

SCUOLA SUPERIORE "G. d'Annunzio"

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMOLECOLARI E FARMACEUTICHE

CICLO XXXVIII

**Sviluppo di un sistema composito a base di solidi lamellari,
membrane biologiche e chitosano come dispositivo medico
innovativo nell'abito della ricostruzione mammaria post-
mastectomia**

Dipartimento di SCIENZE MEDICHE, ORALI E BIOTECNOLOGICHE

Settore Scientifico Disciplinare CHEM-07/A

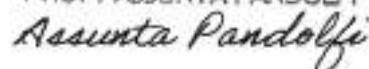
Dottorando

CATERINA FAFFA



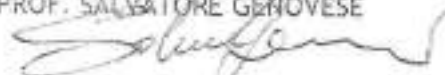
Coordinatore

PROF. ASSUNTA PANDOLFI



Tutor

PROF. SALVATORE GENOVESE



Tutor aziendale

ROBERTO SPOGLI PhD



Anni Accademici 2022 / 2025

Sommario

Abbreviazioni	1
Il chitosano come piattaforma polimerica funzionale.....	3
1. Biomateriali e ingegneria tissutale: contesto generale	3
2. Il chitosano	3
2.1 Origine, struttura chimica e parametri fondamentali del chitosano	4
2.1.1 Comportamento del chitosano in soluzione: ruolo di pH e forza ionica	5
2.1.2 Organizzazione supramolecolare e cristallinità	6
2.1.3 Reattività chimica e possibilità di funzionalizzazione del chitosano	7
2.1.4 Reticolazione del chitosano	7
2.1.5 Chitosano come famiglia di molecole e suo ruolo nella presente tesi	10
2.2 Dal polimero al materiale: forme fisiche e comportamento del chitosano	11
2.2.1 Membrane e film di chitosano	11
2.2.2 Idrogel di chitosano	12
2.2.3 Micro- e nanoparticelle di chitosano.....	13
2.2.4 Spugne e scaffold porosi.....	14
2.2.5 Stabilizzazione del chitosano	14
2.3 Il chitosano nei dispositivi biomedicali	15
2.3.1 Il chitosano come materiale d'interfaccia con le superfici biologiche	15
2.3.2 Il chitosano come bioadesivo	16
2.3.3 Il chitosano come materiale antimicrobico e antibiofilm.....	18
2.3.4 Sinergia tra funzione bioadesiva e funzione antibatterica del chitosano	20
2.3.5 Il chitosano come piattaforma ingegnerizzabile per applicazioni biomedicali	21
Le membrane biologiche come biomateriali.....	23
1. Struttura e caratteristiche generali della ECM di origine animale	23
2. Il pericardio bovino come modello di membrana biologica	24
2.1 Struttura e comportamento meccanico del pericardio bovino.....	24
2.2 Utilizzo del pericardio bovino come biomateriale.....	25
3. Trattamenti di stabilizzazione delle membrane biologiche	26
3.1 Reticolazione delle membrane biologiche.....	26
3.2 Decellularizzazione delle membrane biologiche	27
3.3 Trattamenti fisici	27
3.4 Funzionalizzazione	27
3.5 Interazione tra trattamenti e proprietà finali del materiale	28

4. Ingegnerizzazione delle membrane biologiche	28
4.1 Coating polimerici	28
5. Progettazione modulare dei biomateriali	29
I solidi lamellari.....	30
1. Generalità dei solidi lamellari.....	30
1.1 Classificazione dei solidi lamellari	30
1.2 Intercalazione.....	31
2. Idrotalciti	32
2.1 Struttura delle idrotalciti	32
2.2 Elementi caratterizzanti le idrotalciti	34
2.3 La natura dell'anione e acqua di idratazione.....	34
2.4 Metodi di sintesi	34
2.5 Effetto memoria.....	35
2.6 Caratteristiche macroscopiche	35
2.7 Applicazioni delle idrotalciti	36
2.7.1 Le idrotalciti come piattaforme per il drug delivery nanostrutturato.....	37
3. Fosfati di zirconio di tipo α	38
3.1 Struttura dei fosfati di zirconio di tipo α.....	39
3.2 Metodi di sintesi	39
3.3 Caratteristiche macroscopiche	40
3.4 Scambio ionico e applicazioni dei fosfati di zirconio	40
4. I solidi lamellari come piattaforme chimiche funzionali	40
Sistemi compositi a base di membrane biologiche, solidi lamellari e chitosano	41
1. Integrazione strutturale e ruolo dell'interfaccia.....	41
2. Integrazione del modulo LDH nel coating polimerico	41
3. Moderne tendenze della ricerca sui dispositivi biomedicali	42
4. Scalabilità e trasferibilità tecnologica	42
5. Obiettivo della presente tesi	43
Applicazione: membrane in pericardio bovino funzionalizzate con chitosano e solidi lamellari per chirurgia mammaria	44
1. Introduzione.....	44
1.1 Ambito di intervento del progetto	44
1.2 Scopo e obiettivi del progetto	45
1.3 Potenziale innovativo del progetto.....	47
1.4 Stato dell'arte dei dispositivi biomedicali a base di pericardio bovino	48
1.5 Membrana biologica in pericardio bovino BioRipar®	48

1.6 Attività sperimentale	49
1.6.1 Caratterizzazione chimico-fisica e funzionale della MPB	50
1.6.2 Ricerca e sviluppo di metodi per il conferimento alla MPB di struttura 3D.....	50
1.6.3 Ricerca e sviluppo di metodi per l'adesione alla MPB di solidi lamellari	51
1.6.4 Studio della cinetica di uptake e rilascio degli API antimicrobici e antibiofilm	52
1.6.5 Studio dell'attività antibiofilm complessiva del prototipo ottenuto.....	56
2. Materiali e metodi	57
2.1 Materiali	57
2.2 Tecniche analitiche e strumenti	57
2.3 Metodi	59
2.3.1 Caratterizzazione chimico-fisica e funzionale della MPB	59
2.3.2 Metodi per il conferimento alla MPB di struttura 3D	59
2.3.3 Metodi per l'adesione alla MPB di solidi lamellari	60
2.3.4 Metodi per lo studio della cinetica di uptake e rilascio degli API antimicrobici e antibiofilm ...	63
2.3.5 Metodi per lo studio dell'attività antibiofilm complessiva del prototipo ottenuto	65
3. Risultati e discussione	67
3.1 Caratterizzazione chimico-fisica e funzionale della MPB	67
3.2 Ricerca e sviluppo di metodi per il conferimento alla MPB di struttura 3D.....	70
3.3 Ricerca e sviluppo di metodi per l'adesione alla MPB di solidi lamellari	78
3.4 Studio della cinetica di uptake e rilascio degli API antimicrobici e antibiofilm	91
3.5 Studio dell'attività antibiofilm complessiva del prototipo ottenuto.....	103
3.5.1 Test antibiofilm verso Candida parapsilosis	103
3.5.2 Test antibiofilm verso Staphylococcus epidermidis	112
Conclusioni	114
Riferimenti	119

Abbreviazioni

3D	Three dimensional
Abs	Assorbanza
API	Principi attivi farmaceutici
BET	Brunauer Emmet Teller
BSE	Bovine Spongiform Encefalopatya
CEL	Cellulosa rigenerata
CH	Chitosano
CLO	Clorexidina
CLO DG	Clorexidina digluconato
COL	Collagene
DD	Degree of deacetylation
DLS	Dynamic light scattering
DOPA	3,4-diidrossifenilalanina
DP	Derma porcino
DSC	Differential scanning calorimetry
DTA	Differential thermal analysis
ECM	Extracellular matrix
EDC	1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimide cloridrato
EDX	Energy Dispersive X-ray Analysis
EGDE	Etilene glicole diglicidil etere
EPS	Extracellular polimeric substance
FE-SEM	Field emission scanning electron microscopy
GEL	Gelatina Lapi
GEN	Genipina
GLU	Glutaraldeide
HMW	High molecular weight
HPLC	High performance liquid chromatography
HTLc	Hydrotalcite-like compounds
ICP/OES	Inductively coupled plasma optical emission spectrometry
LC-MS	Liquid chromatography mass spectrometry
LDH	Layered double hydroxides
LMW	Low molecular weight
MBD	Membrana biologica decellularizzata
MD	Medical device
MDP	Membrana in derma porcino
MES	Acido 2-morfolinoetano sulfonico
MIC	Minimum inhibitory concentration
MMW	Medium molecular weight
MPB	Membrana in pericardio bovino
MW	Molecular weight
NHS	N-idrossisuccinimide

OD	Optical density
PB	Pericardio bovino
PBS	Phosphate buffer saline
PHMB	Poli-esametilen-biguanide
SDS	Sodio dodecil solfato
SSI	Surgical site infections
RT	Room temperature
TGA	Thermogravimetric analysis
TPP	Tripolifosfato
TRIS	Tris(idrossimetil)aminometano
TSB	Tryptic soy broth
UR	Umidità relativa
UV-VIS	Radiazione ultravioletta-visibile
VAN	Vanillina
VANCO	Vancomicina
XRD	X-ray diffraction
ZrP	Zirconium phosphate

Il chitosano come piattaforma polimerica funzionale

1. Biomateriali e ingegneria tissutale: contesto generale

Lo sviluppo di biomateriali avanzati rappresenta uno dei pilastri fondamentali della moderna bioingegneria e della medicina rigenerativa. L'obiettivo primario di questo settore è la progettazione di materiali in grado di interagire in modo controllato e sicuro con i tessuti biologici, supportando processi complessi quali la riparazione, la rigenerazione o la sostituzione di strutture danneggiate. Un biomateriale ideale deve soddisfare una serie di requisiti stringenti, tra cui: biocompatibilità, stabilità chimica, adeguate proprietà meccaniche, capacità di integrazione con i tessuti ospiti e, in molti casi, biodegradabilità controllata [1].

Nel corso degli ultimi decenni, l'approccio alla progettazione dei biomateriali si è progressivamente spostato da una concezione puramente strutturale a una visione funzionale e bioattiva, in cui il materiale non svolge soltanto un ruolo passivo di supporto, ma partecipa attivamente ai processi biologici locali. Questo cambiamento di paradigma ha portato allo sviluppo di materiali in grado di modulare la risposta cellulare, favorire l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare, nonché di veicolare molecole bioattive quali fattori di crescita o farmaci [2].

In questo contesto, i polimeri naturali hanno acquisito un ruolo di primo piano rispetto ai materiali puramente sintetici, grazie alla loro intrinseca affinità con i sistemi biologici. Materiali quali collagene, gelatina, alginato, acido ialuronico e chitosano sono stati ampiamente studiati e utilizzati in una vasta gamma di applicazioni biomediche, tra cui medicazioni avanzate per ferite, scaffold per ingegneria tissutale, sistemi di rilascio controllato e adesivi biologici [3].

Tra le molteplici sfide ancora aperte nel campo dei biomateriali, una delle più rilevanti riguarda la gestione delle interfacce tra materiali artificiali e tessuti biologici. In numerose applicazioni cliniche, infatti, è necessario garantire un'adesione efficace e duratura del materiale al tessuto ospite, spesso in condizioni ambientali sfavorevoli caratterizzate da elevata umidità, presenza di sangue o fluidi biologici e continua sollecitazione meccanica. Tali condizioni rendono inefficaci molti adesivi convenzionali di uso industriale e impongono lo sviluppo di bioadesivi specificamente progettati per l'ambiente fisiologico [3].

2. Il chitosano

Il chitosano rappresenta uno dei biopolimeri più studiati e utilizzati in ambito biomedico, insieme ai poliesteri alifatici (policaprolattone, acido polilattico e acido poliglicolico) e agli uretani. Questo è dovuto alla combinazione estremamente favorevole di caratteristiche quali biocompatibilità, biodegradabilità, bassa tossicità, versatilità chimica (capacità di formare film, membrane, idrogel, spugne e scaffold porosi) e attività biologica intrinseca (attività antimicrobica). Inoltre, il chitosano mostra una notevole affinità per i tessuti biologici, dovuta sia alle interazioni elettrostatiche tra i suoi gruppi amminici protonati e le componenti anioniche della matrice extracellulare, sia alla possibilità di formare legami a idrogeno e interazioni secondarie con proteine e glicoproteine di superficie [1-5]. Queste caratteristiche hanno portato al suo utilizzo in numerosi ambiti della bioingegneria, in

particolare nelle medicazioni avanzate per ferite, nei sistemi di rilascio controllato e nei materiali per ingegneria tissutale.

2.1 Origine, struttura chimica e parametri fondamentali del chitosano

Il chitosano è ottenuto per deacetilazione della chitina, un polisaccaride strutturale tra i più diffusi in natura: è presente negli esoscheletri dei crostacei, negli insetti, nelle pareti cellulari dei funghi, nelle alghe, nei molluschi e anche in alcuni fossili. Dal punto di vista strutturale, la chitina è un polimero lineare costituito da unità ripetitive di N-acetil-D-glucosamina (2-acetamido-2-deossi-D-glucopiranosio) legate tra loro da legami β -(1 $\rightarrow$ 4) glicosidici.

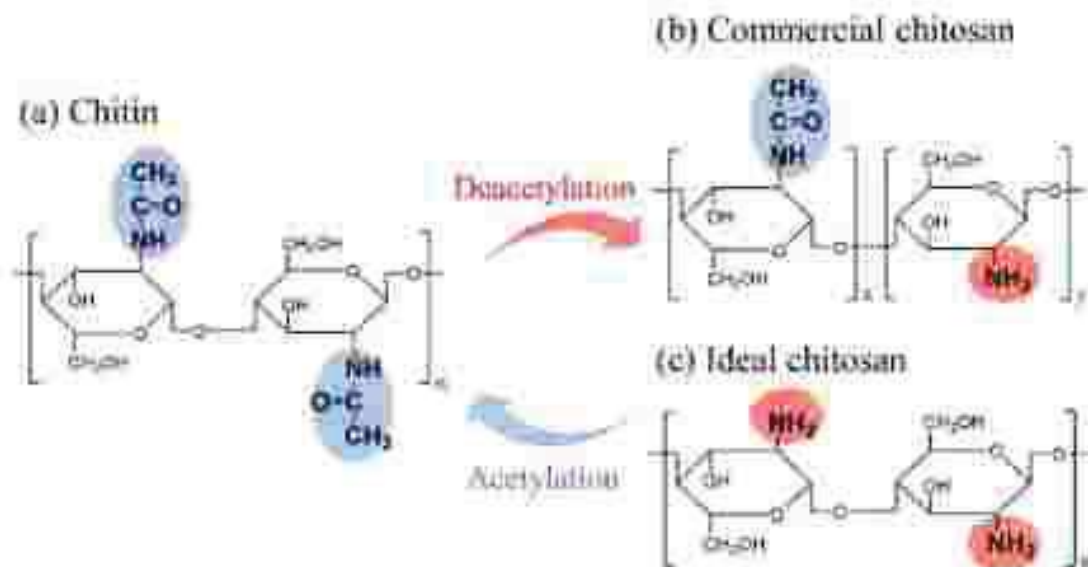


Figura 1. Formule di struttura di chitina e chitosano

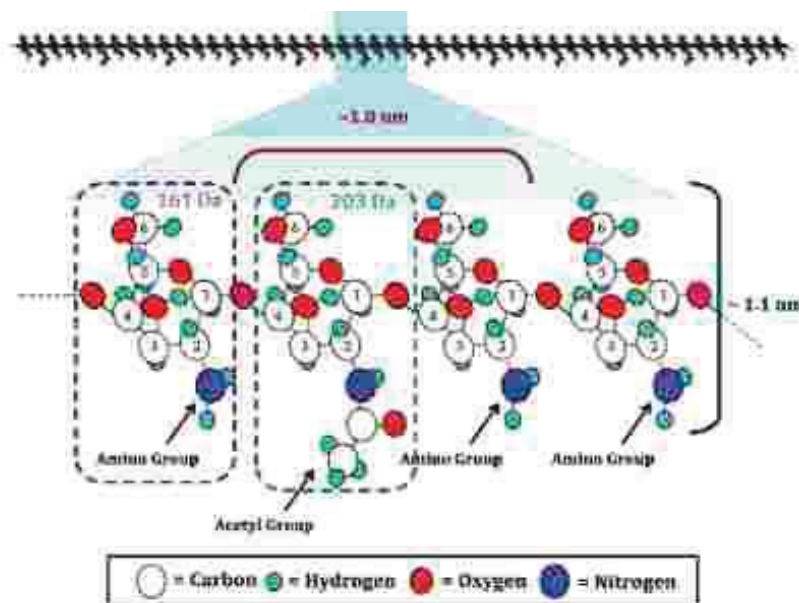


Figura 2. Porzione ingrandita di una molecola di chitosano

La deacetilazione di questo polisaccaride prevede, per via chimica o enzimatica, la rimozione parziale o quasi completa dei gruppi acetilici dalle unità monomeriche della chitina. Dal punto di vista strutturale, il chitosano è costituito quindi da unità di N-acetil-D-glucosamina e di D-glucosamina (2-ammino-2-deossi-D-glucopiranosio) sempre legate tra loro da legami β -(1 $\rightarrow$ 4) glicosidici, in modo analogo alla cellulosa, ma con la presenza dei gruppi amminici primari lungo la catena polimerica

(vedi Figure 1 e 2). Questi gruppi amminici primari in ambiente acido risultano protonati, conferendo al materiale una carica positiva netta, rendendolo solubile in ambiente acido e modificandone in modo sostanziale il comportamento chimico e biologico rispetto alla chitina [1,3]. Questa proprietà rende il chitosano di estremo interesse tra i polisaccaridi naturali, in quanto lo rende l'unico della sopracitata categoria ampiamente disponibile e con comportamento policationico e costituisce il fondamento di gran parte delle sue proprietà chimico-fisiche e della sua interazione con cellule, proteine, matrici extracellulari e superfici caricate negativamente, determinandone il comportamento biologico peculiare [1-7].

Il chitosano è quindi un copolimero, e le sue proprietà chimico-fisiche e biologiche sono fortemente dipendenti da due parametri fondamentali: il **grado di deacetilazione (DD)** e il **peso molecolare medio (MW)**.

Il grado di deacetilazione (DD - degree of deacetylation) è frazione molare di unità glucosaminiche presenti lungo la catena polimerica, ed è solitamente compreso tra il 60 e il 95%. Per convenzione, quando il grado di deacetilazione supera il 50%, si parla di chitosano e non più di chitina. Il grado di deacetilazione è direttamente rappresentativo della densità di gruppi amminici protonabili lungo la catena polimerica e quindi della densità di carica del polimero in ambiente acido e, di conseguenza, da esso dipendono la solubilità, la carica, la reattività chimica e le interazioni con i sistemi biologici da parte del polisaccaride [1-4]. Valori elevati di DD comportano una maggiore densità di gruppi amminici liberi lungo la catena polisaccaridica e sono pertanto associati a: maggiore idrofilicità, solubilità in ambiente acido, maggiore reattività chimica e a una più marcata capacità di interazione elettrostatica con superfici caricate negativamente, quali membrane cellulari, proteoglicani e componenti della matrice extracellulare. Materiali con DD più basso presentano invece una minore densità di gruppi amminici e perciò un carattere più simile alla chitina, con maggiore cristallinità e minori idrofilicità, solubilità e reattività [1-2-4-8].

Il peso molecolare, d'altra parte, influenza in modo determinante la viscosità delle soluzioni, le proprietà meccaniche, la cinetica di degradazione e il comportamento biologico del chitosano. Molecole di chitosano ad alto peso molecolare tendono a formare strutture più coese e meccanicamente resistenti, ma presentano una minore solubilità e una maggiore viscosità in soluzione; al contrario frazioni a basso peso molecolare o oligomeriche mostrano maggiore mobilità molecolare, migliore diffusività nei sistemi biologici e, in alcuni casi, un'attività biologica più marcata, in particolare per quanto riguarda gli effetti antimicrobici [2-5,7].

È importante sottolineare che i processi industriali di estrazione della chitina e di deacetilazione alcalina portano inevitabilmente a una distribuzione polidispersa dei pesi molecolari e a variazioni del DD, rendendo necessario un attento controllo e una caratterizzazione accurata del materiale destinato ad applicazioni biomediche [2,9]. Questa possibilità di modulare in modo relativamente indipendente il grado di deacetilazione e il peso molecolare rende il chitosano non un singolo materiale, ma una vera e propria famiglia di polimeri con proprietà regolabili su un ampio intervallo [1-4].

2.1.1 Comportamento del chitosano in soluzione: ruolo di pH e forza ionica

Il comportamento del chitosano in soluzione acquosa è strettamente legato alla protonazione dei suoi gruppi amminici primari, il cui pKa è generalmente riportato in un intervallo compreso tra 6.2 e 6.5, a seconda del DD e del contesto chimico locale [2,10].

Di conseguenza, al di sotto di questo valore di pH, essi risultano protonati, conferendo al polimero una carica positiva netta (*polielettrolita cationico*) e rendendolo solubile in soluzioni acide diluite (tipicamente acido acetico, lattico o cloridrico) [1,11,12]. In queste condizioni, il chitosano è in grado di interagire fortemente con polianioni (proteine, glicosaminoglicani, DNA, acido ialuronico, alginato, ecc.), di formare reticolazione con anioni multivalenti come il tripolifosfato e di interagire con superfici biologiche cariche negativamente, attraverso una combinazione di interazioni elettrostatiche e legami a idrogeno [1,2,11]. Questo comportamento polielettrolitico è quindi di grande rilevanza per le applicazioni biomediche.

All'aumentare del pH invece, la progressiva deprotonazione dei gruppi amminici comporta una drastica riduzione della solubilità e una crescente importanza delle interazioni intermolecolari, che possono portare a fenomeni di aggregazione, precipitazione o gelificazione del materiale [1,11,12]. Questo comportamento, che potrebbe apparire come un limite, costituisce in realtà uno degli strumenti più potenti per la progettazione di sistemi funzionali a base di chitosano, poiché consente di indurre transizioni di stato e processi di strutturazione semplicemente modulando le condizioni chimico-fisiche dell'ambiente [2,11].

Anche la forza ionica ha un importante effetto sul comportamento del chitosano. In soluzione acida infatti, il chitosano assume una conformazione estesa a causa della repulsione elettrostatica tra le cariche positive lungo la catena, con conseguenze importanti sulla viscosità e sulle proprietà reologiche delle soluzioni. L'aggiunta di sali e l'aumento della forza ionica del mezzo schermano tali interazioni elettrostatiche, inducendo una contrazione della catena e una riduzione della viscosità [13,14].

2.1.2 Organizzazione supramolecolare e cristallinità

Allo stato solido, il chitosano presenta una struttura semi-cristallina, il cui grado di ordine dipende dal DD, dal MW e dalla storia termica e meccanica del materiale. Le regioni cristalline sono stabilizzate da una fitta rete di legami a idrogeno tra gruppi ossidrilici e amminici intra- e intermolecolari, mentre le regioni amorfe conferiscono al materiale una certa flessibilità e capacità di assorbire acqua, rendendo nel complesso il chitosano un insieme di domini più o meno ordinati [1,11,13].

In particolare, l'aumento del contenuto di unità deacetilate tende a favorire una maggiore densità di legami a idrogeno e una più forte coesione intermolecolare, mentre la presenza di gruppi acetilici residui introduce disordine strutturale e riduce il grado di organizzazione cristallina [1,13].

La presenza di regioni cristalline e amorfe coesistenti influenza in modo diretto le proprietà meccaniche (la resistenza meccanica dei film e delle membrane), la solubilità (la permeabilità all'acqua e ai soluti), il comportamento viscoelastico (il rigonfiamento o *swelling* in ambiente acquoso), la velocità di degradazione enzimatica e idrolitica e la processabilità di tale materiale [2,6,9,11,13].

Questa delicata interazione tra struttura chimica e organizzazione supramolecolare spiega in larga misura l'ampia variabilità delle proprietà osservate nei diversi tipi di chitosano commerciali e sperimentali [1–3]. Un controllo mirato della cristallinità attraverso processi di dissoluzione, rigenerazione, orientamento o reticolazione consente quindi di modulare finemente le proprietà del materiale in funzione dell'applicazione desiderata.

Cross-linking chimico

Si ottiene tramite formazione di legami covalenti tra i gruppi amminici del polimero e le specie cross-linker. Tra queste specie la glutaraldeide (GLU) è uno dei più antichi e più utilizzati agenti di reticolazione per il chitosano. Essa reagisce principalmente con i gruppi amminici primari del polimero formando legami di tipo imminico (basi di Schiff). I materiali a base di chitosano reticolati con GLU mostrano elevata stabilità in acqua e in ambiente fisiologico, forte riduzione del grado di swelling, significativo aumento del modulo elastico e della resistenza meccanica. Tuttavia, l'uso della glutaraldeide è accompagnato da notevoli problemi di biocompatibilità, dovuti alla citotossicità di questa specie, all'irrigidimento eccessivo del materiale e alla potenziale risposta infiammatoria dei tessuti. Per questo motivo, nonostante la GLU sia ancora molto utilizzata a livello sperimentale come strumento di riferimento, il suo impiego clinico diretto è fortemente limitato.

La genipina è un agente di reticolazione estratto dal frutto di *Gardenia jasminoides*, che reagisce con i gruppi amminici del chitosano formando legami covalenti stabili. Rispetto alla glutaraldeide, la genipina presenta citotossicità drasticamente inferiore, migliore compatibilità biologica e maggiore gradualità nel processo di reticolazione. I materiali di chitosano reticolati con genipina mostrano buone proprietà meccaniche, elevata stabilità in ambiente acquoso, colore blu-verde caratteristico e ottima tolleranza cellulare. Per queste ragioni, la genipina è oggi considerata uno dei crosslinker più promettenti per applicazioni biomediche del chitosano.

Altri agenti di reticolazione chimica per il chitosano sono dialdeidi aromatiche (ad esempio vanillina), epossidi, carbodimmidi, anidridi e isocianati in contesti più chimicamente aggressivi.

Questi approcci consentono una fine modulazione delle proprietà meccaniche e di degradazione, ma richiedono un attento bilanciamento tra efficienza di reticolazione, condizioni di reazione e mantenimento della biocompatibilità del sistema.

Cross-linking elettrostatico

Si ottiene tramite formazione di legami ionici tra i gruppi amminici protonati del polimero e le specie cross-linker, quali citrati, solfati, fosfati e ossalati.

Una delle strategie più eleganti e biocompatibili per la stabilizzazione del chitosano è rappresentata dalla reticolazione ionotropica mediante polianioni multivalenti, in particolare il tripolifosfato di sodio (TPP). In questo caso, la reticolazione avviene per mezzo dei gruppi fosfato negativi del TPP, come mostrato in Figura 5. La reticolazione con TPP è ampiamente documentata in letteratura per la preparazione di nanoparticelle e microsfele di chitosano, membrane e idrogel stabilizzati, sistemi per il rilascio controllato di farmaci. Dal punto di vista strutturale, il grado di reticolazione può essere modulato variando il rapporto chitosano/TPP, il pH, la forza ionica del mezzo; consentendo un controllo fine su dimensione dei pori, swelling, rigidità meccanica, cinetica di rilascio delle molecole incorporate.

I vantaggi principali di questo approccio sono condizioni di preparazione blande (acquose, a temperatura ambiente), assenza di reagenti tossici ed elevata biocompatibilità del sistema risultante [12,15,17,18,20].

Cross-linking fisico

Si ottiene tramite formazione di legami a idrogeno, interazioni idrofobiche, complessi polielettrolitici con polimeri anionici (alginato, acido ialuronico, carragenina) tra il polimero e le specie cross-linker.

In questi sistemi, il materiale che si ottiene è meno stabile rispetto ai sistemi chimicamente reticolati ma spesso più dinamico e bio-mimetico. Queste reti fisiche sono particolarmente interessanti per la preparazione di idrogel iniettabili, sistemi auto-riparanti e materiali temporanei per applicazioni di wound healing.

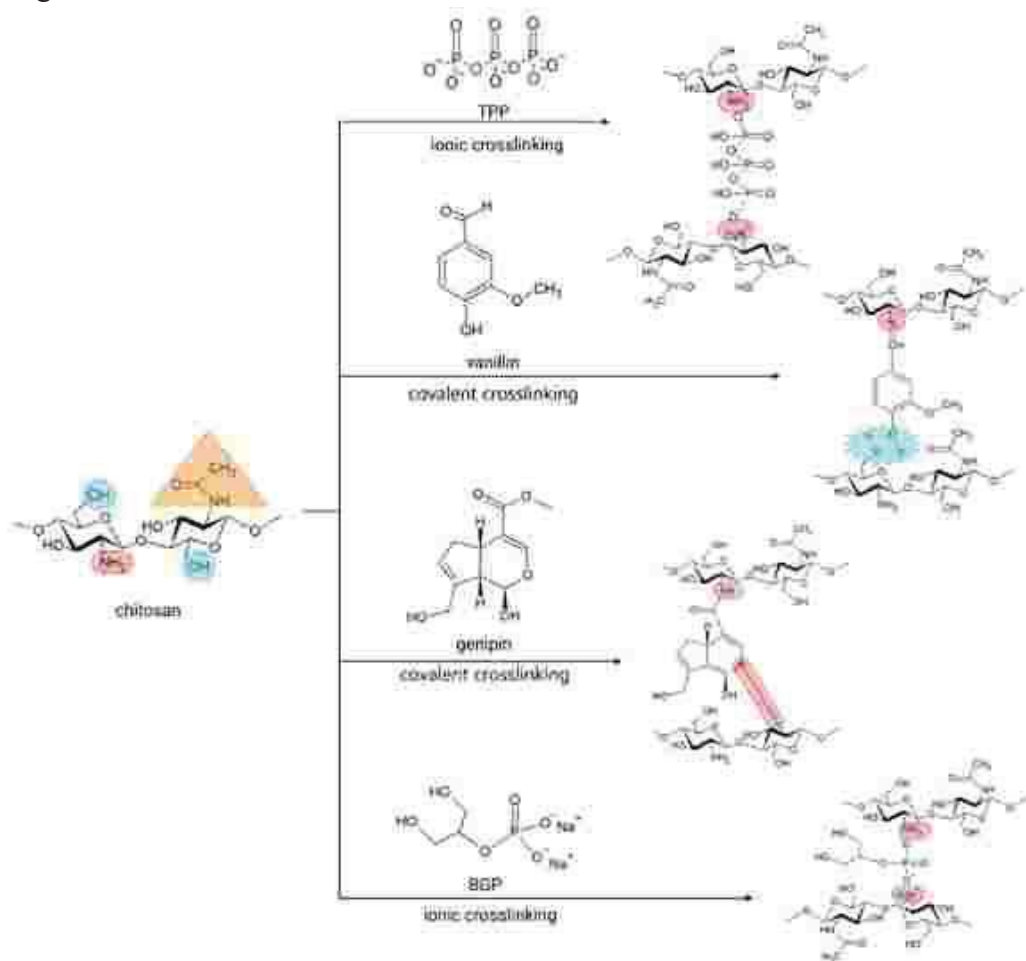


Figura 4. Tipi di cross-linking del chitosano: ionico con TPP e BGP e covalente con vanillina e genipina

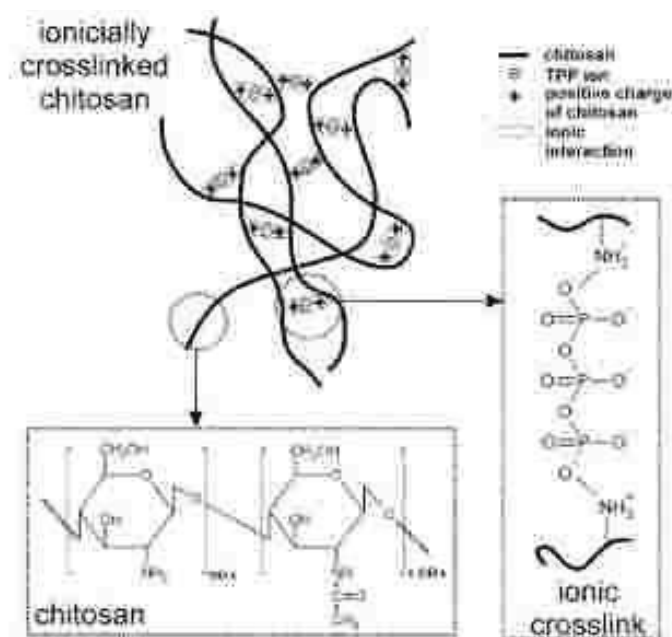


Figura 5. Rappresentazione schematica del cross-linking ionico tra chitosano e TPP

2.1.5 Chitosano come famiglia di molecole e suo ruolo nella presente tesi

La straordinaria flessibilità chimica del chitosano, sintetizzata in Figura 6, permette di considerare questa molecola non semplicemente come un materiale unico e invariabile, ma come una famiglia di polimeri le cui proprietà sono finemente regolabili variando parametri strutturali quali il grado di deacetilazione, il peso molecolare e l'organizzazione supramolecolare, nonché modificandone ad hoc la struttura tramite gruppi funzionali o molecole cross-linker [1–4]. Il chitosano può essere considerato quindi come una vera e propria piattaforma molecolare ingegnerizzabile, sulla quale è possibile costruire sistemi con proprietà mirate per applicazioni specifiche in ambito farmaceutico, biomedicale e bioingegneristico [2–4].

Per quanto riguarda la reticolazione del chitosano, nel contesto della presente tesi, questa assume un significato particolarmente critico. Quando il chitosano viene utilizzato come strato funzionale su una membrana biologica di origine bovina è infatti necessario che il coating sia sufficientemente stabile in ambiente fisiologico e non venga rapidamente dilavato o degradato, e che mantenga al tempo stesso flessibilità, compatibilità meccanica con il substrato biologico e biocompatibilità elevata, nonché resistenza meccanica, permeabilità e degradabilità controllata. Inoltre, la reticolazione del chitosano non serve solo a stabilizzare il polimero, ma anche a fissare e immobilizzare fasi secondarie all'interno della matrice, come nanoparticelle, principi attivi farmaceutici e solidi lamellari. In questi sistemi compositi, la rete di chitosano reticolato svolge il ruolo di matrice continua e fase di interfaccia tra il substrato biologico e la fase inorganica funzionale.

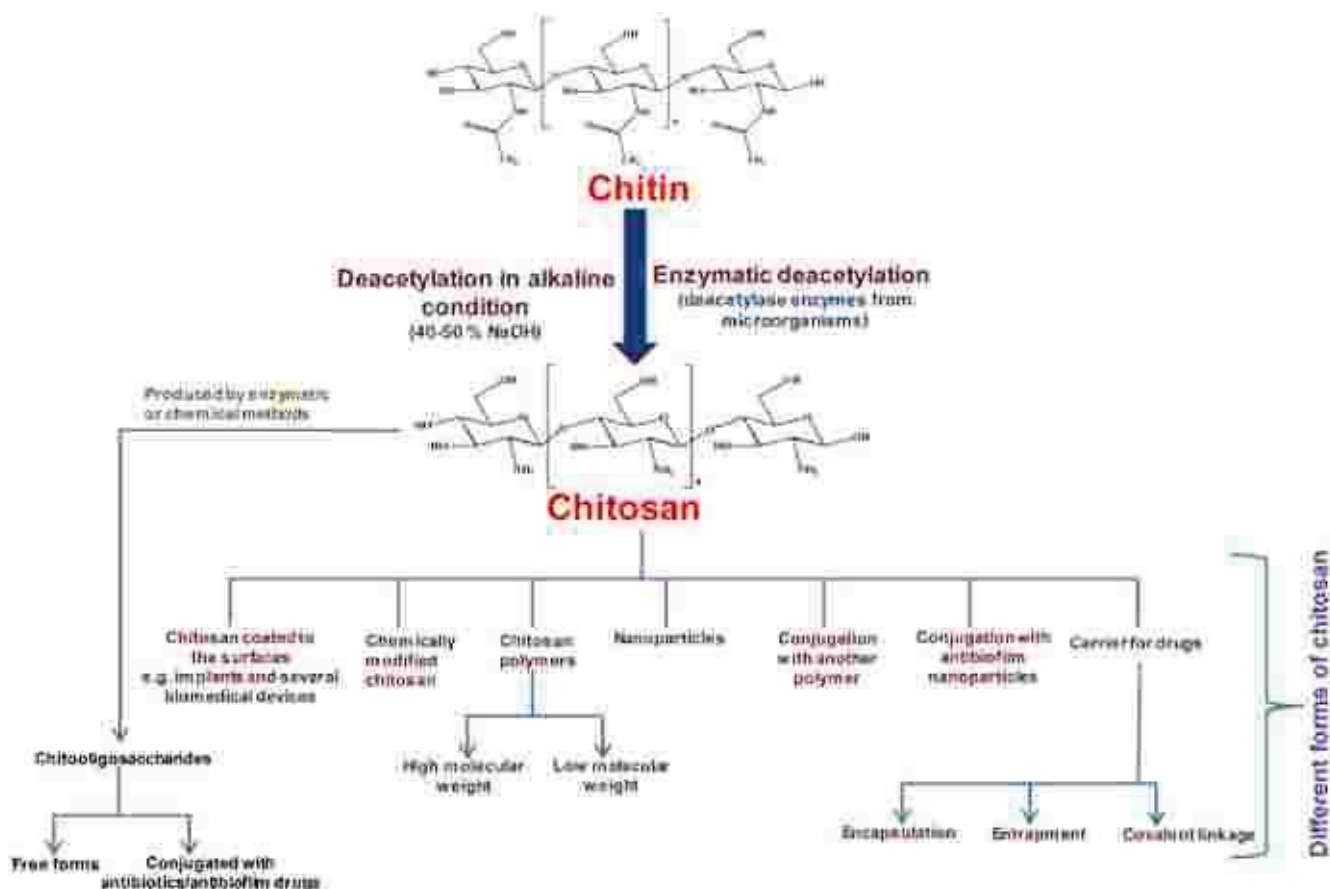


Figura 6. Diagramma delle diverse forme di chitosano e dei loro derivati [21]

2.2 Dal polimero al materiale: forme fisiche e comportamento del chitosano

Il chitosano, grazie alla presenza simultanea di gruppi amminici primari e gruppi ossidrilici lungo la catena polisaccaridica, e quindi grazie al suo comportamento polielettrolitico in ambiente acido, rappresenta una piattaforma polimerica estremamente versatile dal punto di vista chimico, in grado di essere trasformata in un'ampia varietà di forme fisiche [1–4].

Per quanto riguarda le proprietà reologiche invece, soluzioni di chitosano mostrano un comportamento non newtoniano di tipo pseudoplastico, cioè con una viscosità che diminuisce all'aumentare del gradiente di velocità. La viscosità dipende in modo marcato dalla concentrazione, dal MW, dal DD e dalla forza ionica del mezzo. Queste caratteristiche reologiche sono di grande importanza pratica, poiché consentono di processare il chitosano in soluzione e di indurlo successivamente la gelificazione o la precipitazione controllata attraverso variazioni di pH, aggiunta di agenti reticolanti, additivi, plasticizzanti, fasi inorganiche disperse o specie polianioniche [1,2,11,12].

Dal punto di vista bio-ingegneristico, la straordinaria versatilità chimica, morfologica e processuale del chitosano lo rende un polimero di grande interesse nel campo biomedico consentendo di adattarlo a contesti applicativi molto diversi. A partire dallo stesso polimero di base è infatti possibile ottenere un'ampia gamma di forme fisiche, che vanno da: film sottili e membrane, a spugne porose e scaffold tridimensionali, a microsfele e nanoparticelle, a idrogel iniettabili; semplicemente variando il metodo di preparazione (casting, elettrofilatura, stampa 3D ecc), le condizioni di processo e l'eventuale presenza di agenti reticolanti o fasi secondarie [1–4].

2.2.1 Membrane e film di chitosano

Le membrane e i film di chitosano, di cui un'immagine in Figura 7, sono generalmente ottenuti via *solvent-casting*. In questo approccio, il polimero viene disciolto in una soluzione acida diluita (tipicamente acido acetico o lattico), la soluzione viene colata su un supporto piano e il solvente viene lasciato evaporare lentamente e in modo controllato, portando alla formazione di un film continuo omogeneo e trasparente [2,11,13,16,19,22,23].

Le proprietà finali del film dipendono in modo critico da numerosi parametri, quali la concentrazione della soluzione polimerica, il tipo e concentrazione dell'acido, il peso molecolare e il grado di deacetilazione del chitosano, la velocità di evaporazione del solvente, l'eventuale presenza di plasticizzanti (come glicerolo o sorbitolo) e di trattamenti post-formazione (neutralizzazione, reticolazione, essiccamento controllato).

