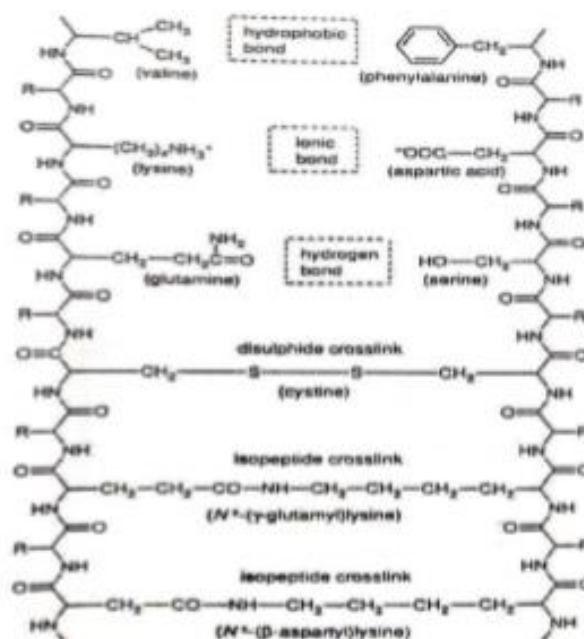
**Figura 11:** struttura  $\beta$ -Cheratina



- $\gamma$ -Cheratina, che costituisce la matrice della proteina finale ( $\alpha$  o  $\beta$  cheratina sono invece filamenti inseriti nella  $\gamma$ ), è caratterizzata da una struttura amorfa, con pesi molecolari che vanno dagli 11 ai 28 kDa, e da un elevato contenuto di amminoacidi solforosi (4-8 % in peso) che consentono la formazione di numerosi ponti disolfuri intermolecolari e intramolecolari.

Rispetto alle altre proteine naturali, come fibroina e collagene, la cheratina si distingue per l'elevato contenuto dell'amminoacido solforato cisteina (7-20 % degli amminoacidi totali) e di conseguenza di ponti disolfuro, che conferiscono alla cheratina la sua struttura tridimensionale compatta, causa della sua limitata solubilità in acqua, ma di una grande stabilità nonché di quelle proprietà chimico-fisiche che la distinguono dalle altre proteine. Oltre ai ponti disolfuri però anche altre interazioni, soprattutto quelle tra i gruppi laterali della sequenza amminoacidica, di diversa natura, influenzano notevolmente le proprietà meccaniche e non solo della cheratina (**Figura 12**).

Come il collagene, un altro grande vantaggio della cheratina dei mammiferi è la presenza di particolari sequenze amminoacidiche chiave, come la RGD (Arginina-Glicina-Acido aspartico) e la LDV (Leucina-Acido aspartico-Valina), le quali mimano i siti di attacco cellulare e in questo modo favoriscono la crescita cellulare di fibroblasti, cheratinociti, osteoblasti e neuroblasti [18].



**Figura 12:** struttura chimica della cheratina



Grazie a tutte queste caratteristiche peculiari i materiali a base di cheratina si dimostrano come ottimi candidati per diverse applicazioni: nel biomedicale, come il drug delivery o per l'ingegneria tissutale, ma anche come eccellenti assorbenti di metalli pesanti, coloranti o composti organici volatili (VOC) in sistemi di filtraggio e depurazione di aria e acqua, grazie alle funzionalità degli amminoacidi da cui essa è costituita <sup>[19]</sup>.

L'estrazione della cheratina dalla lana avviene mediante denaturazione della proteina, effettuata ossidando, riducendo o solfonando i ponti disolfuro delle cisteine. La cheratina così denaturata risulta maggiormente processabile, ma si riducono notevolmente le proprietà meccaniche dei prodotti finali. Le strategie più utilizzate per ovviare a questo problema consistono:

- a) nell'uso di agenti reticolanti in grado di formare legami covalenti intra ed intermolecolari;
- b) nel miscelare la cheratina con polimeri strutturali aventi migliori prestazioni meccaniche, come ad esempio l'acido polilattico (PLA), usato in questo lavoro di tesi.

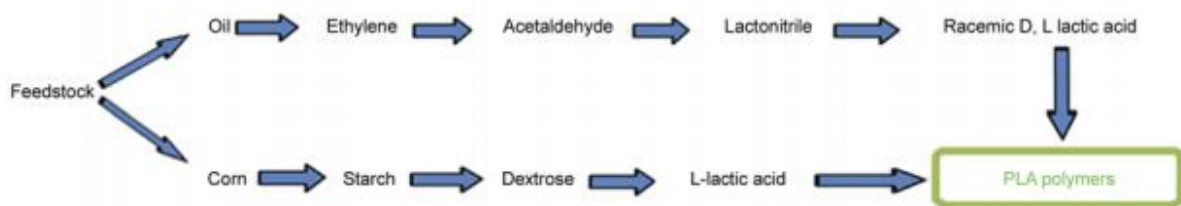
## **1.5 Poliacido lattico (PLA)**

Il poliacido lattico (PLA), molto studiato negli ultimi decenni, è un polimero che appartiene alla famiglia dei poliesteri alifatici, comunemente prodotti a partire da  $\alpha$ -idrossiacidi, i quali sono considerati polimeri biodegradabili e compostabili.

La scoperta e il successivo sviluppo di PLA iniziarono nel 1893, con la pubblicazione della formula per la preparazione del lattide da parte di Bischoff e Walden; 40 anni più tardi, nel 1932, Carothers, con il suo gruppo alla DuPont, riuscì a sintetizzare del PLA con basso peso molecolare riscaldando l'acido lattico sottovuoto per rimuovere l'acqua di condensazione. Ulteriori lavori eseguiti dalla DuPont portarono infine alla produzione di PLA ad alto peso molecolare grazie a polimerizzazione per apertura dell'anello del lattide, che venne brevettato nel 1954. Il suo primo utilizzo fu in combinazione con il poliacido glicolico (PGA) come materiale da sutura e venduto con il nome commerciale di Vicryl negli USA nel 1974. Fu poi con la nascita della Cargill Dow LLC nel 1997 che il PLA divenne un polimero con grandi volumi di produzione e questo grazie ad un nuovo processo di produzione a basso costo <sup>[20]</sup>.

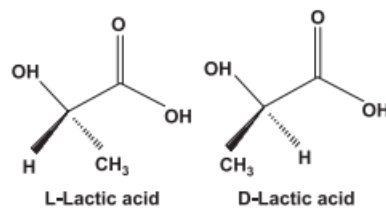
In base alla linea di produzione utilizzata per l'ottenimento del monomero, ossia l'acido lattico (acido 2-idrossipropionico), si otterrà un PLA più o meno sostenibile e con differenti proprietà; le linee di produzione sono essenzialmente due:

- una petrolchimica, che porta alla generazione di una miscela racemica di acido L-lattico e D-lattico, con conseguente formazione di un PLA amorfo;
- una catena più ecosostenibile, che prevede l'utilizzo di risorse di origine vegetale, come canne da zucchero, amido di mais e radici di tapioca o patate, per l'ottenimento di carboidrati che poi, attraverso un processo di fermentazione, ad opera di batteri della famiglia *Lactobacilli*, portano alla formazione di solo acido L-lattico, con conseguente formazione di P(L)LA, semicristallino e di maggiore interesse applicativo per via delle migliori proprietà chimico-fisiche [21] (**Figura 13**).



**Figura 13:** Linee di produzione del PLA

Dal punto di vista chimico, il PLA si ottiene mediante policondensazione dell'acido lattico, una molecola chirale che presenta due enantiomeri L e D (**Figura 14**), i quali si distinguono per il loro effetto sulla luce polarizzata.



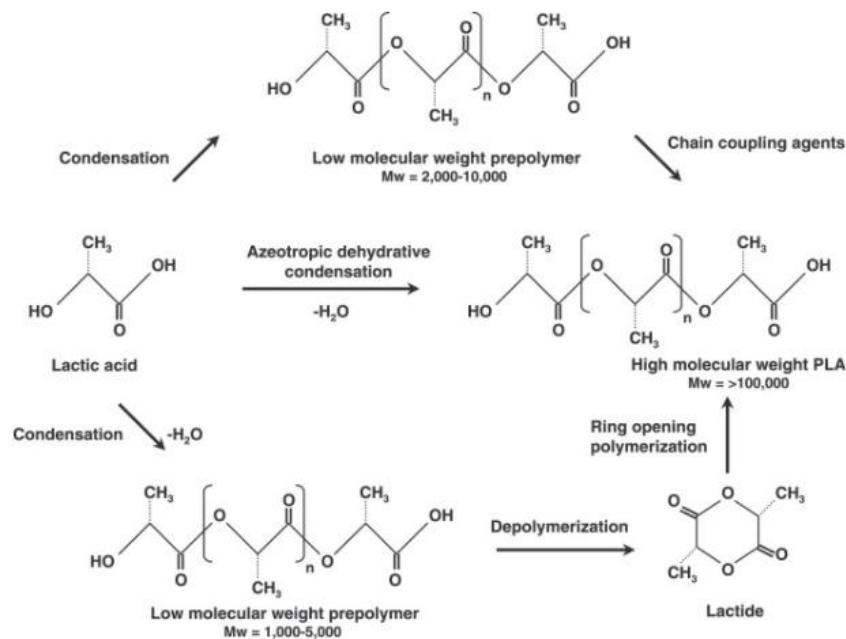
**Figura 14:** isomeri acido lattico

Il PLA esiste quindi in due forme differenti, ovvero come acido poli-(D)-lattico (PDLA) e acido poli-(L)-lattico (PLLA), e la polimerizzazione dei due enantiomeri dell'acido lattico porta alla formazione di PDLLA; i due derivati dai monomeri D e L, otticamente

attivi, sono semi-cristallini mentre PDLLA, otticamente inattivo, è amorfo. La più importante tra le varie forme ottenibili risulta però essere il PLLA.