Dal punto di vista microstrutturale, questi materiali sono costituiti da una rete polimerica densa, stabilizzata da una fitta trama di legami a idrogeno intra- e intermolecolari, con un grado di cristallinità parziale, una distribuzione di porosità molto bassa e ricchi di gruppi funzionali esposti in superficie [1,2,13].

Queste caratteristiche favoriscono la loro interazione con i sistemi biologici e quindi li rendono particolarmente adatti come barriere fisiche, rivestimenti protettivi o strati di interfaccia su superfici biologiche e materiali compositi. Per questi motivi tali materiali sono particolarmente interessanti per applicazioni biomedicali quali medicazioni avanzate, rivestimenti e membrane funzionali [2,16,18,19,24].

I film di chitosano presentano generalmente una buona resistenza meccanica, ma anche una certa fragilità. Le proprietà meccaniche dei film di chitosano (modulo elastico, resistenza a trazione e allungamento a rottura), sono fortemente dipendenti dal peso molecolare, dal grado di cristallinità e dal contenuto d'acqua del materiale. In generale tipi di chitosano ad alto MW e con maggiore cristallinità producono film più rigidi e resistenti. L'aggiunta di plasticizzanti aumenta la flessibilità ma riduce la resistenza meccanica di tali film, mentre l'assorbimento di acqua porta a un comportamento più duttile.

In ambiente acquoso i film di chitosano presentano ovviamente un comportamento fortemente idrofilo, con significativo rigonfiamento (swelling) e una marcata transizione verso un comportamento viscoelastico simile a quello dei tessuti molli [11,13,16,19]. La stabilità in acqua può essere modulata tramite reticolazione, che riduce la solubilità e controlla la mobilità delle catene [11,15-19].

Dal punto di vista funzionale, un aspetto cruciale è rappresentato dalle proprietà di trasporto, in particolare: la permeabilità all'acqua e al vapore acqueo, a ioni e molecole di piccole dimensioni e il rigonfiamento (swelling) in ambiente acquoso [6,13,14,20].

Queste proprietà sono di fondamentale importanza nelle applicazioni biomediche, poiché determinano la capacità del materiale di mantenere un ambiente umido favorevole alla guarigione delle ferite, la possibilità di fungere da barriera selettiva contro agenti patogeni e la cinetica di rilascio di farmaci o molecole bioattive eventualmente incorporate nella matrice [13,14,16,22].

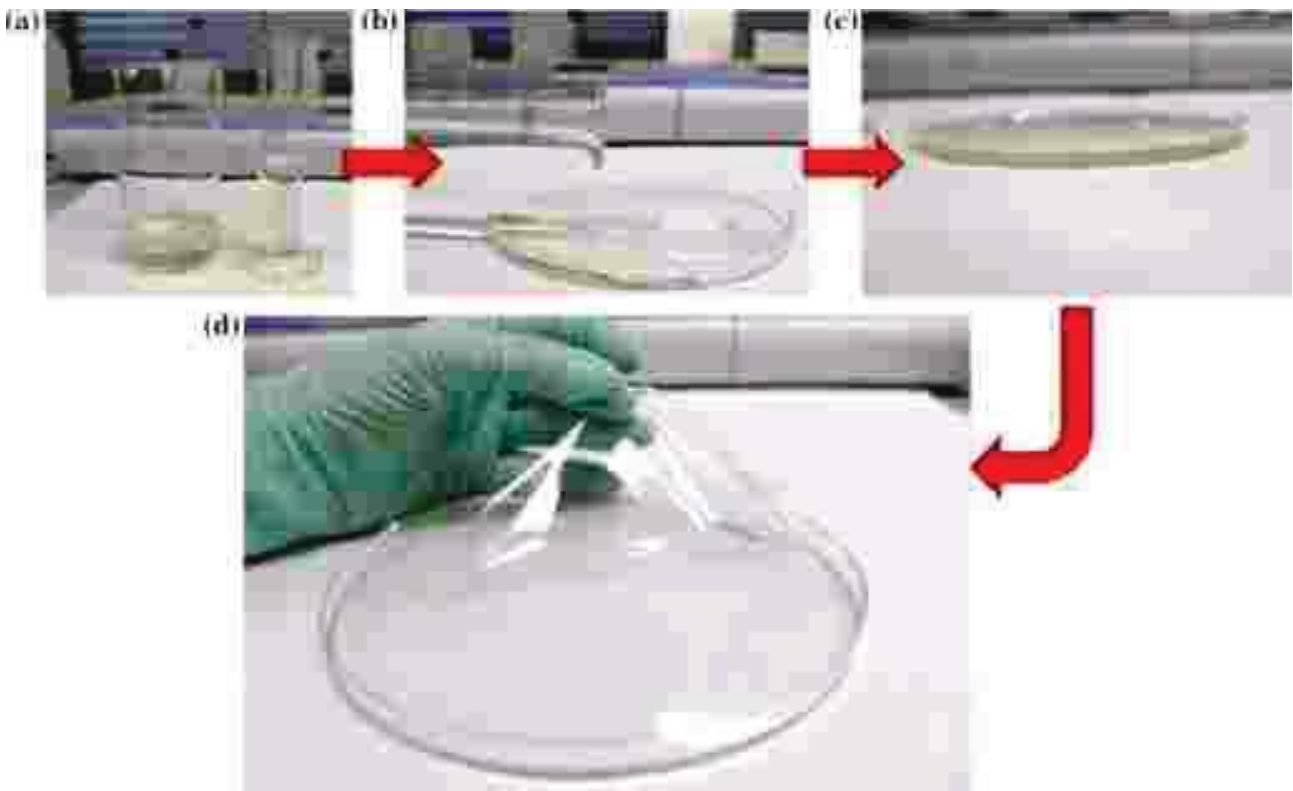


Figura 7. Film a base di chitosano

2.2.2 Idrogel di chitosano

Gli idrogel, come si evince dalla Figura 8, rappresentano un'evoluzione tridimensionale delle membrane e film di chitosano. Sono costituiti da reti polimeriche capaci di incorporare e trattenere grandi quantità di acqua mantenendo una struttura solida e coerente [13,15-19,24,25].

Essi possono essere ottenuti mediante reticolazione covalente (ad esempio con glutaraldeide, genipina o carbodiimmidi), reticolazione ionica (ad esempio con tripolifosfato), interazioni fisiche o combinazione di questi 3 meccanismi [12,15-20].

A livello microstrutturale, gli idrogel sono costituiti da una rete polimerica porosa e altamente idratata. La densità di reticolazione è il parametro fondamentale degli idrogel, in quanto direttamente responsabile delle proprietà meccaniche, del grado di rigonfiamento e della permeabilità dell'idrogel, della diffusività dei soluti e della velocità di degradazione del materiale [13,15-19].

Tali sistemi sono ampiamente studiati come matrici per l'ingegneria tissutale, come veicoli per il rilascio controllato di farmaci e come piattaforme per la realizzazione di interfacce morbide con i tessuti utili nei campi delle medicazioni avanzate per ferite e come matrici per la crescita cellulare [2,15,17-19,24,25].



Figura 8. Idrogel a base di chitosano

2.2.3 Micro- e nanoparticelle di chitosano

Le micro- e nanoparticelle di chitosano, di cui un'immagine SEM in Figura 9, sono sistemi di dimensioni controllate generalmente ottenuti mediante processi di gelificazione ionica, complessazione polielettrolitica o precipitazione controllata [12,14,15,20,26].

Nel caso più comune, l'aggiunta di una soluzione di TPP a una soluzione di chitosano porta alla formazione spontanea di particelle reticolate per interazione elettrostatica [12,15,17,18,20]. La dimensione delle particelle, la loro distribuzione granulometrica e la loro stabilità colloidale dipendono in modo critico dal peso molecolare del polimero, dal grado di deacetilazione, dal rapporto chitosano/reticolante e dalle condizioni di miscelazione [12,14,15,20,26].

Dal punto di vista strutturale, queste particelle possono essere descritte come reti polimeriche densamente reticolate su scala nanometrica o micrometrica, caratterizzate da elevata area superficiale e da una significativa densità di carica positiva residua [14,15,17,18,24-26]. Queste caratteristiche conferiscono alle micro- e nanoparticelle una buona capacità di interazione con membrane biologiche e la possibilità di incapsulare o complessare una vasta gamma di molecole terapeutiche, incluse piccole molecole, proteine e acidi nucleici [14,15,17,18,24-26]. Inoltre, la loro carica superficiale positiva favorisce l'adesione a superfici biologiche cariche negativamente e può migliorare la ritenzione locale del sistema nel sito di applicazione. Dal punto di vista applicativo, le particelle di chitosano sono oggi ampiamente studiate come vettori per il rilascio controllato di specie attive, rilascio che può essere governato da diffusione, degradazione della matrice o variazioni di pH, consentendo di progettare sistemi con profili di rilascio adattati alle esigenze cliniche, in particolare per applicazioni locali [2,14,15,17,18,26].

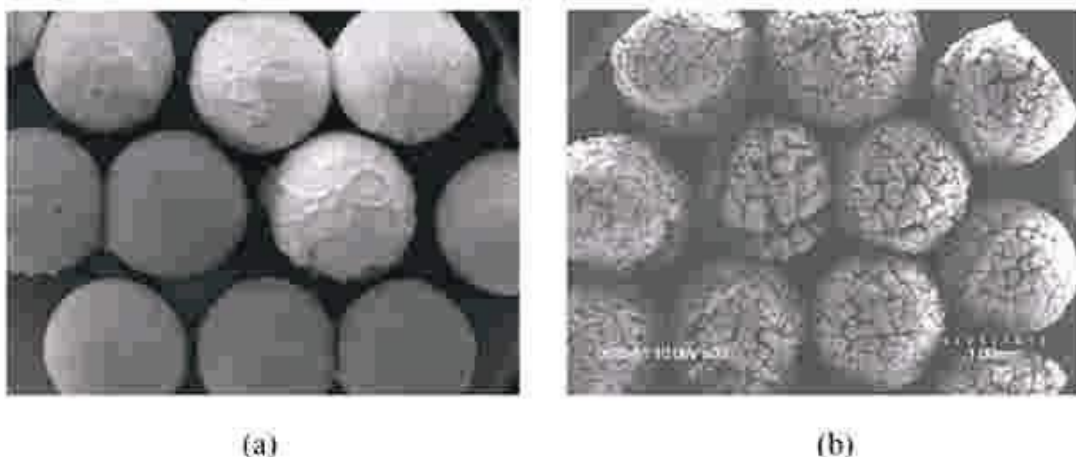


Figura 9. Immagini SEM di microparticelle di chitosano cross-linkate con TPP e genipina [27]

2.2.4 Spugne e scaffold porosi

Attraverso tecniche quali liofilizzazione (freeze-drying), gas foaming, porogen leaching, elettrofilatura e stampa 3D, il chitosano può essere trasformato in scaffold tridimensionali altamente porosi (Figura 10), progettati per imitare in modo approssimativo la struttura della matrice extracellulare naturale.

In questi sistemi, parametri quali dimensione e interconnessione dei pori, rigidità meccanica, biodegradabilità, bagnabilità e chimica di superficie sono cruciali per determinare l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare.

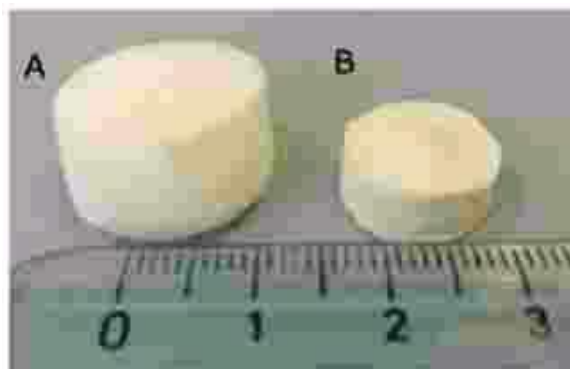


Figura 10. Scaffold porosi a base di chitosano

2.2.5 Stabilizzazione del chitosano

La possibilità di modulare MW, DD, funzionalizzazione, grado di reticolazione del chitosano, la possibilità di variare le condizioni del mezzo (pH, additivi di varia natura, forza ionica) e la possibilità di trattare il chitosano con diversi processi, rendono il chitosano un materiale altamente ingegnerizzabile, capace di coprire un ampio spettro di comportamenti per applicazioni biomediche avanzate, soprattutto nel drug delivery, nell'ingegneria tissutale e nell'ambito di patch e medicazioni [2,14-18,22,24,25].

Tuttavia, senza un'adeguata stabilizzazione, i materiali a base di chitosano non sarebbero idonei ad un utilizzo in ambiente fisiologico poiché:

- troppo solubili,
- troppo permeabili all'acqua ed eccessivamente rigonfiabili,
- soggetti a perdita della loro integrità meccanica,

- soggetti a degradazione enzimatica, mediata da lisozima e altre idrolasi in grado di scindere i legami β -(1 $\rightarrow$ 4) glicosidici. La velocità di degradazione dipende dal DD, dal MW e dal grado di organizzazione cristallina del materiale: in generale, chitosani più deacetilati e più cristallini risultano più resistenti alla degradazione [11,13,16,19].

Perciò, per le applicazioni biomediche un aspetto cruciale è rappresentato dalle modifiche strutturali volte alla stabilizzazione del chitosano, in particolare la reticolazione. Tali modifiche consentono di ridurre la solubilità, controllare la permeabilità e il grado di rigonfiamento, migliorare la resistenza meccanica e modulare la velocità di degradazione del chitosano, rendendone possibile la transizione da materiale solubile a biomateriale strutturale [13,15-19].

Spesso inoltre, in tali applicazioni, è richiesto un compromesso tra stabilità meccanica e biodegradabilità controllata.

2.3 Il chitosano nei dispositivi biomedicali

Nel loro insieme, le caratteristiche funzionali del chitosano (dipendenti da pochi parametri chiave come DD, MW, stato ionico, cristallinità, eventuali funzionalizzazioni, densità di reticolazione, condizioni del mezzo e tipo di processamento del materiale), rendono il chitosano un materiale straordinariamente flessibile dal punto di vista progettuale e consentono di adattarlo a un'ampia gamma di applicazioni in campo biomedicale.

2.3.1 Il chitosano come materiale d'interfaccia con le superfici biologiche

In particolare, la combinazione di capacità filmogena, affinità per le superfici biologiche e possibilità di fungere da matrice per l'incorporazione di fasi funzionali (come solidi lamellari o specie d'interesse farmaceutico), costituisce il fondamento razionale per il suo impiego come materiale di interfaccia tra tessuti biologici (come le membrane di origine bovina) e componenti funzionali inorganici.

Le superfici di chitosano, sia sotto forma di film che di idrogel che di scaffold, presentano una chimica di superficie favorevole all'interazione con i sistemi biologici. La presenza di gruppi amminici e ossidrilici consente infatti l'adsorbimento di proteine della matrice extracellulare, l'interazione con glicoproteine e proteoglicani e la modulazione dell'adesione cellulare. In molti casi, tuttavia, il chitosano mostra una bioattività relativamente moderata nei confronti di alcune linee cellulari, rendendo vantaggiosa la sua combinazione con altre biomolecole tra cui collagene, gelatina e acido ialuronico al fine di migliorare ulteriormente la risposta biologica.

La possibilità di ottenere materiali sotto forma di film e membrane è di cruciale importanza per la sua applicazione come rivestimento superficiale (coating) di substrati biologici o sintetici, proprietà ricercata in patch e medicazioni avanzate per ferite e nei supporti per la rigenerazione tissutale, dove il chitosano funge da strato di interfaccia in sistemi compositi e da barriera selettiva e membrana semipermeabile.

Per quanto riguarda l'utilizzo del chitosano per il rilascio controllato di farmaci (*drug delivery*), le forme preferenziali che fungono da vettori sono micro e nano-particelle e idrogel. In questi sistemi infatti il rilascio può essere governato da diversi meccanismi, tra cui la diffusione del principio attivo attraverso la matrice, la degradazione del polimero o variazioni di pH che alterano lo stato di ionizzazione del materiale. Questa molteplicità di meccanismi consente di progettare sistemi con profili di rilascio adattati alle esigenze cliniche, in particolare per applicazioni locali, nelle quali è

possibile ottenere elevate concentrazioni di farmaco nel sito di interesse riducendo al minimo gli effetti collaterali sistemici [2,14,15,17,18,24-26].

È importante sottolineare come le proprietà macroscopiche dei materiali a base di chitosano — in termini di resistenza meccanica, rigonfiamento, permeabilità e stabilità — siano strettamente legate alla loro microstruttura e al tipo di reticolazione adottato [11,13,15-19]. La densità di crosslinking, la distribuzione delle zone reticolate e la presenza di eventuali domini più o meno ordinati influenzano in modo diretto sia il comportamento meccanico sia la cinetica di rilascio di molecole incapsulate [13,15-19]. Questa stretta correlazione tra struttura e funzione rende evidente la necessità di un approccio ingegneristico alla progettazione dei materiali a base di chitosano, nel quale la scelta delle condizioni di preparazione e di stabilizzazione non può essere lasciata al caso, ma deve essere guidata dalle prestazioni richieste per l'applicazione finale [2,15-19].

Applicazioni biomedicali del chitosano quale rivestimento antibatterico e bioadesivo sono di tale importanza applicativa da meritare di essere spiegati più dettagliatamente.

2.3.2 Il chitosano come bioadesivo

I bioadesivi sono definiti come materiali in grado di unire due superfici, di cui almeno una è costituita da un tessuto biologico, senza la necessità di supporti meccanici aggiuntivi quali suture o graffe metalliche. Essi trovano applicazione in numerosi ambiti clinici, tra cui la chiusura delle ferite chirurgiche, il controllo delle emorragie, la sigillatura di perdite d'aria o di fluidi corporei e il fissaggio di dispositivi come patch, stabilizzazione di dispositivi impiantabili quali innesti e scaffold ai tessuti.

Un bioadesivo ideale dovrebbe soddisfare una serie di requisiti fondamentali:

- a) essere biocompatibile e non tossico,
- b) poter essere applicato facilmente in situ e solidificare rapidamente,
- c) possedere adeguata forza adesiva e coesione interna,
- d) mantenere le proprie prestazioni in ambiente umido,
- e) degradarsi in modo controllato senza generare sottoprodotti dannosi,
- f) contribuire ai processi di guarigione e rigenerazione tissutale [6].

L'adesione di un materiale polimerico a un tessuto biologico può avvenire attraverso una combinazione di diversi meccanismi:

- Interblocco meccanico: penetrazione del materiale nelle micro- e nano-irregolarità della superficie tissutale.
- Interazioni elettrostatiche (ad esempio tra polimeri cationici e superfici biologiche anioniche), legami a idrogeno (ad esempio tra gruppi polari del polimero e gruppi funzionali delle proteine e polisaccaridi della superficie tissutale), interazioni idrofobiche e di Van der Waals, legami covalenti (nei sistemi più avanzati e reattivi).

Nei sistemi bioadesivi reali, l'adesione osservata è quasi sempre il risultato di una combinazione sinergica di più meccanismi.

L'adesione ai tessuti biologici rappresenta una delle sfide più complesse e critiche in ambito biomedico. A differenza dei sistemi ingegneristici convenzionali, le superfici biologiche sono infatti umide, oltre che chimicamente eterogenee e meccanicamente deformabili. Queste caratteristiche rendono inefficaci molti adesivi sintetici tradizionali, progettati per funzionare in ambiente secco e

su superfici rigide. Per questo motivo, lo sviluppo di bioadesivi capaci di funzionare in ambiente fisiologico rappresenta un tema di ricerca di primaria importanza.

Attualmente, diversi tipi di adesivi biologici sono utilizzati o in fase di sviluppo clinico. Tra questi, le colle a base di cianoacrilato offrono un'elevata forza adesiva e una rapida polimerizzazione, ma presentano problemi di citotossicità e rigidità, che possono compromettere la guarigione dei tessuti [109]. Le colle di fibrina, basate sulla cascata della coagulazione fisiologica, sono ampiamente utilizzate grazie alla loro eccellente biocompatibilità, ma soffrono di limitazioni legate alla debolezza meccanica, al costo e ai rischi connessi all'origine biologica dei componenti [8].

Queste limitazioni hanno stimolato un intenso sforzo di ricerca volto allo sviluppo di nuovi bioadesivi polimerici, in grado di combinare sicurezza biologica e prestazioni meccaniche adeguate. In questo scenario, un ruolo di crescente importanza è stato assunto dai materiali ispirati ai sistemi di adesione naturali, come quelli osservabili in alcuni organismi marini, in particolare i mitili, capaci di aderire con elevata resistenza a superfici bagnate e irregolari [3]. I mitili marini sono in grado di risolvere questo problema attraverso la secrezione di proteine adesive ricche di 3,4-diidrossifenilalanina (DOPA), un amminoacido contenente gruppi catecolici responsabili di interazioni forti e versatili con una grande varietà di superfici [28]. I gruppi catecolici possono stabilire legami a idrogeno, interazioni di coordinazione con ioni metallici, interazioni π - π e, in condizioni ossidative, legami covalenti con nucleofili presenti sulle superfici biologiche. Questa pluralità di meccanismi di interazione è alla base dell'eccezionale capacità adesiva dei sistemi ispirati ai mitili, anche in presenza di acqua o fluidi biologici [28].

Negli ultimi anni, numerosi polimeri naturali e sintetici sono stati studiati come materiali bioadesivi. Tra questi, il chitosano possiede una serie di caratteristiche che lo rendono naturalmente predisposto all'uso come bioadesivo, in quanto, oltre ad essere biocompatibile, presenta altre proprietà, di seguito elencate [1-5,16,19, 29-33].

1. È policationico in ambiente fisiologico acido, e perciò può stabilire forti interazioni elettrostatiche con le superfici biologiche, incluse le membrane extracellulari, il collagene e molte glicoproteine, che presentano in genere una carica netta negativa a pH fisiologico [1-3,11,16,19,34]; queste interazioni costituiscono uno dei principali contributi all'adesione iniziale.
2. Presenta un'elevata densità di gruppi funzionali polari ($-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$) eventualmente funzionalizzabili con gruppi catecolici per potenziarne l'adesività.
3. È in grado di bagnare efficacemente le superfici biologiche tramite diversi meccanismi che sfruttano l'eterogeneità chimica di queste strutture: tramite legami a idrogeno, interazioni secondarie e un certo grado di interpenetrazione fisica delle catene polimeriche nelle strutture superficiali della ECM, che contribuisce alla stabilità meccanica dell'interfaccia formata [16,31,34].
4. Mostra una buona deformabilità meccanica: a differenza degli adesivi sintetici rigidi, il chitosano in ambiente idratato si comporta come un *bioadesivo morbido*, caratterizzato da un modulo elastico relativamente basso e da un comportamento viscoelastico che gli consente di adattarsi alla topografia del substrato e di seguire le sue deformazioni senza generare elevate concentrazioni locali di tensione [16,19,34]. Questo aspetto è di particolare rilevanza per applicazioni su tessuti molli e dinamici, nei quali una interfaccia troppo rigida porterebbe rapidamente a delaminazione o a danneggiamento del substrato biologico [34-36].

Dal punto di vista chimico-strutturale, l'efficacia adesiva del chitosano dipende in modo critico dal grado di deacetilazione, dal peso molecolare e dallo stato di reticolazione del materiale [1-3,11,13]. Un elevato grado di deacetilazione aumenta la densità di carica positiva e quindi il contributo elettrostatico all'adesione, mentre il peso molecolare governa sia la coesione interna dello strato adesivo sia la sua capacità di formare un film continuo e meccanicamente stabile [2,11,13,16,19].

Numerosi studi hanno dimostrato sperimentalmente la capacità del chitosano di aderire a diversi tipi di tessuti biologici, tra cui pelle, mucose, cartilagine, vasi sanguigni, membrane collageniche (tra cui pericardio).

Tuttavia, per superare i classici limiti classici del chitosano in ambiente fisiologico (swelling, degradazione, perdita di integrità meccanica) [11,13,16,19] e migliorarne le prestazioni come bioadesivo, sono state sviluppate numerose strategie di modificazione chimica e strutturale del chitosano. Tra queste si ha la reticolazione, che consente di aumentare la coesione interna del materiale, ridurre il rigonfiamento e stabilizzare l'interfaccia adesiva senza eliminare la flessibilità intrinseca del polimero [12,15-20]. In questo modo è possibile progettare strati adesivi che mantengano un comportamento "morbido" ma presentino una stabilità meccanica e chimica adeguata all'impiego in ambiente fisiologico [16,19,34]. Un'altra strategia è la funzionalizzazione con gruppi catecolici, ispirata ai meccanismi di adesione dei mitili marini. Un altro metodo di grande interesse consiste nello sviluppo di sistemi di chitosano fotoreticolabili o chimicamente reattivi in situ, che possono essere applicati in forma fluida o semifluida, adattarsi perfettamente alla geometria del tessuto ed essere induriti direttamente in loco mediante irradiazione o reazione chimica controllata. Questi sistemi sono stati applicati a tessuti quali aorta, trachea e polmone.

2.3.3 Il chitosano come materiale antimicrobico e antibiofilm

Uno dei principali problemi clinici associati all'uso di biomateriali e dispositivi medici impiantabili è rappresentato dalle infezioni correlate al dispositivo. Queste infezioni sono spesso difficili da trattare, croniche e soggette a recidive, poiché nella maggior parte dei casi sono mediate dalla formazione di biofilm microbici sulla superficie del materiale.

Un biofilm può essere definito come una comunità strutturata di microrganismi aderente a una superficie e inglobata in una matrice extracellulare polimerica (EPS) autoprodotta. All'interno del biofilm, i microrganismi mostrano una resistenza agli antibiotici drasticamente superiore rispetto alle forme planctoniche (circa 10 volte superiore), sono meno accessibili al sistema immunitario e possono persistere per lunghi periodi fungendo da serbatoio di infezione cronica [4,37,38].

Per questi motivi, la prevenzione della adesione microbica iniziale e della successiva maturazione del biofilm è oggi considerata una delle strategie più efficaci per aumentare la sicurezza e la durata dei biomateriali. Le strategie per conferire proprietà antibatteriche ai biomateriali possono essere suddivise, in modo semplificato, in due grandi categorie:

- approcci passivi, che mirano a ridurre l'adesione batterica modificando la topografia superficiale, idrofilicità / idrofobicità superficiale, carica superficiale, energia superficiale;
- approcci attivi, che prevedono il rilascio controllato di agenti antibatterici (antibiotici, ioni metallici, biocidi) oppure l'uso di materiali intrinsecamente antibatterici.

Il chitosano rientra in questa seconda categoria, in quanto possiede un'attività antimicrobica intrinseca, che lo rende particolarmente interessante per applicazioni biomediche in cui è richiesto un

controllo attivo della contaminazione microbica. Numerosi studi hanno dimostrato che il chitosano è attivo contro un'ampia gamma di microrganismi, tra cui:

- batteri Gram-positivi (ad esempio *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*),
- batteri Gram-negativi (ad esempio *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*),
- funghi e lieviti (ad esempio *Candida albicans*) [4,23,37,38].

L'efficacia del chitosano è stata osservata sia in soluzione sia in forma di film, coating, idrogel e nanoparticelle, rendendo questo polimero estremamente versatile per la progettazione di superfici e materiali antibatterici. Nonostante l'ampia mole di dati sperimentali, i meccanismi esatti dell'azione antimicrobica del chitosano non sono completamente univoci e probabilmente non sono riconducibile a un singolo, ma a una combinazione di effetti [4,38]. Sono stati proposti diversi meccanismi principali, che possono agire in modo sinergico, di seguito specificati e rappresentati in Figura 11.

Interazione elettrostatica con la membrana cellulare

Il meccanismo più comunemente accettato prevede l'interazione elettrostatica tra i gruppi amminici protonati del chitosano e i componenti anionici della parete e della membrana cellulare (Gram+ (acidi teicoci della parete dei batteri Gram+, lipopolisaccarde della membrana batterica dei Gram- e mannosio-6-fosfato della parete fungina). Questa interazione può portare a destabilizzazione della membrana con aumento della sua permeabilità, perdita di integrità strutturale, fuoriuscita di componenti intracellulari essenziali finanche alla morte cellulare [4,37,38].

Penetrazione intracellulare e interazione con il DNA

In presenza di frazioni di chitosano a basso peso molecolare, è stata inoltre proposta la possibilità di penetrazione intracellulare del polimero e di interferenza con i processi di replicazione del DNA e di sintesi proteica e di inibizione delle funzioni mitocondriali e della sintesi dell'ATP [4,37].

Chelazione di ioni e inibizione enzimatica

Un ulteriore contributo può derivare dalla capacità del chitosano di chelare ioni metallici e nutrienti essenziali per il metabolismo batterico [4,37]. La sottrazione di tali ioni può inibire l'attività di enzimi chiave, alterare l'equilibrio osmotico e contribuire ulteriormente all'effetto batteriostatico o battericida.

L'attività antibatterica del chitosano non è una proprietà fissa, ma dipende in modo critico dai suoi parametri chimici e da fattori ambientali. Un più elevato grado di deacetilazione implica maggiore densità di carica positiva, interazioni elettrostatiche più forti con le superfici microbiche e, in molti casi, un aumento dell'attività antimicrobica. Chitosani ad alto MW tendono ad agire prevalentemente a livello di superficie cellulare, mentre chitosani a basso MW possono penetrare più facilmente nella cellula. Inoltre, poiché l'attività del chitosano dipende dalla protonazione dei gruppi amminici, essa è più marcata in ambiente acido o debolmente acido, mentre è ridotta in condizioni in cui il polimero è meno carico o in presenza di elevata forza ionica che scherma le interazioni elettrostatiche, rendendo le proprietà antimicrobiche del chitosano dipendenti dalle condizioni di pH e forza ionica del mezzo.

Oltre all'effetto sui microrganismi planctonici, il chitosano mostra una notevole attività antibiofilm [4,7,8-10,21,37-39,40], che si manifesta a due livelli principali:

- 1) Inibizione dell'adesione iniziale dei microrganismi alla superficie.
- 2) Interferenza con la struttura e la stabilità dei biofilm già formati.

Nel primo caso, la presenza di chitosano su una superficie modifica la carica e la chimica superficiale, rende l'adesione microbica energeticamente sfavorevole e può esercitare un effetto batteriostatico

locale. Nel secondo caso, il chitosano può interagire con la matrice extracellulare del biofilm (EPS) destabilizzandone la struttura e aumentando la permeabilità del biofilm ad agenti antimicrobici; in alcuni casi può inoltre indurre una parziale dispersione del biofilm stesso.

Questo duplice effetto — preventivo e attivo — è di particolare importanza applicativa, poiché la prevenzione della formazione del biofilm risulta generalmente molto più efficace della sua eradicazione una volta che la struttura è completamente maturata [4,37]. Grazie a queste proprietà, il chitosano è stato ampiamente studiato come coating antibatterico per applicazioni implantari e ricostruttive, componente di film e membrane antibatteriche e matrice per il rilascio controllato di antibiotici o agenti antimicrobici, in cui la sua attività antibiofilm e quella di drug delivery agiscono in sinergia [37,38]. Rispetto a molti sistemi basati esclusivamente sul rilascio di farmaci, il chitosano offre il vantaggio di fornire una prima linea di difesa intrinseca contro la colonizzazione microbica, ridurre la dipendenza da antibiotici e potenzialmente limitare l'insorgenza di resistenze.

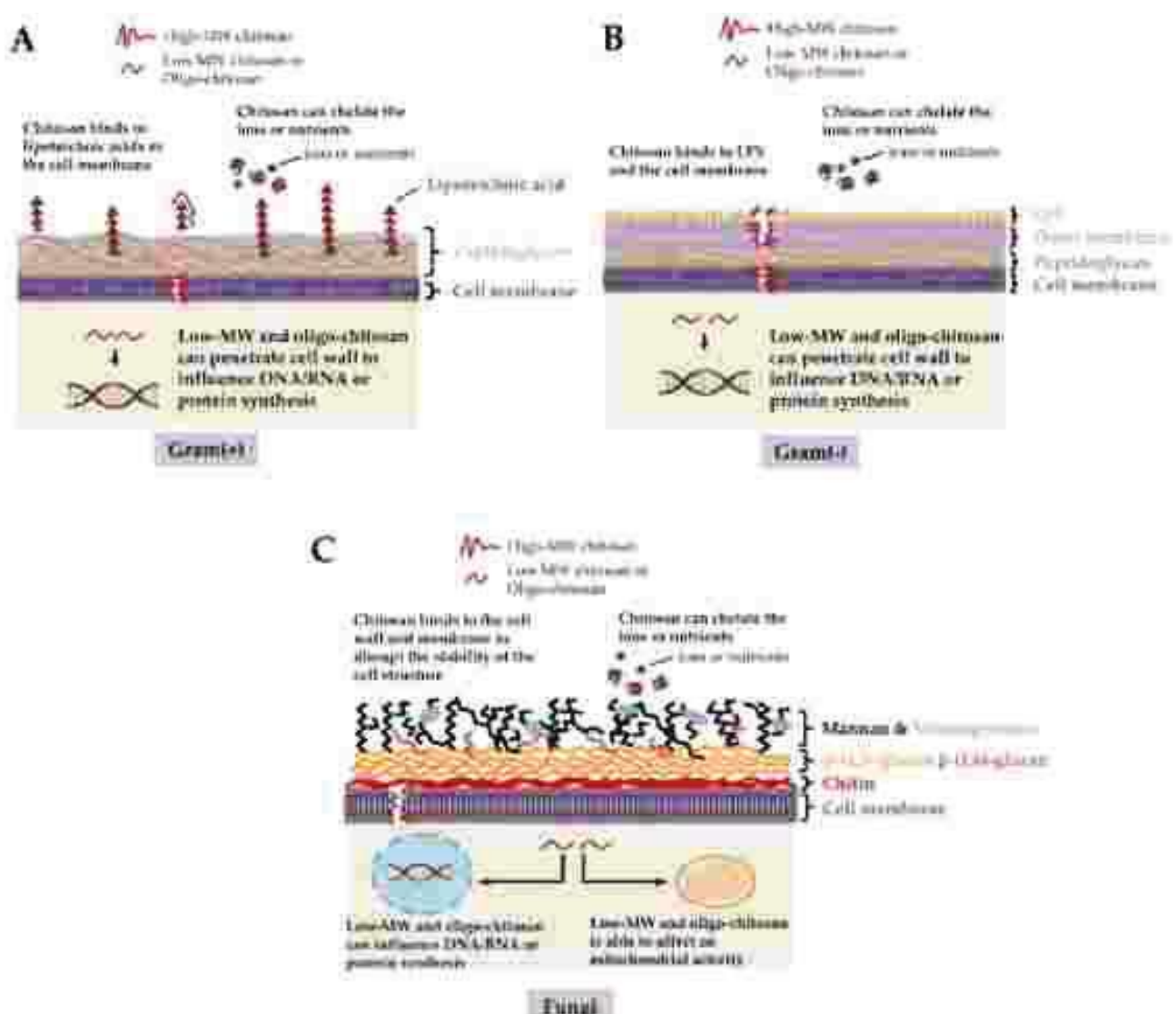


Figura 11. Attività antimicrobica del chitosano verso a) batteri Gram+, b) batteri Gram- e c) funghi [23]

2.3.4 Sinergia tra funzione bioadesiva e funzione antibatterica del chitosano

Alla luce di quanto discusso nei paragrafi 2.3.2 e 2.3.3, emerge chiaramente che il chitosano possieda una duplice natura funzionale, essendo contemporaneamente un eccellente materiale di interfaccia

bioadesivo e un agente antibatterico/antibiofilm intrinseco. Questa combinazione unica di proprietà rende il chitosano particolarmente adatto come strato di collegamento tra membrane biologiche e materiali funzionali e come componente attivo per aumentare la sicurezza e la durabilità del sistema.

Un aspetto di particolare interesse del chitosano è che la funzione di bioadesione e quella antibatterica (e antibiofilm) non sono indipendenti, ma possono agire in modo sinergico. Da un lato, l'adesione stabile del coating al substrato può garantire la persistenza nel tempo della funzione antibatterica sulla superficie del dispositivo; dall'altro, la riduzione della colonizzazione microbica può contribuire a preservare l'integrità dell'interfaccia e a prevenire fenomeni di degradazione biologica precoce [4,16,19,37,38].

2.3.5 Il chitosano come piattaforma ingegnerizzabile per applicazioni biomedicali

Nel contesto dei biomateriali avanzati quindi, il chitosano non deve quindi essere interpretato semplicemente come un materiale volumetrico, ma come un vero e proprio strato funzionale di interfaccia e come matrice per l'integrazione di moduli nano-funzionali in sistemi compositi altamente ingegnerizzati per applicazioni biomediche e farmaceutiche nei quali esso non svolge un singolo ruolo, ma integra contemporaneamente funzioni strutturali (adesione meccanicamente compatibile), biologiche (interazione biochimica con il tessuto) e protettive (protezione antibatterica) in un'unica piattaforma polimerica ingegnerizzabile [16,19,34], rendendolo un materiale strategico per la progettazione di biomateriali avanzati (Figura 12).

In conclusione, il chitosano presenta una straordinaria combinazione di proprietà, quali:

- versatilità strutturale e processuale [2,13,16,19],
- capacità di essere stabilizzato e ingegnerizzato tramite funzionalizzazioni e reticolazione [12,14,15,20,26],
- funzione di interfaccia bioadesiva [16,19,34],
- attività antibatterica e antibiofilm [4,37,38].

Questo insieme di caratteristiche giustifica il crescente interesse per il suo impiego come elemento chiave nei sistemi compositi per applicazioni chirurgiche, ricostruttive e implantari e costituisce il fondamento scientifico e tecnologico per il suo impiego nel settore dei biomateriali.

In questo scenario, il chitosano:

- garantisce l'adesione al substrato biologico,
- fornisce una matrice stabile per l'immobilizzazione della fase inorganica,
- contribuisce alla biocompatibilità del sistema,
- presenta funzionalità biologiche proprie (come l'attività antibatterica e antibiofilm).

Il chitosano rappresenta quindi un candidato ideale come “ponte molecolare” e materiale di interfaccia tra tessuti biologici e materiali funzionali inorganici e per questo è stato selezionato come elemento chiave di collegamento tra il substrato biologico (pericardio bovino) e la fase funzionale inorganica (solidi lamellari) nelle due diverse applicazioni-prototipo trattate nella presente tesi.

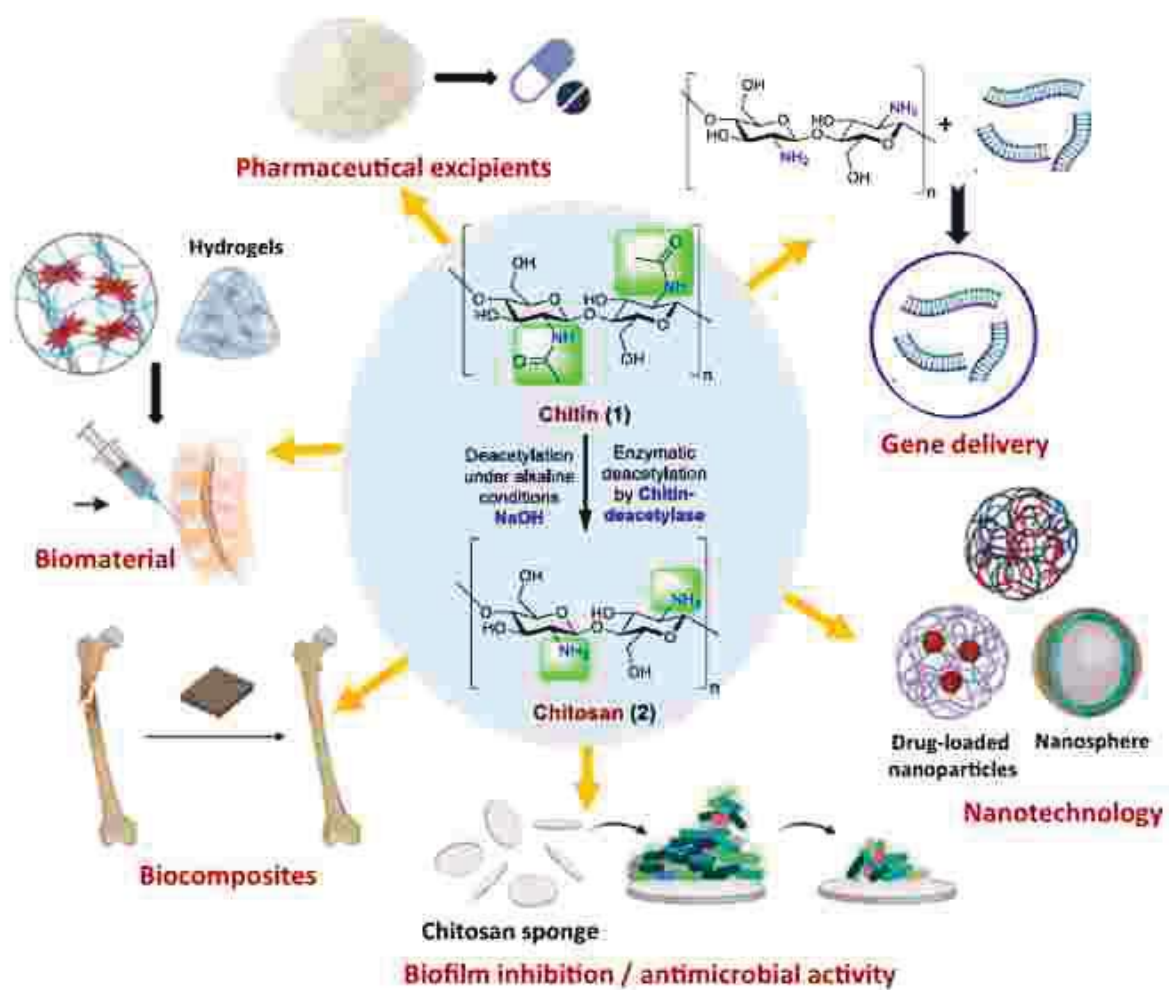


Figura 12. Schema rappresentativo delle applicazioni farmaceutiche del chitosano [33]

Le membrane biologiche come biomateriali

Le membrane biologiche e, più in generale, le matrici extracellulari (ECM) di origine animale occupano una posizione di rilievo tra i biomateriali per applicazioni chirurgiche e ricostruttive per due motivi principali: la loro intrinseca biocompatibilità e la loro affinità strutturale con i tessuti dell'ospite [41,42].