Il PLLA è un polimero termoplastico, caratterizzato da una cristallinità solitamente intorno al 37%, con una temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) compresa tra i 60 e i 70 °C ed una temperatura di fusione ( $T_m$ ) tra i 170 e i 180 °C [22].

I metodi utilizzabili per la sintesi del PLA sono osservabili nella **Figura 15**.



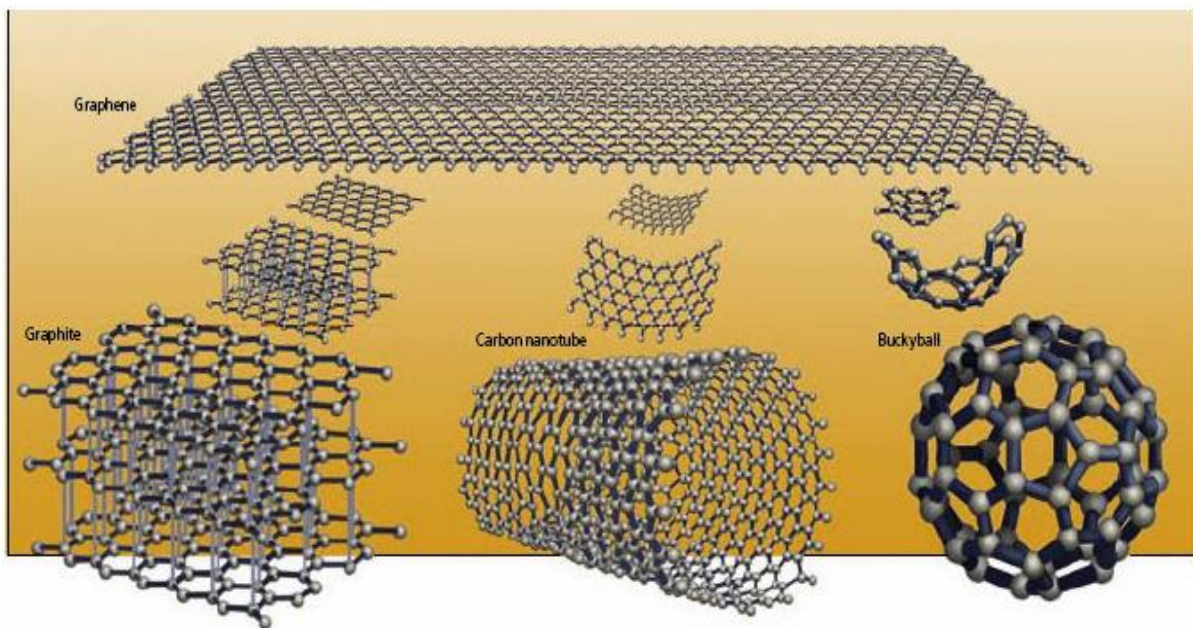
**Figura 15:** metodi di sintesi del PLA.

Numerosi sono i punti di forza che ad oggi catalizzano l'attenzione sul PLA. Tra questi troviamo le buone proprietà meccaniche, simili a quelle del polietilentereftalato (PET), e il fatto che sia eco-friendly, in quanto non solo ottenibile da risorse rinnovabili, quali mais, riso o grano, mediante un processo che consuma anidride carbonica, ma anche biodegradabile, riciclabile e compostabile. Presenta una buona processabilità termica, migliore di altri biopolimeri come i poliidrossialcanoati (PHA) o il PEG e permette di risparmiare, nel percorso di produzione da fonti rinnovabili, dal 25 al 55% di energia rispetto ai polimeri di origine petrolchimica. L'aspetto di maggiore attrattiva verso il PLA è costituito però dalla sua elevata biocompatibilità, aspetto fondamentale nelle applicazioni biomedicali. Quando impiantato negli organismi viventi, infatti, il PLA tende ad idrolizzarsi agli  $\alpha$ -idrossiacidi di partenza che verranno poi eliminati dal corpo. Inoltre, la sua degradazione porta alla formazione di composti non tossici, rendendolo

una scelta talmente ideale per le applicazioni biomedicali, come il rilascio di farmaci o l'ingegneria tissutale, che l'FDA (Food and Drug Administration) ha approvato il PLA per il contatto diretto con i fluidi biologici [23].

## 1.6 Grafene e grafene ossido

Il grafene è una delle tante forme allotropiche del carbonio (**Figura 16**), come il diamante, la grafite, il fullerene o i nanotubi di carbonio. Venne isolato dalla grafite e caratterizzato per la prima volta nel 2004 da Andre Geim e Konstantin Novoselov a Manchester, un gesto che poi valse ai due il Nobel per la fisica nel 2010. Il grafene può essere considerato come l'unità base dei vari allotropi, in quanto se arrotolato su sé stesso si possono ottenere dei nanotubi, sovrapponendo più piani grafenici si può ottenere la grafite e infine ripiegandolo si può ottenere il fullerene.



**Figura 16:** alcune forme allotropiche del carbonio

Dal punto di vista strutturale, il grafene è costituito da un piano monoatomico in cui ogni atomo di carbonio, ibridati  $sp^2$  e distribuiti secondo un reticolo esagonale a nido d'ape, stabilisce tre legami  $\sigma$ , della lunghezza di circa 0,142 nm, con gli atomi di carbonio adiacenti. I restanti elettroni di tipo  $\pi$ , grazie alla delocalizzazione dovuta all'aromaticità del sistema, sono liberi di muoversi lungo la struttura del grafene stesso. Il fatto che il piano sia monoatomico, gli conferisce inoltre un'elevatissima superficie

specifica. L'insieme di queste caratteristiche peculiari conferisce al grafene numerose proprietà interessanti, che difficilmente si riscontrano all'interno di un singolo materiale. La struttura rende il grafene estremamente resistente dal punto di vista meccanico, con un carico di rottura addirittura maggiore rispetto all'acciaio, ma con un peso decisamente minore ed una maggiore flessibilità. Essendo gli elettroni delocalizzati su tutta la struttura, le conducibilità termica ed elettrica sono estremamente elevate, addirittura superiori a quelle del rame. Particolare rilevanza assume infine il fatto che il grafene sia estremamente trasparente (coefficiente di trasparenza pari al 98%) alla radiazione elettromagnetica nonché impermeabile a tutti i comuni gas [24].

È per queste proprietà che il grafene ha assunto un tale interesse da parte della comunità scientifica, perché si presta a svariati utilizzi nei più disparati campi (**Figura 17**).

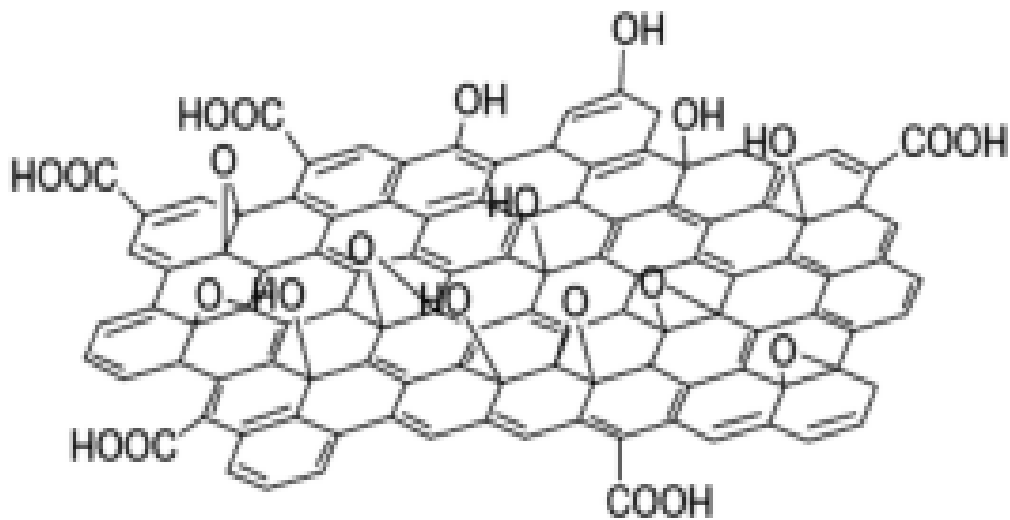


**Figura 17:** alcune tra le principali applicazioni del grafene.

Negli ultimi anni si sta però sviluppando lo studio del grafene per un impiego nel campo biomedicale. Infatti, data la sua struttura planare, in grado di immobilizzare un gran numero di sostanze come principi attivi, metalli o cellule, il grafene viene impiegato e studiato per la realizzazione di materiali antibatterici e antivirali, per il drug delivery oppure per l'ingegneria tissutale.

È possibile ottenere il grafene attraverso due processi opposti, ovvero con una tecnica *bottom-up*, che prevede la crescita controllata di grafene su un substrato mediante deposizione chimica di vapore (CVD), oppure una tecnica *top-down*, in cui rientra anche la tecnica di esfoliazione con il nastro adesivo utilizzata dai due premi Nobel.

Un'opzione molto interessante è quella di andare ad ossidare numerose volte il grafene ed in seguito sonificarlo per generare un materiale a singolo strato denominato grafene ossido (GO). Il GO è quindi costituito da strati monoatomici contenenti isole di grafene alternate a gruppi ossidati, quali gruppi carbossilici, soprattutto sul perimetro del piano, che sono responsabili carica negativa superficiale, gruppi idrossido e gruppi epossidici, presenti invece per lo più al centro del piano, che invece non sono carichi ma comunque polari (**Figura 18**).



**Figura 18:** struttura grafene ossido.

Il livello di ossidazione dipende da numerosi fattori, come il materiale di partenza ed il tempo di esposizione all'agente ossidante, quindi si potranno ottenere GO differenti in base alle diverse condizioni di reazione.

L'introduzione di questi gruppi ossidati permette di ottenere due effetti principali: aumentare la distanza tra i singoli piani per effetti repulsivi e, grazie alla polarità inserita, assumere un comportamento pressoché anfifilico che permette l'infiltrazione di molecole polari in una struttura prima idrofobica. Questi due fattori consentono di processare il GO in soluzione o nei materiali composti, cosa che con il grafene era molto più complessa, a discapito però di una minore conducibilità dovuta alla perdita di continuità nel network aromatico (conducibilità che può essere recuperata nel caso si andasse a ridurre il GO) <sup>[25]</sup>.

Il GO ha dimostrato anch'esso potenziale applicabilità in campo biomedicale, soprattutto nell'ingegneria tissutale e come drug carrier a causa della sua elevata area superficiale, ma soprattutto della moltitudine di gruppi funzionali presenti sulla superficie, i quali possono facilitare notevolmente il processo di loading del principio attivo. Inoltre, grazie alla minore difficoltà di dispersione in solventi polari e organici, è decisamente più processabile in film, membrane o comunque con matrici polimeriche, di cui va ad incrementare le proprietà meccaniche (mantenute anche in forma ossidata) [26].

## 2. SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi cinquant'anni, l'inquinamento generato dallo smaltimento delle materie plastiche ha subito un incremento vertiginoso dovuto soprattutto ad un altrettanto elevato aumento della produzione, passata dai 15 milioni del 1964 agli oltre 310 milioni di tonnellate l'anno odierni (dati del 2017) <sup>[27]</sup>. Dagli anni Cinquanta sono stati prodotti circa 8,3 miliardi di tonnellate di plastica, di cui 6,3 miliardi sono stati poi riversati in natura; di questi il 79% è finito nelle discariche e in tutti gli ambienti naturali, il 12% è stato incenerito e solo il 9% è stato riciclato <sup>[28]</sup>. Per questo motivo oggi, per le applicazioni in cui non serva una durabilità nel tempo, si sta cercando di sostituire i classici materiali polimerici derivanti dalla petrolchimica con polimeri derivati da materie prime naturali, che siano biodegradabili.

In questo contesto si inseriscono gli studi eseguiti sui biopolimeri biodegradabili e, tra questi, particolare considerazione ha ricevuto la cheratina, una proteina molto abbondante in natura e ottenibile a basso costo da biomasse derivanti dai rifiuti delle industrie tessili e della carne.

Negli ultimi anni, infatti, i materiali a base di cheratina sono stati notevolmente studiati, soprattutto per applicazioni biomedicali, per le sue caratteristiche biologiche, quali la promozione della crescita cellulare e la capacità di riuscire ad incapsulare nella propria struttura sia farmaci idrofobici che idrofilici, che la rende un candidato ideale per la progettazione di sistemi a rilascio controllato di farmaci.

In questo contesto, lo studio, svolto presso l'Istituto di Sintesi Organica e Fotoreattività (ISOF) del C.N.R di Bologna, si prefiggeva l'obiettivo di sfruttare le caratteristiche della cheratina in miscela con l'acido polilattico (biopolimero di particolare interesse, utilizzato qui per migliorare le proprietà meccaniche del materiale finale) per la produzione di nanofibre polimeriche da utilizzare per il rilascio controllato di farmaci. Allo scopo poi di migliorare e conferire ulteriori proprietà alle membrane elettrofilate, si è deciso di introdurre anche dell'ossido di grafene (GO) come nanorinforzo e di osservarne l'influenza non solo sulle proprietà meccaniche e strutturali, ma anche sull'entità del rilascio.



Nel corso del progetto di tesi, i sistemi nanofibrosi, ottenuti mediante elettrofilatura delle miscele cheratina/PLA pure o caricate con GO, sono stati caratterizzati dal punto di vista strutturale (porosità, swelling e morfologia) e meccanico. Buona parte del lavoro è stato concentrato però sulla valutazione di questi materiali nanofibrosi come sistemi per il rilascio controllato di principi attivi, attraverso test di rilascio *in vitro* di Rodamina B (RhB). La RhB non è propriamente un farmaco, ma viene spesso utilizzata in chimica analitica come drug model per studiare i sistemi di rilascio in condizioni fisiologiche (Temperatura di 37°C a pH 7,4), in quanto facilmente osservabile allo spettrofotometro UV-Vis.

In base a studi pregressi di ottimizzazione del processo di elettrofilatura, effettuati dal gruppo di ricerca della Dott.ssa Aluigi, si è deciso di utilizzare questi parametri per la produzione dei sistemi di rilascio nanofibrosi:

- solvente HFIP (1,1,1,3,3,3-esafluoro-2-propanolo o esafluoroisopropanolo) perché è comune ad entrambi i polimeri, possiede un'elevata costante dielettrica che permette la formazione di una elevata densità di carica ed inoltre ha una tensione di vapore tale da permetterne l'evaporazione nel percorso tra collettore ed ago;
- rapporto di miscelazione tra cheratina e PLA di 50/50, in quanto è il rapporto con il più elevato contenuto di PLA (polimero di rinforzo) in cui si hanno ancora interazioni positive di interfase e che permette di ottenere quindi le membrane con le migliori proprietà meccaniche;
- contenuto di GO pari allo 0,5% w/w, con il quale si ottengono le migliori dispersioni dei foglietti di grafene ossido (maggiore viscosità delle relative soluzioni composite) e nanofibre più sottili ed omogenee;
- concentrazione di Rodamina B (RhB) al 3% w/w, per ottenere profili di rilascio confrontabili con diversi dati di letteratura relativi a sistemi simili a quello studiato in questo lavoro.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Preparazione miscele di PLA e cheratina caricate con Rodamina-B

Le miscele sono state preparate partendo dalla solubilizzazione della rodamina al 3% w/w in HFIP. La soluzione così ottenuta è stata poi utilizzata per solubilizzare separatamente la cheratina e l'acido polilattico al 10% w/v per due ore circa. Dopodiché le due soluzioni sono state unite in unico vial (ottenendo così il rapporto 50/50 desiderato) e la miscela ottenuta (5 mL totali) è stata lasciata sotto agitazione magnetica per le 24 ore successive.

#### 3.2 Preparazione miscele di PLA e cheratina caricate con Rodamina-B e GO

Il procedimento utilizzato per la produzione di queste miscele è lo stesso utilizzato per quelle senza il GO, ma con l'unica differenza che, prima di solubilizzare i polimeri, nella soluzione di RhB ed HFIP viene disperso anche lo 0,5% w/w di polvere di GO, ottenuta mediante liofilizzazione di una sospensione acquosa. I fogli di GO utilizzati hanno una dimensione laterale media di circa 120 nm e uno spessore di circa 1 nm e sono stati ottenuti mediante metodo Hummers modificato <sup>[29]</sup> partendo da scaglie di grafite con un diametro delle particelle di circa 500 µm.

#### 3.3 Elettrofilatura

Il processo di elettrofilatura è stato effettuato mediante l'apparato presente nel laboratorio di Electrospeinning del C.N.R. di Bologna (**Figura 19**).



**Figura 19:** Apparato di elettrofilatura utilizzato nel lavoro di tesi, in cui sono indicati (da sinistra a destra) il generatore di alta tensione, la pompa dosatrice con la siringa e il collettore metallico.