Derivando direttamente da tessuti animali, queste matrici presentano una composizione biochimica altamente compatibile con l'organismo e conservano l'architettura gerarchica della ECM, che gli consente di avere buona resistenza a trazione, elevata tenacità e comportamento viscoelastico simile a quello dei tessuti naturali, proprietà molto favorevoli per l'uso clinico. Inoltre, mantenendo una micro-struttura già ottimizzata dall'evoluzione per l'interazione con le cellule e avendo una chimica di superficie ricca di sequenze peptidiche bioattive, queste matrici favoriscono l'adesione e la proliferazione cellulare, mostrando quindi un'elevata capacità di integrazione con il tessuto ospite.

Tra le varie fonti animali, i tessuti di origine bovina (in particolare pericardio, derma e altri tessuti ricchi in collagene) rivestono un ruolo di primo piano grazie alla loro ampia disponibilità, buona riproducibilità delle proprietà e consolidata esperienza clinica.

Tali materiali sono ampiamente utilizzati in applicazioni quali: patch chirurgiche, sostituti tissutali, supporti per la rigenerazione guidata, duraplastica e chirurgia cardiovascolare e ricostruttiva.

1. Struttura e caratteristiche generali della ECM di origine animale

La matrice extracellulare (ECM) è una rete tridimensionale complessa costituita da una base fibrosa portante (prevalentemente collagene di tipo I), una fase elastica (elastina) e una matrice amorfa idratata di proteoglicani e glicoproteine (come fibronectina e laminina), come mostrato in Figura 13.

Nel caso del pericardio bovino e di molte altre membrane biologiche utilizzate come biomateriali, il collagene rappresenta il principale componente strutturale, responsabile della resistenza meccanica, della flessibilità e della stabilità dimensionale del tessuto. L'organizzazione strutturale è tipicamente gerarchica, con fibre e fibrille di collagene orientate, e questa caratteristica conferisce ai tessuti una combinazione di resistenza meccanica, flessibilità e funzionalità che risulta estremamente difficile da replicare con materiali sintetici convenzionali [41,43].

Le porosità presenti tra le fibre invece sono responsabili del trasporto di nutrienti e metaboliti.

Per questa sua natura la ECM può essere interpretata come un composito naturale multiscale [41-43]. Dal punto di vista funzionale, la ECM non rappresenta soltanto un supporto strutturale, ma un vero e proprio microambiente biochimico e biomeccanico in grado di influenzare il comportamento cellulare, la migrazione, la proliferazione e la differenziazione [41,42].

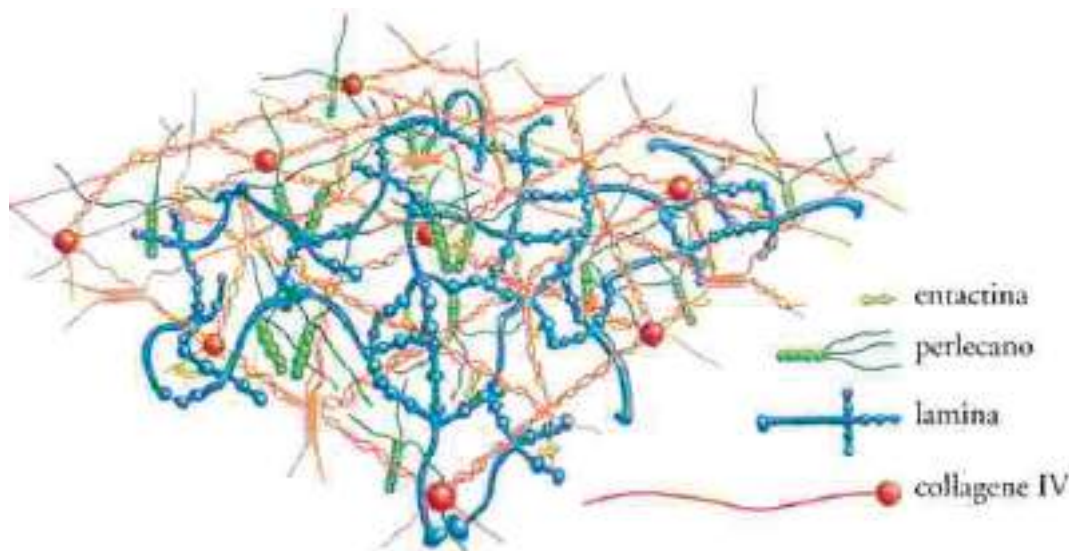


Figura 13. Rappresentazione della struttura della ECM

2. Il pericardio bovino come modello di membrana biologica

Il pericardio bovino (Figura 14) è un tessuto connettivo fibroso altamente specializzato, caratterizzato da una architettura gerarchica complessa che ne determina le peculiari proprietà meccaniche e funzionali come biomateriale strutturale [35,36,41,44,45].

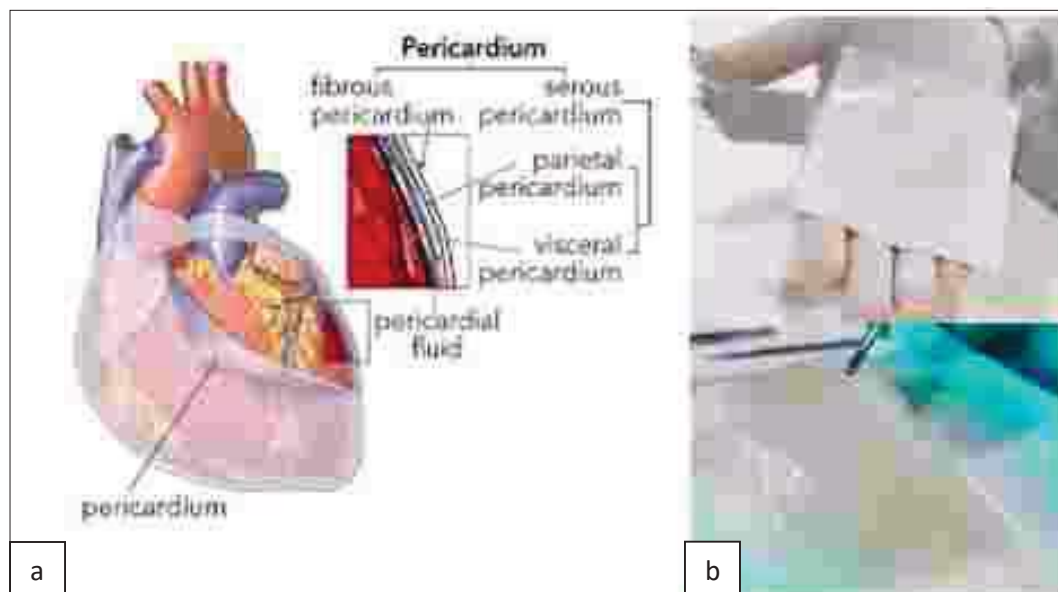


Figura 14. a) Collocazione del pericardio bovino in natura e b) foglietti di pericardio bovino opportunamente trattati per applicazioni biomedicali

2.1 Struttura e comportamento meccanico del pericardio bovino

Dal punto di vista compositivo, esso è costituito prevalentemente da collagene di tipo I, con contributi minori di collagene di tipo III ed elastina, immersi in una matrice amorfa ricca di proteoglicani e glicoproteine [35,44,45]. Su scala microscopica (Figura 15), il tessuto presenta una rete di fasci di fibre collageniche organizzati in modo intrecciato e parzialmente orientato, con una marcata anisotropia strutturale che riflette la direzione preferenziale delle sollecitazioni fisiologiche [36,44,45]. Questa organizzazione multilivello può essere descritta come un composito naturale, nel

quale le fibre di collagene svolgono il ruolo di fase portante, mentre la matrice interstiziale contribuisce alla dissipazione dell'energia e alla distribuzione delle tensioni [41,43,44].

A livello submicrometrico, le fibrille di collagene sono organizzate in fasci ondulati (“crimped”), la cui progressiva distensione sotto carico è responsabile della tipica risposta meccanica non lineare del tessuto, caratterizzata da una fase iniziale a bassa rigidità seguita da un rapido incremento del modulo elastico [44,45]. La presenza di una porosità intrinseca, distribuita in modo eterogeneo tra i fasci fibrosi, contribuisce inoltre alla capacità del pericardio di deformarsi, reidratarsi e adattarsi a variazioni di carico senza subire danni strutturali immediati [36,45]. Questa architettura consente al tessuto di dissipare energia e di adattarsi a sollecitazioni complesse, rendendolo particolarmente adatto a contesti fisiologici caratterizzati da carichi ciclici e deformazioni ripetute.

Questa complessa organizzazione gerarchica, che si estende dalla scala molecolare del collagene fino alla scala macroscopica del tessuto, è alla base della combinazione di elevata resistenza a trazione, flessibilità e compatibilità meccanica con i tessuti molli circostanti che rende il pericardio bovino un substrato particolarmente adatto per applicazioni biomedicali avanzate [35,36,44,45].

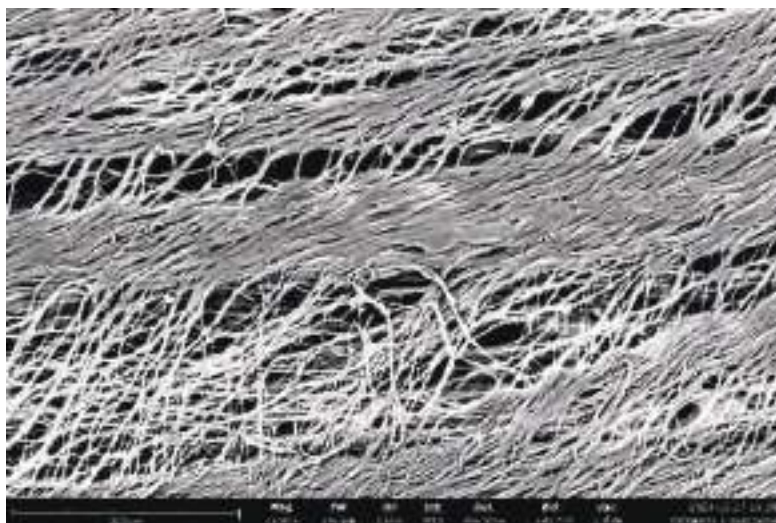


Figura 15. Immagine SEM di pericardio bovino

2.2 Utilizzo del pericardio bovino come biomateriale

Tra le varie membrane biologiche utilizzate in ambito clinico e bioingegneristico, il pericardio bovino rappresenta uno dei materiali più studiati e più ampiamente impiegati come patch chirurgico, supporto per protesi valvolari e membrana di rinforzo tissutale [35,36,44,45]. Il suo successo applicativo è legato a una combinazione di disponibilità, proprietà meccaniche e buona tollerabilità biologica.

In particolar modo per quanto concerne le proprietà meccaniche, la combinazione di elevata resistenza a trazione, flessibilità e compatibilità meccanica con i tessuti molli circostanti rende il pericardio bovino un eccellente candidato per applicazioni in cui il biomateriale deve integrarsi in un ambiente dinamico senza introdurre discontinuità meccaniche significative [35,36,44,45]. Numerosi studi sperimentali hanno evidenziato come le proprietà meccaniche del pericardio dipendano, oltre che dalla sua struttura intrinseca, anche dallo stato di idratazione del tessuto [36,44,45] e da eventuali trattamenti di conservazione e preparazione, come la liofilizzazione o altri processi fisici, che possono modificare in modo non trascurabile la microstruttura e, di conseguenza, il comportamento meccanico del materiale [46,47].

Perciò, nell'utilizzo del pericardio bovino come biomateriale, è fondamentale utilizzare trattamenti di conservazione, stabilizzazione e varia funzionalizzazione che preservino il più possibile la sua complessa organizzazione strutturale e di riflesso le sue proprietà meccaniche. In questo senso, il pericardio può essere visto non semplicemente come un “materiale di partenza”, ma come un substrato già altamente ottimizzato dalla natura, che può essere ulteriormente migliorato e funzionalizzato mediante interventi mirati sulla superficie e sull'interfaccia con l'ambiente biologico [35,36,44,45] come una base strutturale su cui costruire un materiale composito più complesso, nel quale le funzioni di interfaccia e terapeutiche verranno introdotte attraverso strati funzionali aggiuntivi. Questo approccio consente di sfruttare al massimo le qualità intrinseche del tessuto naturale, integrandole in una progettazione razionale di biomateriale avanzato.

3. Trattamenti di stabilizzazione delle membrane biologiche

Come tutti i tessuti biologici, le membrane presentano una stabilità limitata in ambiente fisiologico, dovuta a diversi fenomeni [35,41,42,45,48]:

1. Essendo suscettibili a degradazione enzimatica e a una serie di stress meccanici ciclici e all'ambiente umido come quello biologico, possono presentare una progressiva perdita di integrità strutturale e meccanica nel tempo, con deformazione e deterioramento della matrice collagenica
2. Possono essere soggette a infezione e colonizzazione batterica, soprattutto in contesti chirurgici complessi o in presenza di dispositivi impiantabili.
3. Possono andare incontro a calcificazione nel caso di dispositivi impiantabili a lungo termine e trattati con glutaraldeide
4. Possono subire un'integrazione incompleta o fibrosi, che può compromettere la funzionalità del tessuto riparato.

Per questi motivi è necessario stabilizzare le membrane biologiche (e anche il pericardio bovino) come biomateriali strutturali a medio e lungo termine (a seconda di un utilizzo come dispositivo riassorbibile o meno), è quindi necessario ricorrere a strategie di stabilizzazione opportune che mirino principalmente a ridurre la suscettibilità del collagene alla degradazione e a preservare le proprietà meccaniche del tessuto [11,45,48].

3.1 Reticolazione delle membrane biologiche

In questo contesto, la reticolazione (crosslinking) del collagene rappresenta l'approccio più diffuso e consolidato. La reticolazione del collagene si basa sull'introduzione di legami chimici addizionali tra le catene proteiche, con l'obiettivo di aumentare la stabilità strutturale, ridurre la solubilità e rallentare i processi di degradazione enzimatica [11,48]. Storicamente, la glutaraldeide è stata l'agente di crosslinking più utilizzato per il trattamento del pericardio e di altri tessuti biologici destinati a impieghi biomedicali [48].

Il trattamento con glutaraldeide è altamente efficace nel migliorare la resistenza meccanica e la stabilità del tessuto; tuttavia, il suo utilizzo è associato a ben noti effetti collaterali, tra cui citotossicità residua, rigidificazione progressiva del materiale e una marcata tendenza alla calcificazione in vivo [11,48]. Queste limitazioni hanno stimolato una vasta attività di ricerca volta allo sviluppo di strategie alternative o complementari.

Tra gli agenti di crosslinking alternativi, la genipina e i sistemi basati su carbodiimmidi (come EDC) e genipina hanno ricevuto particolare attenzione grazie alla loro minore citotossicità rispetto alla

glutaraldeide [11,48]. Questi approcci consentono di ottenere un buon livello di stabilizzazione del tessuto mantenendo al contempo una maggiore compatibilità biologica e, in alcuni casi, proprietà meccaniche più vicine a quelle del tessuto nativo. Tuttavia, anche questi metodi presentano compromessi tra grado di stabilizzazione, rigidità del materiale e stabilità a lungo termine, rendendo evidente come la scelta della strategia di crosslinking debba essere attentamente bilanciata in funzione dell'applicazione specifica [11,48].

3.2 Decellularizzazione delle membrane biologiche

La decellularizzazione è un trattamento che mira a rimuovere le componenti cellulari mantenendo il più possibile intatta l'architettura della matrice extracellulare [41-43]. Questo processo è essenziale per ridurre l'immunogenicità del tessuto e migliorare la sua integrazione con l'organismo ospite [41,42]. Il risultato della decellularizzazione è una scaffold biologico acellulare che mantiene la microstruttura e la composizione dell'ECM, ma è più sicuro dal punto di vista immunologico.

I processi di decellularizzazione possono però presentare dei limiti quali l'alterazione parziale delle proprietà meccaniche e la modifica della chimica di superficie, che può influenzare in modo indesiderato la risposta biologica.

Per questo motivo un protocollo di decellularizzazione ben progettato deve trovare un delicato equilibrio tra efficacia nella rimozione delle cellule e preservazione della microstruttura della ECM, poiché un trattamento eccessivamente aggressivo può compromettere in modo significativo le proprietà funzionali del tessuto [41-43].

3.3 Trattamenti fisici

Per facilitare la conservazione delle membrane biologiche, accanto ai trattamenti chimici, vengono spesso impiegati anche trattamenti fisici come la liofilizzazione (freeze-drying) [46,47]. Questo trattamento prevede una fase di congelamento seguita da sublimazione e consente di ottenere materiali facilmente stoccabili e reidratibili, ma può anche introdurre modifiche nella microstruttura della membrana, nella sua orosità e nel comportamento meccanico del tessuto [46,47].

Diversi studi hanno mostrato che il ciclo di congelamento e sublimazione può portare a una riorganizzazione delle fibre collageniche e a variazioni nella rigidità e nella resistenza a trazione del pericardio [46,47]. Per questo motivo, l'uso di tali trattamenti deve essere attentamente valutato nel contesto dell'applicazione finale e integrato in una strategia complessiva di preparazione del biomateriale.

Altro trattamento fisico per stabilizzare le membrane è poi costituito dall'irradiazione con raggi gamma (gammatura) per un determinato periodo e con una determinata intensità, in modo da sterilizzare il tessuto senza comprometterne l'integrità.

3.4 Funzionalizzazione

La modifica e funzionalizzazione delle superfici delle membrane biologiche costituisce un altro sistema vantaggioso per migliorarne le prestazioni in vivo. Tra le strategie di funzionalizzazione figurano: rivestimenti polimerici bioattivi, immobilizzazione di molecole antibatteriche o antinfiammatorie, modificazione chimica della superficie e integrazione con fasi inorganiche funzionali. L'obiettivo comune di questi approcci è trasformare una membrana biologica "passiva" in un biomateriale attivo e multifunzionale.

3.5 Interazione tra trattamenti e proprietà finali del materiale

È importante sottolineare che i diversi trattamenti — decellularizzazione, crosslinking, liofilizzazione, gammatrice, funzionalizzazione — non agiscono in modo indipendente, ma interagiscono tra loro nel determinare le proprietà finali del materiale [11,41-43,48]. La sequenza dei trattamenti, le condizioni operative e i parametri di processo possono influenzare in modo significativo sia la microstruttura sia il comportamento meccanico e biologico del pericardio trattato. Da un punto di vista ingegneristico, questo implica che la preparazione di una membrana biologica destinata a essere ulteriormente funzionalizzata deve essere considerata come un processo integrato, nel quale ogni passaggio contribuisce alla definizione delle prestazioni finali del sistema [42,43,48].

La scelta e l'ottimizzazione di tali trattamenti costituiscono perciò un passaggio chiave per garantire la riuscita del sistema composito finale, nel quale il substrato biologico deve mantenere le proprie proprietà meccaniche pur fungendo da supporto per ulteriori livelli funzionali.

4. Ingegnerizzazione delle membrane biologiche

È ormai ampiamente riconosciuto che, nei biomateriali, è la superficie, e non il bulk, la vera interfaccia biologica, cioè la parte che determina in larga misura l'interazione con l'ambiente biologico, governando fenomeni quali l'adsorbimento proteico, l'adesione cellulare, l'attivazione della risposta infiammatoria e la colonizzazione batterica [6,49,50]. Di conseguenza, materiali con proprietà volumetriche simili possono mostrare comportamenti biologici profondamente diversi se differiscono anche solo per poche caratteristiche della struttura superficiale [106,152,153]. Questo concetto è particolarmente rilevante nel caso delle membrane biologiche, nelle quali il substrato di partenza è già intrinsecamente biocompatibile, ma non necessariamente ottimizzato per resistere a processi di colonizzazione microbica o per svolgere funzioni terapeutiche attive [35,36,49].

L'ingegnerizzazione delle superfici può essere definita come l'insieme delle strategie volte a modificare in modo controllato le proprietà chimiche, fisiche e biologiche dello strato più esterno di un materiale senza alterarne in modo significativo le caratteristiche meccaniche globali [6,41-51,49]. Questo approccio consente di disaccoppiare, almeno in parte, le funzioni strutturali da quelle biologiche e funzionali, permettendo una progettazione modulare del biomateriale [4,49,51]. Nel contesto dei biomateriali avanzati, l'obiettivo dell'ingegnerizzazione non è semplicemente quello di ottenere materiali inerti e tollerati, ma di progettare superfici attive, capaci di interagire in modo selettivo con l'ambiente biologico e di svolgere funzioni specifiche [6,50,51].

Le principali strategie di modifica superficiale delle membrane biologiche devono necessariamente rispettare alcuni prerequisiti: non danneggiare la microstruttura della membrana e non alterare in modo irreversibile le proprietà meccaniche del tessuto [35,36,51]. Questi metodi includono approcci fisici, chimici e l'applicazione di rivestimenti (*coating*) polimerici o compositi [6,49,51].

4.1 Coating polimerici

Il coating polimerico rappresenta probabilmente una delle soluzioni più efficaci ed eleganti per introdurre nuove funzionalità senza compromettere le qualità intrinseche del substrato biologico [6,34,50,51]. I coating polimerici infatti possono adattarsi a un substrato viscoelastico e spesso permanentemente idratato [34-36], producendo rivestimenti conformi che seguono la topografia e le deformazioni del tessuto, realizzando un'interfaccia continua e meccanicamente compatibile [34]. Poiché, a differenza dei substrati rigidi, i tessuti biologici sono deformabili e viscoelastici,

l'interfaccia tra coating e substrato non può quindi essere concepita come una giunzione rigida, ma come una interfaccia graduale e meccanicamente compatibile, in grado di distribuire le tensioni e di adattarsi alle deformazioni senza generare concentrazioni locali di stress [34,35].

L'uso di polimeri morbidi e idratibili, come il chitosano, consente di realizzare questo tipo di interfaccia, nella quale lo strato funzionale non si comporta come un rivestimento estraneo, ma come una prosecuzione funzionale della superficie del tessuto [16,19,34].

I coating polimerici consentono quindi di modificare profondamente la chimica superficiale e le interazioni biologiche di un substrato mantenendo sostanzialmente inalterato il comportamento meccanico del materiale sottostante [6,34,50,51].

Un coating destinato a una membrana biologica deve inoltre soddisfare una serie di requisiti stringenti [34-36]: deve aderire stabilmente in ambiente acquoso, deve essere sufficientemente flessibile da seguire le deformazioni del substrato senza delaminare, non deve occludere eccessivamente la porosità naturale del tessuto, deve mantenere la propria integrità nel tempo e, dal punto di vista funzionale, dovrebbe introdurre proprietà aggiuntive, come attività antibatterica o capacità di rilascio di molecole terapeutiche, senza compromettere la biocompatibilità complessiva del sistema [6,50,51].

In questo contesto, il chitosano si inserisce perfettamente come materiale d'elezione per il coating di membrane biologiche, grazie alle sue proprietà che rispecchiano esattamente i requisiti sopra citati, e come descritto in dettaglio al paragrafo 2.3.5.

Nello specifico, l'interazione tra chitosano e collagene delle ECM è favorita dalla complementarità di carica (chitosano cationico vs collagene parzialmente anionico), dall'abbondanza di gruppi funzionali capaci di formare legami a idrogeno e dalla possibile inter-penetrazione superficiale delle catene polimeriche del chitosano nella membrana. Queste interazioni consentono di avere la formazione di rivestimenti stabili e conformi senza necessità di trattamenti chimici aggressivi e preservando la microstruttura del tessuto biologico.

5. Progettazione modulare dei biomateriali

Le membrane biologiche, e in particolare il pericardio bovino, non sono semplici supporti passivi, ma elementi strutturali centrali di un sistema composito ingegnerizzato, la cui superficie viene razionalmente modificata per introdurre nuove funzioni senza comprometterne le proprietà meccaniche di base [6,34-36,50,51]. Esse rappresentano un substrato ideale per la costruzione di biomateriali funzionali, ma necessitano di una funzionalizzazione intelligente per superarne i limiti intrinseci.

L'ingegnerizzazione è quell'insieme di processi che consentono di trasformare una membrana biologica strutturale in una piattaforma multifunzionale, capace di svolgere ruoli attivi quali la prevenzione delle infezioni, il rilascio locale di farmaci o la modulazione della risposta cellulare [6,34,50,51]. Questo approccio si inserisce nel più ampio concetto di progettazione modulare dei biomateriali, nel quale ogni livello del sistema è responsabile di una funzione specifica e può essere ottimizzato in modo relativamente indipendente [34,51].

Nel contesto della presente tesi, il pericardio bovino costituisce il modulo strutturale, il coating polimerico a base di chitosano rappresenta il modulo di interfaccia e funzionalizzazione, mentre il modulo funzionale vero e proprio è costituito dai solidi lamellari.

I solidi lamellari

I solidi lamellari costituiscono una vasta classe di materiali caratterizzati da una struttura cristallina anisotropa, nella quale unità bidimensionali si impilano lungo una direzione preferenziale mantenendo una coesione garantita da interazioni relativamente deboli. Questa architettura conferisce proprietà peculiari quali elevata anisotropia, tendenza all'intercalazione di specie ioniche o molecolari e notevole flessibilità chimica nella progettazione delle funzionalità [52].

All'interno di questa famiglia, i Layered Double Hydroxides (LDH) e i fosfati di zirconio occupano una posizione di particolare rilievo per la combinazione di una struttura inorganica ordinata e di una chimica interlamellare modulabile, che li rende materiali "programmabili" a livello nanometrico [52].

1. Generalità dei solidi lamellari

Un solido lamellare [52] è un solido nel quale si verifica la condizione per cui i legami tra gli atomi dello stesso piano sono molto più forti delle interazioni tra gli atomi appartenenti a piani adiacenti, rendendo perciò possibile una struttura detta "a strati". In genere, nello stesso piano si osservano legami covalenti tra gli atomi, mentre tra atomi di piani adiacenti si verificano interazioni di Van der Waals. Un singolo strato può essere perciò visto come una macromolecola planare, mentre il solido può essere considerato come un cristallo molecolare formato dall'impacchettamento di tali macromolecole bidimensionali. Appartengono alla categoria dei solidi lamellari grafite, argille, fosfati di metalli tetravalenti.

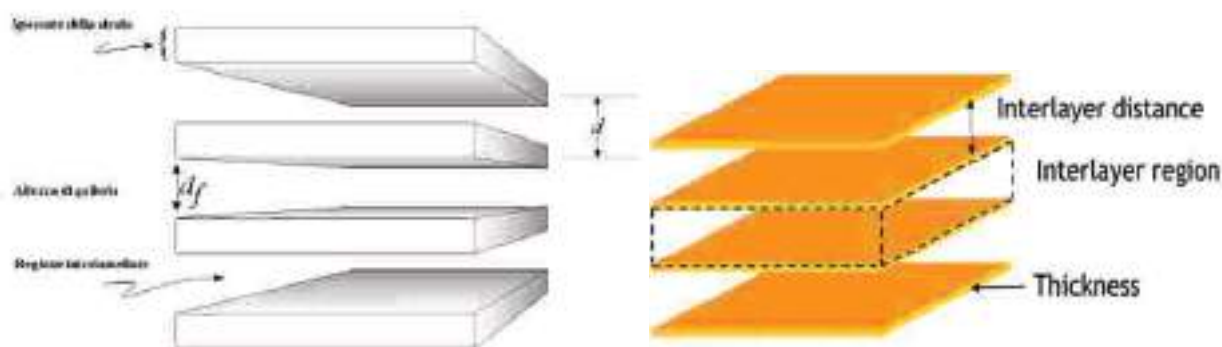


Figura 16. Illustrazione schematica dei parametri strutturali di un solido lamellare [89]

Una rappresentazione schematica di un solido lamellare è riportata in Figura 16.

Si definiscono: d , *distanza interlamellare* o *distanza interstrato*, la distanza tra i baricentri di due lamelle adiacenti; d_f , *altezza di galleria*, la distanza libera tra strati adiacenti, definita come la differenza tra la distanza interlamellare e lo spessore della lamella; *regione interlamellare*, lo spazio libero tra due lamelle adiacenti; S_t , *area specifica superficiale* di una lamella, cioè l'area superficiale di un grammo di solido, considerato come un'unica macrolamella.

1.1 Classificazione dei solidi lamellari

Ci sono molti modi in cui i solidi lamellari possono essere classificati [52].

Una prima classificazione è quella basata sulla natura della lamella, che può essere interamente organica, interamente inorganica oppure mista.

Un'altra classificazione può essere fatta in base alla presenza o meno di cariche fisse sulla superficie della lamella, quindi i solidi possono essere suddivisi in due grandi categorie: solidi lamellari carichi

e solidi lamellari non carichi. I solidi con lamelle neutre possono essere ulteriormente classificati in base alla loro conducibilità in isolanti e conduttori. Un esempio di solidi lamellari non carichi è la grafite. I solidi lamellari carichi possono essere a loro volta distinti in due classi, a seconda della natura della carica fissa della lamella: se positiva, sono detti “*a scambio anionico*”, come le idrotalciti; se negativi sono invece detti “*a scambio cationico*”, come i fosfati e fosfonati di zirconio, le argille e i silicati lamellari. Per i solidi lamellari che presentano cariche fisse si definisce il parametro *densità di carica dello strato* come il numero di cariche elementari per cm^2 , espresso in $\mu\text{C}/\text{cm}^2$.

Un’ultima classificazione è infine effettuata in base allo spessore delle lamelle: se costituite da un monostrato atomico (ad esempio la grafite), da uno spessore di pochi atomi (ad esempio dicalcogenuri), oppure da uno strato di molti atomi (ad esempio argille e fosfati di metalli tetravalenti). Lo spessore delle lamelle è direttamente correlato alla rigidità degli strati costituenti, che è una delle caratteristiche più importanti nei solidi lamellari.

1.2 Intercalazione

I solidi lamellari sono di notevole interesse applicativo in quanto sono in grado di dare luogo al processo di *intercalazione* [52], cioè di inserzione reversibile di una specie ospite (detta *guest*) nella regione interstrato di un composto lamellare ospitante (detto *host*), mantenendo in genere inalterata la struttura degli strati (vedi Figure 17 e 18). Il processo inverso, per il quale la specie *guest* si disinscrive dalla regione interstrato è detta *deintercalazione*.

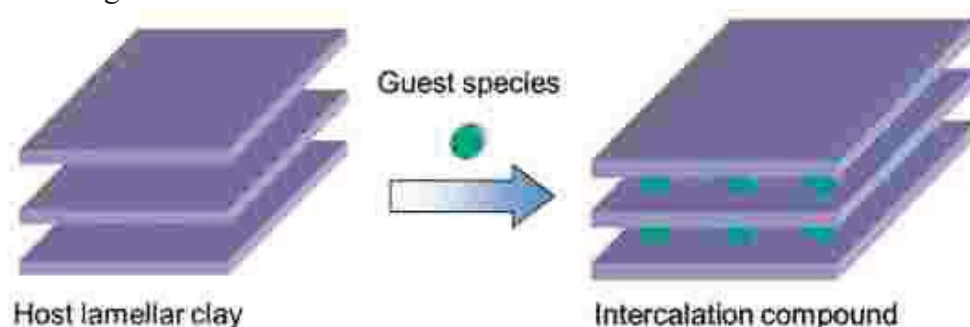


Figura 17. Schema di un processo di intercalazione in un solido lamellare [96]



Figura 18. Schema di un processo di intercalazione in un idrotalcite [88]

L’intercalazione ha una duplice valenza: da una parte, il *guest*, se intercalato, può subire la modifica delle sue proprietà chimiche, catalitiche, elettroniche e ottiche rispetto a se non intercalato; dall’altra parte, l’*host*, al variare del *guest*, può essere modificato nelle sue proprietà macroscopiche. La possibilità di intercalazione di un *guest* in un *host* lamellare dipende da vari fattori:

- interazioni chimiche *host-guest* (che rappresentano la driving force del processo),
- interazioni topologiche dovute alle caratteristiche strutturali degli strati (ad esempio la loro rigidità),
- ingombro sterico del *guest*
- capacità di riorganizzarsi strutturalmente se intercalato, da parte del *guest*.

Nel caso di solidi lamellari carichi, questi possono intercalare specie ioniche, tramite un processo di *scambio ionico*, o specie neutre polari attraverso interazioni dipolo-dipolo, legami a idrogeno, formazione di complessi a trasferimento di carica. Nel caso di solidi lamellari non carichi, l'intercalazione può avvenire per reazione di *sostituzione*.

Altre metodologie di intercalazione sono poi le reazioni di *grafting* (in cui la molecola ospite reagisce con un gruppo funzionale ancorato sulla superficie della lamella formando legami covalenti), lo *scambio topotattico* e la formazione di *composti di coordinazione* [53].

Un importante fenomeno che si osserva quando il processo di intercalazione viene spinto fino al limite estremo è l'*esfoliazione* del cristallo. Alcuni solidi lamellari, come i fosfati e fosfonati di zirconio, se intercalati con propilammina e metilammina, possono dare la formazione di dispersioni colloidali di singole lamelle o di pacchetti di poche lamelle, quando si raggiunge il 50% o il 100% di intercalazione [54]. Ciò può essere spiegato con il fatto che l'intercalazione comporta un allontanamento delle lamelle e quindi una diminuzione delle interazioni deboli esistenti tra lamelle adiacenti, inoltre si instaurano interazioni idrofobiche deboli tra le catene alchiliche di ammine legate a strati adiacenti. Se le molecole d'acqua sono in grado di diffondere nella regione interstrato e solvatare i gruppi carichi e quelli neutri e se l'energia di solvatazione riesce a vincere le interazioni esistenti tra gli strati, allora gli strati stessi si allontaneranno infinitamente formando una dispersione colloidale. Queste dispersioni colloidali possono essere utilizzate per ottenere membrane con elevata conducibilità protonica, o per ottenere sensori a stato solido per alcuni gas, oppure per coprire materiali vari con sottili pellicole [55,56].

2. Idrotalciti

Ci si riferisce comunemente con il termine "idrotalciti" ad un tipo di solidi lamellari con carica positiva di lamella. Questo gruppo di solidi deve il suo nome al suo precursore, l'idrotalcite naturale, un idrossicarbonato di Mg e Al [57]. Le idrotalciti sono dette anche *argille anioniche* [58], per distinguerle da quelle cationiche; a differenza di queste ultime sono poco diffuse in natura e sono in più larga parte di sintesi, perciò sono anche chiamate composti lamellari del tipo idrotalcite (*hydrotalcite-like compounds* - HTlc) e *idrossidi doppi lamellari* (*layered double hydroxides* - LDH) [59,60].

2.1 Struttura delle idrotalciti

Le idrotalciti possono essere considerati derivati strutturali della *brucite*, minerale lamellare neutro di formula $Mg(OH)_2$, nella quale ogni catione Mg^{2+} coordina sei ioni OH^- , identificando così degli ottaedri che condividono gli spigoli per formare infiniti piani elettricamente neutri, come mostrato in Figura 19°_b. Questi piani sono impaccati gli uni con gli altri e sono tenuti insieme da forze di Van der Waals (Figura 19c,e) [61-64]. La sostituzione isomorfa e casuale di una frazione dei cationi bivalenti (Mg^{2+}) con cationi trivalenti (M^{3+}) genera una carica positiva netta sugli strati, che viene compensata dalla presenza di anioni presenti nella regione interstrato, dove è presente anche l'acqua di cristallizzazione.

Le lamelle rimangono distanti le une dalle altre a causa della repulsione delle cariche positive, ma, grazie alle interazioni ioniche tra lamelle cariche positivamente e specie anioniche delle regioni interstrato, le lamelle non segregano del tutto, dando origine a una struttura tridimensionale a strati (Figura 19d) [61-64].

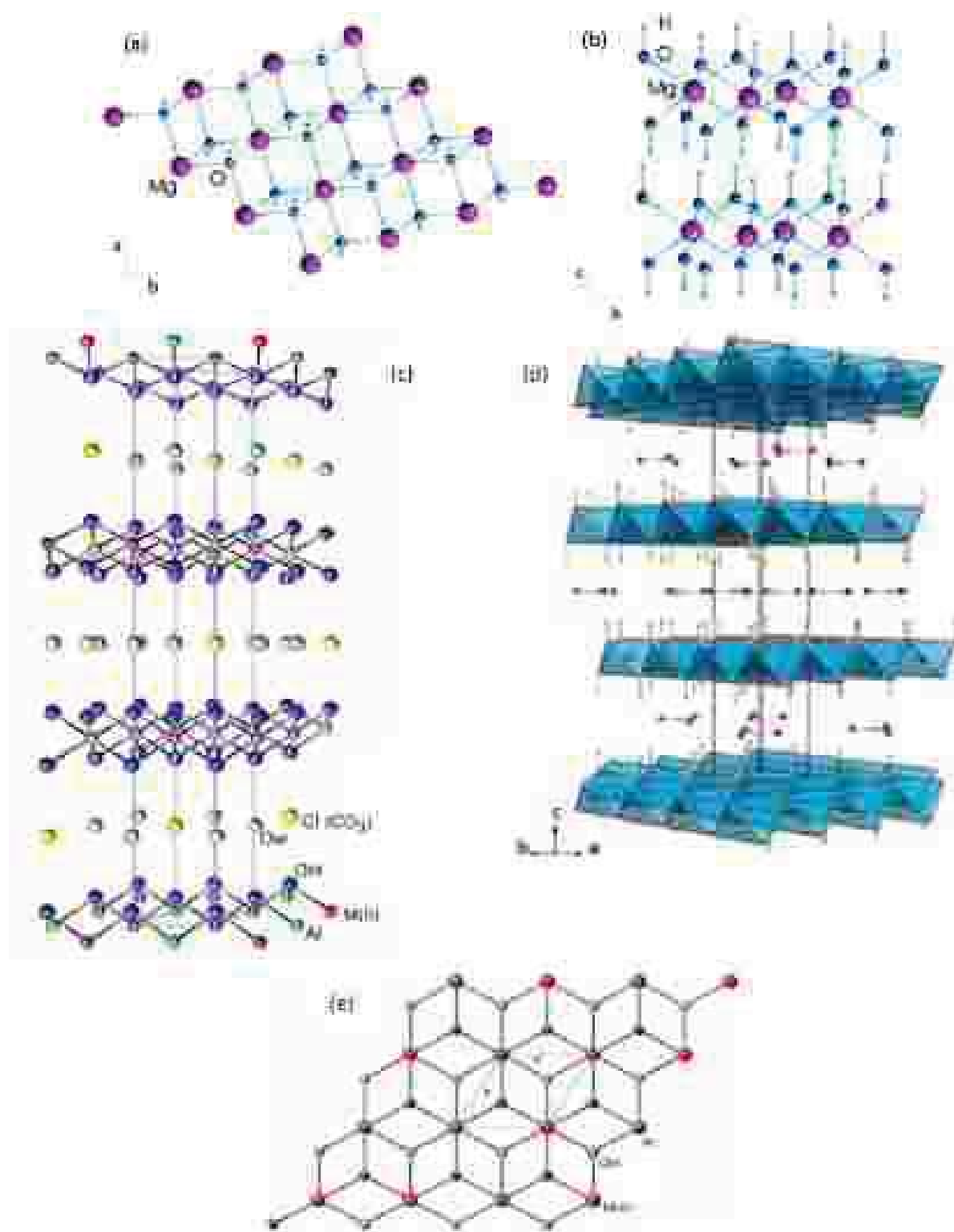


Figura 19. a) Visione di una lamella idrotalcitica lungo gli assi cristallografici ab e (b) visione lungo gli assi cristallografici bc; rappresentazione della struttura a strati di un composto idrotalcite-simile d) lungo gli assi bc e e) lungo gli assi ab e d) struttura di un'idrotalcite MgAl con anioni CO₃²⁻ nelle regioni interstrato [88]

I composti sintetici di tipo idrotalcite presentano la seguente formula generale [65-67]:



La formula racchiusa tra le parentesi quadre indica la composizione delle lamelle, mentre la restante parte quella della regione interstrato. M(II) e M (III) sono cationi metallici, A è un anione interlamellare, X è la frazione molare. Nei composti naturali il valore della frazione molare, X, è

generalmente 0.25 e l'anione più comune è il carbonato. In quelli di sintesi X è generalmente compresa tra 0.25 e 0.33.