Esso è costituito da un generatore di tensione ad alto voltaggio ( $\pm 30\text{KV}$ , 5mA) SVH150, Alintel Power Electronics (Italia), una siringa con diametro dell'ago capillare di 0,8 mm (20 gauge) in cui si inserisce la soluzione polimerica, una pompa per infusione KDS200, KD Scientific Inc. (USA) con la funzione di spingere lo stantuffo della siringa ad una velocità costante.

Alcuni parametri di processo, come il flusso, possono essere regolati tramite un sistema computerizzato. L'apparato presenta infine un collettore metallico (collegato a terra) di dimensioni 5 x 5 cm in acciaio inossidabile su cui vengono depositate le nanofibre.

Per effettuare il processo di elettrofilatura, le miscele cheratina/PLA con e senza GO sono state caricate all'interno della siringa e poi poste sul porta-campione. Il collettore è stato avvolto da carta da forno per poi staccare più facilmente la membrana nanofibrosa.

L'ago è stato collegato al generatore di alta tensione, è stata azionata la pompa in modo da far scorrere il flusso polimerico in direzione del collettore ed è stato quindi applicato l'elevato voltaggio.

I parametri di processo utilizzati per l'elettrofilatura sono visibili nella **Tabella 2**.

Parametro	Valore
Distanza Ago-Collettore (cm)	15
Voltaggio (kV)	18
Flusso (mL/min)	0,03

**Tabella 2:** Parametri utilizzati nel processo di elettrofilatura

### 3.4 Caratterizzazione morfologica delle nanofibre

La caratterizzazione della morfologia delle nanofibre è stata effettuata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM), utilizzando un microscopio Zeiss (LEO) Gemini 1530. Le immagini SEM sono state acquisite applicando una differenza di potenziale di 15 kV ed una distanza di lavoro di 5 mm. Il supporto di carta da forno con sopra le nanofibre è stato tagliato e posizionato su un porta-campioni in alluminio. I campioni nanofibrosi sono stati poi sottoposti ad una fase di preparazione preliminare in cui sono stati metallizzati con uno strato di oro (20-30 nm) in argon rarefatto, per scaricare l'eventuale accumulo di carica sulla superficie (lo renderebbe invisibile al

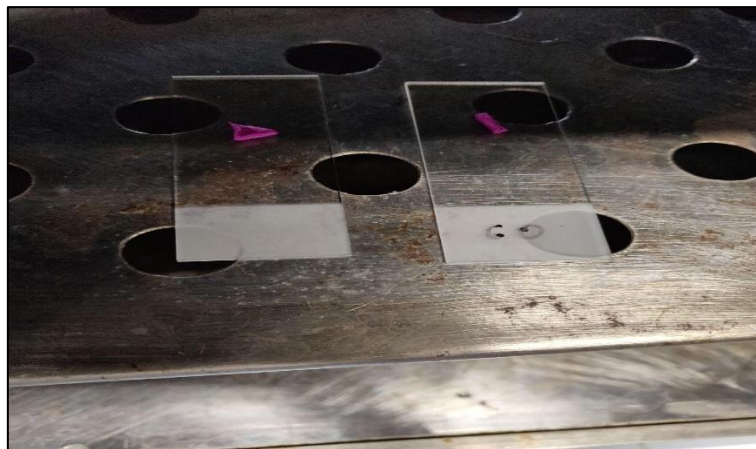
microscopio). Le misure dei diametri e le relative curve di distribuzione dei diametri medi delle nanofibre sono state effettuate utilizzando le immagini SEM acquisite in maniera casuale su zone differenti dei campioni, utilizzando Image J come software di elaborazione e manipolazione di immagini digitali. Per ogni campione la distribuzione dei diametri è stata valutata su 150 misure. Ogni curva di distribuzione dei diametri è stata poi interpolata con una curva Gaussiana usando Origin® Pro 8.0.

### 3.5 Caratterizzazione chimico-fisica delle nanofibre

Allo scopo di investigare le membrane nanofibrose ottenute, queste sono state caratterizzate meccanicamente e ne sono state determinate la porosità e lo swelling.

Le *proprietà meccaniche* di tutte le membrane sono state valutate mediante test a trazione. Per fare ciò è stato utilizzato un dinamometro Remet TC-10, con cella di carico di 100 N. Dalle membrane sono stati ottenuti dei provini campione di dimensioni 30x15 mm, mentre lo spessore è stato valutato utilizzando un calibro micrometrico. Sono stati testati tre campioni per ognuna delle due tipologie di membrane ottenute (con e senza GO) e in seguito alla prova, per normalizzare lo sforzo rispetto alla massa, i provini sono stati pesati. Fissati i provini, si è azionato lo strumento, applicando un carico tale da avere una velocità di allungamento di 10 mm/min.

Per la determinazione della capacità di *swelling*, invece, sono stati preparati, a partire dalle membrane elettrofilate, dei campioni 1x1 cm, i quali sono stati seccati per due ore in stufa ad una temperatura di circa 105 °C (**Figura 20**) e pesati.



**Figura 20:** campioni di nanofibre sottoposti a 105 °C in stufa per 2 ore.

I campioni sono poi stati immersi in 10 mL di PBS a pH 7,4 e lasciati in un bagno ad acqua a temperatura costante di 37 °C per due ore. A questo punto i campioni sono stati prelevati, eliminando il liquido in eccesso, e pesati su bilancia analitica, registrando il peso umido. Il rapporto di swelling è stato poi ottenuto applicando la seguente formula:

$$\text{Swelling ratio} = \frac{\text{Peso umido} - \text{Peso secco}}{\text{Peso umido}}$$

Infine, le misure di *porosità* sono state effettuate tagliando con precisione le membrane elettrofilate in campioni 2x2 cm, in modo da poterne così valutare accuratamente il volume totale occupato (per valutare lo spessore si è utilizzato un calibro di precisione come osservabile alla **Figura 21**).



**Figura 21:** misurazione dello spessore della membrana mediante il calibro di precisione

I singoli campioni sono stati quindi pesati prima in aria ( $m_1$ ) e poi in n-esano ( $m_2$ ), in modo da poter ricavare così la densità del campione applicando la seguente equazione:

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

con  $\rho_h$  = densità dell'esano a temperatura di misura.

La porosità ( $\varepsilon$ ) della membrana viene infine ottenuta applicando quest'ultima formula:

$$\varepsilon = \frac{V_{tot} - V}{V_{tot}} \times 100$$

con:  $V_{\text{tot}}$  = volume totale “apparente” della membrana, ottenuto moltiplicando lo spessore della membrana per la sua area;

$V$  = volume reale ottenuto dividendo la massa della membrana ( $m_1$ ) per la densità ( $\rho$ ).

### 3.6 Studio dei rilasci di Rodamina-B dalle nanofibre

Per la determinazione dei profili di rilascio, sono stati preparati, a partire dalle nanofibre elettrofilate, dei campioni 2x2 cm che sono stati pesati ed in seguito inseriti all'interno di membrane di acetato di cellulosa. L'acetato contenente le membrane è stato quindi chiuso ed inserito in una falcon contenente 6 mL di PBS a pH 7,4. A questo punto le falcon sono state inserite in un bagno ad acqua a 37 °C per mimare al meglio le condizioni fisiologiche (**Figura 22**). Ad intervalli di tempo prestabiliti sono stati effettuati prelievi da 100  $\mu\text{L}$ , rabboccati poi con PBS a pH 7,4 pulito. Il tutto è stato eseguito fino alle 48 ore.

Per avere inoltre un confronto con un sistema “standard”, si è deciso di eseguire lo stesso test di rilascio con soluzioni contenenti la stessa quantità di RhB contenuta all'interno delle membrane 2x2.

La rodamina rilasciata nel tempo è stata calcolata registrando l'assorbanza a  $\lambda = 553 \text{ nm}$  (massimo di assorbimento) con uno spettrofotometro UV-Vis Cary 100 della Agilent Technologies.



**Figura 22:** bagno ad acqua utilizzato per mantenere la temperatura di 37 °C.

Per valutare poi la natura del meccanismo di rilascio, sono state eseguite sulle membrane con e senza GO delle misure di spettroscopia a infrarossi prima e in seguito ai rilasci. Gli spettri IR sono stati acquisiti mediante la tecnica della riflessione attenuata totale (ATR), utilizzando un interferometro Bruker Vertex 70 dotato di un accessorio Platinum ATR a riflessione in cristallo di diamante, nella regione tra 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ , con 32 scansioni. Maggiore attenzione verrà posta però nella zona tra 1800 e 600  $\text{cm}^{-1}$ , dove si concentrano i segnali tipici della cheratina.

## 4. DISCUSSIONE DEI RISULTATI

### 4.1 Caratterizzazione chimico-fisica delle nanofibre

L'elettrofilatura della miscela di cheratina e PLA 50/50 caricata con il 3% w/w di rodamina-B, eseguita utilizzando parametri ottimizzati in lavori pregressi, è risultata stabile, senza problemi di gocciolamento dall'ago, e la deposizione delle nanofibre sul collettore è risultata uniforme. Si sono ottenute così delle membrane nanofibrose facili da maneggiare e omogenee, senza difetti significativi come buchi o accumuli di materiale. Da un punto di vista macroscopico, le membrane ottenute, che contengano o meno il GO, si presentano di colore rosa tendente al fucsia, colore tipico della rodamina (**Figura 23**).



**Figura 23:** fotografia rappresentativa delle membrane ottenute mediante elettrofilatura.

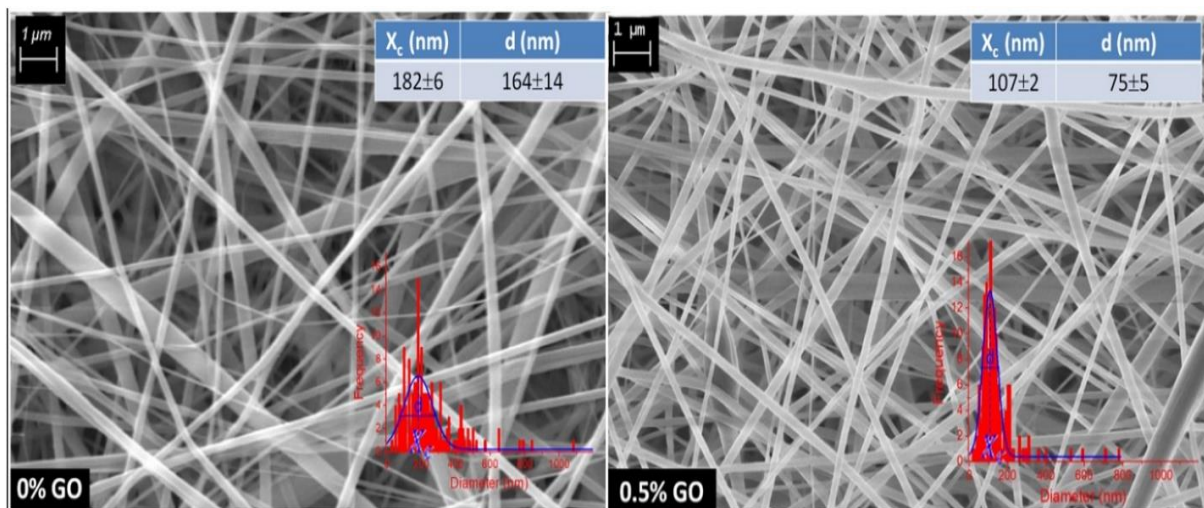
La **Figura 24** rappresenta invece la morfologia delle nanofibre osservata con l'utilizzo del microscopio a scansione elettronica (SEM). Come si può osservare, le membrane elettrofilate sono costituite da nanofibre lisce, prive di difetti, cilindriche ed orientate in maniera casuale a formare una struttura tridimensionale in cui i numerosi pori sono tra loro interconnessi. Sono assenti persino difetti imputabili ai foglietti di grafene, come



eventuali sporgenze, e questo può essere dovuto al fatto che, a causa del processo di elettrofilatura, tali foglietti di GO si siano depositati lungo la direzione della fibra.

I diametri delle nanofibre mostrano una distribuzione Gaussiana, di cui il picco centrale ( $X_c$ ) e la larghezza a metà altezza ( $d$ ) ne descrivono rispettivamente le dimensioni e l'uniformità.

Le nanofibre cheratina-PLA mostrano una distribuzione Gaussiana dei diametri centrata a 182 nm e con un'ampia larghezza di 164 nm. Come ci si aspettava, l'introduzione del GO riduce il diametro delle nanofibre con uno shift del picco centrale che lo porta fino a 100 nm, contribuendo a produrre nanofibre maggiormente uniformi (come indicato da un valore di  $d$  significativamente minore, ossia 75 nm).



**Figura 24:** immagini SEM dei campioni nanofibronici comprendenti le distribuzioni dei diametri.

Questo comportamento può essere attribuito ad una maggiore viscosità, nonché ad un maggiore tempo di rilassamento delle catene polimeriche in presenza dei fogli di grafene ossido, i quali contribuiscono da un lato a stabilizzare il getto fuoriuscente dalla siringa durante l'elettrofilatura e dall'altro a mantenere lo stiramento e l'orientazione delle catene polimeriche, indotte dal campo elettrostatico (vedi **Tabella 3**).

Per quanto riguarda invece la porosità e la capacità di assorbire fluidi (swelling ratio) si ricorda che queste sono proprietà molto importanti per un materiale che viene progettato per l'ingegneria tissutale o per il rilascio controllato di farmaci, in quanto favoriscono l'adesione e la proliferazione delle cellule, nonché influenzano il processo di carica e rilascio dei farmaci. Dai dati raccolti si è potuto osservare come le membrane prodotte

siano caratterizzate da un'elevata porosità e da un elevato swelling ratio ma d'altro canto, l'aggiunta del grafene ossido non provoca alcun cambiamento significativo riguardo alla porosità e allo swelling ratio, come riportato in **Tabella 3**. Questi risultati fanno ben sperare per possibili applicazioni future di questi sistemi nell'ingegneria tissutale e nella cura delle ferite, in quanto potrebbero essere molto utili nell'allontanare eventuali eccessi di essudati.

<i>% GO</i>	<i>Viscosità Zero-shear (Pa s)</i>	<i>Diametro (nm)</i>	<i>Spessore (<math>\mu</math>m)</i>	<i>Porosità (%)</i>	<i>Swelling Ratio</i>
0	0,96 $\pm$ 0,01	182 $\pm$ 6	48 $\pm$ 6	97 $\pm$ 3	72 $\pm$ 2
0,5	5,27 $\pm$ 0,02	107 $\pm$ 2	31 $\pm$ 7	97 $\pm$ 1	70 $\pm$ 6

**Tabella 3:** caratteristiche fisiche osservate nei campioni con e senza GO

## 4.2 Caratterizzazione meccanica delle membrane

Per valutare le proprietà meccaniche delle membrane elettrofilate, le considerazioni classiche sulla rigidità del materiale e lo studio degli andamenti delle curve sforzo-deformazione risultano assai complessi, in quanto complessa è la struttura delle membrane nanofibrose e la risposta mostrata in seguito alla trazione. Per studiare il comportamento di questi materiali è necessario un approccio differente, che tenga proprio conto della struttura nanofibrosa.

Utilizzando l'approccio classico, che prevede la normalizzazione della forza rispetto all'area della sezione perpendicolare su cui la forza stessa è applicata (per cui lo sforzo  $\sigma = F/A$ ), non infatti conto della morfologia fibrosa del materiale e si assume che il volume libero tra le fibre sia riempito con lo stesso materiale che le costituisce. Ciò però costituisce un'approssimazione alquanto grossolana, soprattutto nel nostro caso in cui è stata osservata una porosità molto elevata, addirittura pari al 97%, la quale porta ad una sottostima degli sforzi e di tutte le altre proprietà meccaniche correlate.

Per superare questo problema è stato introdotto un nuovo metodo di normalizzazione della forza, basato questa volta sulla massa del provino anziché sulla sezione, eliminando così l'incertezza presente sullo spessore, anch'esso di difficile misurazione (varia in base alla strumentazione utilizzata) <sup>[30]</sup>.

Qui lo sforzo diventa funzione della massa e di altri parametri facilmente misurabili:

$$\sigma \text{ (MPa)} = \rho \frac{F}{m} L$$

in cui: m = massa provino (mg);  $\rho$  = densità del materiale (mg/mm<sup>3</sup>); F = forza applicata (N); L = lunghezza iniziale del provino (mm).

Utilizzando questa normalizzazione si vanno così ad evitare tutti gli errori legati alla misura dello spessore e quindi anche della sezione, ottenendo risultati più affidabili, riproducibili e accurati.

Durante le prove di trazione le nanofibre hanno mostrato una buona capacità di deformazione, in quanto la rottura non è stata istantanea, ma la membrana ha subito un cedimento graduale.

La **Tabella 4** riporta i risultati delle prove di trazione delle membrane nanofibrose; in particolare vengono riportati i valori di sforzo a rottura e del modulo di Young, con le relative deviazioni standard, calcolati sia seguendo il metodo classico che con il metodo della normalizzazione della forza basata sulla massa.

% GO	Modulo (su massa) (MPa)	Dev.st. (MPa)	Modulo (su sezione) (MPa)	Dev.st. (MPa)	Sforzo Max (su massa) MPa	Dev.st. (MPa)	Sforzo Max (su sezione) MPa	Dev.st. (MPa)
0	363,57	93,33	47,02	15,61	9,24	1,48	1,17	0,12
0,5	382,49	38,35	56,11	8,84	7,41	0,77	1,08	0,04

**Tabella 4:** risultati delle prove di trazione eseguite sulle membrane nanofibrose.

I risultati ottenuti con l'approccio classico dimostrano un'influenza poco significativa del GO sul modulo di Young e sui valori di sforzo massimo e di allungamento a rottura, i cui valori rimangono pressoché inalterati.