Per valori di X minori di 0.33 gli ottaedri dell'alluminio sono sufficientemente lontani. Per valori di X molto più alti aumenta il numero di ottaedri di $\text{Al}(\text{OH})_6$ e la struttura tende a segregare la specie $\text{Al}(\text{OH})_3$; similmente, per valori di X minori di 0.2 l'alta densità del magnesio porta alla formazione del $\text{Mg}(\text{OH})_2$ [68].

La formula generale evidenzia la straordinaria flessibilità composizionale di questi materiali, nei quali è possibile variare sia la natura dei cationi metallici M(II) e M(III) costituenti gli strati, sia la loro quantità relativa, cioè la frazione molare X dei cationi, sia la natura degli anioni intercalati, sia la quantità di acqua di idratazione, modulando così struttura, stabilità, distanza basale, grandezza e morfologia dei cristalli e proprietà funzionali [61-64].

Lo spazio interlamellare delle idrotalciti non rappresenta quindi un semplice volume vuoto, ma una vera e propria nanocamera chimica nella quale specie ioniche e molecolari possono essere ospitate, organizzate e scambiate in modo reversibile.

2.2 Elementi caratterizzanti le idrotalciti

I cationi metallici tipici che danno struttura brucitica, e quindi per mezzo dei quali è possibile sintetizzare idrotalciti in laboratorio, sono quelli che danno coordinazione ottaedrica, e questa capacità dipende fondamentalmente dal loro raggio ionico. Tali cationi metallici sono per lo più i metalli bivalenti Mg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} e i metalli trivalenti come Al^{3+} , Ga^{3+} , Ni^{3+} , Co^{3+} , Fe^{3+} , Mn^{3+} , Cr^{3+} , come mostrato in Tabella 1.

Tabella 1. Raggio ionico di alcuni cationi bivalenti e trivalenti espresso in Å

M(II)	Be	Mg	Cu	Ni	Co	Zn	Fe	Mn	Cd	Ca
	0.30	0.65	0.69	0.72	0.74	0.74	0.76	0.80	0.97	0.98
M(III)	Al	Ga	Ni	Co	Fe	Mn	Cr	V	Ti	In
	0.50	0.62	0.62	0.63	0.64	0.66	0.69	0.74	0.76	0.81

2.3 La natura dell'anione e acqua di idratazione

Nelle idrotalciti sintetiche la carica positiva delle lamelle è bilanciata generalmente dalle seguenti specie:

- 1) anioni inorganici: F^- , Cl^- , Br^- , I^- , $(\text{ClO}_4)^-$, $(\text{NO}_3)^-$, $(\text{ClO}_3)^-$, $(\text{IO}_3)^-$, $(\text{OH})^-$, $(\text{CO}_3)^{2-}$, $(\text{SO}_4)^{2-}$, $(\text{S}_2\text{O}_3)^{2-}$, $(\text{WO}_4)^{2-}$, $(\text{CrO}_4)^{2-}$, $[\text{SiO}(\text{OH})_3]^-$;
- 2) isopolianioni ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$, $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$, ecc.) ed eteropolianioni ($\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$, $\text{PW}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ ecc.);
- 3) complessi anionici ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, ecc.) e complessi organometallici,
- 4) anioni di acidi organici con funzionalità carbossilica, solfonica, fosforica, ecc.

Il numero, la grandezza, l'orientazione e la forza dei legami tra l'anione e il gruppo idrossido determinano la distanza interstrato. Le molecole di acqua sono localizzate in quei siti non occupati dagli anioni e la quantità di acqua presente viene usualmente determinata attraverso misure termogravimetriche di perdita in peso [61-64].

2.4 Metodi di sintesi

Esistono vari metodi di sintesi delle idrotalciti, di seguito illustrati [69-71].

- 1) *Coprecipitazione* di due metalli tramite il raggiungimento di condizioni di supersaturazione; o tramite evaporazione (metodo fisico) o più comunemente tramite variazione del pH (metodo

chimico). In questo secondo caso, il pH di precipitazione deve essere maggiore o uguale di quello al quale precipita l'idrossido più solubile.

- 2) *Sintesi idrotermale e invecchiamento*. Consiste nel trattare miscele di idrossidi precipitati o miscele meccaniche di ossidi con acqua (possibilmente in presenza di altri anioni) in modo da ottenere la formazione delle argille anioniche e la trasformazione dei precipitati amorfi in cristallini. Sono usate due condizioni di trattamento idrotermale: a $T < 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, per il quale si parla di invecchiamento; e a $T > 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ sotto pressione in autoclave. I tempi di reazione sono molto lunghi.
- 3) *Soft Chemistry*. Con questo nome vengono indicate tutte quelle sintesi inorganiche condotte in condizioni blande cioè utilizzando una bassa temperatura e semplici reazioni, per esempio metodi elettrochimici.
- 4) *Metodo dell'urea*. Consiste nella precipitazione di solidi lamellari da una soluzione omogenea di sali dei metalli M(II) e M(III), sfruttando come agente precipitante l'urea, una base debole molto solubile in acqua, la cui velocità di idrolisi può essere facilmente controllata regolando la temperatura di reazione. Il meccanismo di idrolisi si sviluppa passando attraverso un primo stadio lento che porta alla formazione di cianato di ammonio: $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \rightarrow \text{NH}_4\text{CNO}$, seguito dalla veloce idrolisi dell'ammonio cianato a carbonato di ammonio $\text{NH}_4\text{CNO} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Gli equilibri acido-base dello ione ammonio ad ammoniaca e dello ione carbonato a idrogeno carbonato producono un pH di circa 9 nella soluzione, condizione adatta per la precipitazione di un gran numero di idrossidi di metalli. Regolando le condizioni di sintesi (temperatura, concentrazione dei sali, tempo, rapporto molare urea/M(III)) è possibile ottenere idrotalciti di diversa cristallinità, dimensione e morfologia.

Sulla base delle considerazioni strutturali si può affermare che il metodo dell'urea sia quello migliore per preparare le idrotalciti, in quanto porta alla formazione di solidi con un buon grado di cristallinità, particelle di dimensioni dell'ordine del micron e con una stretta distribuzione delle dimensioni e un elevato rapporto superficie-volume.

2.5 Effetto memoria

Un aspetto particolarmente interessante dal punto di vista applicativo è il cosiddetto “memory effect”, per cui, dopo decomposizione termica via calcinazione con formazione di ossidi misti, l'idrotalcite è in grado di ricostruire spontaneamente la struttura lamellare originaria in presenza di acqua e anioni appropriati [61-64].

Dopo la decomposizione termica viene mantenuta infatti la microstruttura lamellare del solido, permettendo la ricostituzione della struttura idrotalcitica. In soluzione acquosa e sotto forte agitazione, si ha un notevole rigonfiamento dei microcristalli. L'aggiunta di un acido provoca la ricomposizione delle lamelle a seguito della reazione di neutralizzazione tra gli acidi e gli ossidrilici dell'idrotalcite [71].

Questo metodo è utilizzato per intercalare anioni senza passare per lo scambio ionico. Questa proprietà è fortemente dipendente dalla temperatura di calcinazione del LDH [70].

2.6 Caratteristiche macroscopiche

Dal punto di vista morfologico, le idrotalciti si presentano tipicamente sotto forma di piastrine sottili con spessore nanometrico e dimensioni laterali che possono variare da poche decine a diverse centinaia di nanometri, in funzione delle condizioni di sintesi e di trattamento (vedi Figura 20). Il

grado di cristallinità, la dimensione delle particelle e la presenza di difetti strutturali influenzano in modo significativo sia la stabilità del materiale sia il suo comportamento in dispersione e in sistemi compositi. In particolare, la riduzione delle dimensioni delle particelle e l'aumento dell'area superficiale specifica favoriscono le interazioni con matrici polimeriche e con l'ambiente biologico, ma possono anche aumentare la reattività e la velocità di dissoluzione parziale del materiale [61-64].

2.7 Applicazioni delle idrotalciti

Come si evince dalla loro descrizione, è possibile ottenere un gran numero di idrotalciti sintetiche che variano per la natura dei cationi costituenti, per cristallinità, per dimensioni e per area superficiale. Inoltre, le idrotalciti possono essere variamente funzionalizzate cambiando la natura dell'anione interstrato e in questo modo è possibile introdurre nuove proprietà senza sacrificare le loro speciali caratteristiche. L'elevata variabilità dei parametri che controllano il tipo di solidi ottenibili rende possibile creare quindi sistemi su misura per diverse applicazioni, delle quali le principali sono di seguito descritte.

Le idrotalciti possono essere utilizzate come precursori e supporti di catalizzatori, scambiatori anionici, assorbenti, additivi, antiacidi, stabilizzatori chimici, dispositivi magnetici, filler di compositi polimerici, ma anche e soprattutto per l'incorporazione e il rilascio di specie biologicamente attive, nei campi ambientale, nutraceutico, farmaceutico e biomedicale [72].

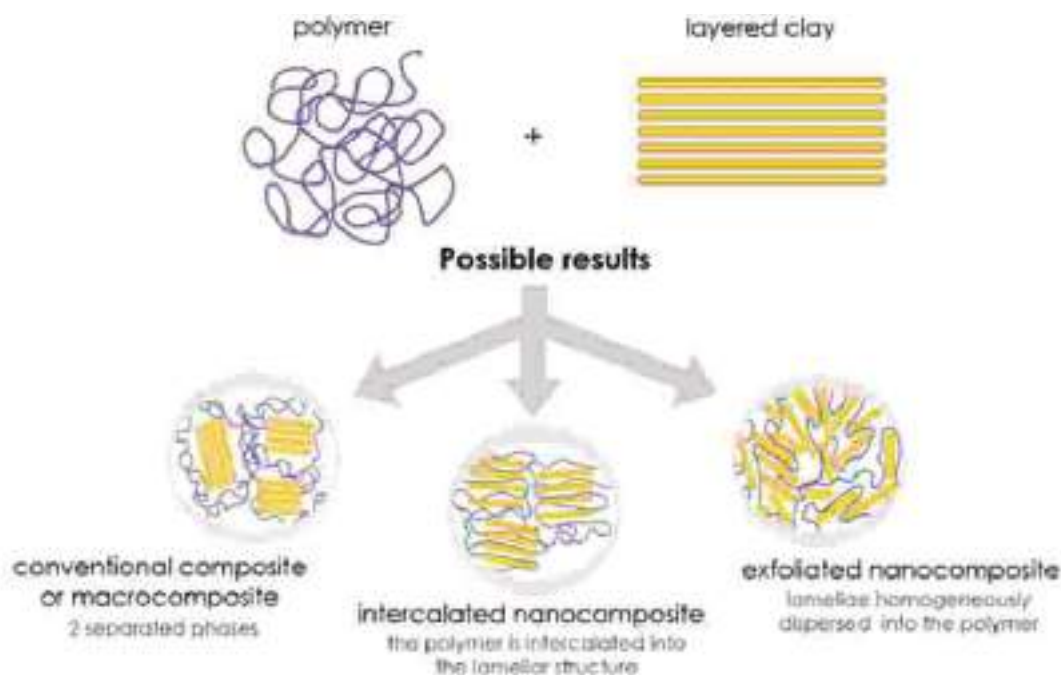


Figura 20. Illustrazione della morfologia di una dispersione di idrotalcite in una matrice polimerica

Le idrotalciti sono incorporabili in matrici polimeriche con formazione di *nanocompositi* (vedi Figura 20) grazie alla loro capacità di essere funzionalizzate nella regione interstrato con gruppi anionici organici, che ne aumentano la compatibilità con i polimeri, producendo un'ottimale dispersione del filler inorganico idrotalcitico nella matrice polimerica. La dispersione a livello nanometrico di un basso carico di tali particelle inorganiche in polimeri organici in molti casi produce nuovi materiali compositi con proprietà meccaniche, di barriera a gas e liquidi, ritardo alla fiamma, stabilità chimica, migliori rispetto al polimero tal quale. Inoltre, se prodotte con particolari metalli e disperse in opportune matrici polimeriche, le idrotalciti possono anche indurre nuove proprietà ottiche, catalitiche, elettriche o magnetiche, risultando così essere dei veri e propri filler attivi [73-75].

Se calcinate, gli ossidi ottenuti assumono proprietà interessanti quali elevata area superficiale, basicità, formazione di una miscela omogenea di ossidi con dimensioni molto piccole dei cristalli, che per riduzione formano piccoli cluster metallici stabili termicamente e finemente dispersi, che li rendono degli ottimi attori nel campo della catalisi eterogenea [76].

L'introduzione di specie contenenti particolari gruppi funzionali, quali coloranti azoici, permettono invece l'utilizzo delle idrotalciti anche come coloranti e pigmenti nei settori tessile, alimentare, delle vernici e inchiostri [77].

L'inserimento di particolari metalli nella struttura conferisce alle argille anioniche proprietà magnetiche, aprendo le porte per questi materiali ad un utilizzo per la produzione di carte di credito, tessere, nastri e dispositivi magnetici [78].

2.7.1 Le idrotalciti come piattaforme per il drug delivery nanostrutturato

Grazie alla loro struttura lamellare e alla presenza di uno spazio interlamellare accessibile e chimicamente attivo, i Layered Double Hydroxides (LDH) si sono affermati come piattaforme estremamente promettenti per il drug delivery, in particolare per molecole anioniche, tipo principi attivi farmaceutici (API) con carica negativa e biomolecole come acidi nucleici. A differenza di molti altri sistemi di trasporto, gli LDH consentono un vero e proprio confinamento strutturale del principio attivo all'interno di una matrice inorganica ordinata, con importanti implicazioni in termini di stabilità e controllo del rilascio [64,72].

Il caricamento del principio attivo può avvenire mediante diversi approcci, tra cui intercalazione diretta durante la sintesi, scambio anionico post-sintesi o sfruttando il già citato memory effect dopo calcinazione [69-71]. La scelta del metodo influenza in modo significativo la quantità di farmaco incorporato, la sua distribuzione nello spazio interlamellare e la stabilità del complesso ottenuto.

L'inserimento nella regione interstrato di specie biologicamente attive presenta diversi vantaggi [72]:

- Il confinamento del farmaco nello spazio interlamellare può garantire **protezione della specie attiva** dall'ossidazione, dalla fotolisi, da degradazione chimica o enzimatica, schermando il farmaco dall'ambiente esterno fino al momento del suo rilascio e migliorandone quindi la stabilità durante lo stoccaggio e dopo la somministrazione. Questo aspetto è particolarmente rilevante per molecole sensibili come alcuni antibiotici, antinfiammatori o acidi nucleici.
- Il farmaco viene immagazzinato nello spazio interlamellare e rilasciato solo al momento desiderato e nel sito target, garantendo un **rilascio controllato** dello stesso (un'illustrazione esplicativa in Figura 21). Questo è possibile poiché il rilascio del principio attivo da sistemi a base di LDH è governato principalmente da due meccanismi: lo scambio ionico con gli anioni presenti nei fluidi biologici e la parziale dissoluzione delle idrotalciti in ambiente acido. In condizioni fisiologiche neutre, lo scambio ionico rappresenta spesso il meccanismo dominante, mentre in ambiente leggermente acido, come quello gastrico, endosomiale o dei tessuti infiammati, la dissoluzione della matrice solida lamellare può accelerare in modo significativo il rilascio del principio attivo. Questa duplice modalità di rilascio conferisce ai sistemi LDH una certa sensibilità al pH, che può essere sfruttata per ottenere profili di rilascio selettivi o accelerati in specifici microambienti biologici.
- Nel caso di principi attivi poco biodisponibili, poiché parte del farmaco è presente in soluzione e parte è immagazzinata nei solidi lamellari e gradualmente rilasciata a livello locale secondo le

condizioni di equilibrio, si ha un aumento della solubilità apparente della specie attiva e di conseguenza **un aumento della biodisponibilità del farmaco**.

- L'incorporazione di un principio attivo in un'idrotalcite ne **modifica la cinetica di rilascio**, permettendo di modularla a piacimento in un senso o nell'altro (velocizzandola o rallentandola), agendo su diversi parametri del sistema quali composizione dell'idrotalcite, morfologia e dimensione delle particelle, grado di cristallinità e presenza di una matrice polimerica circostante.

La regione interstrato delle idrotalciti può quindi essere considerata come un micro-container dove le specie ospiti vengono immagazzinate, protette e rilasciate al momento giusto e con la cinetica desiderata. Per questo le idrotalciti sono di grande interesse in vari settori dell'area biomedica.

Le dimensioni tipiche delle particelle di LDH destinate ad applicazioni biomedicali si collocano generalmente nell'intervallo nanometrico o sub-micrometrico, consentendo l'interazione con le cellule e, in alcuni casi, l'internalizzazione per endocitosi. Una volta internalizzati, i sistemi LDH possono rilasciare il carico in ambiente endosomiale o lisosomiale, sfruttando l'acidificazione di questi compartimenti cellulari per attivare la dissoluzione parziale degli strati [79].

Diversi studi hanno mostrato che gli LDH presentano una biocompatibilità complessivamente buona, con profili di citotossicità dipendenti da composizione, dimensione delle particelle e dose [80].

Le idrotalciti trovano perciò grande campo di utilizzo in applicazioni farmaceutiche [81-84], cosmetiche [85-90], nutraceutiche [91,92] e dei dispositivi biomedicali [93-96], come dimostrato dalla vastissima letteratura a riguardo. Nel contesto della presente tesi, le idrotalciti vengono utilizzate quindi come **modulo nanostrutturato funzionale** per il drug delivery, integrato in un sistema composito più ampio, formato dal polimero e dalla membrana biologica.

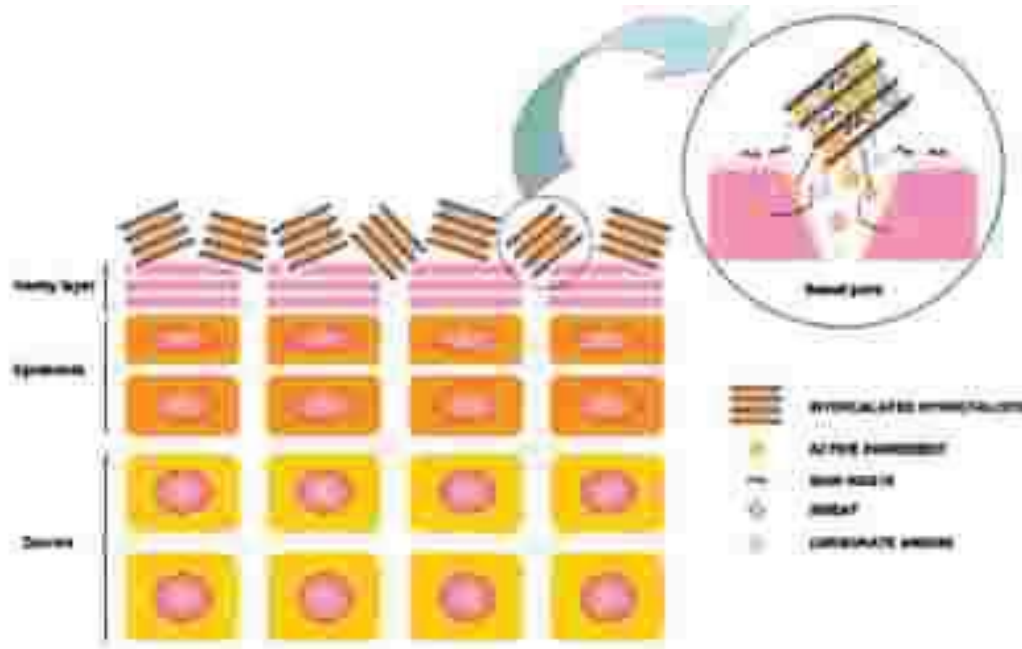


Figura 21. Meccanismo di rilascio controllato di specie attive intercalate in un LDH [89]

3. Fosfati di zirconio di tipo α

I fosfati di zirconio sono materiali lamellari che, a differenza degli LDH, ospitano delle specie cationiche nei loro spazi interstrato. Essendo dotati di interessanti proprietà di caricamento di specie

attive, ma essendo orientati verso specie diverse da quelle di destinazione degli LDH, sono anche questi dei materiali di estremo interesse in vari campi, tra cui il biomedicale.

3.1 Struttura dei fosfati di zirconio di tipo α

I fosfati di zirconio di tipo α (per distinguerli da quelli di tipo γ , aventi diversa struttura cristallina, formula e distanza interstrato) sono caratterizzati dalla formula generale $\text{Zr(IV)}\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_8\text{Ns}$ (dove S rappresenta le molecole intercalate nella regione interlamellare). Sono costituiti da pacchetti di lamelle, ognuna formata da atomi di Zirconio, metallo tetravalente, ognuno coordinante 6 gruppi idrogeno fosfato a formare degli ottaedri. La struttura della lamella è quindi costituita da una disposizione planare di atomi di Zr(IV) con simmetria pseudoesagonale al centro dello strato e da gruppi tetraedrici O_3POH posti alternativamente sopra e sotto il piano, che coordinano ciascuno tre diversi atomi metallici (Figura 22).

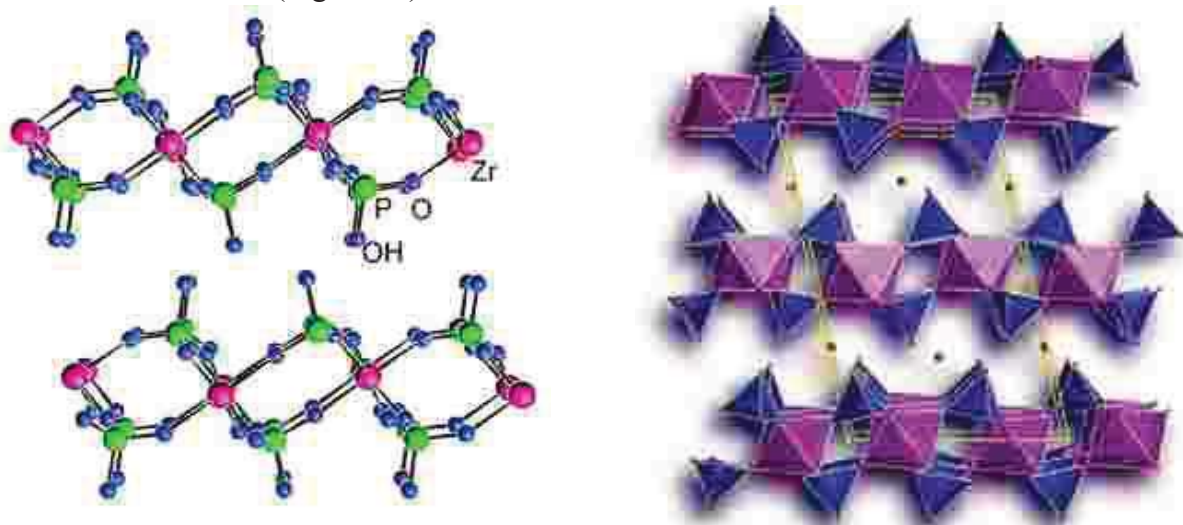


Figura 22. Rappresentazione a) schematica e b) tridimensionale della struttura di $\alpha\text{-Zr(HPO}_4)_2$ [89]

La struttura lamellare è dovuta all'impilamento dei macroanioni planari $[\text{Zr(PO}_4)_2]_2^-$ in cui le cariche negative su un ossigeno di ogni gruppo fosfato sono bilanciate da protoni. L'impacchettamento delle lamelle crea delle cavità di tipo zeolitico, in rapporto 1:1 con gli atomi di Zr, delimitate dagli atomi di ossigeno dei gruppi idrogenofosfato, ognuna delle quali è occupata da una molecola di acqua.

Non sono presenti legami a idrogeno fra lamelle adiacenti, che sono tenute insieme soltanto da forze di Van der Waals. I legami a idrogeno tra l'acqua di cristallizzazione e i gruppi OH degli strati si sviluppano solo all'interno della stessa lamella. Viste quindi le deboli forze tra strati adiacenti si deduce la facilità con cui i protoni negli spazi interstrato possono essere sostituiti da altri cationi in una reazione di scambio ionico [97-99].

3.2 Metodi di sintesi

La sintesi del fosfato acido di zirconio cristallino può essere portata avanti tramite due metodi.

Il primo consiste nella precipitazione veloce del prodotto amorfo e quindi nella digestione del precipitato a caldo per lungo tempo, in presenza di un eccesso di H_3PO_4 , fino ad ottenere la cristallizzazione. Il grado di cristallinità è funzione del tempo di digestione del precipitato e della concentrazione dell'acido [100].

Il secondo metodo prevede la formazione di complessi fluoridrici dello zirconio (ZrF_6^-) di elevata solubilità, l'aggiunta dell'acido fosforico e la graduale de-complessazione dello zirconio per evaporazione dell'acido fluoridrico. Lo zirconio così liberato può combinarsi con il fosfato presente in soluzione, per formare il fosfato acido di zirconio lamellare. La velocità di formazione del

precipitato può essere semplicemente controllata dalla velocità di allontanamento di HF, ed il grado di cristallinità è tanto più elevato quanto più lenta è la decomplessazione [101].

3.3 Caratteristiche macroscopiche

Il fosfato di zirconio è molto insolubile, è pertanto difficile ottenerlo in cristalli di grandi dimensioni. È tuttavia possibile ottenere polveri con un buon grado di cristallinità utilizzando un agente complessante, allo scopo di avere sempre in soluzione una bassa concentrazione di metallo libero (Figura 25).

3.4 Scambio ionico e applicazioni dei fosfati di zirconio

Nei fosfati di zirconio acidi la presenza di protoni in grado di diffondere attraverso il reticolo conferisce a tali materiali proprietà di scambio ionico [102] e di trasporto protonico [103].

Per i fosfati di zirconio non si parla in senso stretto, come per i LDH, di processi di scambio ionico, quanto di formazione di *composti di intercalazione*. Dato che nella regione interstrato sono presenti gruppi acidi, la driving force del processo di intercalazione è la protonazione della molecola guest o la formazione di legami ad idrogeno fra la molecola guest ed il gruppo acido del reticolo della molecola host. Composti di intercalazione sono tipicamente ottenuti con molecole facilmente protonabili quali alcoli ed ammine [104].

Questo rende i fosfati di zirconio degli ottimi precursori per la preparazione di composti di intercalazione anche con specie di interesse farmaceutico quali amminoacidi, ciclodestrine, imidazolo, benzilimidazolo [105-107], rendendo questi solidi lamellari dei veicoli per principi attivi farmaceutici nel campo biomedicale.

4. I solidi lamellari come piattaforme chimiche funzionali

Nel contesto della presente tesi, i solidi lamellari, rappresentati dalle categorie di LDH e fosfati di zirconio di tipo α , vengono utilizzati come modulo nanostrutturato funzionale per il drug delivery, integrato in un sistema composito più ampio, formato dal polimero chitosano e dalla membrana biologica. Questa configurazione consente di combinare la funzione di serbatoio nanostrutturato con la funzione di interfaccia e di adesione fornita dal chitosano, ottenendo un sistema nel quale il rilascio del farmaco è confinato spazialmente al sito di interesse e temporalmente modulabile. In particolare, l'integrazione degli LDH in matrici polimeriche, come quelle a base di chitosano, consente di introdurre un ulteriore livello di controllo, nel quale il rilascio non è governato solo dalle proprietà intrinseche del solido lamellare, ma anche dalla diffusione attraverso la matrice e dal suo eventuale rigonfiamento o degradazione.

I Layered Double Hydroxides rappresentano quindi in questo contesto una piattaforma inorganica altamente versatile per l'ingegnerizzazione di biomateriali multifunzionali. La loro integrazione con il chitosano e con membrane biologiche apre la strada a sistemi di rivestimento avanzati, superfici intelligenti e biomateriali a funzionalità multipla.

Sistemi compositi a base di membrane biologiche, solidi lamellari e chitosano

L'accoppiamento tra chitosano, LDH e membrane biologiche porta alla costituzione di un materiale composito gerarchico e multifunzionale, in cui ogni componente svolge un ruolo specifico e complementare [8,32-34,51]. Questa organizzazione riflette un approccio di progettazione modulare, nel quale ciascun livello è ottimizzato per una specifica funzione, pur mantenendo una forte integrazione fisica e funzionale con gli altri [34,51]. I livelli principali che costituiscono tali sistemi compositi sono perciò i seguenti:

- a) membrana biologica (in pericardio bovino), che rappresenta il substrato biologico e fornisce il *modulo strutturale* del composito, biocompatibile e ben integrabile nei tessuti in vivo;
- b) coating a base di chitosano, che rappresenta lo strato intermedio polimerico e funge da *modulo di interfaccia*, strato adesivo e anche da matrice funzionale, essendo dotato di attività antibatterica e antibiofilm intrinseca che lo rendono una prima linea di difesa verso le infezioni;
- c) solidi lamellari, che rappresentando la fase inorganica e il *modulo funzionale*, avendo capacità di carico e di rilascio controllato di specie attive antimicrobiche e antibiofilm e rappresentando così la seconda linea di difesa.

1. Integrazione strutturale e ruolo dell'interfaccia

Uno degli aspetti più delicati nella realizzazione di sistemi compositi multistrato è la progettazione dell'interfaccia tra materiali con proprietà meccaniche e chimiche molto diverse. Nel caso in esame, è necessario garantire una adesione stabile tra un substrato biologico viscoelastico e uno strato polimerico idratante, evitando la formazione di discontinuità meccaniche che potrebbero portare a delaminazione o danneggiamento del tessuto [32,34-36]. L'impiego del chitosano come strato di interfaccia consente di realizzare una transizione graduale tra il tessuto naturale e il modulo funzionale, grazie alla sua capacità di adattarsi alla topografia del substrato, di formare legami multipli con la superficie biologica e di mantenere un comportamento meccanico compatibile in ambiente idratato [16,19,32,34].

Dal punto di vista ingegneristico, il sistema deve mantenere un equilibrio tra flessibilità e stabilità. Lo strato di coating non deve irrigidire in modo eccessivo il substrato biologico, ma allo stesso tempo deve possedere una coesione interna sufficiente a resistere a rigonfiamento, sollecitazioni meccaniche e stress chimici in ambiente fisiologico [32,34-36]. La scelta delle condizioni di reticolazione del chitosano e del contenuto di fase inorganica consente di modulare in modo fine queste proprietà, dimostrando ancora una volta come la progettazione del materiale debba essere guidata da una visione sistemica e non dalla semplice ottimizzazione di un singolo componente [16,19,32,51].

2. Integrazione del modulo LDH nel coating polimerico

L'inclusione degli LDH all'interno del coating polimerico non rappresenta una semplice aggiunta di carica inerte, ma un elemento centrale della progettazione funzionale del sistema [8,32,33]. È necessario controllare con precisione:

- la quantità di fase inorganica incorporata,

- la sua dispersione nella matrice di chitosano,
- l'accessibilità del mezzo fisiologico alle particelle,
- e la stabilità complessiva del composito in ambiente acquoso.

Una dispersione omogenea e una buona interazione tra fase polimerica e fase inorganica sono condizioni essenziali per garantire sia la riproducibilità delle proprietà meccaniche sia un comportamento di rilascio controllato e prevedibile [32,33,51].

Il modulo LDH rappresenta il cuore funzionale del sistema composito, determinato dalla capacità di fornire un rilascio terapeutico locale controllato. In questa architettura, il farmaco è confinato nel modulo LDH e il suo rilascio è ulteriormente modulato dalla presenza della matrice polimerica sovrastante [8,32,33]. Questo doppio livello di controllo — nanostrutturale e macroscopico — consente di ottenere profili di rilascio più stabili, prolungati e adattabili alle esigenze cliniche rispetto a sistemi più semplici [8,33]. Inoltre, la localizzazione del rilascio al sito di impianto consente di massimizzare l'efficacia terapeutica riducendo al minimo l'esposizione sistemica [33].

3. Moderne tendenze della ricerca sui dispositivi biomedicali

I compositi di questo tipo si inseriscono pienamente nelle moderne tendenze della ricerca sui biomateriali, che vanno oltre la creazione di semplici strutture passive di sostegno, ma mirano a sviluppare materiali attivi e multifunzionali, capaci non solo di sostituire o supportare un tessuto, ma anche di interagire attivamente con l'ambiente biologico, modulare le risposte cellulari supportando la rigenerazione tissutale e prevenire complicanze come le infezioni.

Nel sistema proposto, il chitosano non è semplicemente un rivestimento, né solo un agente antibatterico, né solo un adesivo, ma rappresenta l'elemento strutturale e funzionale chiave che connette il mondo biologico con quello inorganico.

All'interno della matrice di chitosano, i solidi lamellari (LDH) non sono concepiti come semplici cariche inerti, ma come moduli funzionali attivi.

In questo modo, il sistema diventa una *piattaforma multifunzionale ingegnerizzata*. Rispetto a semplici membrane biologiche non funzionalizzate o rivestimenti polimerici passivi, il sistema composito proposto offre:

- maggiore resistenza alla colonizzazione microbica e riduzione del rischio di infezione e biofilm,
- possibilità di integrare funzioni terapeutiche aggiuntive,
- mantenimento della biocompatibilità del substrato naturale,
- approccio modulare e adattabile a diverse applicazioni cliniche.

4. Scalabilità e trasferibilità tecnologica

Un ulteriore aspetto di grande importanza è la potenziale scalabilità del sistema. Le tecniche di fabbricazione basate su coating, immersione e reticolazione sono intrinsecamente semplici e compatibili con processi industriali, rendendo il concetto di materiale sviluppato non solo scientificamente interessante, ma anche potenzialmente trasferibile verso applicazioni reali [8,34,51]. Questo elemento è fondamentale per collocare il lavoro non solo nel contesto della ricerca di laboratorio, ma anche in una prospettiva di sviluppo tecnologico e applicazione clinica.

Dal punto di vista bio-ingegneristico, il sistema sviluppato in questa tesi si basa su alcuni principi chiave: la progettazione per strati funzionali (layer-by-layer); la separazione dei ruoli (struttura - membrana biologica, interfaccia - chitosano, funzione avanzata – LDH); la possibilità di modulare ciascun livello in modo relativamente indipendente per ottimizzare le proprietà globali del sistema. Questo approccio rende il sistema scalabile, flessibile e adattabile a diversi tipi di tessuti, applicazioni e requisiti clinici.

5. Obiettivo della presente tesi

Alla luce di questo, nella presente tesi verranno esposti due dispositivi biomedici compositi, seguendo questo iter:

1. Sviluppo e caratterizzazione di un rivestimento a base di chitosano su membrane biologiche di origine bovina,
2. Stabilizzazione di tale rivestimento mediante opportune strategie di crosslinking,
3. Integrazione dei solidi lamellari (LDH) nella matrice di chitosano,
4. Valutazione delle proprietà fisico-chimiche e meccaniche del sistema, della sua stabilità in ambiente acquoso/fisiologico, e delle sue prestazioni antibatteriche e antibiofilm.
5. Analisi del potenziale del sistema come piattaforma multifunzionale per applicazioni biomediche.

In conclusione, il lavoro presentato in questa tesi si prefigge come obiettivo quello di sviluppare un prototipo di sistema bio-ibrido multifunzionale, capace di combinare integrazione biologica, protezione antibatterica e funzionalità avanzate in un'unica piattaforma.

Applicazione: membrane in pericardio bovino funzionalizzate con chitosano e solidi lamellari per chirurgia mammaria

1. Introduzione

Il progetto della presente tesi di Dottorato industriale ha consistito nella ricerca e sviluppo di un prototipo di dispositivo medico basato su una membrana biologica decellularizzata in pericardio bovino, opportunamente ingegnerizzata tramite chitosano e solidi lamellari, per l'utilizzo come supporto delle protesi mammarie negli interventi di chirurgia ricostruttiva del seno. Lo sviluppo di tale prototipo è stato portato avanti nell'ambito del progetto BIOLOAD (Anti-Biofilm Biological Prostheses in 3D Conformation), in collaborazione tra Prolabin & Tefarm srl e Assut Europe spa, una delle più importanti aziende a livello europeo per la produzione e commercializzazione di dispositivi medici di alta qualità per le diverse specializzazioni chirurgiche.

1.1 Ambito di intervento del progetto

Il cancro al seno è la neoplasia più diffusa tra le donne, e si manifesta con la frequenza di 2,3 milioni di nuovi casi ogni anno del mondo, di cui 50-60 mila solo in Italia, secondo l'aggiornamento biennale dell'*American Cancer Society* [108], i cui dati provengono dal *National Cancer Institute* e dai *Centers for Disease Control and Prevention*. Si stima che una donna su 8 si ammali di questa patologia nel corso della vita, e la sopravvivenza netta a 5 anni dalla diagnosi è stimata dal report dell'88% [109]. Il carcinoma mammario ha un tasso di crescita dello 0,5% (registrato nel 2022), minore rispetto a quello della decade precedente (2012-2021). In contrasto con l'aumento dell'incidenza, il tasso complessivo di mortalità per carcinoma mammario ha mostrato una riduzione continua nel periodo 1989–2022, con un decremento complessivo del 44%, corrispondente a circa 517.900 decessi evitati [108].

Oltre ai progressi nella riduzione dell'impatto del carcinoma mammario tramite opportuni programmi di screening, negli ultimi decenni sono stati compiuti molti passi in avanti nel trattamento della malattia, che comprendono la riduzione del numero di interventi, l'uso di *medical devices* (MDs) più performanti tra cui protesi e miglioramento delle modalità ricostruttive [110].

In particolare, la chirurgia del tumore della mammella ha compiuto negli anni progressi notevolissimi, passando dai primi interventi di tipo demolitivo (mastectomia) ai recenti interventi detti "conservativi" poiché prevedono una mastectomia seguita dalla ricostruzione chirurgica con il posizionamento di espansore prima e successivamente della protesi [111]. La tecnica classica prevede che dopo la mastectomia, alla paziente sia inserito un espansore per rendere ampia e stabile la tasca dove troverà alloggio la protesi futura. Tale tasca è localizzata al di sotto della cute della mammella ed è formata dal muscolo pettorale, dalla fascia del muscolo obliquo esterno e da una parte del piccolo pettorale. La protesi vera e propria viene inserita in un secondo intervento, a distanza di un tempo variabile dai 3 ai 6 mesi a seconda che siano necessari o meno cicli di radio e/o di chemioterapia.

È stata messa a punto recentemente una nuova tecnica che, grazie a membrane biologiche di origine animale (in pericardio bovino - MPB o derma porcino - MDP), consente invece la mastectomia e la ricostruzione della mammella nello stesso intervento [112,113]. La *membrana biologica*

decellularizzata (MBD) permette di creare infatti, agganciandola al muscolo pettorale, una tasca temporanea idonea alla protesi nello stesso intervento in cui avviene l'asportazione del tumore. Dopo la sua applicazione, l'organismo reagisce all'introduzione di collagene iniziando il processo di riparazione dei tessuti danneggiati, liberando un gran numero di citochine, fattore di crescita e sostituendo gradualmente il materiale impiantato con i tessuti sani. La membrana viene quindi riassorbita lasciando spazio alla creazione di nuovi tessuti da parte dell'organismo, mentre la protesi vera e propria chiaramente rimane permanentemente. Questa soluzione consente alla paziente, dopo quindici giorni dall'intervento, di tornare alla vita precedente alla diagnosi del tumore, con una buona resa estetica, senza cicatrici evidenti. Questo approccio porta ad un vantaggio enorme per la paziente dal punto di vista psico-fisico in quanto essa viene sottoposta ad una sola seduta operatoria invece che ad una serie, e nello stesso tempo non sperimenta la privazione della sua integrità fisica ed estetica.