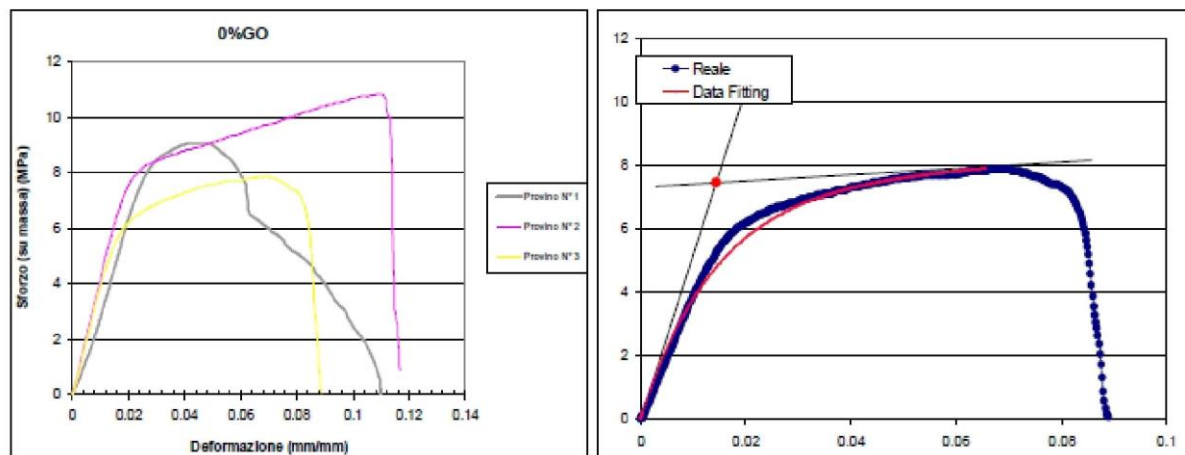
Rielaborando però i risultati delle prove di trazione utilizzando il metodo di normalizzazione della forza sulla massa ed il modello di data fitting ( $\sigma(\epsilon) = \sigma_1(\epsilon) - \sigma_2(\epsilon) = (a*\epsilon + b) - (b*e^{-(c*\epsilon)}) = a*\epsilon + b*(1 - e^{-(c*\epsilon)})$ ); lo sforzo totale è dato dalla somma dei due contributi, uno lineare e uno esponenziale, con "a", "b" e "c" che

vengono determinati sperimentalmente volta per volta per ottenere il miglior fitting dei dati sperimentali), si riscontrano valori di sforzo notevolmente maggiori, dato che non viene considerato il volume vuoto tra le fibre.

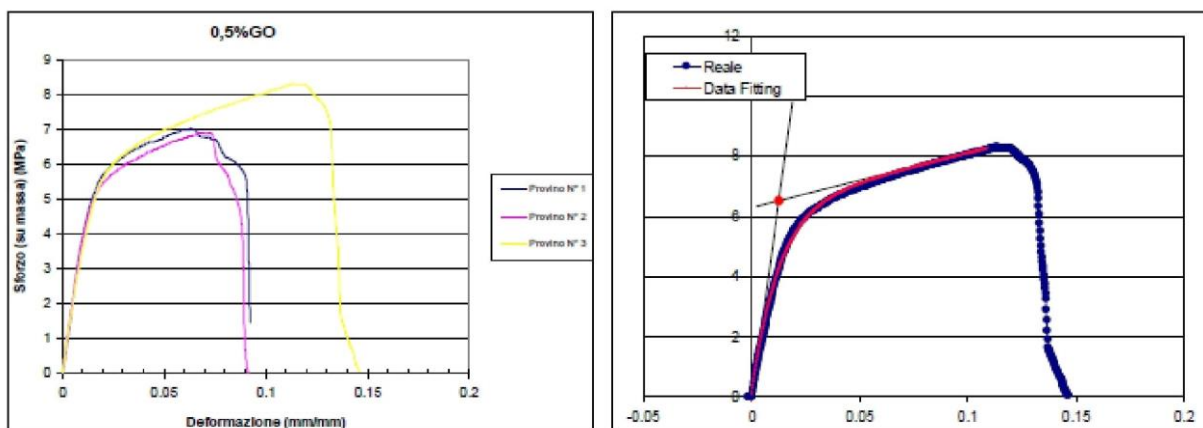
Questa procedura di analisi evidenzia che l'introduzione di GO non provoca variazioni significative sull'allungamento a rottura, ma si osservano un buon aumento del modulo di Young e, allo stesso tempo, una diminuzione dello sforzo massimo a rottura.

La **Figura 25** mostra le curve sforzo-deformazione ottenute utilizzando lo sforzo ottenuto col metodo della normalizzazione sulla massa. Risulta evidente come l'aggiunta di GO vada quindi ad influenzare le proprietà meccaniche delle membrane elettrofilate, incrementando il modulo di Young.

#### KER/PLA – 0% GO



#### KER/PLA – 0,5% GO



**Figura 25:** Grafici sforzo-deformazione delle membrane elettrofilate ottenute mediante normalizzazione della forza basata sulla massa e data fitting.

Inoltre, si può osservare un incremento del modulo nella zona con tendenza lineare, il quale permette di valutare anche l'influenza del GO su come le nanofibre siano organizzate all'interno della membrana elettrofilata.

Durante l'applicazione di un carico alle membrane, queste subiscono uno scioglimento dei nodi tra le fibre, le quali si orientano in direzione dello stiro allungandosi fino a rottura. A rafforzare questa ipotesi entra in gioco il fatto che la presenza del GO porta ad una diminuzione dei diametri nanofibrosi, con conseguente assottigliamento delle membrane ed incremento degli entanglements tra le fibre, che si oppongono al carico applicato.

È stato dimostrato infatti che una struttura nanofibrosa potrebbe migliorare le prestazioni meccaniche di un materiale quando il loro diametro scende al di sotto di un certo valore di soglia <sup>[31]</sup>. Il GO, grazie alla sua elevata area superficiale, funge quindi da rinforzo delle nanofibre, ritardandone la rottura quando queste ultime sono orientate in direzione dello stiro.

### **4.3 Studio dei profili di rilascio di Rodamina-B dalle nanofibre**

Il rilascio dei farmaci da materiali di natura polimerica dipende da un numero elevato di fattori, ma le principali driving force che portano alla migrazione del farmaco al di fuori del carrier sono sicuramente la diffusione del principio attivo attraverso la matrice polimerica, lo swelling del materiale oppure l'erosione del sistema con conseguente fuoriuscita del farmaco.

La modellizzazione matematica di questi processi nasce quindi con lo scopo di semplificare il processo di rilascio, di per sé complesso, concentrandosi su una o due delle forze motrici dominanti. Numerosi sono stati sinora i modelli matematici sviluppati per descrivere il trasporto dei soluti al di fuori di un sistema di rilascio <sup>[32]</sup>, ma capita ancora spesso che dati sperimentali e teoria non concordino proprio in virtù delle numerose forze in gioco nel processo di rilascio.

In questo studio, i rilasci sono stati effettuati in condizioni fisiologiche (37 °C e pH 7,4 mantenuto dal tampone fosfato PBS) attraverso delle membrane di acetato di cellulosa, generalmente usate come primo modello di screening per valutare i profili di rilascio determinati sia dal tipo di matrice sia dal tipo di interazione tra farmaco e matrice.

La quantità di Rodamina ottenuta dai rilasci è stata quindi rilevata mediante spettroscopia UV-Vis, utilizzando i valori di assorbanza corrispondenti al massimo di assorbimento ( $\lambda = 553 \text{ nm}$ ).

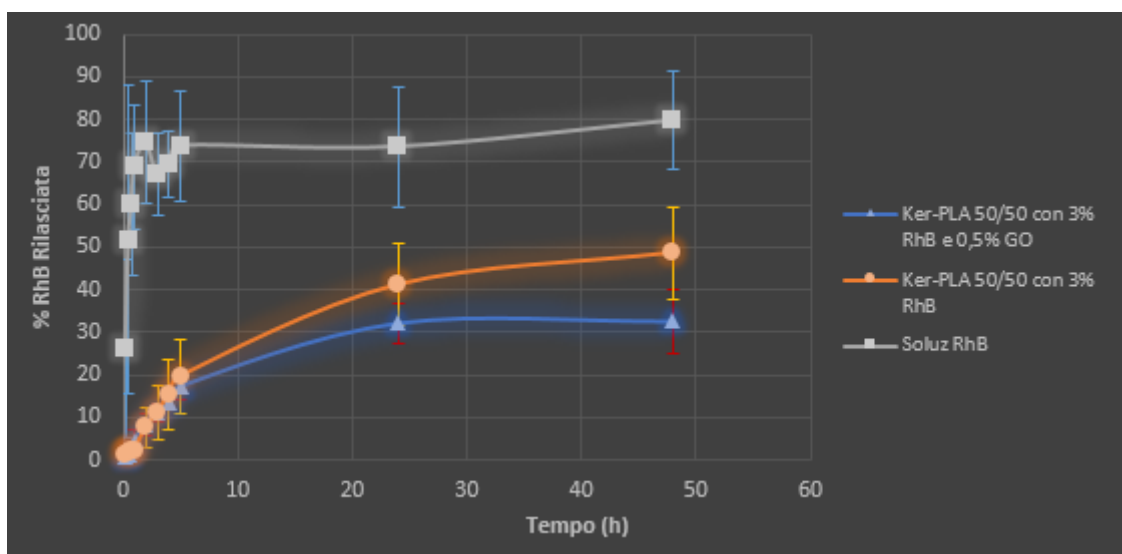
In **Figura 26**, i profili di rilascio di RhB da membrane elettrofilate di cheratina-PLA 50/50 con e senza GO sono stati paragonati a quello di RhB libera (considerato come profilo di riferimento).