Tuttavia, ad oggi, questo tipo d'intervento presenta due importanti criticità:

- 1) A questo tipo d'intervento può essere sottoposta solo una piccola percentuale delle donne trattate, ovvero quelle che presentano caratteristiche dimensionali ed anatomiche idonee all'alloggiamento di tali membrane, non facilmente adattabili all'anatomia di tutte le pazienti. È opinione diffusa dei chirurghi disporre, in un prossimo futuro, di membrane in configurazione 3D idonea per un più agevole posizionamento in situ [114].
- 2) Inoltre, data l'elevata incidenza nel panorama dei dispositivi medici impiantabili delle infezioni post-operatorie (SSI – *surgical site infections*) da biofilm, con la conseguente necessità di re-intervento o di trattamenti antibiotici debilitanti [115], sarebbe auspicabile in questo settore, come sta cominciando ad avvenire nel settore ortopedico, disporre di membrane che possano essere caricate con farmaci prima dell'impianto e che rilascino gradualmente gli stessi nel post intervento, per ridurre l'incidenza di tali infezioni.

La tecnica chirurgica che fa utilizzo di MBD quindi ha ancora ampi spazi di miglioramento. Il lavoro di questa tesi si inserisce esattamente in questa tematica proponendo di sviluppare delle protesi innovative per l'applicazione in chirurgia mammaria per il trattamento del tumore al seno, basate su sistemi compositi costituiti da membrane biologiche decellularizzate opportunamente ingegnerizzate con un coating polimerico e con solidi lamellari in modo da superare le criticità associate a questo trattamento.

1.2 Scopo e obiettivi del progetto

Il lavoro di questa tesi si inserisce nell'ambito sovraesposto proponendo lo sviluppo di un sistema composito basato su una MBD in PB, funzionalizzata e ingegnerizzata in modo opportuno per conseguire due obiettivi principali:

- 1) dotare le protesi di una forma 3D anatomica (vedi Figura 23), che ne faciliti il posizionamento chirurgico in situ, al fine di mantenere la forma desiderata e di essere adattabile a quante più pazienti possibili;
- 2) rendere le protesi dotate di funzionalità anti-biofilm per ridurre il rischio di SSI e garantire il successo di quanti più interventi chirurgici possibili.

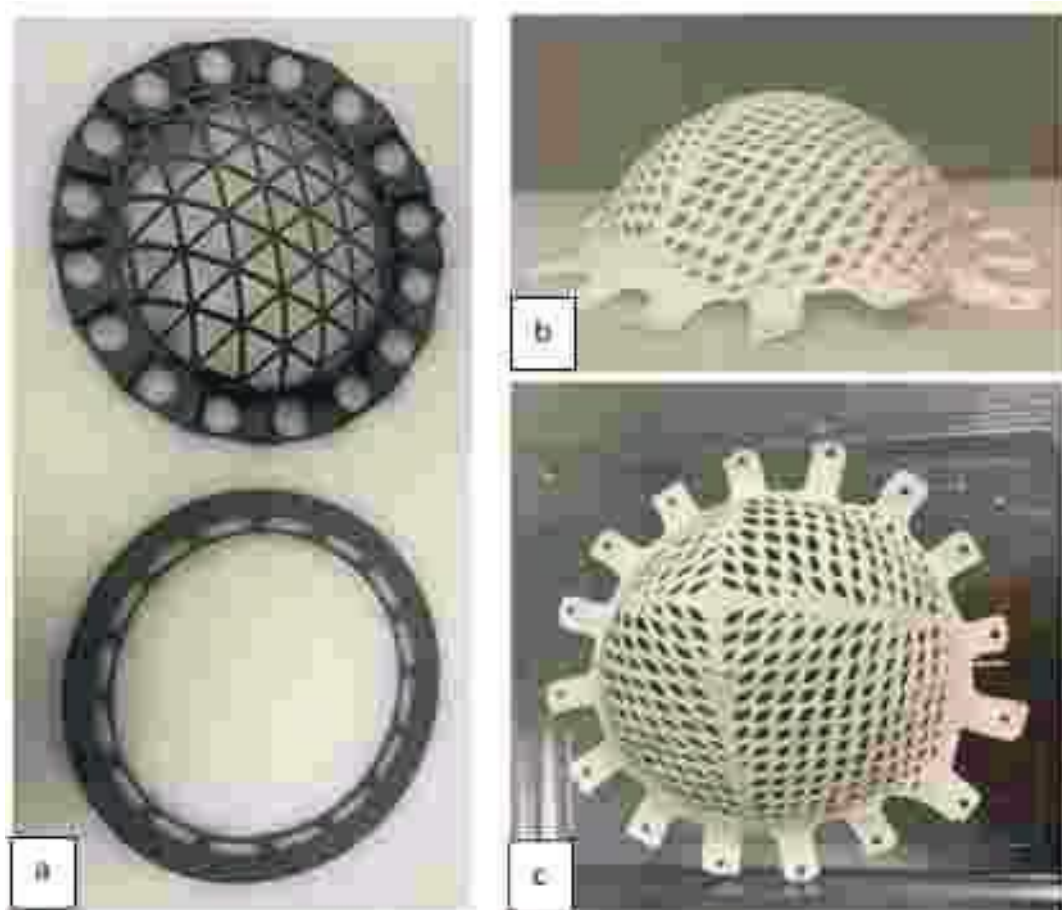


Figura 23. Immagini della a) dima utilizzata per il conferimento della forma anatomica 3D alla MPB, b e c) della MPB con forma 3D

Il primo obiettivo vuole essere raggiunto rivestendo la MBD con un coating a base di chitosano, materiale di note biocompatibilità, biodegradabilità, affinità per le superfici biologiche e capacità filmogena. Inoltre, la sua capacità di fungere da matrice per l'incorporazione di fasi funzionali lo rende il candidato ottimale anche per l'adesione di solidi lamellari alla MBD.

Il secondo obiettivo vuole essere conseguito funzionalizzando la MBD tramite solidi lamellari adesi in modo stabile, rendendo così la membrana un substrato proattivo al caricamento con principi attivi farmaceutici (API) antimicrobici e antibiofilm. L'utilizzo di solidi lamellari infatti permette al dispositivo di essere caricato in fase pre-operatoria con gli API d'interesse, che sono poi gradualmente rilasciati in fase di post-intervento, agendo in modo da evitare l'insorgenza di infezioni post-operatorie.

La ricerca di casi simili di DM impiantabili caricati direttamente con API in sala operatoria ha portato all'individuazione in commercio di un unico prodotto che si avvale di una tecnologia simile, ovvero di StimulanTM, utilizzato però in ambito ortopedico. È un prodotto dell'azienda britannica Biocomposites Ltd. e consiste in dei pellets di solfato di calcio di grado farmaceutico che possono essere miscelati con antibiotici nella fase pre-impianto. È riassorbibile e approvato per la rigenerazione ossea e contro i biofilm, se miscelato con vancomicina, gentamicina e tobramicina [116].

L'adesione dei solidi lamellari alla membrana è operata tramite l'utilizzo di biocolle, in primis del chitosano appunto, che viene perciò ad assumere un duplice ruolo: quello di coating per la funzionalizzazione 3D e quello di bioadesivo per i LDH. Il rilascio degli API è stimolato

dall'ambiente in cui il dispositivo si trova impiantato, è progettato per essere a lungo termine in modo da proteggere l'ospite dalle SSI per un ampio intervallo di tempo e può essere addirittura stimolato in caso di infezione, grazie all'aumento della temperatura locale e all'aumento di ioni nella ECM, con una risultante reazione responsiva contrastante l'infezione.

In ultima analisi, ma non per importanza, il chitosano, possedendo un'intrinseca e documentata attività antimicrobica (4,7,8-10,21,37-39,40) opera in modo sinergico con gli API caricati sui solidi lamellari, fornendo un ulteriore livello di difesa, per abbattere lo sviluppo di infezioni da biofilm sul dispositivo stesso.

Lo scopo ultimo di questo lavoro è quindi quello di mettere a punto un sistema innovativo e integrato di DM in supporto alla rigenerazione del tessuto muscolare mammario, che sia in grado di influire positivamente sull'impianto e sul processo di guarigione e che possa esercitare un'azione terapeutica personalizzata, attraverso il rilascio di antibiotici.

Il raggiungimento degli obiettivi di progetto, potrebbe aprire la strada allo sviluppo di nuovi dispositivi medici, anche per altre sedi corporee ed altre applicazioni chirurgiche, basati su sistemi compositi che combinano membrane biologiche, coating polimerici e solidi lamellari in un unico sistema multi-funzionale.

1.3 Potenziale innovativo del progetto

Nel presente lavoro di ricerca sperimentale si possono riscontrare direttrici di innovazione nei seguenti settori dell'area biomedicale:

1. Medicina di precisione e personalizzazione: la conformazione 3D delle MBD deve tenere conto dei requisiti unici del tessuto di destinazione, imitandone fedelmente l'architettura per avere integrazione in vivo e funzionalità ottimale.
2. Materiali intelligenti e reattivi: lo sviluppo di biomateriali intelligenti in grado di rispondere alle indicazioni ambientali o ai cambiamenti fisiologici è un'area di ricerca attiva. Questi materiali si adattano dinamicamente alle esigenze del tessuto ospite, rilasciando API o modulando le loro proprietà in risposta a segnali specifici. In questo lavoro di ricerca, il dispositivo che si vuole realizzare è caricato con antibiotici prima dell'impianto e la velocità di rilascio degli stessi sarà modulabile in base all'eventuale insorgenza di infezioni: in questo caso si hanno condizioni di temperatura e forza ionica che stimolano il rilascio degli API, rendendo così il dispositivo in grado di rispondere agli stimoli dell'ambiente circostante.
3. Miglioramento della biocompatibilità e dell'immuno-modulazione: la funzionalizzazione delle MBD volta a conferire una maggiore stabilità 3D della protesi ne migliora anche la biocompatibilità e quindi modula la risposta immunitaria del paziente, contribuendo al successo a lungo termine dell'impianto. Inoltre, un avanzamento successivo di questa ricerca potrebbe prevedere l'integrazione di API antinfiammatori a lento rilascio al sistema anti-biofilm.
4. Tecniche di vascolarizzazione: lo sviluppo di metodi efficaci per la vascolarizzazione all'interno delle protesi biologiche è essenziale per garantire la sopravvivenza e la funzionalità dei tessuti rigenerati. Approcci innovativi, come l'uso di fattori bioattivi per stimolare l'angiogenesi, possono avere un impatto significativo sul successo di questi impianti. Un progresso successivo di questo lavoro potrebbe prevedere l'integrazione di fattori di crescita e di angiogenesi al sistema anti-biofilm.

5. Nanomedicina rigenerativa: le nanotecnologie promettono di fornire terapie rigenerative su scala nanometrica. Le nanoparticelle possono essere progettate per trasportare fattori di crescita, geni o farmaci direttamente ai tessuti bersaglio, migliorando la precisione e l'efficienza dei processi rigenerativi.
6. Per la prima volta un sistema ingegnerizzato costituito da solidi lamellari quali idrotalciti e fosfati di zirconio pro-attivi sarà ancorato a una membrana, ottenendo un sistema caricabile con antibiotici in uno step pre-impianto.

Il potenziale di innovazione di questo progetto di ricerca quindi è molto elevato, per gli obiettivi che si propone di raggiungere, sia per i futuri sbocchi che le conoscenze generate potrebbero contribuire a creare negli ambiti sopracitati.

1.4 Stato dell'arte dei dispositivi biomedicali a base di pericardio bovino

Le protesi a base di MBD di origine animale utilizzate in chirurgia mammaria per il rinforzo, la riparazione e la rigenerazione dei tessuti molli sono varie e di seguito descritte. Veritas Collagen Matrix® (di Baxter/Synovis) [117], il pericardio bovino Tutopatch® [118] e il pericardio bovino fenestrato Tutomesh® [119] di Tutogen, il derma fetale e neonatale bovino Surgimend™ di Integra [120], Bioripar® da pericardio bovino e Bioripar Derma® da derma porcino di Assut europe spa [121].

Tutti questi dispositivi impiantabili a base di pericardio bovino (ma anche derma bovino o porcino) sono DM impiantabili di Classe III. Hanno caratteristiche di: biocompatibilità, modellabilità, flessibilità, resistenza alla trazione e alla pressione, sono facili da suturare, semplici da gestire in sala operatoria. Data la loro natura derivante da tessuti biologici, una volta impiantati hanno la capacità di conformarsi facilmente alle strutture anatomiche, offrendo supporto per la rivascolarizzazione e il rimodellamento tissutale. Sono ottenuti dai tessuti biologici tramite processi di sterilizzazione e decellularizzazione, e quindi non sono immunogenici. Tipicamente esse sono disponibili in una varietà di dimensioni, fenestrati e non fenestrati con forme rettangolari e ovali.

Di tutti i prodotti presenti sul mercato nessuno di questi è però disponibile in conformazione 3D o con proprietà antibatteriche. Per questo, protesi biologiche innovative con un effetto antibatterico e anti-biofilm e/o in conformazione 3D sarebbero di sicuro interesse per il mercato, specialmente nell'ambito della ricostruzione mammaria.

1.5 Membrana biologica in pericardio bovino BioRipar®

Tra i dispositivi a base di pericardio bovino, Bioripar® è la membrana biologica usata per il presente lavoro di tesi (Figura 24). Essa è costituita fondamentalmente da collagene di tipo I ed elastina ed è prodotta da Assut Europa spa a partire da vero pericardio bovino tramite un processo multifasico di lavorazione di proprietà dell'azienda stessa. Da qui in avanti, in tutta la parte sperimentale della presente tesi ci si riferirà sempre a questo tipo di membrana, che verrà semplicemente indicata come MPB.

In questo processo di lavorazione, soggetto a segreto industriale perciò non esplicitato nel presente lavoro di tesi, la membrana biologica viene sterilizzata, decellularizzata e ritagliata.

Il processo permette di rimuovere l'antigenicità della membrana, inattivare ogni tipo di patogeno mantenendo inalterata la struttura 3D del collagene, conservandone le proprietà biomeccaniche e

garantendone la biocompatibilità. Si ottiene pertanto una matrice per la germinazione dei fibroblasti che promuove la formazione di nuovi tessuti e vasi sanguigni.

Le proprietà meccaniche sono state confermate da test di resistenza a trazione e prova di resistenza allo scoppio. Studi preclinici ne hanno verificato la biocompatibilità e i meccanismi che sono alla base del processo di integrazione con il tessuto ospite [122]. Dal processo è possibile ottenere membrane in varie forme e dimensioni, idratate o non idratate, forate o non forate. Per le attività sperimentali svolte nell'ambito della presente tesi, sono state utilizzate membrane BioRipar® rettangolari, di dimensioni 6x8 cm, non idratate, non forate.

Il materiale utilizzato per la produzione di BioRipar® deriva da bovini nati, allevati e macellati in Italia, di età inferiore ai 24 mesi e riconosciuti sani (in particolare che non abbiano contratto Encefalopatia Spongiforme Bovina - BSE) dopo il controllo ante e post mortem secondo le vigenti disposizioni comunitarie, al fine di escludere ogni "cross-contamination". I tessuti sono processati con il metodo "single-donor" e non vi è mai "pooling" dei tessuti. Gli animali selezionati da veterinari, secondo rigorosi criteri, sono tutti certificati e impiegati per il consumo alimentare.

Oltre che per la chirurgia mammaria, questo dispositivo medico è utilizzato per la riparazione dei tessuti molli, per il rinforzo dei lembi muscolari, per il rinforzo delle strutture tendinee, per il rinforzo e/o la sostituzione di tessuti connettivali, per prevenire la formazione delle aderenze e accelerare i tempi di riparazione tissutale nelle chirurgie: addominale, plastica ricostruttiva, urologia, ginecologia, andrologia, toracica, ortopedia, otorinolaringoiatria, traumatologia, implantologia e parodontologia.



Figura 24. Immagine di MBD in pericardio bovino BioRipar® a seguito del processo di lavorazione

1.6 Attività sperimentale

L'attività di ricerca sperimentale del presente lavoro di tesi ha consistito in cinque principali punti, di seguito esposti.

1. Caratterizzazione chimico-fisica e funzionale della MPB BioRipar®.
2. Ricerca e sviluppo di metodi per il conferimento alla MPB di struttura 3D permanente in ambiente fisiologico, tramite procedure di cross-linking e/o essiccamento; valutazione dei risultati.
3. Ricerca e sviluppo di metodi per l'adesione alla MPB di solidi lamellari idonei all'uptake e al rilascio di API antimicrobici e antibiofilm; valutazione dei risultati.
4. Studio della cinetica di uptake e rilascio degli API antimicrobici e antibiofilm.
5. Studio dell'attività antibiofilm complessiva del prototipo ottenuto.

È importante sottolineare che si è cercato di integrare le procedure di caricamento dei solidi lamellari sulle membrane e di conferimento alle stesse di forma 3D con i vari metodi, valutando procedure sequenziali o contestuali in modo da ottimizzare il processo di funzionalizzazione delle MPB.

1.6.1 Caratterizzazione chimico-fisica e funzionale della MPB

Per quanto riguarda la caratterizzazione chimico-fisica e funzionale della MPB sono state valutate proprietà quali spessore, peso specifico, umidità relativa, micro-morfologia tramite SEM, capacità di assorbimento di liquidi della membrana secca e di desorbimento di liquidi da parte della membrana umida.

1.6.2 Ricerca e sviluppo di metodi per il conferimento alla MPB di struttura 3D

Per quanto riguarda le attività di ricerca e sviluppo di metodi per il conferimento alla MPB di struttura 3D, sono state valutate varie procedure basate sulla reticolazione e su diverse tecniche di essiccamento delle MPB posizionate su apposite dime, per ottenere rispettivamente membrane in forma umida e in forma secca. I metodi valutati sono stati validati in riferimento al Regolamento (UE) 2017/745 per l'applicazione in ambito biomedico [123].

Le attività di questo punto hanno consistito nello sviluppo delle formulazioni di cross-linking a base di chitosano, delle procedure di essiccamento e nella valutazione dei prototipi ottenuti.

Per quanto riguarda le procedure di essiccamento, queste sono state ritenute funzionali alla buona riuscita dei protocolli di conferimento della forma 3D oltre che a quelli di adesione dei solidi lamellari. Sono state prese in considerazione le tecniche di freeze-drying (liofilizzazione), di essiccamento in condizioni ambientali, in condizioni di essiccamento spinto e mediante solvente organico volatile.

Per quanto riguarda le procedure di cross linking, è stata prima svolta un'ampia attività di ricerca bibliografica sui metodi di reticolazione delle membrane biologiche.

Sono stati presi in considerazione tra i reticolanti chimici:

- gli epossidi EGDE (etilene glicole diglicidil etere) [125] e pentaepossido [124], entrambi in grado di legare aminoacidi del collagene e con buoni risultati in termini di resistenza alla calcificazione dei tessuti cross-linkati e buona citocompatibilità;
- il sistema EDC (1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimide cloridrato (EDC), NHS (N-idrossisuccinimide) e MES (acido 2-morfolinoetano sulfonico) [112], dove EDC è un agente di cross-linking che reagisce con i gruppi carbossilici delle proteine, attivandoli per legarsi con i gruppi amminici e NHS funge da stabilizzante dell'intermedio reattivo, questi danno eccellenti risultati a livello delle proprietà meccaniche e di biocompatibilità;
- genipina (GEN) [126], che reagisce con i gruppi amminici liberi presenti nelle proteine e dà ottima biocompatibilità e un buon tasso di rigenerazione tissutale in base a modelli *in vivo* [127];
- glutaraldeide (GLU), che possiede un'ottima capacità reticolante ma è tossica e può provocare un eccessivo irrigidimento dei tessuti sottoposti al trattamento [127].

Tra i reticolanti fisici sono stati considerati invece tripolifosfato (TPP) [20,35] e riboflavina + destrano (cross linking tramite radiazione UVA) [128] in quanto biocompatibili, non tossici e con un grado di reticolazione che dà prodotti meno rigidi rispetto ai reticolanti chimici.

In base a queste premesse è stato selezionato TPP come agente cross-linker sperimentale e i test sono stati effettuati sia su membrane in PB tal quali che in seguito a trattamento con il CH, in modo da valutare l'effetto sul sistema di una reticolazione combinata del collagene di membrana e del polimero con lo stesso agente. GLU è stata usata come controllo positivo di avvenuta reticolazione. La valutazione del cross-linking si è basata su parametri quantitativi (% di assorbimento di acqua) ma anche su alcuni qualitativi, come la rigidità e l'aspetto rispetto alle MPB tal quali, in quanto un buon procedimento di reticolazione di membrane biologiche deve in primis assicurare la conservazione delle proprietà meccaniche ed elastiche del tessuto, fondamentale per il suo impiego chirurgico: un eccessivo irrigidimento causerebbe problemi a livello di maneggevolezza operatoria, di adattabilità ai piani anatomici e di integrazione biologica.

1.6.3 Ricerca e sviluppo di metodi per l'adesione alla MPB di solidi lamellari

Il fine ultimo dell'attività di ricerca e sviluppo di metodi per l'adesione alla MPB di solidi lamellari, è stato quello di ottenere un prototipo di membrana biologica ingegnerizzata in modo da legare in modo stabile solidi lamellari capaci di adsorbire in modo efficiente (e poi rilasciare in modo controllato e in un ambiente opportuno che mimino le condizioni *in vivo*) API antimicrobici.

La scelta di dotare il DM impiantabile non direttamente di farmaci antimicrobici, ma di un rivestimento di solidi lamellari, proattivi al caricamento, è stata fatta sulla base del brevetto europeo EP22195794 (pubblicato come EP 4154923 A1) di proprietà di Prolabin & Tefarm srl, relativo all'invenzione di uno scaffold proattivo per il caricamento di principi attivi [129]. L'obiettivo è quello infatti di caricare gli API antimicrobici sul dispositivo direttamente in sala operatoria prima dell'impianto in vivo, tramite semplici procedure di contatto con soluzioni delle specie di interesse, che saranno facilmente adsorbite e intercalate dai solidi lamellari. Le specie antimicrobiche saranno quindi rilasciate in modo graduale e controllato in vivo nel post-operatorio, garantendo protezione nell'arco di vari giorni contro le SSI.

Le attività di questa parte hanno consistito: nella selezione, sintesi e caratterizzazione dei solidi lamellari più idonei al caricamento degli API e biocompatibili; nello sviluppo delle soluzioni a base di biocolle più adatte all'adesione, considerando come parametri-chiave il mantenimento delle proprietà funzionali inalterate delle MPB e la stabilità chimica e funzionale dei solidi lamellari; nello sviluppo di un processo efficiente di adesione dei solidi lamellari alle MPB.

I solidi lamellari sono stati selezionati all'interno dei gruppi delle idrotalciti (CAS 12304-65-3) e dei fosfati di zirconio tipo α (CAS 13772-29-7), con caratteristiche di biocompatibilità, dimensioni, area superficiale e composizione secondo quanto indicato nel brevetto europeo EP22195794. La scelta è ricaduta su idrotalcite $MgAl-CO_3$ 3:1, in grado di intercalare API anionici, e su α -ZrP, capace di caricare specie cationiche. Accanto al classico fosfato di zirconio di tipo α , sono stati testati anche ZrP nanometrico e ZrP esfoliato con Tris, per studiare la capacità di veicolare API da parte di solidi con elevata area superficiale e struttura esfoliata. In questo modo si è pensato di creare un sistema ad ampio spettro, abile al caricamento con API di diversa natura e carica.

Come bioadesivo è stato preso in considerazione principalmente il chitosano, per le sue proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità, versatilità chimica e affinità per i tessuti biologici, ampiamente caratterizzate nell'introduzione della presente tesi. Sono stati analizzati chitosani di diverso MW (alto medio e basso), in quanto questo fattore impatta le sue proprietà di biocolle e di agente antimicrobico, come da letteratura a riguardo [11,13,37,38]. Sono state testate soluzioni con la concentrazione

massima di chitosano possibile (2%), ma con diversa concentrazione di acido acetico, per aumentare la solubilità del chitosano, e diverso pH, e quindi diverso comportamento elettrolitico del chitosano. Sono state valutate anche altre biocolle: collagene, gelatina e cellulosa rigenerata. È stata infine testata anche l'associazione di più biocolle nella stessa soluzione.

Tra i metodi di adesione sono stati testati la filtrazione, il bar-coating, l'immersione e il gocciolamento. I prototipi sono stati caratterizzati e valutati sulla base della omogeneità dei solidi sulla MPB, della stabilità dell'adesione dei solidi alle membrane a secco, a seguito di sollecitazione meccanica e a seguito di immersione in opportuno mezzo.

È stata anche valutata la quantità di solidi adesi, con l'obiettivo di caricare stabilmente le MPB con solidi lamellari in percentuale rispetto al peso della membrana anidra compreso tra lo 0.5% e il 10%.

1.6.4 Studio della cinetica di uptake e rilascio degli API antimicrobici e antibiofilm

Questa parte della sperimentazione ha previsto un'iniziale fase di studio dello stato dell'arte esistente riguardante gli API antibiofilm. Dopo aver selezionato gli API più idonei alla sperimentazione, sono state svolte delle prove preliminari di intercalazione di tali API nei solidi lamellari, e sono stati messi a punto i protocolli di uptake e di rilascio di tali specie antimicrobiche dal dispositivo a base di MPB-biocolla-solidi lamellari.

1.6.4.1 Valutazione delle specie microbiche più comuni nelle infezioni da biofilm su protesi

La letteratura riguardante le infezioni ai dispositivi protesici impiantabili causate da biofilm ha messo in evidenza come le specie microbiche maggiormente responsabili di tali infezioni siano, tra i batteri: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterococci spp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e streptomiceti; tra i funghi: *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* [115,130,131]. In particolar modo, ci si è concentrati tra tutti questi sulle specie più comuni: *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*.

1.6.4.2 Valutazione degli API più idonei con attività antibiofilm

Lo stato dell'arte ha anche fornito conoscenze per la valutazione di quali API fossero più idonei al trattamento delle infezioni da parte delle specie microbiche sopra elencate e sulla loro MIC. Per sua natura il biofilm è difficilmente debellabile, richiedendo una MIC dell'antibiotico circa 10 volte superiore a quella sufficiente in condizioni planctoniche del microrganismo [132]. Per questo motivo si è optato per una strategia basata sulla prevenzione della formazione di biofilm, piuttosto che sul tentativo di una sua eradicazione a innesto già avvenuto. Si è deciso di prendere in considerazione sia antibiotici che antisettici, in modo da fornire due livelli di protezione antimicrobica al dispositivo medico: uno, di prima linea, più immediato e più generico, quello degli antisettici; e uno, in seconda difesa, più specifico e più protratto nel tempo, a base di antibiotici.

Antibiotici

Tra i possibili antibiotici ed antifungini ad ampio spettro, il cui uso contro le infezioni su dispositivi medici impiantabili è raccomandato dalla letteratura, sono stati valutati (vedi Tabella 2): Amfotericina B, Amoxicillina, Bacitracina, Cefazolina, Ceftarolina, Ciprofloxacina, Clindamicina, Daptomicina, Fosfomicina, Gentamicina, Kanamicina, Meropenem, Metronidazolo, Neomicina, Oxazolidinoni (Linezolid e Tedizolid fosfato), Penicillina G, Streptomicina, Tobramicina, Vancomicina [133-140]. Nella valutazione degli antibiotici ottimali sono state considerate la possibilità di caricare i solidi lamellari con l'API (presenza di carica netta e MW), solubilità dell'API a pH fisiologico; metodo analitico per il rilevamento dell'API e sua sensibilità (spettroscopia UV-vis o HPLC-OES).

Tabella 2. Lista degli antibiotici ed antifungini valutati come potenziali API

Antibiotico o antifungino	Rilevabilità UV-vis (nm)	Spettro d'azione	MW (g/mol)	Solubilità in H ₂ O 20 °C (mg/ml)
Beta-lattamici				
Amoxicillina	230	Gram+	365	si
Cefazolina	272	Gram+	454	slightly
Ceftarolina	242	Gram+	685	no
Meropenem	298	Gram+ e Gram-	383	>50
Penicillina G	290	Gram+ e Gram-	334	210
Macrolidi				
Amfotericina B	347,365,384,408	Funghi	924	no
Chinoloni				
Ciprofloxacina	277	Gram+ e Gram-	331	30
Aminoglicosidi				
Gentamicina	no	Gram+ e Gram-	478	si
Kanamicina	no	Gram-	485	50
Neomicina	310	Gram-	614	250
Streptomicina	279, 326	Gram-	582	>20
Tobramicina	no	Gram+ e Gram-	467	si
Polipeptidici				
Bacitracina	278	Gram+	1422	50-100
Lincosamidi				
Clindamicina	202	Gram+ e Gram-	425	si
Lipopeptidi				
Daptomicina	223	Gram+	1620	100
Fosfonici				
Fosfomicina	no	Gram+ e Gram-	138	50
Ossazolidinoni				
Linezolid	251,360	Gram+	337	3
Tedizolid	290	Gram+	370	2-3
Nitroimidazoli				
Metronidazolo	319	Gram+ e Gram- e protozoi	171	10-12
Glicopeptidi				
Vancomicina	238,282	Gram+	1449	>100

Alcuni antibiotici, come Gentamicina, Tobramicina e Kanamicina sono stati esclusi dalla scelta in quanto non direttamente rilevabili tramite spettroscopia UV-visibile. Altri, come Clindamicina, Amoxicillina, Ciprofloxacina, Fosfomicina, Neomicina, Bacitracina, Oxazolidinoni, Meropenem e Metronidazolo sono stati esclusi perché venduti come formulazioni contenenti eccipienti. Altresì, tutti gli antibiotici poco o scarsamente solubili in acqua, quali Ceftarolina e Amfotericina B, sono stati esclusi per problemi a mettere in atto la procedura di uptake in sala operatoria. Infine, antibiotici con MW molto elevato, come Daptomicina, sono stati esclusi perché l'elevato peso molecolare non consente un efficiente intercalazione nei solidi lamellari.

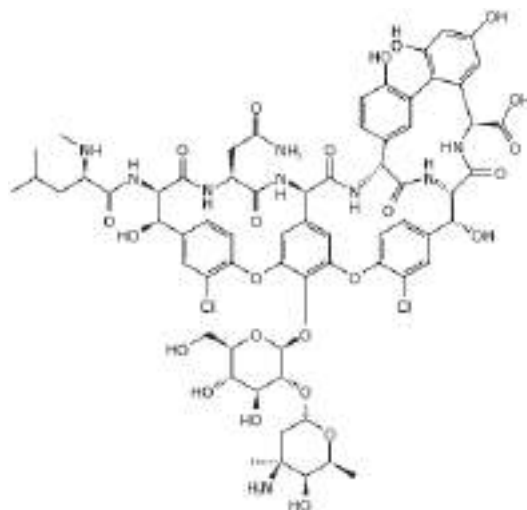


Figura 25. Struttura chimica della vancomicina

Tra i rimanenti, si è data la preferenza a antibiotici anfoteri, che si prestano sia all'intercalazione in idrotalciti che in zirconio fosfato, e ad alta solubilità in acqua, favorevole ad un caricamento con bassi tempi di contatto. Tra questi, è stato selezionato **Vancomicina** (Vanco), la cui struttura è riportata in Figura 25.

Antisettici

Tra gli antisettici raccomandati dalla letteratura sono stati presi in considerazione i seguenti [141-146]:

- clorexidina digluconato (0,05-4%), già ampiamente utilizzata per la disinfezione cutanea prechirurgica, per i lavaggi intraoperatori e come rivestimento di DM ed efficace contro batteri, funghi e virus con mantello;
- iodopovifone (0,1-10%) efficace contro batteri, virus, funghi e protozoi e utilizzato per la disinfezione cutanea, i lavaggi superficiali, chirurgia minore;
- acido ipocloroso (HOCl , 10-200 ppm), usato per la disinfezione di ferite, ulcere, lavaggi intraoperatori sperimentali contro batteri, virus e funghi;
- ipoclorito di sodio (NaOCl , 0,5-5%) e perossido di idrogeno (H_2O_2 , 3-6%), efficaci entrambi contro batteri, virus, funghi e spore e usati per disinfezione di strumenti, endodonzia, irrigazione di ferite necrotiche, il primo e per pulizia di ferite superficiali e disinfezione di strumenti, il secondo;
- alcool etilico/isopropilico (70-90%) usato per la disinfezione cutanea preoperatoria, l'igiene delle mani ed efficace contro batteri e virus enveloped;
- poliesanide (PHMB), usato nel trattamento di ferite croniche e lavaggi intraoperatori in ortopedia e argento e derivati (es. Ag^+ , nanoparticelle d'argento), usato come rivestimento di protesi, medicazioni avanzate per ferite infette, entrambi efficaci contro batteri, biofilm e funghi.

Nello specifico, è stata selezionata **clorexidina digluconato** CLO DG (struttura in Figura 26a), per l'ampio spettro d'azione e l'elevata efficacia, l'elevata solubilità in acqua ($>20\%$ p/v), la moderata citotossicità e perché già impiegata ampiamente nel rivestimento di dispositivi medici come cateteri e impianti. A seguito della consulenza con il Dott. Michele Riccio, specialista in chirurgia plastica, estetica e ricostruttiva presso l'Azienda ospedaliera universitaria delle Marche (Ancona) e dell'Accademia del Lipofilling, si è deciso di eseguire i test anche sul **poliesanide** PHMB (struttura in Figura 26b), nome commerciale Preventia®, in quanto antisettico di nuova generazione ampiamente utilizzato nella disinfezione delle ferite chirurgiche con ottimi risultati in termini di

efficacia e scarsa citotossicità [147]. Essi sono entrambi caricabili su zirconio fosfato lamellare e a pH idonei possono essere assorbiti anche dal chitosano durante la fase di uptake, permettendo un rilascio controllato dell'API nel tempo.

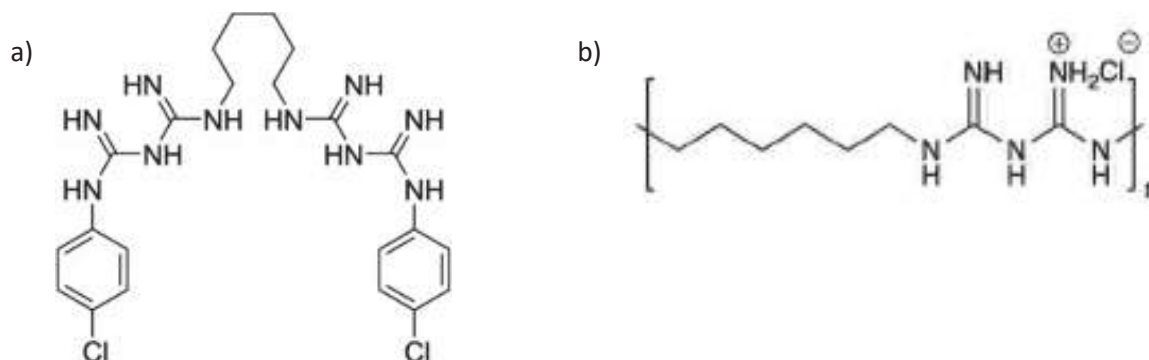


Figura 26. Struttura chimica della a) clorexidina e del b) PHMB

In Tabella 3 i valori di MIC (Minimum Inhibitory Concentration) espressi in $\mu\text{g/ml}$, relativi alle tre molecole selezionate verso *Staphylococcus epidermidis* e *Candida spp.* [141,147-150]:

Tabella 3. MIC verso *S. epidermidis* e *Candida spp.* per CLO DG, PHMB e Vanco

	CLO DG	PHMB	Vanco
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<145 $\mu\text{g/ml}$	0,25 - 2 $\mu\text{g/ml}$	Susceptible (VSSA): $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ Intermediate (VISA): 4 – 8 $\mu\text{g/ml}$ Resistant (VRSA): $\geq 16 \mu\text{g/ml}$
<i>Candida parapsilosis</i>	2 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	-

1.6.4.3 Prove preliminari di intercalazione

Una volta selezionati gli API di interesse, questi sono stati testati nella loro capacità di essere intercalabili nei solidi scelti in condizioni di contatto simili a quelle di sala operatoria. In particolare sono state studiate l'intercalazione della clorexidina digluconato (cationica) in α -ZrP e l'intercalazione di PHMB (cationico) nei vari tipi di zirconio fosfato, poiché essendo questa specie ad alto MW, si è voluta studiare la reattività dei tre tipi di zirconio fosfato, di cui due a maggiore capacità di intercalazione - in quanto ZrP nano ha elevata area superficiale e ZrP-tris ha lamelle pre-allargate - e selezionare quello più idoneo al caricamento su membrana. Non è stata sperimentata l'intercalazione di vancomicina (anfotera) nell'idrotalcite poiché già ampiamente descritta in letteratura [151].

1.6.4.4 Messa a punto del protocollo per l'uptake e il rilascio degli API

Sono state testate la capacità di up-take degli API selezionati da parte dei solidi lamellari adesi alle membrane, e la velocità di rilascio di tali API dai solidi in condizioni mimanti l'essudato di una ferita. È stata prevista una fase iniziale di ricerca nella letteratura scientifica di protocolli esistenti per studiare la cinetica di rilascio di principi attivi da dispositivi medici impiantabili, e in particolar modo è stata presa in considerazione la sperimentazione delle cinetiche di uptake e rilascio svolta per StimulanTM [116]. In base a tale ricerca bibliografica sono stati messi a punto i protocolli di uptake e rilascio. I test hanno consistito per l'uptake, nel contatto delle membrane funzionalizzate con una soluzione di API per un tempo opportuno, idoneo ai protocolli di sala operatoria, e nella quantificazione del titolo di API caricato sui prototipi; per il rilascio, nell'immersione delle membrane precedentemente caricate con gli API in una soluzione e in condizioni mimanti i fluidi

biologici a livello di una ferita chirurgica e nella quantificazione nel tempo del titolo di API rilasciato in tale fluido tramite spettroscopia UV-visibile o HPLC.

È stato tenuto conto delle seguenti considerazioni, fatte in via preliminare.

1. La necessità di minimizzare i tempi in cui la membrana è immersa nel liquido contenente gli API (15') e di utilizzare API in forme uguali a quelle in cui sono comunemente preparati per l'utilizzo in sala operatoria (CLO DG 20%, Preventia® e Vancomicina 6 mg/ml; in modo da non incidere significativamente sulle procedure di sala operatoria già previste, e da garantire un "facile uso medico" del dispositivo da produrre.
2. Per quanto riguarda la presenza di uno step o meno di risciacquo della membrana post imbibizione e pre rilascio è stato escluso in quanto non necessaria alle condizioni di sterilità e di sicurezza previste dal protocollo operatorio e in quanto potrebbe influire negativamente sull'uptake degli API da parte dei solidi adesi alla membrana.
3. La necessità di avere un protocollo sequenziale tra i test di uptake e quelli di rilascio, in modo da evitare l'errore nella quantificazione degli API e da mimare le condizioni di sala operatoria, in cui i dispositivi sono posti in situ nella ferita chirurgica subito dopo l'uptake, ha consentito di eseguire il protocollo di rilascio immediatamente dopo quello di uptake.
4. Per quanto riguarda la natura del mezzo di rilascio, sono state testate svariate soluzioni isotoniche, tra le quali: soluzione fisiologica, PBS (phosphate buffer saline), tampone acetato pH 4,5, soluzione sodio acetato pH 5,5 e pH 6,5. Dalle prove effettuate in via preliminare si è optato per la soluzione sodio acetato pH 6.5 per i test su CLO DG, tampone PBS pH 7.4 per quelli su PHMB e su Vancomicina, in quanto favorevoli al mantenimento in soluzione degli API e con un pH vicino alla neutralità.
5. Per quanto riguarda la metodologia di ottenimento dei campioni dal test di rilascio è stato selezionato il metodo via sostituzione del mezzo e non via prelievo, in modo da riprodurre delle condizioni in vivo in cui la quantità di API che viene rilasciato dal prototipo è portata lontano dalla sede di impianto dal sistema linfatico, e in cui quindi l'API viene continuamente rimpiazzato da quello liberato dalla membrana.
6. Per quanto riguarda le tempistiche del test di rilascio è stato selezionato un timesheet con sostituzioni del mezzo ogni 24 h per 7 giorni continuativi, tempo idoneo all'eventuale abbattimento sul nascere del biofilm.
7. Per quanto riguarda infine l'eventuale presenza simultanea di più antimicrobici e loro interazioni, queste non sono state valutate, ma saranno oggetto di studi più approfonditi a valle del presente progetto di tesi.