Il profilo di rilascio della RhB raggiunge sin da subito elevate percentuali, arrivando ad un plateau dopo solo due ore (*Burst release*).

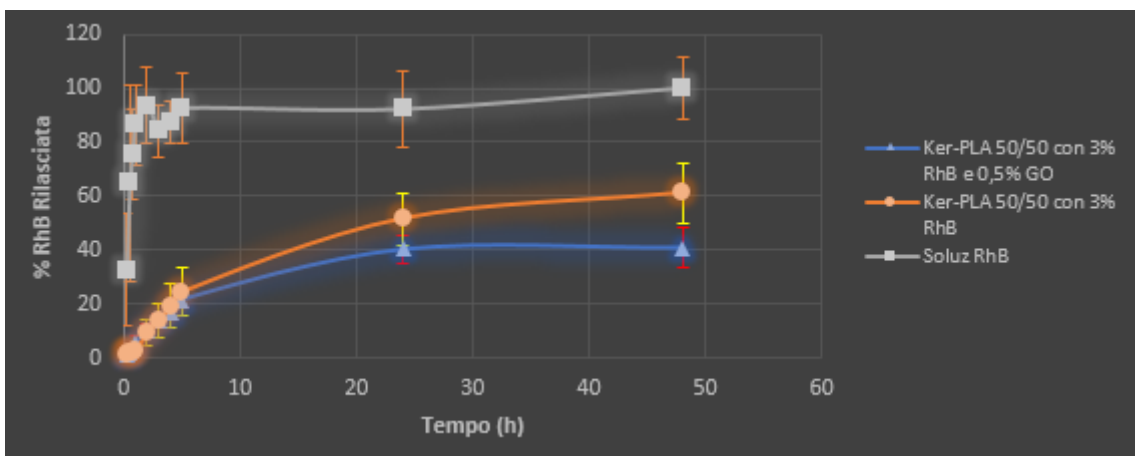
Dalla Figura 26 si può però notare che la percentuale di rodamina rilasciata dalla soluzione raggiunge un plateau all'80% (e non al 100%), probabilmente perché un quantitativo di rodamina viene trattenuto dalla membrana di acetato di cellulosa (questa ipotesi è stata fatta considerando che i dati finali costituiscono una media di 5 misure ripetute per tempo). Si è deciso quindi di normalizzare tutti i dati di rilascio ponendo come 100% la quantità massima di RhB rilasciata dalla soluzione libera, ovvero quell'80% ottenuto alle 48 ore (**Figura 27**).

Paragonando i profili di rilascio normalizzati come descritto sopra, si può osservare che la rodamina rilasciata dopo solo due ore dalle membrane elettrofilate è circa del 9%. Non si osserva quindi un effetto significativo del GO nella fase iniziale di rilascio.

A tempi più lunghi invece (24 e 48 ore), si osserva che la quantità di RhB rilasciata dalle membrane contenenti il GO risulta inferiore a quella della membrana senza GO.



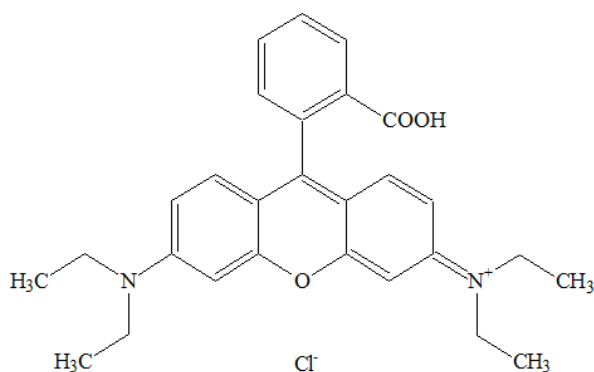
**Figura 26:** Grafico raffigurante la percentuale di RhB rilasciata in funzione del tempo di contatto.



**Figura 27:** Grafico della Figura 26 normalizzato.

Infatti, ad un tempo pari alle 48 ore, il sistema contenente il GO presenta una percentuale di rodamina rilasciata pari al 41%, mentre nel sistema in cui il grafene ossido è assente si ha già un rilascio pari al 61%.

Se si pensa infatti alla struttura della Rodamina-B (**Figura 28**), questa è caratterizzata dalla presenza di un elevato numero di anelli aromatici e dalla presenza di una carica positiva sull'atomo di azoto. Si potrebbe ipotizzare che l'elevata area superficiale e la presenza di un network aromatico come quello del GO possa provocare la formazione di interazioni di stacking  $\pi$ - $\pi$  tra gli anelli aromatici della rodamina e quelli del GO, permettendo un maggiore controllo del rilascio, che sarà quindi più prolungato nel tempo.



**Figura 28:** struttura Rodamina-B

Per comprendere il meccanismo del rilascio di RhB dalle membrane nanofibrose, è stato utilizzato il modello matematico di Korsmeyer-Peppas <sup>[33]</sup>.

Si tratta di un modello semi-empirico che correla il rilascio del farmaco al tempo attraverso un'equazione esponenziale e per una frazione di rilascio del farmaco  $\leq 60\%$ . Il modello matematico di Korsmeyer-Peppas è descritto nella seguente equazione:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n$$

in cui  $\frac{M_t}{M_\infty}$  è la frazione di RhB rilasciato al tempo  $t$ ,  $k$  è la costante cinetica e l'esponente  $n$  è indicativo del meccanismo di rilascio.

Nel caso di campioni cilindrici (come sono, per approssimazione, le nanofibre),  $n \leq 0,45$  rappresenta un rilascio per diffusione di Fick;  $n = 0,89$  indica un rilascio puramente controllato dal rigonfiamento e/o dall'erosione della matrice; mentre, se  $0,45 < n < 0,89$  il rilascio avviene in parte per diffusione di Fick ed in parte per rigonfiamento/erosione della matrice. I valori di  $k$  invece sono legati alla cinetica del rilascio: un  $k$  inferiore indica un rilascio più lento.

In **Tabella 5**, sono riportati i parametri di Korsmeyer-Peppas  $n$  e  $k$  relativi alle membrane di cheratina-PLA 50/50 con e senza GO. Come si può notare, entrambi i campioni hanno mostrato un valore  $n$  superiore a 0,45 e inferiore a 0,89 indicando che il rilascio di RhB è controllato in parte dal rigonfiamento (o erosione) della matrice ed in parte dalla diffusione di Fick. Sebbene l'aggiunta di GO riduca la quantità finale di RhB rilasciata, non rallenta il rilascio all'inizio, poiché i due campioni presentano gli stessi valori della costante cinetica  $k$ .

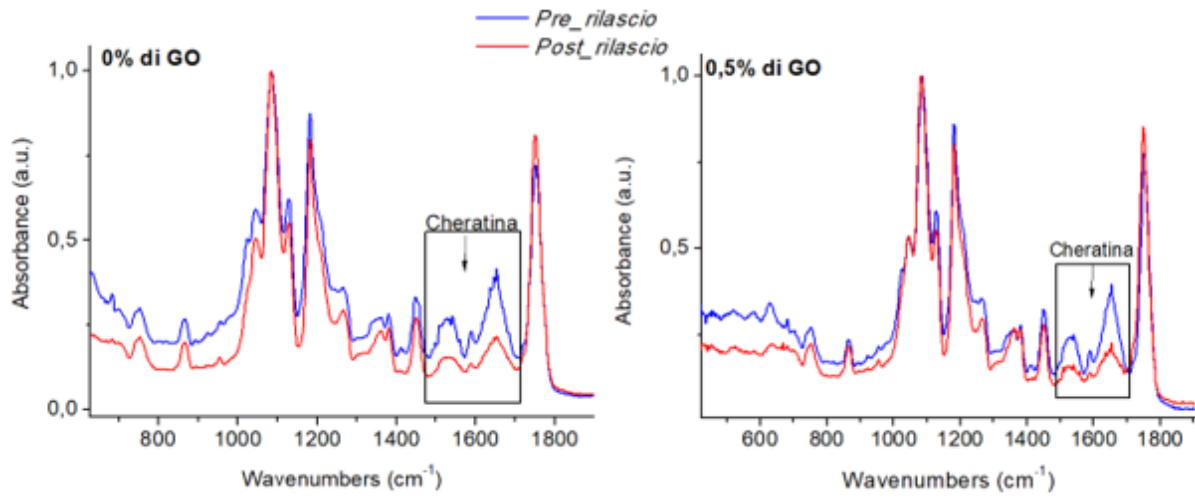
% GO	$n$	$k$ (h <sup>-n</sup> )	R <sup>2</sup>
0	0,65±0,05	7±1	0,96071
0,5	0,56±0,05	7,1±0,9	0,956

**Tabella 5:** parametri di Korsmeyer-Peppas per le due membrane.

In **Figura 29**, sono riportati gli spettri IR delle membrane prima (linea blu) e dopo (linea rossa) i test di rilascio. Gli spettri sono stati normalizzati per il segnale del PLA a 1080 cm<sup>-1</sup> (vibrazioni C-O-C). Come si può notare, le intensità delle bande relative alla cheratina delle membrane dopo il rilascio sono inferiori rispetto a quelle delle membrane di partenza (prima del rilascio). Pertanto, indipendentemente dalla presenza o meno di GO, le membrane dopo il rilascio presentano una quantità inferiore di cheratina.



Questo comportamento suggerisce che il rilascio di RhB per erosione coinvolge in modo particolare la parte proteica della membrana.



**Figura 29:** spettri IR delle membrane con e senza GO in condizioni pre e post rilascio.

## 5. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sperimentale sono state prodotte delle membrane nanofibrose a base di cheratina e PLA, con lo scopo di studiare l'effetto della presenza di grafene ossido sulle proprietà chimico-fisiche e meccaniche del materiale elettrofilato e sul processo di rilascio dei farmaci (utilizzando la Rodamina-B come modello di farmaco), per un futuro impiego di questi sistemi nel settore biomedicale.

Questi materiali sono stati prodotti mediante un processo di elettrofilatura a partire da una miscela 50/50 di cheratina e PLA, i quali sono stati solubilizzati utilizzando in un caso una soluzione di rodamina e HFIP, mentre nell'altro una soluzione di rodamina e HFIP contenente anche uno 0,5 % w/w di grafene ossido.

Lo studio delle proprietà chimico-fisiche delle membrane ha portato alla determinazione della distribuzione dei diametri delle nanofibre ed all'osservazione di un'incidenza del GO sulla morfologia. I materiali contenenti GO presentano infatti nanofibre con un minore diametro e maggiore omogeneità e ciò potrebbe essere dovuto ad una maggiore viscosità, nonché ad un maggiore tempo di rilassamento delle catene polimeriche in presenza dei fogli di grafene, che però non causano alcuna variazione significativa per quanto concerne la porosità ed il fenomeno del rigonfiamento (swelling) delle membrane.

Le membrane sono state poi sottoposte a prove di trazione, dimostrando una buona resistenza meccanica. Anche in questo caso il GO influisce sulle proprietà del materiale, incrementando notevolmente il modulo di Young e fungendo così da nanorinforzo.

Lo studio dei profili di rilascio della Rodamina-B in condizioni fisiologiche ha dimostrato come la presenza del GO influenzi notevolmente il rilascio della rodamina, riducendo in modo significativo la quantità di farmaco rilasciato in un intervallo di tempo relativamente lungo (48 ore). Questo potrebbe dipendere da interazioni di stacking  $\pi$ - $\pi$  che si vengono ad instaurare tra gli anelli aromatici della rodamina e quelli del grafene ossido.

I dati ottenuti sono incoraggianti, per questo motivo saranno effettuati ulteriori studi andando a valutare i sistemi dal punto di vista biologico (studiando, ad esempio, quanto favoriscano l'adesione e la proliferazione dei fibroblasti), andando a studiare lo stesso

sistema ma utilizzando questa volta un vero farmaco, come può essere il Diclofenac, e verranno sicuramente effettuati anche test per studiare l'influenza di concentrazioni maggiori di GO sui rilasci.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. [https://salute.regione.emilia-romagna.it/normativa-e-documentazione/rapporti/dispositivi-medici/medicazioni\\_avanzate](https://salute.regione.emilia-romagna.it/normativa-e-documentazione/rapporti/dispositivi-medici/medicazioni_avanzate);
2. Caretti D., *Dispense Polimeri per Usi Speciali* **2019**;
3. Zhang X Z, Tian C H, Chen Z R, Zhao G, *Advanced Therapeutics* **2020**, 3, 2000001;
4. Yang S, Leong K F, Du Z, Chua C K, *Tissue Engeneering* **2001**, 7, 679-689;
5. Juliano C., *Seminario su: Rilascio controllato di farmaci* **2004-2005**;
6. Kajdič S., Planinšek O., Gašperlin M., Kocbek P., *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2019**, 51, 672-681;
7. Kamble P., Sadarani B., Majumdar A., Bhullar S., *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2017**, 41, 124-133;
8. Dhiman S., Singh T. G., Rehni A. K., *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2011**, 3, 26-34;
9. Cheng J F, Li H, Zhou J, Lin Z X, Wu D, Liu C L, Cao Z, *Journal of Hazardous Materials* **2020**, 399, 122976;
10. Palmqvist A. E. C., *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2003**, 8, 145–155;
11. Liu M H, Duan X-P, Li Y-M, Yang D-P, Long Y-Z, *Materials Sciance and Engeneering: C* **2017**, 76, 1413-1423;
12. Han D, Cheung K C, *Polymers (Basel)* **2011**, 3, 1684–1733
13. Maghsoodlou S., Noroozi B., Haghi A. K., *Nano* **2017**, 12, 1750028;
14. Agrahari Vib., Agrahari Viv., Meng J., Mitra A. K., *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices* **2017**, 189-215;
15. Aluigi A., Sotgiu G., Torreggiani A., Guerrini A., Orlandi V. T., Corticelli F., Varchi G., *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, 7, 17416-17424;
16. Kim N. K., Lin R. J. T., Bhattacharyya D., *The 38th Polymer Conference & Annual Meeting of the Polymer Society* **2015**;
17. Ferroni C., Sotgiu G., Sagnella A., Varchi G., Guerrini A., Giuri D., Polo E., Orlandi V. T., Marras E., Gariboldi M., Monti E., Aluigi A., *Biomolecules* **2016**, 17, 2882-2890;

18. Posati T., Giuri D., Nocchetti M., Sagnella A., Gariboldi M., Ferroni C, Sotgiu G., Varchi G., Zamboni R., Aluigi A., *European Polymer Journal* **2018**, *105*, 177-185;
19. Aluigi A., Varesano A., Vaneis C., Del Rio A., *Materials & Design* **2017**, *127*, 144-153;
20. Mehta R., Kumar V., Bhunia H., Upadhyay S. N., *Journal of Macromolecular Science-Polymer Review* **2005**, *45*, 325–349;
21. Hamad K., Kaseem M., Yang H. W., Deri F., Ko1 Y. G., *eXPRESS Polymer Letters* **2015**, *9*, 435-455;
22. Gupta B., Revagade N., Hilborn J., *Progress in Polymer Science* **2007**, *32*, 455-482;
23. Rasal R. M., Janorkar A. V., Hirt D. E., *Progress in Polymer Science* **2010**, *35*, 338-356;
24. Cassani M. C., *Dispense di Chimica Inorganica con Laboratorio* **2018**;
25. Ding X. L., Liu H. F., Fan Y. B., *Advanced Healthcare Materials* **2015**, *4*, 1451-1468;
26. Mao Z., Li J. L., Huang W. J., Jiang H., Zimba B. L., Chen L., Wan J. L., Wu Q. Z., *RSC Advanced* **2018**, *8*, 16619-16625;
27. Ellen Mac Arthur Foundation e Mc Kinsey Company, *The New Plastic Economy: Rethinking the future of plastic*, *World Economic Forum* **2016**;
28. Geyer R., Jambeck J. R., Law K. L., *Production, use and fate of all plastic ever made*, *Science Advances* **2017**;
29. Zaaba N. I., Foo K. L.; Hashim U., *Advances in Material & Processing Technologies Conference* **2016**, *184*, 469-477;
30. Maccaferri E., Mazzocchetti L., Benelli T., Zucchelli A., Giorgini L., *Composites Part B* **2019**, *166*, 120-129;
31. Deitzel J. M., Kleinmeyer J., Harris D., Tan N. C. B., *Polymer* **2001**, *42*, 261– 272;
32. Rezaei A., Nasirpour A., Tavanai H., Fathi M., *Flavour and Fragrance Journal* **2016**;
33. Dash S., Murthy P. N., Nath L., Chowdhury P., *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* **2010**, *67*, 217-223.