1.6.5 Studio dell'attività antibiofilm complessiva del prototipo ottenuto

Per quanto riguarda la valutazione dell'attività antibiofilm effettiva del dispositivo medico, i prototipi a base di MPB caricate con solidi lamellari, pre e post contatto con gli API d'interesse, sono stati sottoposti a test per valutarne l'effettiva capacità di decontaminazione microbica e anti-biofilm. Questa parte della sperimentazione ha previsto ha previsto un'iniziale attività di ricerca bibliografica riguardante i test in vitro eseguiti per testare l'attività antibiofilm di dispositivi impiantabili simili a quello oggetto del presente studio, e in particolare sul caso-studio StimulanTM [115].

Il protocollo messo a punto ha consistito in una iniziale valutazione della capacità anti-biofilm delle MPB funzionalizzate con la biocolle, per verificare l'effettiva attività antimicrobica del chitosano nelle conduzioni di utilizzo. La seconda parte della sperimentazione ha consistito invece nella

valutazione dell'attività antibiofilm dei prototipi con chitosano e con i solidi lamellari caricati, in modo da verificare eventuali variazioni rispetto alla condizione con la sola biocolla. Di questi campioni è stato eseguito il confronto tra la condizione nativa (non caricati ancora con API) e post-uptake degli API, in modo da valutare l'effettiva attività dell'API una volta inserito nel sistema composito. Come API modello è stata scelta CLO DG.

L'attività antibiofilm è stata testata verso ceppi appartenenti a specie microbiche ad alta incidenza di infezione nelle SSI: il batterio *Staphylococcus epidermidis* e il fungo *Candida parapsilosis*, nello specifico verso *C. parapsilosis* T210U, un ceppo isolato da protesi mammarie infette. La valutazione dell'attività antibiofilm è avvenuta tramite SEM, microscopia ottica e OD. Come tempo di valutazione per la crescita microbica è stato scelto 24 h per *C. parapsilosis* e 48 h per *S. epidermidis*, tempo necessario alle specie selezionate per ottenere un biofilm maturo. Per il primo ceppo si è ottenuta un'analisi semi-quantitativa dell'attività anti-biofilm delle MPB funzionalizzate, mentre per il secondo un'analisi quantitativa.

2. Materiali e metodi

2.1 Materiali

Le MPB sono state fornite da AssutEurope spa nel prodotto Bioripar®, in forma umida o secca, non fenestrata, di dimensioni 6x8 cm. Anche le dime nei diversi materiali e forme sono state fornite da Assut Europe spa, così come Collagene in polvere, Lapi Gelatina e Cellulosa ossidata rigenerata Oxitamp.

α -ZrP è stato acquistato da Sunshine Factory Co. Ltd. (China).

Etanolo denaturato $\geq 99\%$ con 1% MEK è stato acquistato da PanReac AppliChem.

Acetone $\geq 99,5\%$; anidride fosforica $P_2O_5 \geq 98,0\%$; chitosano alto MW, 310-375 kDa, 800-2000 cP, DD $>75\%$; chitosano medio MW, 190-310 kDa, 200-800 cP, DD $>75\%$; alluminio nitrato nonaidrato $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O \geq 99,9\%$; magnesio nitrato esaidrato $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O \geq 99,9\%$; NaOH $\geq 98,0\%$; sodio tripolifosfato TPP grado tecnico $\geq 85,0\%$; glutaraldeide grado I, 25% in acqua; acido acetico glaciale 100%, anhydrous EMSURE® ACS; fosfato di sodio Na_2HPO_4 ACS $\geq 99,0\%$; fosfato di potassio KH_2PO_4 ACS $\geq 99,0\%$; sodio cloruro NaCl ACS $\geq 99,0\%$; soluzione di sodio idrossido NaOH 50% e 1 M; acido cloridrico 37%; acido ortofosforico H_3PO_4 85% Suprapur®; Tris base (2-ammino-2-(idrossimetil)-1,3-propanediolo) $\geq 99,8\%$ ACS; soluzione di clorexidina digluconato 20% in acqua; acetato di sodio anidro Emsure® ACS; bicarbonato di sodio anidro $\geq 99,0\%$; Vancomicina B $\geq 85\%$ e cristal violetto $\geq 99,0\%$ sono stati acquistati da Sigma-Aldrich.

Chitosano basso MW, 50-190 kDa, 20-300 cP, DD $>75\%$ da funghi è stato acquistato da Alidans.

Preventia® (soluzione 0,1% PHMB poli(esametilene biguanide) + polossamero) è stata fornita da Dott. Michele Riccio, UOSD di Chirurgia Ricostruttiva e della Mano presso gli Ospedali Riuniti di Ancona. Propionato di zirconile $C_{12}H_{20}O_8Zr \geq 95,0\%$ è stato acquistato da Mel Chemicals.

Tutte le materie prime sono state utilizzate senza ulteriore purificazione.

L'acqua deionizzata è stata prodotta internamente con un distillatore Decasei Forwater.

2.2 Tecniche analitiche e strumenti

Un microscopio elettronico a scansione ad emissione di campo FE-SEM Electron Microscope LEO 1525 con sonda per spettrometria EDX Bruker, risoluzione di 1.5nm a 20kV e 3.5nm a 1kV e una

distanza di lavoro di 8,5 mm, stub circolari in alluminio ricoperti di biadesivo conduttivo in grafite e metallizzati con sputtering ionico in oro è stata utilizzato per la caratterizzazione micro-strutturale ed elementare delle membrane biologiche in pericardio bovino in forma nativa, a seguito delle procedure di essiccamento e di reticolazione e a seguito del trattamento con le soluzioni di bioadesivi, per effettuare la valutazione dell'impatto di tali tecniche/materiali sulle proprietà strutturali (e di conseguenza funzionali) di membrana. La microscopia SEM+EDX è stata anche utilizzata per la caratterizzazione dei solidi lamellari utilizzati per l'adesione sulle MPB e per la caratterizzazione della distribuzione dei solidi depositi sulle membrane stesse. È stata infine la tecnica di base per la valutazione dell'attività antibiofilm del dispositivo composito a base di MPB, solidi lamellari e chitosano, pre e post uptake degli API antimicrobici.

Una bilancia analitica Sartorius è stata utilizzata per la caratterizzazione delle MPB: peso specifico, capacità di assorbire acqua da forma secca e di perdere acqua a seguito di disidratazione (peso acqua assorbita o desorbita / peso membrana). Un calibro elettronico di sensibilità 0,001 mm è stato utilizzato per determinare lo spessore delle MPB in forma nativa e a seguito dei test di essiccamento e reticolazione. Una stufa Binder e un essiccatore sono stati utilizzati per le procedure di essiccamento delle MPB. Un liofilizzatore 5PASCAL LIO-20 FP è stato utilizzato per le procedure di essiccamento delle MPB a seguito dei trattamenti con le soluzioni di reticolazione e di adesione dei solidi lamellari e per ottenere i provini per i test antibiofilm. Un viscosimetro rotazionale Fungilab Viscolead ADV è stato utilizzato per la caratterizzazione delle soluzioni di adesione. Un ultra turrax Ika T25 Digital e un bar-coater RK K-control coater sono stati utilizzati per la preparazione e l'applicazione delle biocolle alle MPB.

Uno spettrometro ad emissione ottica al plasma ICP/OES (inductively coupled plasma / optical emission spectroscopy) PerkinElmer Avio 200 è stato utilizzato per la caratterizzazione dei solidi lamellari a seguito del contatto con le soluzioni di adesione.

Un diffrattometro a raggi X (XRD) per analisi strutturale e di fase con raffinamento Rietveld (Bruker D2 Phaser 2nd generation) è stato utilizzato per la caratterizzazione dei solidi lamellari utilizzati per l'adesione sulle MPB, per la stabilità di tali solidi a seguito del contatto con le soluzioni di adesione, per la caratterizzazione delle MPB a seguito di tale deposizione e per la caratterizzazione delle prove preliminari di intercalazione degli API antimicrobici nei solidi lamellari.

L'analisi termica simultanea TGA/DTA/DSC (PerkinElmer STA 8000), con una rampa di temperatura da 25 a 1000 °C, una velocità di riscaldamento di 10 °C/min, in flusso di aria è stata utilizzata per la caratterizzazione delle MPB, per valutare l'UR % nelle prove di essiccamento e di reticolazione e per caratterizzare le intercalazioni degli API antimicrobici nei solidi lamellari nelle prove preliminari.

L'analisi granulometrica tramite Laser Diffraction (Malvern Panalytical Mastersizer 2000), l'analisi di Area Superficiale BET e Porosità (Micromeritics Gemini VIII) e l'analisi dimensioni particelle (Dynamic Light Scattering) e potenziale zeta (Anton Paar Litesizer 500) sono state utilizzate per la caratterizzazione dei solidi lamellari utilizzati per essere adesi sulle MPB.

Uno spettrofotometro UV-vis JascoV-750-ISU-922 con emissione di lunghezze d'onda nel range 190-800 nm è stato utilizzato per la determinazione delle cinetiche di uptake e rilascio degli API antimicrobici dal dispositivo prototipo.

Un microscopio ottico MIT 300\500 Series è stato utilizzato per la valutazione dell'attività antibiofilm dei prototipi, una spettroscopia Optech e una Tecan Infinite 200 sono state utilizzate per il controllo rispettivamente della crescita microbica post inoculo e post incubazione con i provini.

Una camera climatica Heraeus BBD 6220 è stata utilizzata per i test di rilascio.

2.3 Metodi

2.3.1 Caratterizzazione chimico-fisica e funzionale della MPB

La caratterizzazione delle MPB ha previsto l'analisi del peso specifico, dello spessore, dell'umidità relativa, della capacità di idratazione della membrana in forma secca, della capacità di disidratazione della membrana in forma umida e la caratterizzazione della loro micro-struttura e morfologia. Il peso specifico è stato misurato con bilancia analitica su campioni di MPB secca, umida ed essiccata e riportato come mg/cm^2 . Lo spessore è stato misurato con un calibro elettronico e riportato in mm. L'umidità relativa (UR%) è stata misurata tramite analisi termogravimetrica. Per quanto riguarda la capacità di idratazione, la MPB secca è stata immersa in acqua per 24h e quindi sgocciolata per 30'', pesata e calcolata la percentuale $[(\text{peso umido} - \text{peso secco}) / \text{peso secco}]$. Per quanto riguarda la capacità di disidratazione, la MPB umida è stata essiccata in liofilizzatore per 24h, pesata e calcolata la percentuale $[(\text{peso umido} - \text{peso secco}) / \text{peso umido}]$. Tutti i risultati sono stati ottenuti dalla replica di 10 campioni e riportati come media $\pm$ deviazione standard.

La micro-struttura e la composizione elementare delle MPB è stata analizzata tramite SEM ed EDX, ricavando dei dischetti circolari di 1 cm di diametro dalle membrane secche.

2.3.2 Metodi per il conferimento alla MPB di struttura 3D

2.3.2.1 Metodi per l'essiccamento

Lo studio della modalità ottimale di essiccamento delle MPB, sono stati effettuati sulle MPB in forma umida, trattandole con 4 diverse tipologie di essiccamento (A-D), e testando 5 campioni per ogni metodologia:

- A) La MPB è stata immersa completamente in acetone in una piastra petri e lasciata in queste condizioni per 24 h.
- B) La MPB è stata posta in essiccatore sotto vuoto e in presenza di P_2O_5 per 24h.
- C) La MPB è stata congelata a -20°C per 2h e subito liofilizzata per 24 h.
- D) La MPB è stata lasciata essiccare all'aria a T e umidità ambientali per 24h.

La procedura migliore è stata valutata in base alle proprietà visive (plastificazione o meno del tessuto e spessore), che hanno trovato perfetta corrispondenza nell'analisi della microstruttura tramite SEM e dell'umidità relativa (UR%) tramite analisi termo gravimetrica TGA.

Una volta selezionato il processo ottimale, le MPB sono state essiccate su dima per testare se il processo di essiccamento permettesse a tali membrane di mantenere la forma 3D conferitagli. Le dime, realizzate da Assut Europe spa, sono: due in acciaio inox e a forma di cupola, di due dimensioni differenti (1), altezza $H \sim 30 \text{ mm}$ e diametro $d \sim 60 \text{ mm}$, (2) $H \sim 40 \text{ mm}$ e $d \sim 120 \text{ mm}$; la terza è in plastica PA12 e di forma cilindrica ad arco (3), lunghezza $L \sim 70 \text{ mm}$. In Figura 27 i disegni tecnici (a,b) e un'immagine (c) delle dime. La scelta delle caratteristiche delle dime è stata effettuata da Assut a seguito di una consulenza apposita con uno medico chirurgo specialista in ortopedia.

a)

b)

c)

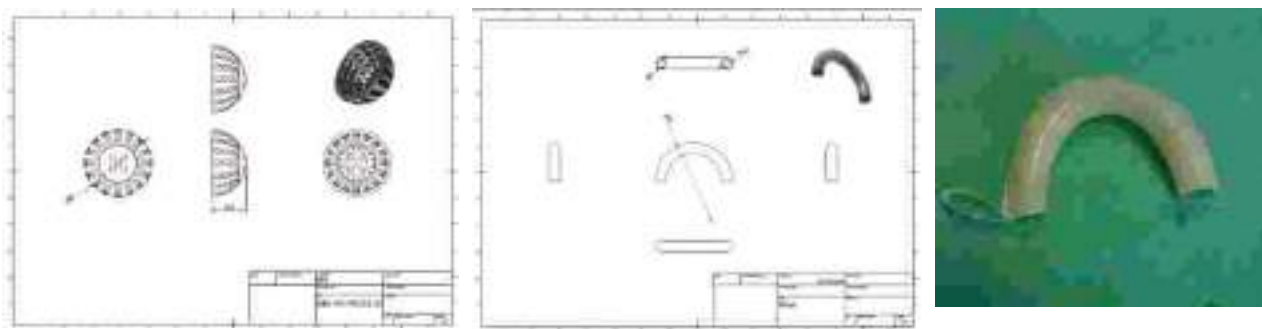


Figura 27. Disegni tecnici (a,b) e immagine (c) delle dime utilizzate

2.3.2.2 Metodi per il cross linking

La sperimentazione ha consistito nel trattamento delle MPB, tal quali o dopo coating con CH, con le soluzioni di cross-linking (TPP, GLU), nel successivo essiccamento su dima tramite liofilizzazione e nella valutazione dell'avvenuta reticolazione tramite immersione per 24 h in tampone PBS.

Sono state preparate: una soluzione chitosano alto/medio MW 2% w/v in soluzione acido acetico 1% v/v, agitata magneticamente a 60°C per 24 h e poi centrifugata 3500 rpm per 10'; una soluzione TPP 2% pH 9; una soluzione GLU 8×10^{-6} %; una soluzione PBS pH 7,4 a partire da Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 e NaCl. Le membrane con coating con CH HMW/MMW sono state ottenute mediante la tecnica descritta nel paragrafo 1.6.3.3. La procedura di reticolazione ha previsto il contatto delle MPB, tal quali o con coating, poste su una dima cilindrica, nelle soluzioni a base TPP o GLU (controllo positivo) a RT, sotto costante agitazione per garantire un contatto uniforme tra le membrane e le soluzioni e rispettivamente per 8 h (TPP) e 30' (GLU). Dopo il trattamento, le MPB sono state rimosse dalle soluzioni e dalle dime, risciacquate in PBS per rimuovere l'eccesso di TPP/GLU non reagito e congelate -20 °C per 2h e liofilizzate per 24. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato e sono stati valutate anche 3 MPB non sottoposte a reticolazione (controlli negativi). I campioni così ottenuti sono stati pesati e immersi in tampone PBS 37 °C (mimante le condizioni fisiologiche) per 24 h, al termine delle quali sono stati valutati:

- aspetto visivo (se mantenuto quello tipo delle MPB non reticolate),
- rigidità (se uguale a quella delle MPB non reticolate (2), maggiore (3) o minore(1)),
- variazione della forma rispetto a quella conferitagli dalla dima,
- assorbimento di liquidi ($W\%$, dato da W_{24h}/W_0 , dove W_{24h} è il peso dopo 24 h in PBS e W_0 il peso secco iniziale). Per quest'ultimo parametro, non è stato possibile eseguire una vera e propria valutazione del grado di swelling, come è d'uso comune nel caso della sperimentazione sui metodi di cross-linking, poiché i campioni non sono scaffold porosi, ma membrane rivestite, ma si è potuto comunque procedere alla valutazione dell'assorbimento di acqua da parte dei campioni. Questo valore ($W\%$) è indicativo infatti della capacità dei gruppi amminici del collagene (e del CH) di interagire con le molecole di acqua, capacità che diminuisce nel caso in cui questi gruppi siano impegnati in legami di cross-linking.

2.3.3 Metodi per l'adesione alla MPB di solidi lamellari

2.3.3.1 Sintesi e caratterizzazione dei solidi lamellari

L'idrotalcite MgAlCO_3 3:1 è stata sintetizzata con il metodo della co-precipitazione. Ad una soluzione 1 M dei sali $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ in rapporto 3/1 (Mg/Al) è stata aggiunta NaOH 50% fino a pH 9, sotto agitazione magnetica e a temperatura ambiente. Al momento della precipitazione, sono stati aggiunti 400 ml di una soluzione Na_2CO_3 1,8 M, sotto agitazione meccanica e per 2 ore. Il prodotto è stato ottenuto tramite centrifugazione e lavaggio con acqua. Percentuale del

secco sul prodotto = 21,7% (w/w). Da una soluzione 0,2 M di propionato di zirconile in etanolo, aggiungendo velocemente acido fosforico 85% in rapporto P/Zr=6 e mantenendo in agitazione meccanica per 2h, si è ottenuto lo ZrP nanometrico, sottoforma di gel trasparente. Questo è stato centrifugato e lavato con etanolo. Percentuale del secco sul prodotto = 12,9% (w/w). ZrP-tris è stato ottenuto aggiungendo α -ZrP ad una soluzione acquosa 5% (w/v) Tris (2-ammino-2-(idrossimetil)-1,3-propanediolo) fino ad ottenere un gel di concentrazione 10% (w/v). Tutti i solidi lamellari utilizzati sono stati caratterizzati tramite le seguenti tecniche analitiche: XRD, particle size distribution tramite analisi granulometrica o DLS (a seconda delle dimensioni del solido, micro- o nanometriche), BET, SEM ed EDX. 5% w/v

2.3.3.2 Preparazione e caratterizzazione delle biocolle

Sono state preparate soluzioni acquose di biocolle a base di: chitosano cloridrato (CH) 2% (w/v), ad alto (HMW), medio (MMW) o basso (LMW) peso molecolare, in acido acetico 1 o 2%. La soluzione CH LMW è stata ottenuta per semplice agitazione magnetica a RT e poi portata a vari pH (4,5; 5,5; 6,5), tramite aggiunta di NaOH 1 M; mentre le soluzioni con CH MMW e HMW sono state agitate magneticamente a 60 °C per 24 h e poi centrifugate 3500 rpm per 10'. Sono state preparate soluzioni di CH 2% con diverse concentrazioni (0,5-1-2% (w/v)), di collagene (COL) idrolizzato con HCl 0,5 M, con gelatina (GEL) 0,5% (w/v) e cellulosa rigenerata (CEL) 0,5% (w/v). Sono state preparate soluzioni di soli COL, GEL e CEL 0,5-1-2% (w/v). Di tutte le soluzioni sono stati determinati pH e viscosità e ne è stata valutata la stabilità, lasciandole a temperatura ambiente per 48 h e osservando in seguito eventuale precipitazione di materiale. Le soluzioni sono sempre state conservate a 4 °C.

Le biocolle sono state valutate anche tramite il contatto tra le soluzioni di bioadesivi e:

- le MPB, per determinare il mantenimento dell'integrità strutturale e funzionale di membrana,
- i solidi lamellari, per verificarne la stabilità chimica.

Un campione di MPB è stato immerso in ogni soluzione di biocolle da testare per 30', quindi ogni provino è stato fatto sgocciolare per 1' e messo in una piastra petri, liofilizzato e ne è stata valutata l'integrità tramite SEM.

Sono state ottenute delle dispersioni al 5% (w/v) dei solidi $MgAlCO_3$ e α -ZrP (preso come modello per i fosfati di zirconio utilizzati) nelle soluzioni di adesione sotto agitazione magnetica per 72 h, quindi i solidi sono stati recuperati per centrifugazione e lavati con acqua deionizzata e i pellet finali seccati in stufa a 70 °C per 12 h. Dal peso secco ottenuto rispetto al peso iniziale del solido usato si è ricavata la perdita in peso percentuale (wt %). Si è deciso di utilizzare come limite inferiore per l'accettazione della stabilità del solido nelle soluzioni di adesione il valore di wt % = 90%.

Per confermare ulteriormente la stabilità dei solidi nelle soluzioni, i solidi recuperati sono stati analizzati tramite XRD e confrontati con lo spettro di partenza, per determinare eventuali processi di intercalazione o modifica superficiale a seguito del contatto con le soluzioni di adesione.

Come ulteriore prova della stabilità dei solidi nelle soluzioni di adesione, nel caso della $MgAlCO_3$ 3:1, è stata eseguita un'analisi ICP sulle acque di centrifugazione e di lavaggio delle dispersioni per quantificare il titolo di Al presente e da questo risalire al quantitativo di idrotalcite eventualmente disciolto. È stato prima effettuata un'analisi sulle acque come controllo negativo, e il titolo di Al è risultato essere al di sotto del limite di rilevabilità dello strumento.

Accanto ai test sulle soluzioni di adesione, sia le MPB che i solidi sono stati anche testati in acqua come controllo negativo.

2.3.3.3 Sviluppo del protocollo di adesione e relativa valutazione

Scelta del metodo di adesione

Lo sviluppo del protocollo di adesione dei solidi lamellari alle MPB tramite la biocolla selezionata come soluzione-modello al punto 1.6.3.2 (Soluzione 3: CH LMW 2%, acido acetico 1%, pH 6,5) ha previsto la valutazione di 4 metodi: filtrazione, bar-coating, immersione e gocciolamento.

In tutti i casi, le MPB sono state ritagliate in una forma opportuna, pesate (da secche) e identificate e, al termine della procedura, ripesate (da umide) e liofilizzate per favorire l'ancoraggio dei solidi alle membrane. I test sono stati effettuati solo sull'idrotalcite MgAlCO_3 , usata come solido modello in questa fase, con un quantitativo in peso pari al massimo utilizzabile, pari cioè al 10% rispetto al peso della MPB, in modo da massimizzare il carico di API nella successiva fase della sperimentazione. Per ogni metodo, sono state preparate delle dispersioni al 5% di MgAlCO_3 nella Soluzione 3* tramite un ultra-turrax. Ogni metodo è stato testato in triplicato. Sono state effettuate anche delle prove con acqua al posto della biocolla e con sola soluzione di biocolla, come controlli.

- A) *Filtrazione*: un provino circolare di MPB è stato usato come membrana di filtrazione, tramite un buchner e una pompa a vuoto, di 20 ml di dispersione solido-biocolla.
- B) *Gocciolamento*: un provino rettangolare di MPB è stato posizionato su una piastra petri e 5 ml di dispersione solido-biocolla è stata gocciolata con una pasteur sullo stesso fino a completo assorbimento.
- C) *Immersione*: un provino circolare di MPB è stato immerso per 24h in 20 ml di dispersione solido-biocolla in una piastra petri opportunamente modificata con un'intercapedine per l'agitazione magnetica.
- D) *Bar-coating*: un provino rettangolare di MPB è stato sottoposto a stesura della dispersione solido-biocolla tramite bar-coater con barra da 80 μm , con una deposizione ripetuta per 3 volte di seguito. Le membrane sono state fissate con aghi a un supporto di polistirolo prima di essere liofilizzate.

I provini ottenuti sono stati tutti valutati per: 1) mantenimento della flessibilità della membrana, 2) adesione del film polimerico alla membrana, 3) omogeneità dei solidi adesivi, 4) stabilità dell'adesione dei solidi a secco e 5) dell'adesione dei solidi a seguito di sollecitazione meccanica. Ad ogni parametro è stato assegnato un punteggio da 1 (peggior risultato) a 3 (miglior risultato). Le MPB funzionalizzate ottenute sono state anche caratterizzate tramite XRD, confrontandole con gli spettri delle membrane native e dei solidi puri, SEM ed EDX per confermare la presenza dei solidi lamellari sulle stesse e determinarne l'omogeneità della distribuzione sulla superficie del provino.

Scelta della biocolla

Una volta individuato come metodo di deposizione il bar-coating, sono state effettuate ulteriori prove testando anche le altre soluzioni di biocolle (individuate al punto 1.6.3.2) e utilizzando come solido modello sempre l'idrotalcite MgAlCO_3 al massimo quantitativo possibile, pari cioè al 10% rispetto al peso della MPB. In questo modo sono state selezionate le migliori soluzioni di biocolle sempre in base ai parametri 1-5.

Scelta delle condizioni dei solidi lamellari

Una volta individuata la biocolla, sono state effettuate delle prove a diversa concentrazione e composizione di solidi; e sono state valutate questa volta secondo i parametri:

- Valutazione stesura: bontà della dispersione (1), facilità di stesura (2);

- Valutazione provini a secco: omogeneità del film depositato (3), stabilità dell'adesione dei solidi a secco (4), a seguito di sollecitazione meccanica (5), carico dei solidi (7) e di CH (8);
- Stabilità dell'adesione dei solidi in umido, ponendoli in soluzione fisiologica per 7 giorni a 37 °C e 90% UR e valutando il distacco dei solidi ogni 24 h (6).

È stata anche valutata la quantità di solidi adesi, tramite gravimetria per differenza tra il peso della membrana tal quale secca e di quella depositata e secca, noti la concentrazione di solidi e di biocolle nella dispersione e il quantitativo di dispersione depositato.

2.3.4 Metodi per lo studio della cinetica di uptake e rilascio degli API antimicrobici e antibiofilm

2.3.4.1 Prove preliminari di intercalazione

Ad una soluzione 20% CLO DG viene aggiunto α -ZrP in concentrazione 17% w/v e mantenuto in agitazione magnetica per 15' RT, il prodotto di intercalazione viene poi filtrato e seccato 70 °C per 6 h. L'esito dell'intercalazione è stato valutato tramite caratterizzazioni XRD e TGA/DSC.

L'intercalazione di PHMB nei vari tipi di ZrP ha previsto il contatto di a) 100 mg α -ZrP, b) 1 g ZrP nano e c) 1 g ZrP-tris con 35 ml di Preventia®, sotto agitazione magnetica RT per 15'. I prodotti sono stati quindi centrifugati 10' 11500 rpm e i solidi recuperati. L'esito dell'intercalazione è stato valutato tramite caratterizzazioni XRD e TGA/DSC.

La caratterizzazione XRD ha previsto la registrazione di spettri nel range compreso tra 0 e 20 °2 θ , mentre la TGA nel caso dei solidi lamellari in forma secca (α -ZrP) ha previsto un aumento di temperatura da RT a 1000 °C con una velocità di 10 °C/min, nel caso di solidi lamellari in forma di dispersione acquosa, ha previsto una prima rampa di temperatura da RT a 110 °C (per consentire l'evaporazione di tutta l'acqua di idratazione), un'isoterma di 30' a 110 °C e una seconda rampa di temperatura da 110 a 1000 °C con velocità di 10 °C/min.

2.3.4.2 Protocollo per l'uptake e il rilascio degli API

Protocollo di uptake

I prototipi di MPB funzionalizzate con i solidi lamellari, liofilizzati e di dimensioni 6x4 cm, sono stati pesati e immersi in una soluzione di API (CLO DG 20% (0,4 M) / Preventia® tal quale) in un volume opportuno (20 ml) a ricoprirli interamente, in condizioni di temperatura (20°C) e umidità (50%) mimanti le condizioni di sala operatoria, per 15' (tempo necessario all'uptake degli attivi nei solidi). I provini sono stati quindi prelevati, sgocciolati per 20'' e depositi su una nuova petri e pesati. Il carico di API è stato ottenuto per via gravimetrica, tramite la differenza di peso tra la membrana secca e la stessa post imbibizione e noti quindi il quantitativo di soluzione assorbita e la sua concentrazione, ed espresso come peso su area di membrana (mg/cm²). Tale carico è stato successivamente verificato tramite i dati di rilascio.

Sono stati testati alcuni dei prototipi ottenuti nel paragrafo 3.6.3.3, ovvero MPB caricate con diversi tipi e diverse concentrazioni di ZrP (essendo CLO e PHMB caricabili solo su zirconio fosfato), singolarmente o come mix, depositi su un solo lato della membrana con la soluzione di biocolla a base di CH MMW (vedi Tabella 4). Sono state testate anche una membrana con sola biocolla e una membrana nativa, come controlli. Ogni campione è stato analizzato in triplicato.

Tabella 4. Campioni analizzati nei test di uptake e rilascio per CLO DG e PHMB

Campione	Identificativo
MPB tal quale	m tq
MPB con CH 2%	m CH

MPB con CH + α -ZrP 2%	m ZrP
MPB con CH + ZrP nano 12%	m ZrP nano
MPB con CH + ZrP-tris 18%	m ZrP-tris
MPB con CH + mix solidi 39%	m mix

Nel caso della Vancomicina invece, al fine di incrementare la sensibilità del metodo sperimentale, la procedura di uptake ha previsto il contatto di frammenti di MPB in 5 ml di soluzione Vanco 50 mg/ml in tampone fosfato per 15' all'interno di matracci, a 20 °C e 50 % UR. Dopo questo tempo di contatto, i matracci sono stati capovolti e svuotati del liquido di uptake, lasciando i frammenti di membrana all'interno. Il carico di API è stato ottenuto sempre per via gravimetrica ed espresso come peso su area di membrana (mg/cm²). In questo caso, essendo Vanco una molecola anfotera e in quanto tale intarcalabile sia su LDH che su zirconio fosfato, è stata testata una MPB caricata con entrambi i solidi lamellari (MgAlCO₃ 1% e ZrP 2%) e con la soluzione di biocola a base di CH MMW (vedi Tabella 5). È stata testata anche una membrana nativa, come controllo. Ogni campione è stato analizzato in triplicato.

Tabella 5. Campioni analizzati nei test di uptake e rilascio per Vanco

Campione	Identificativo	Area totale campione (cm ²)	Peso totale campione (mg)
MPB tal quale	m tq	51,1	748
MPB con CH + MgAlCO ₃ 1% + α -ZrP 2%	m mix	42,5	723

Protocollo di rilascio

I campioni ottenuti dallo step di uptake degli API sono stati posti ognuno in una piastra petri e immersi in 20 ml di una soluzione sodio acetato pH 6,5 (per CLO DG) / tampone PBS pH 7,4 per PHMB), le piastre sono state sigillate e poste in camera climatica a 37 °C e 60% UR. Ad intervalli di tempo regolari (ogni 24 ore) il fluido di rilascio è stato prelevato e rimpiazzato con nuovo fluido, termostato alla stessa temperatura. La cinetica di rilascio degli API dalla membrana è stata valutata per un periodo totale di 7 giorni. Il liquido di rilascio è stato analizzato tramite spettrofotometro UV-vis, per determinare la concentrazione di antimicrobico rilasciato nel tempo, previo ottenimento di un'opportuna retta di taratura dello strumento. Dalle assorbanze (Abs) ottenute ai vari tempi, si è risalito alla concentrazione molare di API grazie alla retta di taratura ottenuta. Da tale concentrazione molare si è ottenuta la concentrazione di API e in mg/ml e in normalizzata rispetto all'uptake (%). Dal valore in mg/ml è stato ottenuto, noto il volume dei prelievi, il quantitativo effettivo di API rilasciato (mg), e da questo, nota l'area della membrana, la concentrazione di API su area di membrana (mg/cm²) e da questa la media giornaliera di rilascio (mg/die/cm²). La curva di rilascio di ogni API è stata ottenuta esprimendo la [API] in mg/cm² o in percentuale sull'uptake in funzione del tempo. Ogni valore è stato espresso come media con deviazione standard.

Nel caso della Vancomicina invece, i matracci contenenti i frammenti di MPB sono stati riempiti con tampone PBS pH 7,4 e posti in camera climatica a 37 °C e 60% UR. Ad intervalli di tempo regolari (ogni 60 ore) il fluido di rilascio è stato interamente prelevato e rimpiazzato con nuovo fluido, termostato alla stessa temperatura. La cinetica di rilascio degli API dalla membrana è stata valutata per un periodo totale di 20 giorni. Il liquido di rilascio è stato analizzato tramite spettrofotometro UV-vis, e, previo ottenimento di un'opportuna retta di taratura dello strumento, è stata ottenuta la concentrazione molare di Vanco nel tempo e da questa la [API] in mg/cm².

Ottenimento della retta di taratura per la rilevazione UV-vis degli API

La retta di calibrazione per CLO DG ($\lambda_{\max}=254$ nm) è stata ottenuta analizzando per via spettrofotometrica diverse concentrazioni di questo API a partire dalla soluzione madre 20% w/v (da $5 \cdot 10^{-5}$ M a $1 \cdot 10^{-6}$ M) in tampone acetato pH 6,5. Le Abs₂₅₄ sono state espresse in funzione della [CLO DG] e dai punti è stata ottenuta una retta di fitting.

La retta di calibrazione per PHMB ($\lambda_{\max}=236$ nm) è stata ottenuta analizzando per via spettrofotometrica diverse concentrazioni di questo API a partire dalla soluzione madre 0,1% w/v (da 0,000005% a 0,00004%) in tampone PBS pH 7,4. Le Abs₂₃₆ sono state espresse in funzione della [PHMB] e dai punti è stata ottenuta una retta di fitting.

La retta di calibrazione per Vancomicina ($\lambda_{\max}=280$ nm) è stata ottenuta analizzando per via spettrofotometrica diverse concentrazioni di questo API a partire dalla soluzione madre 6 mg/ml (da 0,01 mg/ml a 0,7 mg/ml) in tampone PBS pH 7,4. Le Abs₂₈₀ sono state espresse in funzione della [Vanco] e dai punti è stata ottenuta una retta di fitting.

2.3.5 Metodi per lo studio dell'attività antibiofilm complessiva del prototipo ottenuto

2.3.5.1 Test antibiofilm verso *Candida parapsilosis*

L'analisi è stata eseguita sui campioni di MPB funzionalizzate con diversi tipi di chitosano, ad alto, medio o basso peso molecolare e con chitosano più solidi lamellari, singoli o in mix, pre e post-uptake di clorexidina digluconato. È stata valutata anche la membrana nativa come controllo negativo (vedi Tabella 6). Ogni campione è stato analizzato in triplicato.

*Tabella 6. Campioni analizzati nei test anti-biofilm verso *C. parapsilosis**

Campione	Identificativo
MPB tal quale	A 1-3
MPB con CH HMW 2%	B 1-3
MPB con CH MMW 2%	C 1-3
MPB con CH LMW 2%	D 1-3
MPB con CH 2% + MgAlCO ₃	E 1-3
MPB con CH 2% + MgAlCO ₃ + CLO DG	EC 1-3
MPB con CH 2% + α -ZrP	F 1-3
MPB con CH 2% + α -ZrP + CLO DG	FC 1-3
MPB con CH 2% + ZrP nano	G 1-3
MPB con CH 2% + ZrP nano + CLO DG	GC 1-3
MPB con CH 2% + ZrP-tris	H 1-3
MPB con CH 2% + ZrP-tris + CLO DG	HC 1-3
MPB con CH 2% + mix solidi	I 1-3
MPB con CH 2% + mix solidi + CLO DG	IC 1-3
MPB con CH 2%	L 1-3
MPB con CH 2% + CLO DG	LC 1-3

I campioni di MPB con solo CH (B,C,D) sono stati ottenuti per immersione dei provini nelle soluzioni di adesione per 1' e poi liofilizzati. Quelli con CH + solidi lamellari (E,F,G,H,I) e solo CH per confronto (L) sono stati ottenuti con la procedura di bar-coating descritta al punto 1.6.3.3. Quelli con CH + solidi lamellari + CLO DG (EC,FC,GC,HC,IC,LC) sono stati ottenuti con una procedura identica a quella descritta al punto 1.6.4.2 (Uptake), ma invece di essere sottoposti a test di rilascio, sono stati direttamente liofilizzati dopo l'uptake. Una volta secco, di ogni campione è stato ottenuto

un dischetto di 1 cm di diametro tramite una fustellatrice. I provini sono stati chiusi ermeticamente in busta in alluminio e sottoposti a sterilizzazione via irradiazione con raggi γ .

Il ceppo di *Candida parapsilosis* T210U è stato inizialmente pre-inoculato in brodo YPD supplementato con cloramfenicolo (0,5 g/L) e incubato a 37 °C con agitazione per 22–24 ore. Al termine dell'incubazione, la crescita cellulare è stata valutata mediante misurazione della densità ottica a 600 nm (OD_{600}) e le cellule sono state successivamente diluite in terreno RPMI-1640 tamponato con MOPS (pH 7,0 $\pm$ 0,2) fino a raggiungere un' OD_{600} pari a 0,1.

La capacità dei ceppi di formare biofilm è stata valutata analizzando ogni provino in triplicato. Un volume noto della sospensione cellulare standardizzata è stato quindi trasferito in piastre multiwell da 12 pozzetti (2 mL per pozzetto). In ciascun pozzetto è stato inserito un provino sterile, posizionato con il lato rivestito (coating) rivolto verso l'alto e quello non rivestito verso il fondo. Le piastre sono state incubate a 37 °C per 24 ore per consentire l'adesione iniziale delle cellule e la maturazione del biofilm.

Al termine dell'incubazione, i provini sono stati prelevati mediante pinzette sterili e lavati due volte con acqua sterile per rimuovere le cellule non aderenti. I campioni sono stati quindi trasferiti su una nuova piastra multiwell sterile, sottoposti a liofilizzazione, fissati su stub per microscopia elettronica a scansione (SEM) mediante adesivo al carbonio, soffiati con aria compressa per rimuovere particolato non aderente e successivamente metallizzati. L'analisi SEM è stata quindi eseguita per osservare la formazione del biofilm.

Parallelamente, i terreni residui nei pozzetti sono stati sottoposti a lettura della densità ottica per verificare la crescita microbica. Dopo la rimozione del terreno, il fondo dei pozzetti è stato colorato con una soluzione di cristal violetto allo 0,1% per 15 minuti a temperatura ambiente. I pozzetti sono stati quindi lavati con acqua deionizzata per rimuovere il colorante in eccesso e osservati al microscopio ottico, al fine di valutare la presenza di biofilm sul fondo come controllo della crescita sulle superfici dei provini.

È stata tentata la colorazione dei provini di MPB con lo stesso colorante ma si è osservato che questo si lega in modo aspecifico al collagene della MPB, non permettendo di discriminare le cellule fungine.

2.3.5.2 Test antibiofilm verso *Staphylococcus epidermidis*

L'analisi è stata eseguita sui campioni di MPB funzionalizzata con biocolle e solidi lamellari e sulla membrana tal quale come riferimento (vedi Tabella 7). Ogni campione è stato analizzato in triplicato.

Tabella 7. Campioni analizzati nei test anti-biofilm verso *S. epidermidis*

Campione	Identificativo
MPB tal quale	RIF
MPB con CH 2% - COL 0,5% + mix solidi	M
MPB tal quale controllo senza ceppo	RIF ₀
MPB con CH 2% - COL 0,5% + mix solidi controllo senza ceppo	M ₀

I campioni di MPB con CH-COL e solidi lamellari sono stati ottenuti con la procedura descritta al punto 1.6.3.3. Di ogni campione è stato ottenuto un dischetto di 1 cm di diametro tramite una fustellatrice. I provini sono stati chiusi ermeticamente in busta in alluminio e sottoposti a sterilizzazione via irradiazione con raggi γ .

L'analisi microbiologica è stata eseguita ispirandosi alla norma tecnica ISO 4768 [152] che descrive un metodo per la determinazione di attività anti-biofilm su plastiche e superfici non porose, opportunamente adattata alla tipologia dei campioni oggetto di test.

Il ceppo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 6538 è stato preparato con le condizioni descritte dalla norma UNI EN 12353:2021 [153], messo in coltura liquida overnight a 37°C in agitazione in terreno TSB (Tryptic Soy Broth) e il giorno successivo, dopo misurazione dell'assorbanza (OD₆₀₀) è stata preparata una sospensione del ceppo compresa tra $1,0 \cdot 10^4$ - $1,0 \cdot 10^5$ UFC/ml in terreno TSB. Questa sospensione è stata piastrata in piastra multiwell da 96 pozzetti insieme alle MPB trattate (M) e non trattate (RIF), la piastra è stata incubata a 37°C per 48 ore. Sono stati inseriti nel test anche dei controlli sempre in triplicato consistenti nelle membrane incubate con solo terreno TSB senza aggiunta del ceppo (M₀ e RIF₀). Dopo 24 ore di incubazione è stato rimosso da tutti i pozzetti una parte di terreno esausto e sostituito con terreno TSB fresco, e la piastra reincubata per le altre 24 ore. Terminato il tempo di incubazione, le membrane sono state rimosse dai pozzetti con pinzette sterili e lavate in acqua sterile per rimuovere l'eccesso di terreno e le cellule non adese. L'eventuale biofilm adeso sulle membrane è stato recuperato tramite scraping, colorato con cristal violetto 0,1% per 30 minuti a temperatura ambiente, risospeso in un piccolo volume di acqua e centrifugato a 6000 rpm per 10 minuti. I lavaggi con acqua e i passaggi in centrifuga sono stati ripetuti fino a quando il surnatante è diventato limpido ed è comparso un pellet sul fondo della provetta. Tutto il surnatante è stato rimosso e il pellet è stato lasciato asciugare sotto cappa a flusso laminare, risospeso in SDS 1%, vortexato e lasciato a temperatura ambiente per 10 minuti. Sono state eseguite misurazioni allo spettrofotometro (OD₆₀₀) sia dei controlli sia dei campioni. Di ogni campione e controllo sono state eseguite tre misurazioni e i dati riportati sono la media delle tre. Come bianco è stata usata la OD₆₀₀ dell'SDS 1%.

La condizione di validità del test è che il titolo del ceppo microbico dopo 48 ore di incubazione a 37°C non risulti inferiore a $1,0 \times 10^6$ UFC/ml. L'attività anti-biofilm è stata determinata comparando i valori medi di assorbanza misurati nel trattato rispetto al controllo, e nello specifico sottraendo alla misurazione dell'assorbanza media ottenuta dal campione inoculato con il ceppo la misurazione dell'assorbanza del campione inoculato con terreno di crescita TSB.

$$\% \text{ di inibizione del biofilm} = (1 - (A/B)) * 100$$

Dove A = valore medio di assorbanza calcolato sui 3 replicati del campione trattato (M) dopo sottrazione del bianco (M₀) e B = valore medio di assorbanza calcolato sui 3 replicati del controllo negativo (RIF) dopo sottrazione del bianco (RIF₀).

3. Risultati e discussione

3.1 Caratterizzazione chimico-fisica e funzionale della MPB

Aspetto di una membrana in pericardio bovino (MPB) in forma umida e in forma secca (Figura 28).



Figura 28. Immagine di MPB in forma umida e in forma secca

Nella Figura 29 l’analisi termogravimetrica di uno dei campioni di MPB in forma umida, con riportati in blu la perdita di peso (%) e in rosso il flusso di calore (mW).

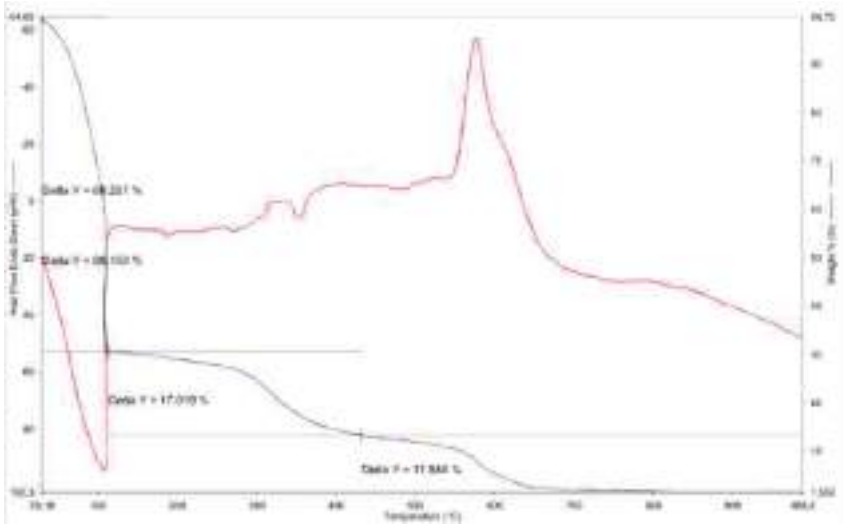


Figura 29. Analisi termogravimetrica di una MPB umida

La Tabella 8 di seguito riportata presenta i risultati della caratterizzazione delle MPB.

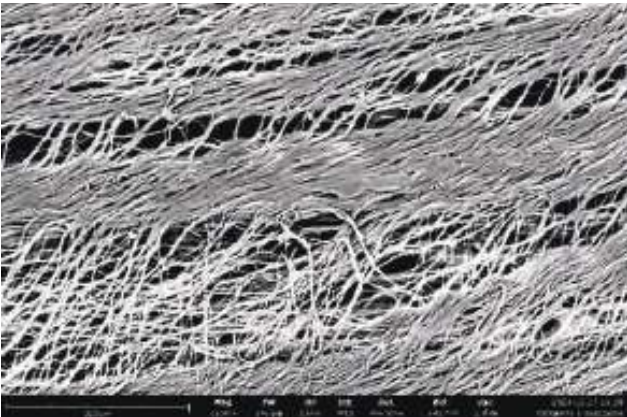
Tabella 8. Caratterizzazione chimico-fisica delle MPB

	MPB secca	MPB umida
Peso specifico (mg/cm²)	12,7±4,2	66,3±7,2
Spessore (mm)	0,250±0,100	0,220±0,100
Capacità di idratazione (%)	340±70	-
Capacità di disidratazione (%)	-	77±10
Umidità relativa (UR%)	70,2±5	Vedi paragrafo 3.6.2

Dalla capacità di idratazione si ottengono risultati notevoli, in quanto come di evince la MPB è in grado di assorbire acqua fino a più di 3 volte il suo peso secco, comportandosi come una “spugna” e con importanti prospettive per l’assorbimento delle soluzioni di API d’interesse.

La micro-struttura e la composizione elementare delle MPB ottenute tramite SEM ed EDX sono riportate in Figura 29 e 30 rispettivamente.

1500x



1000x

1000x



1000x

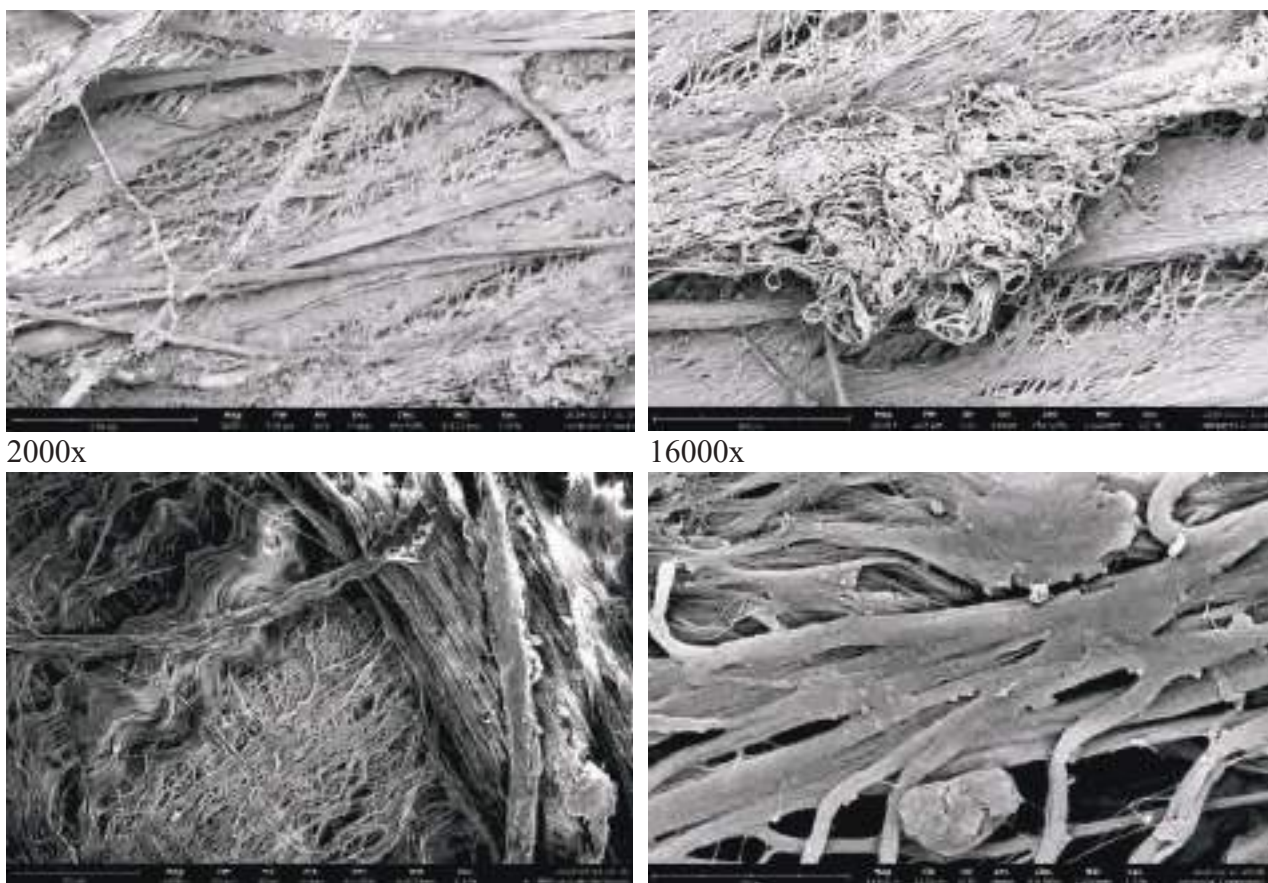


Figura 30. Immagini SEM a vari ingrandimenti delle MPB

Dalle immagini riportate in Figura 30 si può osservare come la MPB sia costituita da una struttura filamentosa con lunghe fibre di collagene di tipo I, quelle più spesse (circa 1-10 μm), lunghe e lineari, ed elastina, più rappresentate, arricciate e sottili (spessore fino a 1 μm).

L'analisi EDX (Figura 31) permette di evidenziare come i campioni siano costituiti essenzialmente dai classici elementi costitutivi delle macromolecole biologiche: C, N ed O.

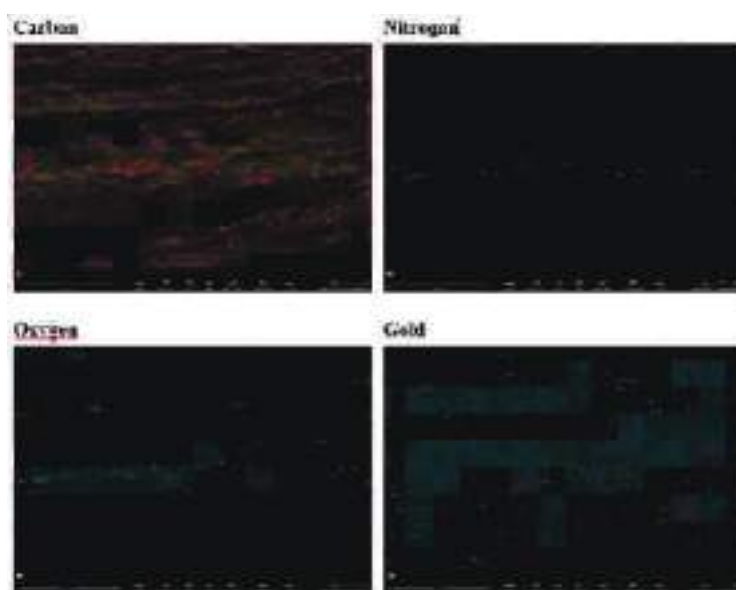


Figura 31. Caratterizzazione EDX delle MPB

3.2 Ricerca e sviluppo di metodi per il conferimento alla MPB di struttura 3D

3.2.1 Metodi per l'essiccamento

Per quanto riguarda lo studio delle modalità ottimali di essiccamento delle MPB, come si può osservare dalle Figure 32 e 33, relative all'aspetto visivo e alla microstruttura dei campioni a seguito delle procedure A-D, il trattamento migliore, che mantiene le proprietà strutturali della membrana inalterate, è la liofilizzazione (C). In tutti gli altri casi (trattamento con acetone A, essiccatore con P_2O_5 B, condizioni ambientali D), l'eccessiva disidratazione delle fibre porta a una completa perdita della loro integrità strutturale, spiegando anche l'aspetto macroscopico "plastificato" dei campioni.

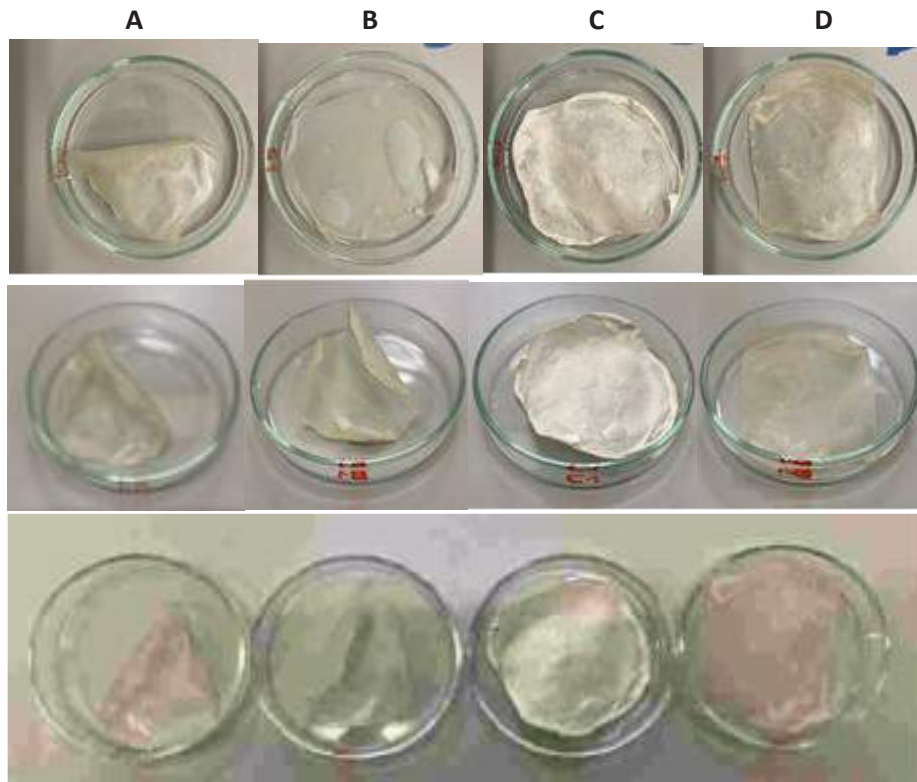
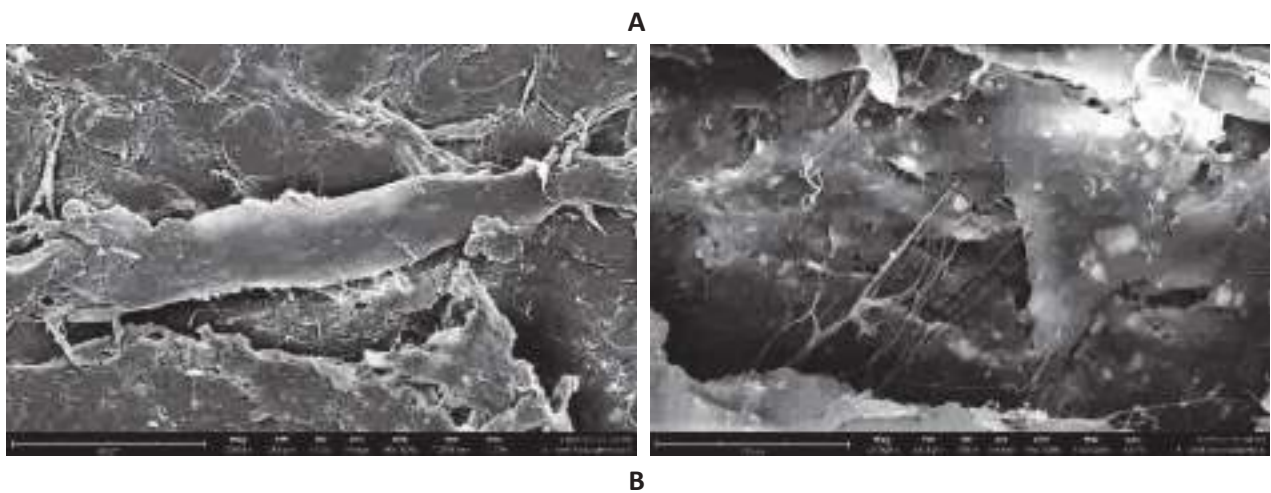


Figura 32. Aspetto visivo dei campioni di MPB a seguito delle procedure di essiccamento tramite acetone (A), essiccatore (B), liofilizzazione (C) e in condizioni ambientali (D)



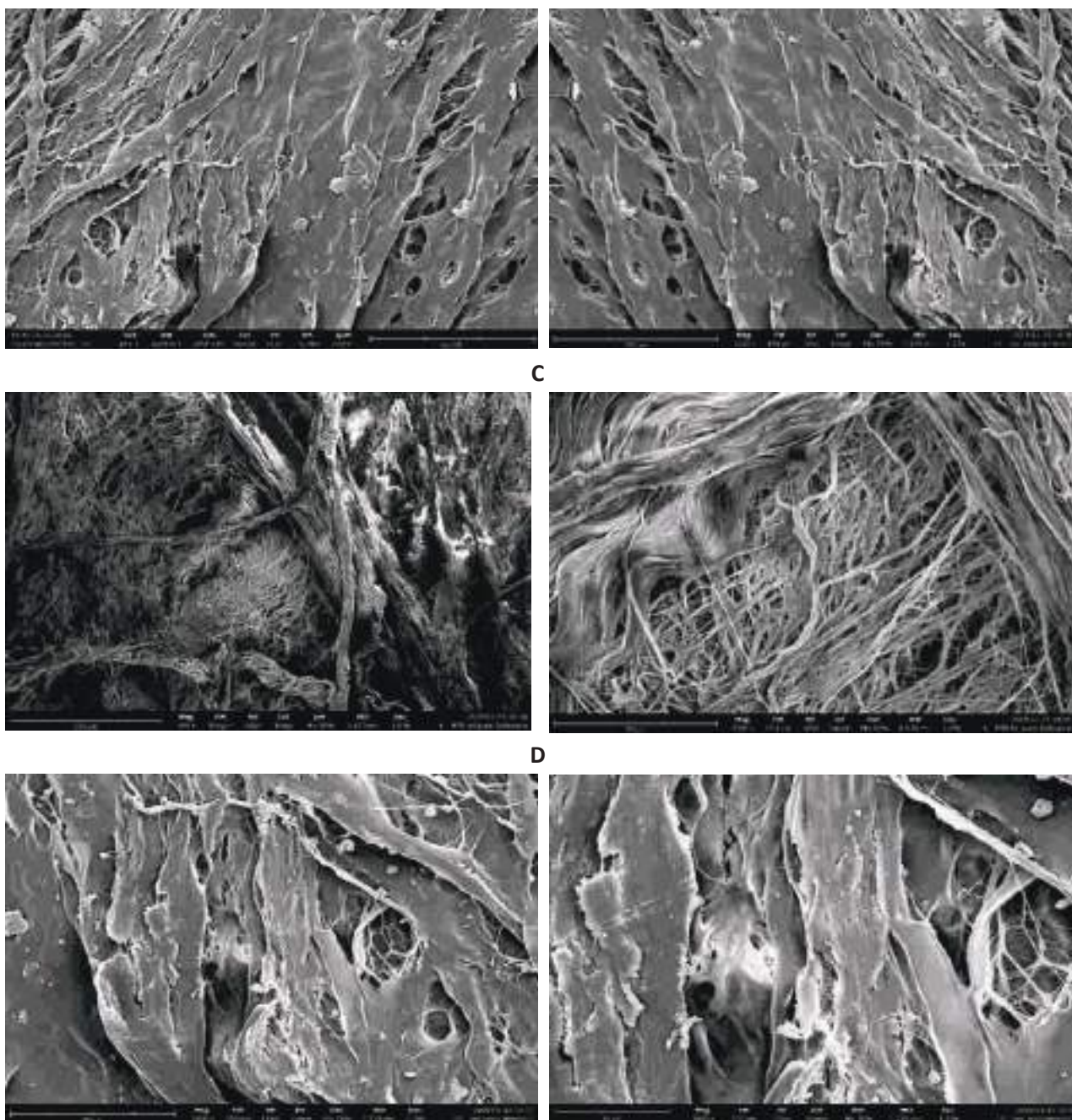
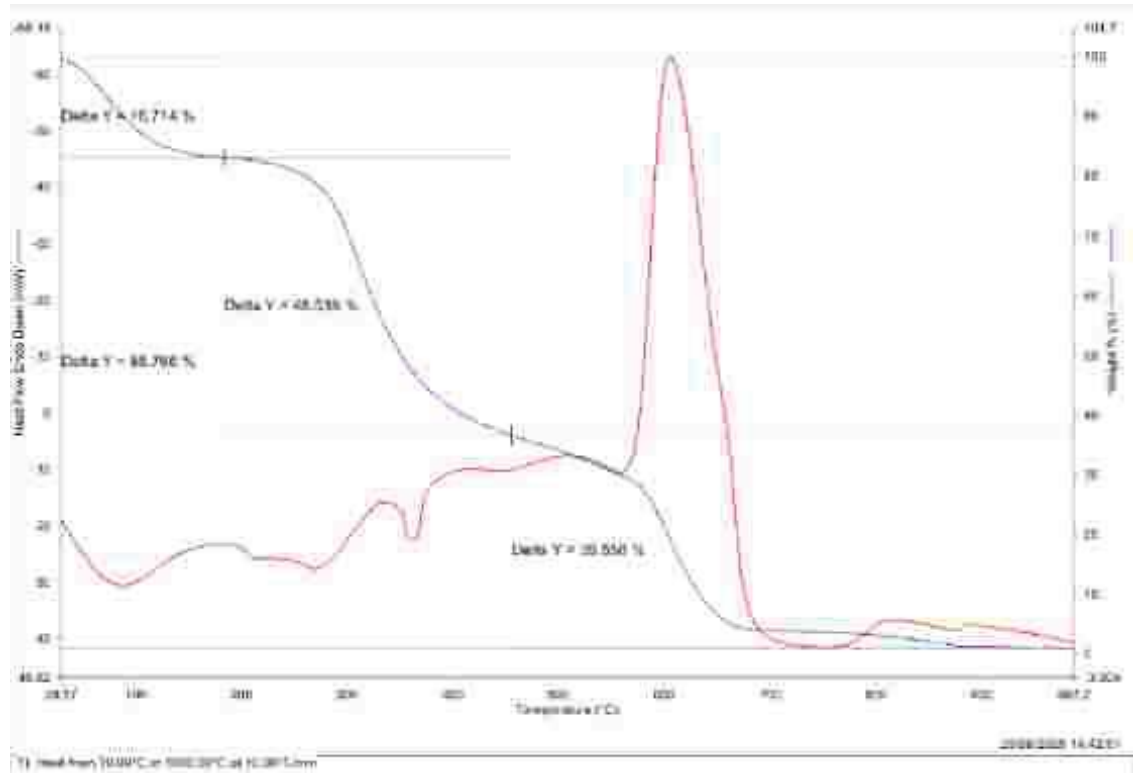


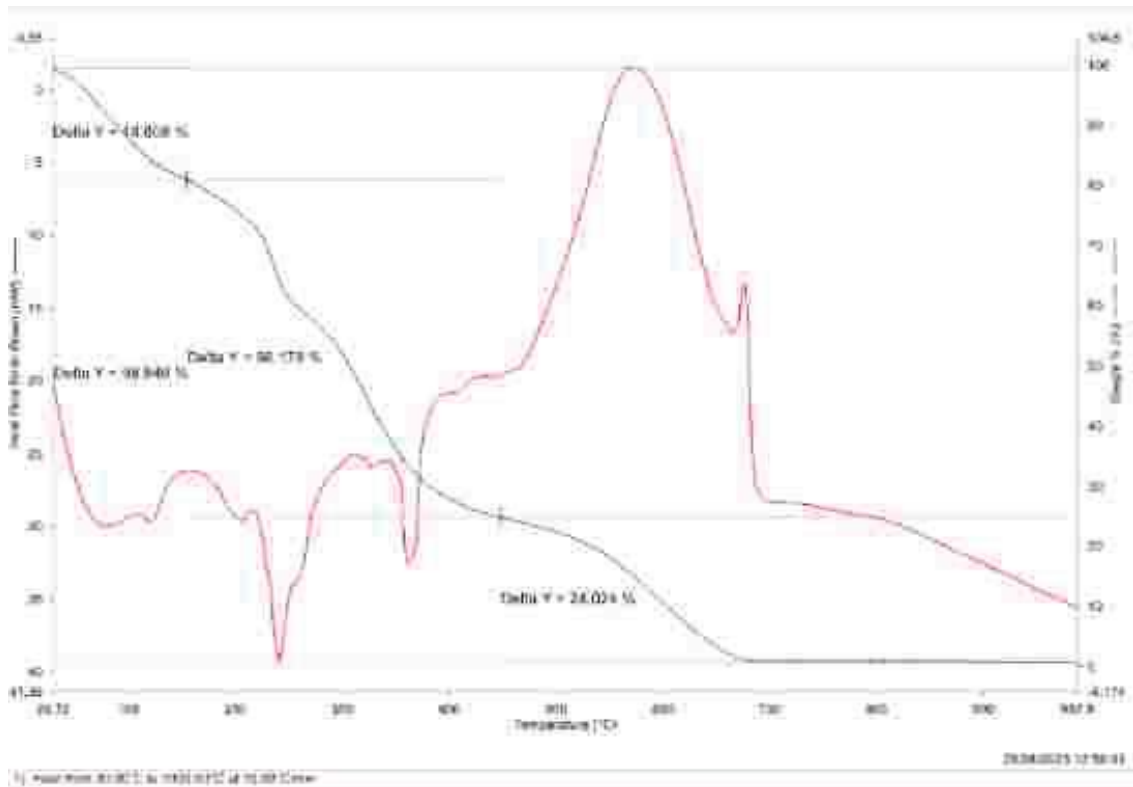
Figura 33. immagini SEM dei campioni di MPB a seguito delle procedure di essiccamento tramite acetone (A), essiccatore (B), liofilizzazione (C) e in condizioni ambientali (D)

L'analisi termogravimetrica TGA (Figura 34) ha confermato i dati ottenuti fornendo dei valori di umidità relativa (UR%), riportati in Tabella 9, che sono maggiori per i campioni sottoposti alle procedure A, B, D ($UR\% > 16\%$), e che infatti risultano eccessivamente disidratati visivamente e da analisi SEM rispetto alla procedura C ($UR\% = 12\%$). Anche i valori dello spessore mostrano un trend in concordanza con i dati ottenuti, essendo questo maggiore per i campioni A, B, D rispetto allo C.

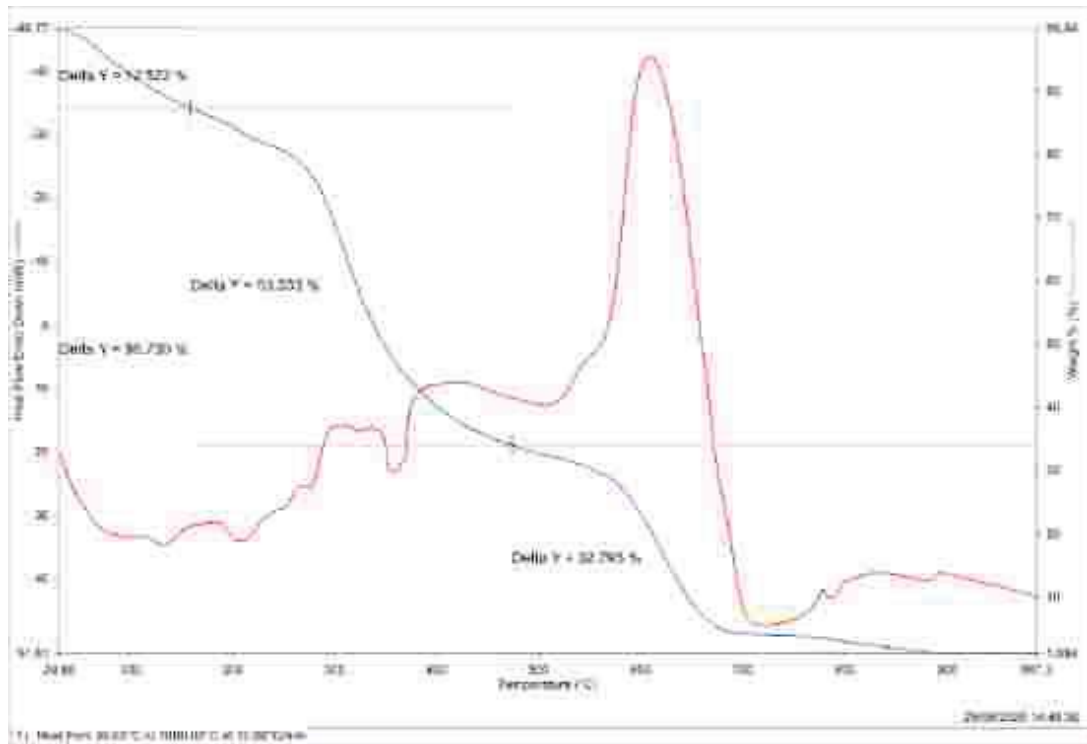
A



B



C



D

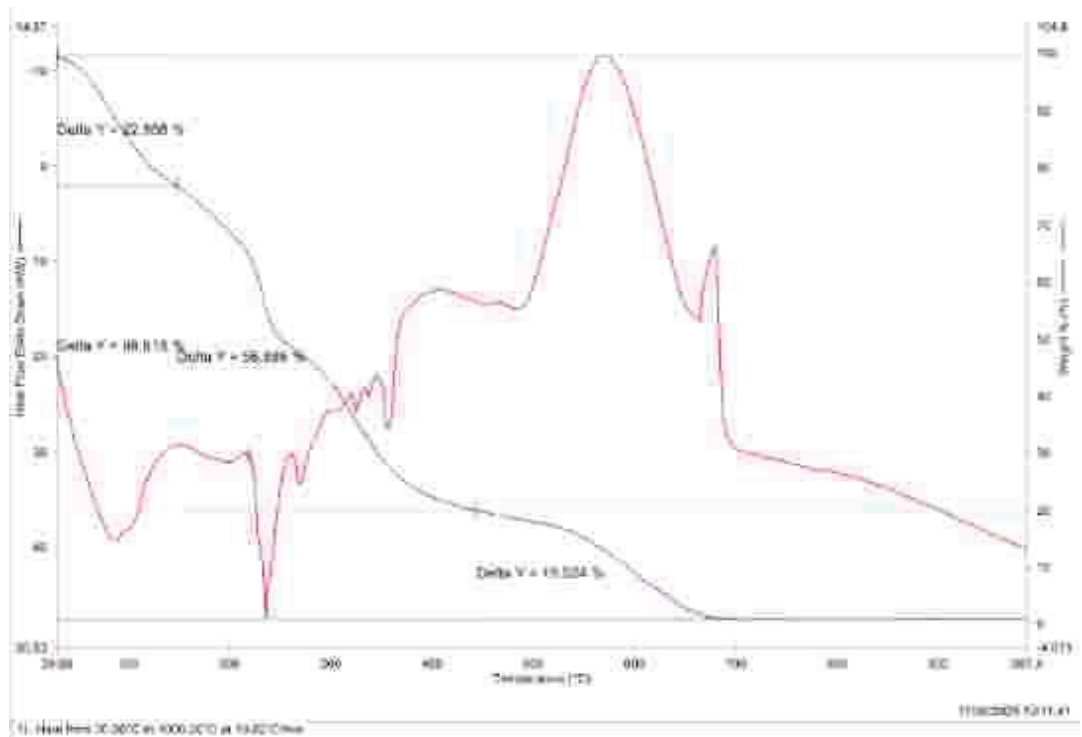


Figura 34. Analisi termogravimetrica delle MPB sottoposte alle prove di essiccamento A-D

Tabella 9. Umidità relativa (UR %) e spessore (mm) dei campioni sottoposti ad essiccamento (A-D)

Prova essiccamento	UR (%)	Spessore (mm)
A	16,5±2	0,390±0,100
B	18,0±2	0,430±0,100
C	12,7±2	0,250±0,100
D	22,6±3	0,420±0,100

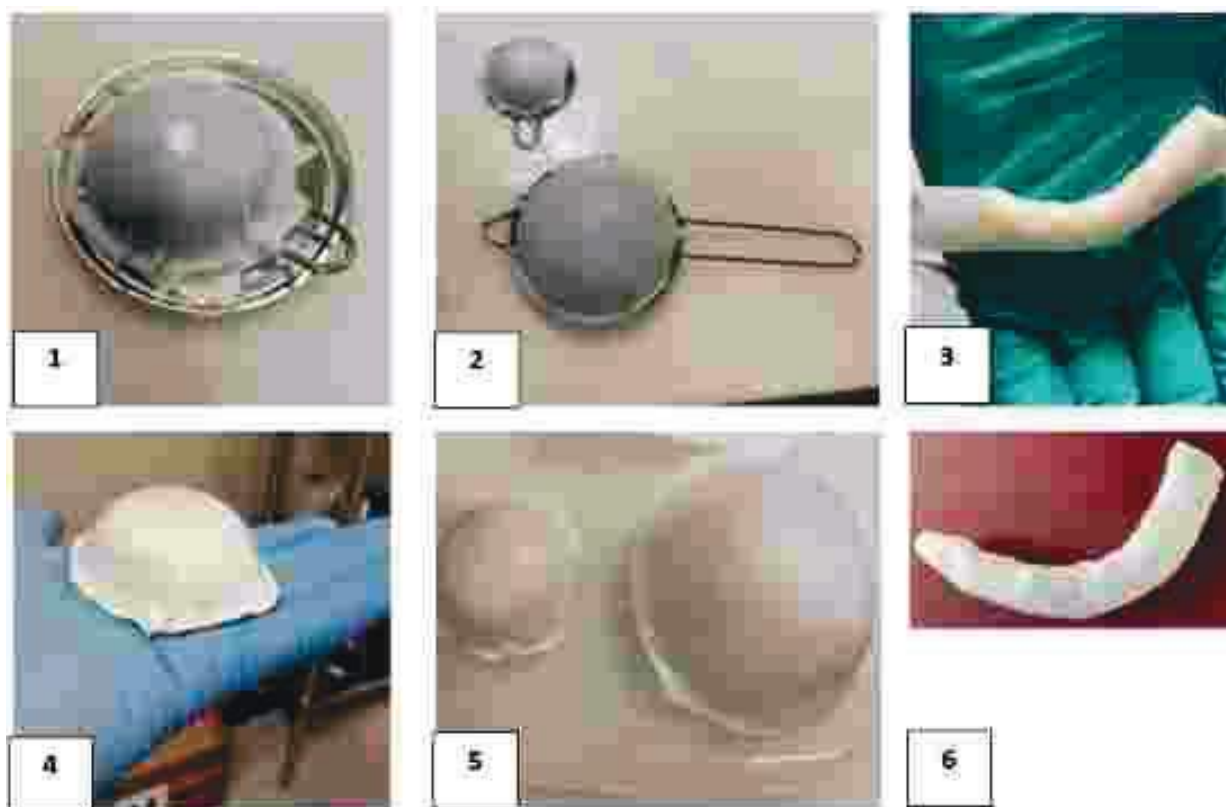


Figura 35. Immagini delle MPB su dime 1) a cupola piccola, 2) a cupola grande e 3) ad arco, dopo liofilizzazione: la conformazione 3D conferita dalla dima è mantenuta dalla MPB secca

La liofilizzazione è stata quindi selezionata come metodo di elezione per l'essiccamento delle MPB e in quanto tale è stata sempre utilizzata a seguito dei test di reticolazione e di adesione dei solidi analizzati in dettaglio nei paragrafi successivi.

Dal processo di liofilizzazione delle membrane direttamente su dima si è osservato che le stesse mantengono, da secche, la struttura 3D conferitagli (vedi Figura 35). È inoltre confermata l'idoneità dei materiali usati per le dime (acciaio inox e plastica PA12), nel mantenimento delle proprietà strutturali del PB. Chiaramente, il mantenimento della forma 3D non permane però in ambiente umido e perciò sono necessari trattamenti reticolanti.

3.2.2 Metodi per il cross linking

In Tabella 10 sono riportati i risultati della reticolazione effettuata sulle MPB tal quali (campioni A-B-C) e su quelle rivestite con CH HMW (campioni HA-HB-HC) e con CH MMW (campioni MA-MB-MC) con TPP, con GLU (controllo positivo) e non reticolate (controllo negativo).

Per quanto riguarda l'aspetto visivo e la rigidità, si può osservare dalla Tabella 10, che solo nel caso della GLU si ha una colorazione gialla e un irrigidimento delle membrane rispetto a quelle non trattate. Per quanto riguarda l'aumento di peso dovuto all'assorbimento di acqua dopo 24h, si può osservare che, come rappresentato nel grafico in Figura 37, all'interno di ogni serie di campioni (CH HMW, CH MMW e MPB tal quali), nel caso del trattamento con TPP si ha un aumento di peso superiore a quello che si ha nel caso del trattamento con GLU, ma minore rispetto ai campioni non trattati, indicando una reticolazione più blanda di quella con GLU ma che permette di avere risultati in termini di assorbimento di acqua migliori rispetto ai campioni non trattati. Confrontando invece i risultati ottenuti per MPB rivestite con CH o tal quali, si hanno risultati migliori in termini di assorbimento di acqua (minore aumento di peso %) per le membrane trattate con CH rispetto a quelle

non rivestite, ad indicare un effetto sinergico della reticolazione del collagene di membrana e del chitosano del coating.

Tabella 10. Valori di W_0 , W_{24h} , $W\%$, rigidità e aspetto dei campioni di membrane con CH HWM, MMW e tal quali trattati con TPP, GLU e bianchi.

Nome campione	Trattamento	W_0 (g)	W_{24h} (g)	$W\%$	Media $W\%$	SD $W\%$	Rigidità	Aspetto
HA1	bianco	0,317	1,1109	351	356	4	2	bianco
HA2	bianco	0,281	1,1005	358			2	bianco
HA3	bianco	0,210	0,7543	359			2	bianco
HB1	TPP	0,352	1,1786	335	329	7	2	bianco
HB2	TPP	0,221	0,7271	330			2	bianco
HB3	TPP	0,251	0,806	321			2	bianco
HC1	GLU	0,340	1,0363	305%	305	4	3	giallo
HC2	GLU	0,265	0,8192	309			3	giallo
HC3	GLU	0,454	1,3721	302			3	giallo
MA1	bianco	0,248	0,9069	366	361	4	2	bianco
MA2	bianco	0,303	1,09	360			2	bianco
MA3	bianco	0,306	1,0955	358			2	bianco
MB1	TPP	0,306	1,0404	340%	344	5	2	bianco
MB2	TPP	0,298	1,0192	342			2	bianco
MB3	TPP	0,287	1,0045	350			2	bianco
MC1	GLU	0,302	0,9422	312	314	5	3	giallo
MC2	GLU	0,299	0,9568	320			3	giallo
MC3	GLU	0,257	0,7992	311			3	giallo
A1	bianco	0,171	0,6296	368%	362	8	2	bianco
A2	bianco	0,203	0,7409	365			2	bianco
A3	bianco	0,199	0,7025	353			2	bianco
B1	TPP	0,202	0,7373	365	357	10	2	bianco
B2	TPP	0,220	0,792	360			2	bianco
B3	TPP	0,189	0,652	345			2	bianco
C1	GLU	0,178	0,5874	330%	325	5	3	giallo
C2	GLU	0,189	0,6142	325			3	giallo
C3	GLU	0,201	0,6452	321			3	giallo

Per quanto riguarda il mantenimento della forma a seguito di reticolazione, dalla Figura 36 si può osservare come a seguito del processo le membrane mantengano la forma 3D impostagli dalla dima. Dopo 24h in ambiente in umido invece, a differenza dell'atteso (cioè che i campioni reticolati mantengano la forma per più tempo), si osserva in tutti i casi una perdita della forma conferita dalla dima, rendendo questo metodo non particolarmente informativo del grado di cross linking (Figura 38).

In conclusione, si è ottenuto che il TPP ha un effetto sull'assorbimento di acqua da parte dei campioni di membrane migliorativo rispetto alle membrane non trattate, anche se più blando di GLU, e non da criticità a livello di variazione delle proprietà meccaniche ed elastiche del tessuto, a differenza della GLU. Tuttavia dato il mancato riscontro a livello di mantenimento della forma 3D in ambiente umido, sono necessari ulteriori studi sulle condizioni d'uso del TPP e sulla sua valutazione, anche tramite tecniche quali FTIR, TGA e SEM.

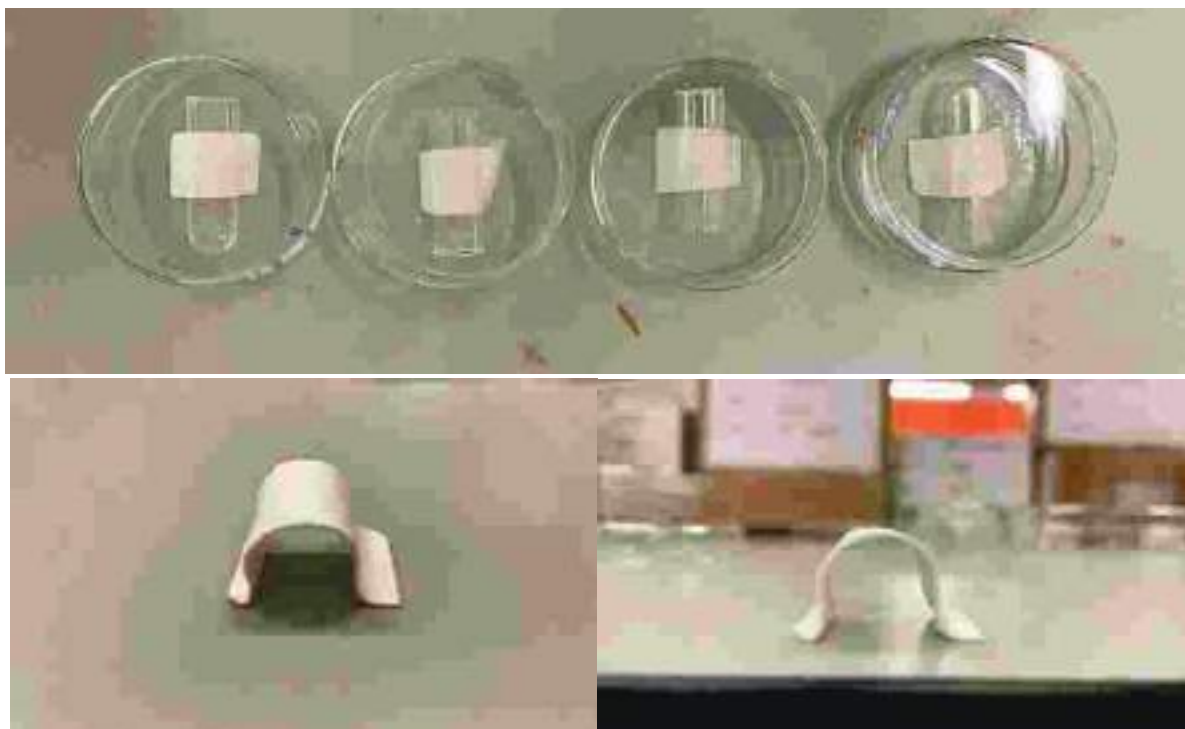


Figura 36. Alcune MPB durante il trattamento con le soluzioni di cross-linking e dopo liofilizzazione

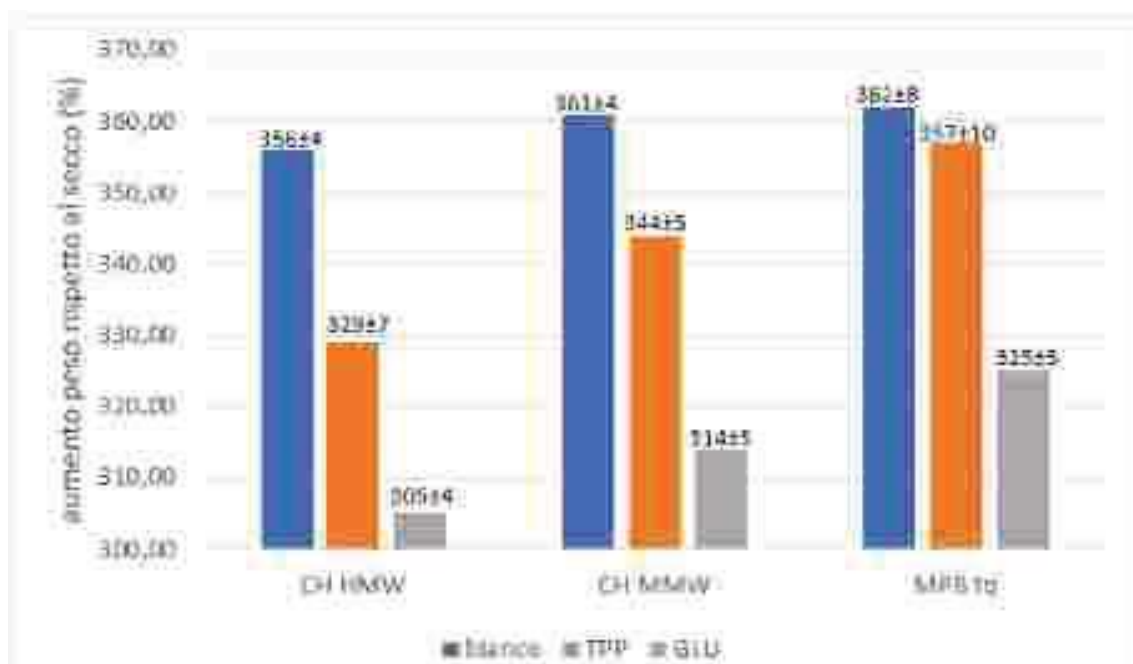


Figura 37. Aumento di peso delle MPB dopo 24 h in tampone PBS: in blu i bianchi, in arancione le membrane reticolate con TPP e in grigio le membrane reticolate con GLU

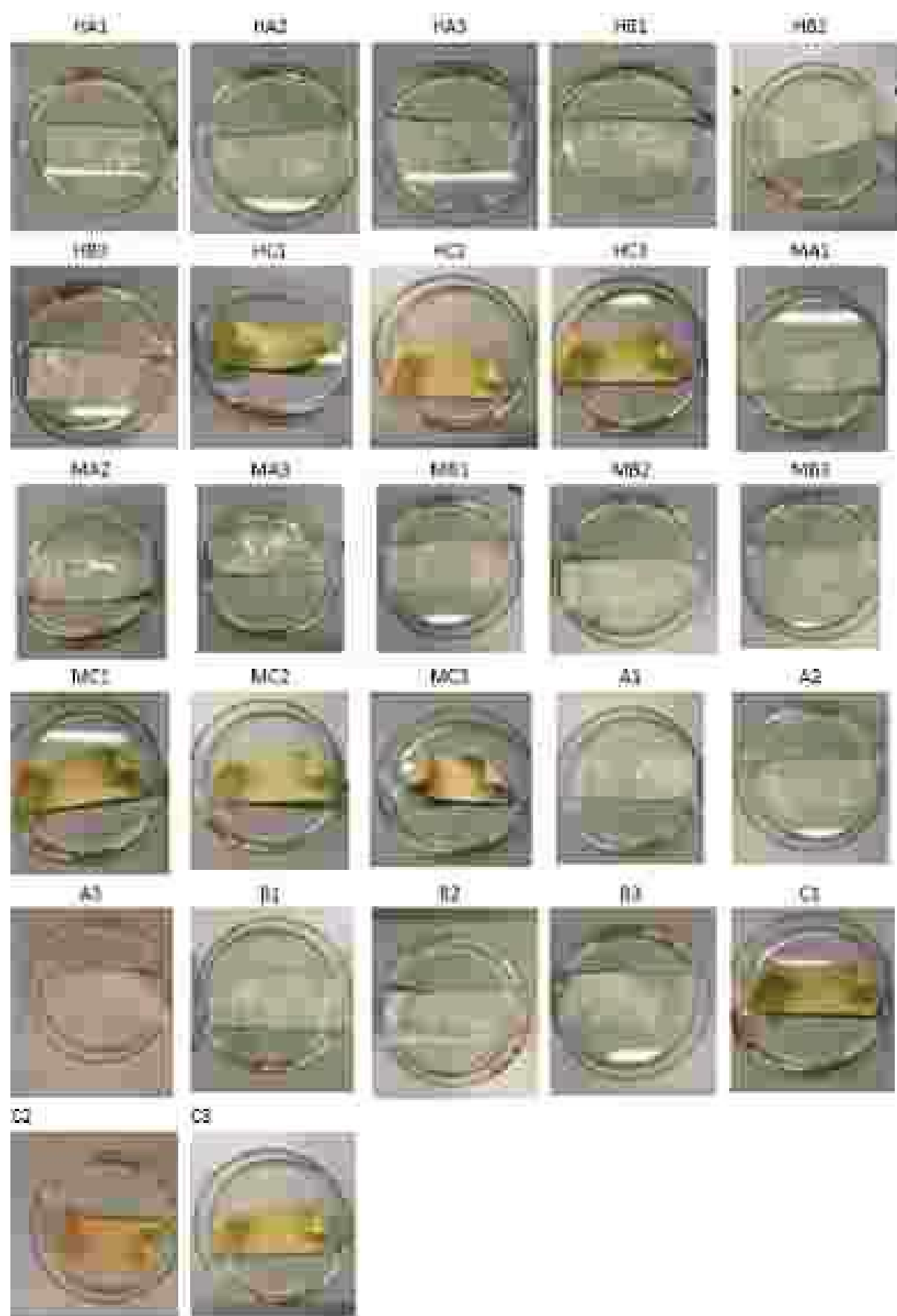


Figura 38. MPB con CH HWM, MMW e tal quali trattate con TPP, GLU e bianchi dopo 24 h in tampone PBS

3.3.1 Sintesi e caratterizzazione dei solidi lamellari

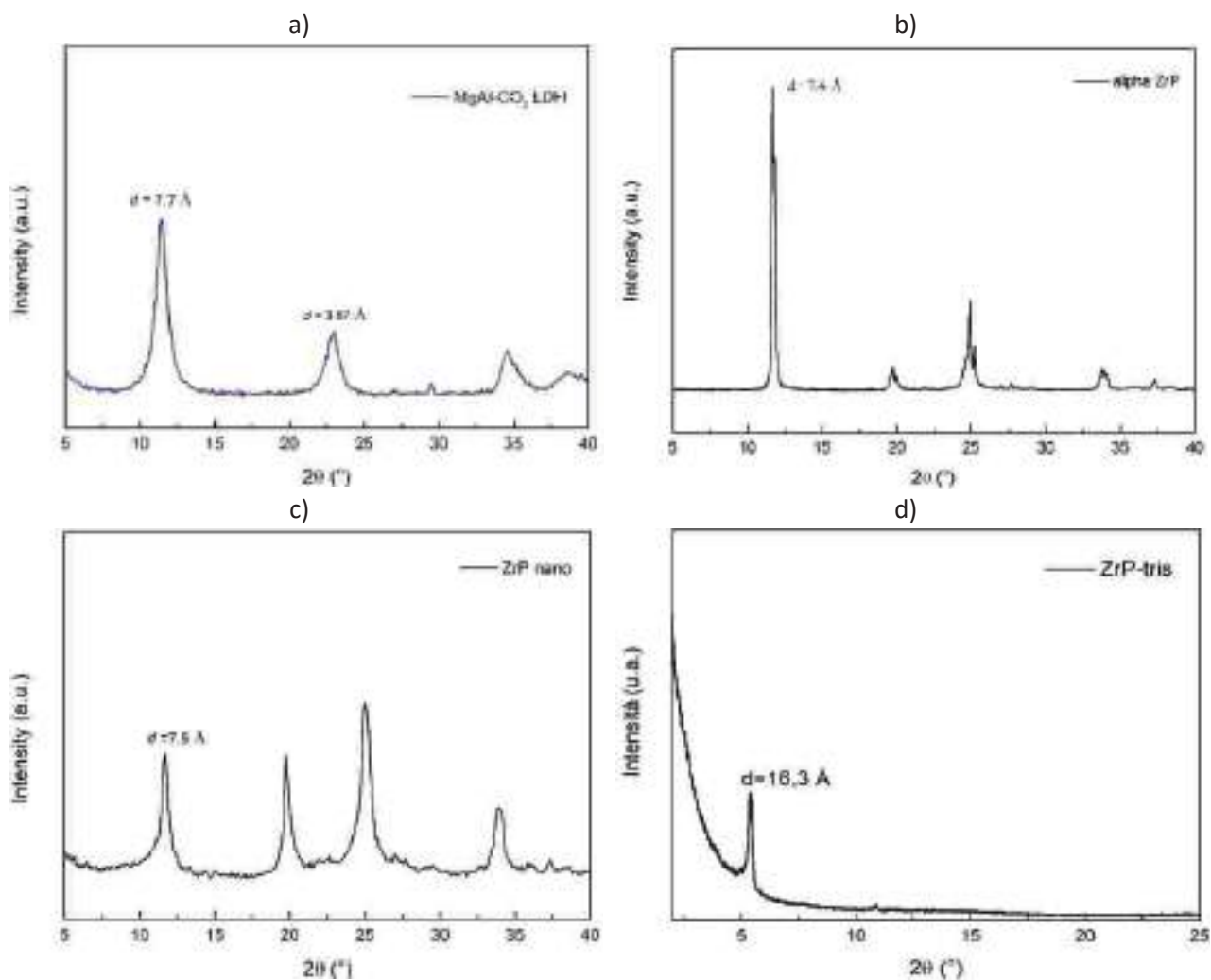


Figura 39. Spettri XRD dei solidi lamellari utilizzati a) MgAlCO_3 , b) α -ZrP, c) ZrP nano e d) ZrP-tris

Dall'analisi XRD in Figura 39 è resa evidente la struttura cristallina tipica dei solidi lamellari, con spettri con segnali di diffrazione che indicano distanze interstrato di a) 7,7 Å per l'idrotalcite MgAlCO_3 3:1, b) 7,6 Å per α -ZrP, c) 7,5 Å per ZrP nanometrico e d) 16,3 Å per ZrP-tris.

Immagini dei prodotti delle sintesi sono riportati in Figura 40.

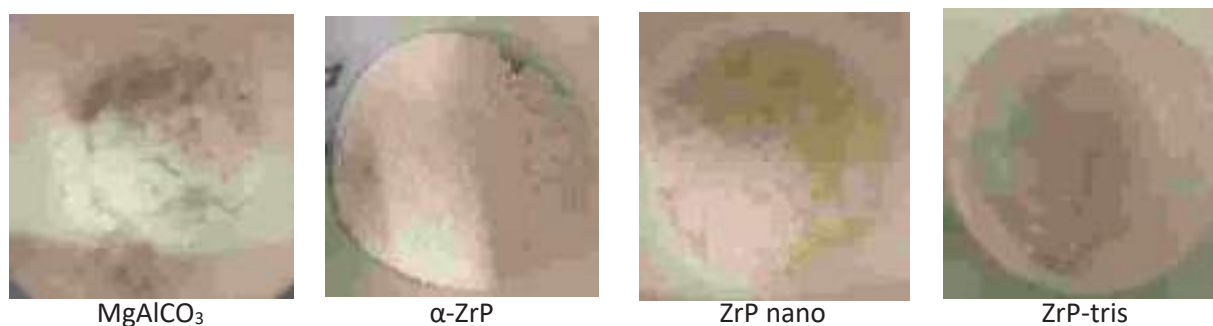


Figura 40. Aspetto macroscopico dei solidi lamellari sintetizzati

Dalle analisi dimensionali combinate (granulometria tramite diffrazione laser, DLS e BET), indicate in Tabella 11, si può osservare come idrotalcite MgAlCO_3 3:1 e α -ZrP abbiano una D_{90} di pochi micron e un'area superficiale di qualche decina di m^2/g . ZrP-tris ha D_{90} sotto al micron, mentre non

è stato possibile eseguire la BET. Per quanto riguarda ZrP nano, non è stato possibile seguire alcuna misura perché la dimensione nanometrica si mantiene solo in dispersione e per questo ci si avvale solamente dei dati SEM.

Tabella 11. Analisi dimensionali dei solidi lamellari utilizzati

solido	Dimensioni	BET (m ² /g)
MgAl-CO ₃ 3:1	D ₁₀ =3,9 μm; D ₅₀ =4,8 μm; D ₉₀ =6,1 μm	42,23
α-ZrP	D ₁₀ =1,6 μm; D ₅₀ =2,1 μm; D ₉₀ =4,8 μm	10,47
ZrP nano	-	-
ZrP-tris	D ₁₀ =0,4 μm; D ₅₀ =0,6 μm; D ₉₀ =0,8 μm	-

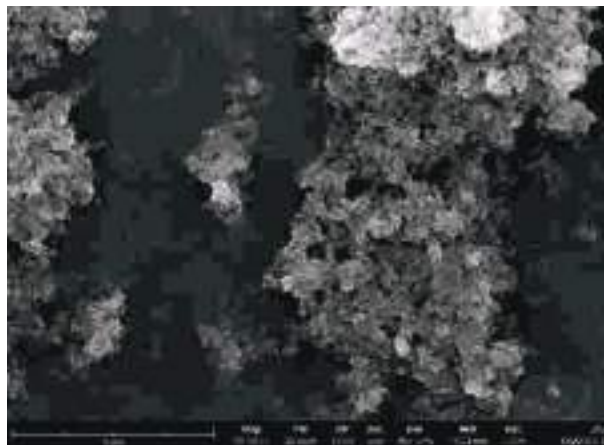
Dalle foto SEM (in Figura 41) è stato possibile confermare le caratteristiche dimensionali dei solidi lamellari utilizzati. L'idrotalcite MgAlCO₃ 3:1 presenta particelle di dimensioni intorno a qualche unità di micron, così come il α-ZrP, con particelle pseudo-esagonali. Il ZrP nano è costituito da aggregati di particelle di dimensioni inferiori a 1 μm. Non è stato possibile eseguire l'analisi per ZrP-tris. Per quanto riguarda l'analisi EDX (in Figura 42) è confermata la composizione negli elementi tipici dei solidi (Mg, Al, O per l'idrotalcite; Zr, P, O per il fosfato di zirconio).

MgAlCO₃ 3:1

10000x



20000x



α-ZrP

10000x

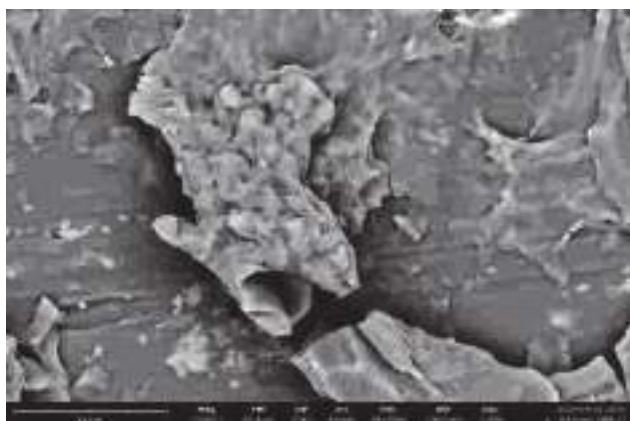


25000x



ZrP nano

10000x



13000x

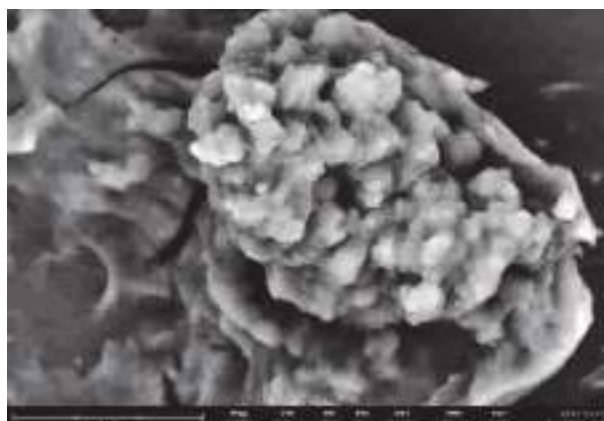


Figura 41. Immagini SEM dei solidi lamellari utilizzati

MgAlCO₃ 3:1



α -ZrP

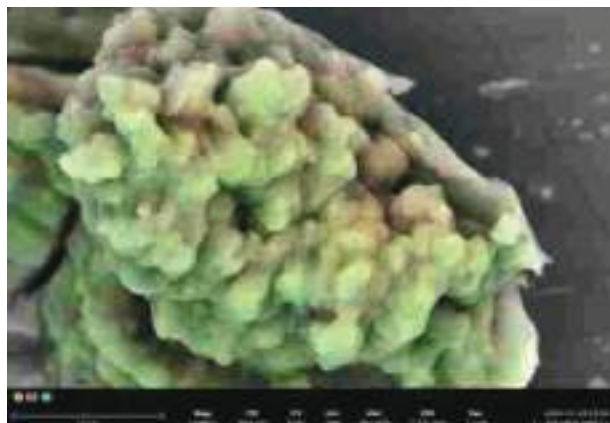


Figura 42. Analisi EDX dei solidi lamellari utilizzati

3.3.2 Preparazione e caratterizzazione delle biocolle

Nella Tabella 12 e Figura 43, le soluzioni di biocolle preparate. I dati mancanti di pH e viscosità sono riscontrati nei casi di mancata solubilizzazione della biocolle (30-32) o di impossibilità a misurare la viscosità (24-29) perché al di sotto del limite strumentale.

Di tutte le soluzioni di adesione preparate, quelle con concentrazione di acido acetico al 2% sono state escluse poiché il pH risultante era troppo basso per il range di stabilità delle idrotalciti (il cui limite inferiore è pH=4). Tra le rimanenti, sono state selezionate quelle di CH e COL 0,5%, CH e GEL 0,5%, COL 0,5% e GEL 0,5% (w/v), perché nelle altre sono stati riscontrati problemi di solubilizzazione della biocolle o di stabilità. Le soluzioni selezionate (indicate in Tabella 7 con un *) sono state valutate verso i solidi lamellari e le MPB.



Figura 43. Immagini di alcune delle soluzioni di adesione testate

Tabella 12. Tabella riassuntiva delle soluzioni di adesione testate

Soluzione di bioadesivo	Tipo CH	[acido acetico]	Altre biocolle	pH	Viscosità (cP)
1*	LMW	1%	-	4,5	41,96
2*	LMW	1%	-	5,5	30,00
3*	LMW	1%	-	6,5	35,71
4	LMW	2%	-	3,8	40,86
5*	MMW	1%	-	4,3	216,53
6	MMW	2%	-	4,3	220,65
7*	HMW	1%	-	4,2	253,12
8	HMW	2%	-	3,7	255,04
9*	LMW	1%	COL 0,5%	4,5	50,71
10	LMW	1%	COL 1%	4,6	48,20
11	LMW	1%	COL 2%	4,6	47,85
12*	MMW	1%	COL 0,5%	4,3	220,45
13	MMW	1%	COL 1%	4,3	223,03
14	MMW	1%	COL 2%	4,4	218,98
15*	HMW	1%	COL 0,5%	4,5	250,01
16	HMW	1%	COL 1%	4,2	249,34
17	HMW	1%	COL 2%	4,2	250,56
18*	LMW	1%	GEL 0,5%	4,3	40,66
19*	MMW	1%	GEL 0,5%	4,5	218,55
20*	HMW	1%	GEL 0,5%	4,1	249,54
21	LMW	1%	CEL 0,5%	4,5	40,13
22	MMW	1%	CEL 0,5%	4,3	220,65
23	HMW	1%	CEL 0,5%	4,6	254,70
24*	-	-	COL 0,5%	3,9	-
25	-	-	COL 1%	3,6	-
26	-	-	COL 2%	3,1	-
27*	-	-	GEL 0,5%	5,4	-
28	-	-	GEL 1%	5,3	-
29	-	-	GEL 2%	5,4	-
30	-	-	CEL 0,5%	-	-
31	-	-	CEL 1%	-	-
32	-	-	CEL 2%	-	-

Per quanto riguarda l'effetto delle soluzioni di adesione sulle MPB, è stato osservato per tutte che, a seguito del trattamento, mantengono inalterate le loro proprietà visive (no plastificazione), e l'integrità strutturale è confermata dalle immagini SEM (Figura 44). Si può osservare perdita di tridimensionalità rispetto alle membrane native, per via della presenza del film polimerico che copre le fibre, ma si nota anche che al di sotto di tale film l'integrità della rete delle fibre permane, a differenza di quanto visto precedentemente per la plastificazione e ad indicare come le soluzioni di adesione non compromettano l'integrità delle membrane. Essendo l'esito identico per tutte, in Figura 44 sono riportate le immagini sono dei test relativi alla Soluzione 3*.

Per quanto riguarda l'effetto delle soluzioni di adesione sui solidi, dalla Tabella 14 si può osservare come in tutti i campioni il peso residuo sia superiore al 90% rispetto al peso iniziale e quindi come in tutte le soluzioni testate i solidi rimangano stabili.

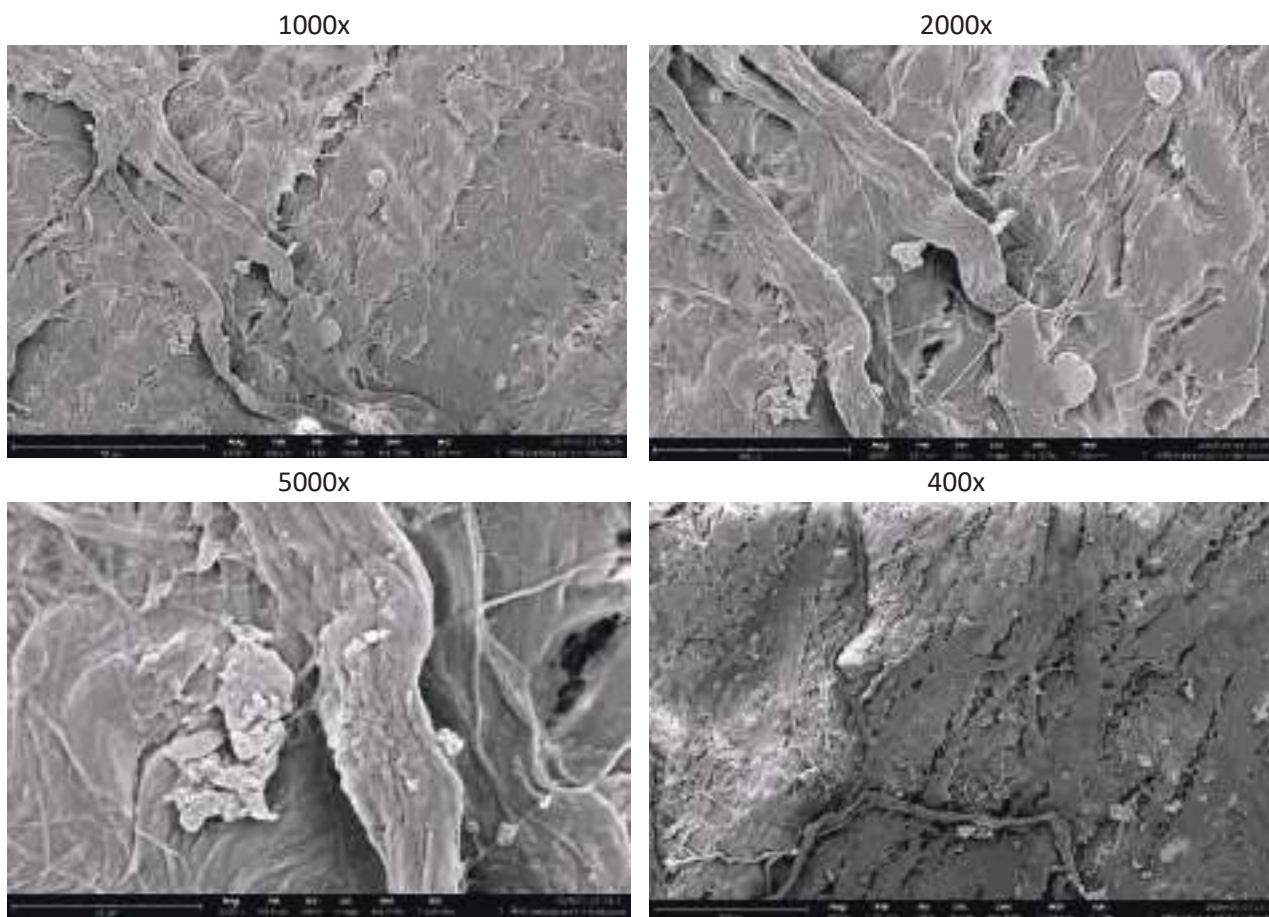


Figura 39. Immagini SEM delle MPB dopo trattamento con la soluzione di adesione 3*

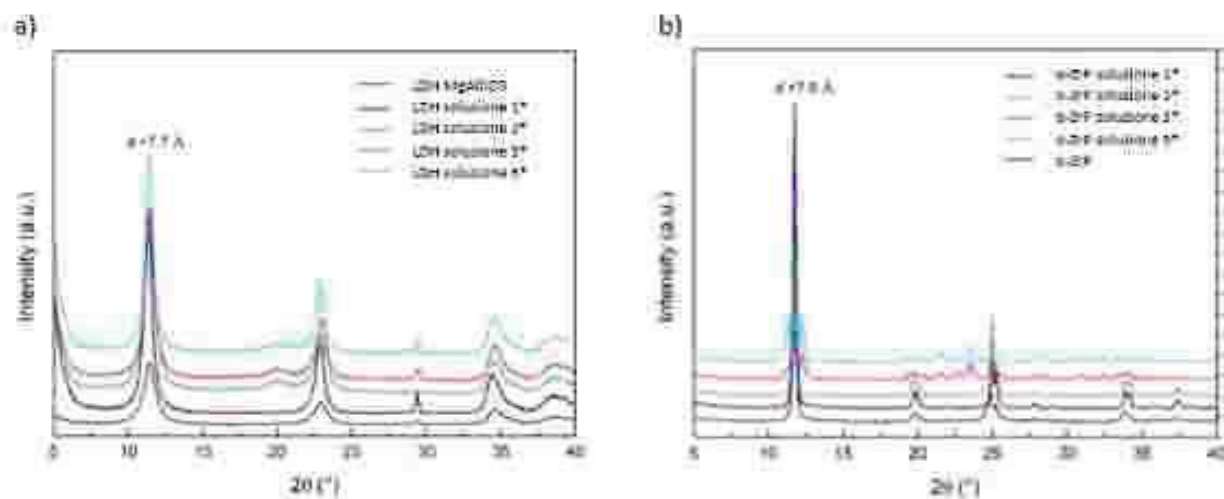


Figura 45. Spettri XRD di a) MgAlCO_3 e b) $\alpha\text{-ZrP}$ dei solidi prima e dopo contatto con le soluzioni di adesione 1*, 2*, 3* e 5*

Dagli spettri XRD dei solidi dopo la dispersione nelle soluzioni di biocolle (in Figura 45, sono riportati gli spettri solo per i test nelle soluzioni 1*, 2*, 3*, 5*) si può osservare che la distanza interstrato tipica dei solidi MgAlCO_3 (7,7 Å) e $\alpha\text{-ZrP}$ (7,5 Å) rimane invariata rispetto agli spettri dei solidi iniziali, a confermare che i solidi non hanno subito processi di intercalazione dovuti al contatto con le soluzioni di adesione e rimangono proattivi al caricamento con API.

Dall'analisi ICP della MgAlCO_3 3:1 (Tabella 13, riportati i risultati solo per le soluzioni 1*, 2*, 3* e 5*) si osserva che la perdita in peso dell'Al a seguito del trattamento con le soluzioni di biocolle è in ogni caso inferiore allo 0,01%, perciò la porzione di idrotalcite disciolta in soluzione è trascurabile.

Tabella 13. Effetto delle soluzioni di adesione 1*,2*,3* e 5* su $MgAlCO_3$ (% Al disciolto)

prova	g teorici Al in $MgAlCO_3$ 3:1	ppm Al rilevati nelle acque	mg Al disciolto nelle acque	Perdita in peso dell'Al (%)
1*	0,0981	0,089	0,0103	0,010%
2*	0,1115	0,055	0,0064	0,006%
3*	0,1289	0,046	0,0056	0,004%
5*	0,1466	0,039	0,0049	0,003%

Tabella 14. Effetto delle soluzioni di adesione sulle MPB e sui solidi $MgAlCO_3$ e α -ZrP (peso residuo wt % e XRD)

Soluzione di bioadesivo	Effetto sulle MPB	wt %		XRD solidi	
		$MgAlCO_3$	α -ZrP	$MgAlCO_3$	α -ZrP
1*	Ok	92	97	Ok	Ok
2*	Ok	91	94	Ok	Ok
3*	Ok	97	98	Ok	Ok
5*	Ok	97	99	Ok	Ok
7*	Ok	93	96	Ok	Ok
9*	Ok	92	94	Ok	Ok
12*	Ok	96	92	Ok	Ok
15*	Ok	96	95	Ok	Ok
18*	Ok	98	98	Ok	Ok
19*	Ok	92	92	Ok	Ok
20*	Ok	94	97	Ok	Ok
24*	Ok	96	98	Ok	Ok
27*	Ok	95	92	Ok	Ok

Dal momento che tutte le soluzioni selezionate si sono dimostrate compatibili verso la stabilità dei solidi lamellari e dell'integrità strutturale di membrana, tutte sono state considerate idonee per i test di adesione dei solidi sulle MPB. Si è deciso di scegliere come soluzione modello da testare quella a pH più vicino alla neutralità (soluzione 3*) in modo da essere il più compatibile possibile con il sito di impianto, il più tollerabile possibile per la stabilità dei solidi lamellari, pur mantenendo una leggera acidità in grado di conferire carattere policationico al chitosano.

3.3.3 Sviluppo del protocollo di adesione e relativa valutazione

3.3.3.1 Scelta del metodo di adesione

Di seguito alcune immagini (Figura 46) delle procedure utilizzate per l'adesione dei solidi alle MPB: a) filtrazione, b) ultra-turrax, c e d) piastre petri modificate per l'immersione, e) dispersioni solido-biocolla, f) provino post gocciolamento, g e h) fissaggio dei provini dopo bar-coating e i) bar-coater.

In Tabella 15 sono riportate le prove effettuate per lo studio dei metodi di adesione dei solidi lamellari alle MPB tramite biocolla. Per ogni metodo (A-D) sono riportati 3 test (ad esempio metodo A: A1, A2, A3), il controllo con acqua e solidi (A4) e il controllo con sola biocolla (A5). I parametri oggetto di valutazione sono individuati con un numero da 1 a 5; ad ogni parametro è stato assegnato un punteggio da 1 (peggior risultato) a 3 (miglior risultato).

Il metodo di filtrazione è stato immediatamente scartato in quanto le MPB non risultano permeabili alla soluzione di biocolla (anche se diluita con acqua fino a un rapporto 1:20, come verificato da test non riportati in Tabella), ma solo all'acqua, ma quest'ultima non è sufficiente per garantire l'adesione dei solidi alla MPB. Nel metodo di gocciolamento, si è osservata una scarsa adesione del film sulla membrana e una scarsissima omogeneità della dispersione sui campioni ottenuti e quindi una scarsa riproducibilità del metodo stesso.

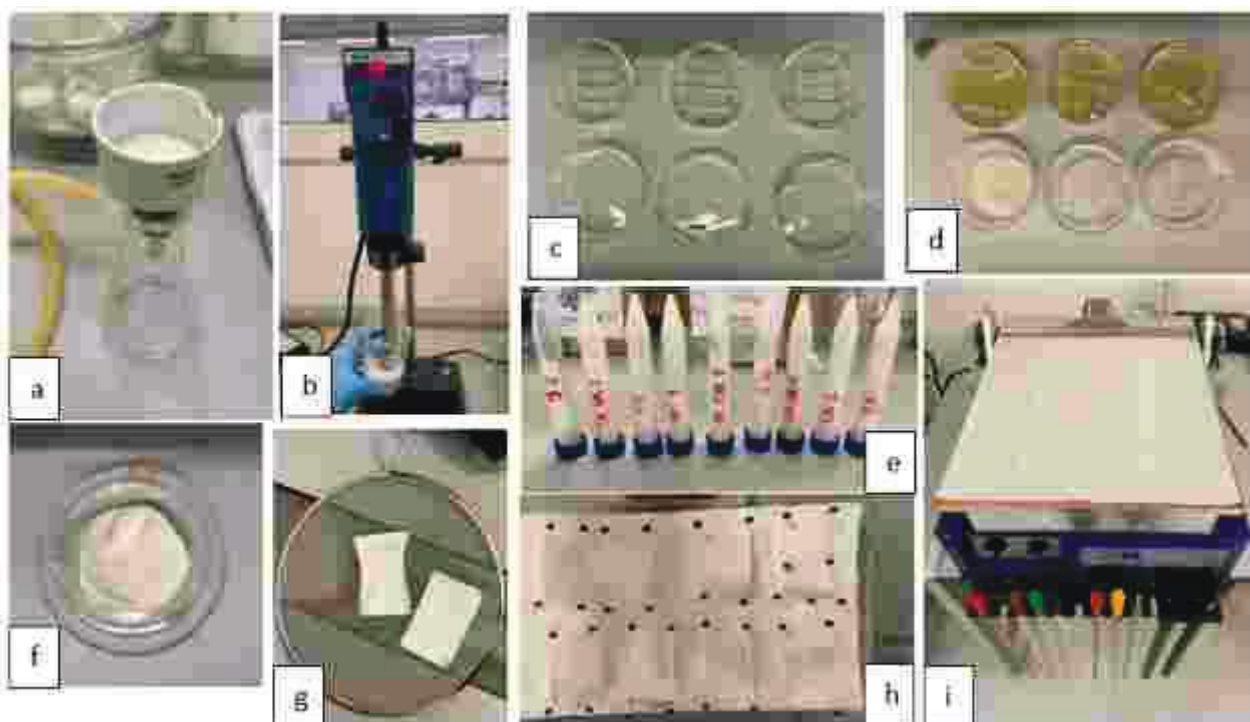


Figura 40. Differenti metodi di adesione dei solidi sulle MPB: a) filtrazione, c,d) immersione, f) gocciolamento e g,h,i) bar-coating; b)ultra-turrax ed e) dispersioni testate

Tabella 15. Prove effettuate sui metodi di adesione dei solidi alle MPB tramite biocolle, parametri valutati e relativo punteggio

Parametro	1	2	3	4	5
Prova	flessibilità MPB	adesione film polimerico a MPB	omogeneità solidi adesi	stabilità adesione a secco	adesione solidi sollecitazione meccanica
Filtrazione					
A1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
A2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
A3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
A4 (ctrl acqua-solido)	3	n.a.	3	1	1
A5 (ctrl biocolle)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Gocciolamento					
B1	3	1	1	1	1
B2	3	2	2	1	1
B3	3	1	1	1	1
B4 (ctrl acqua-solido)	3	n.a.	1	1	1
B5 (ctrl biocolle)	3	1	n.a.	n.a.	n.a.
Immersione					
C1	3	3	1	3	2
C2	3	3	1	3	2
C3	3	3	1	3	2
C4 (ctrl acqua-solido)	3	n.a.	1	1	1
C5 (ctrl biocolle)	3	3	n.a.	n.a.	n.a.
Bar-coating					
D1	3	3	3	3	3
D2	3	3	3	3	3
D3	3	3	3	3	2
D4 (ctrl acqua-solido)	3	n.a.	1	1	1
D5 (ctrl biocoll)	3	3	n.a.	n.a.	n.a.

Per quanto riguarda l'immersione, anche in questo caso, nonostante il sistema sia soggetto ad agitazione magnetica continua, non si ha buona omogeneità della deposizione dei solidi sulla membrana, anche se l'adesione sia del solo film che dei solidi sulla stessa migliora rispetto agli altri metodi. La strategia del bar-coating infine, ha dato i risultati migliori in termini di omogeneità della distribuzione dei solidi e di stabilità dell'adesione, non solo a secco, buoni anche per il metodo di immersione, ma anche a seguito di sollecitazione meccanica. Il metodo del bar-coating è stato quindi selezionato come la tecnica per la deposizione dei solidi sulle membrane per le sue caratteristiche di riproducibilità e semplicità di esecuzione.

Come si può osservare infine, in ogni caso l'utilizzo della soluzione con la biocolla migliora l'adesione rispetto al risultato utilizzando sola acqua, mentre l'utilizzo di sola biocolla è indicativo del mantenimento della proprietà di flessibilità della MPB e dell'adesione del film polimerico allo stesso.

Dalle immagini SEM (Figura 48) si può osservare come nei campioni ottenuti da gocciolamento, immersione e bar-coating (la filtrazione è stata esclusa in partenza), il tipo di metodo influenza il tipo di copertura della MPB con il film polimerico, dando una copertura più omogenea nel caso del bar-coating, rispetto a gocciolamento ed immersione. In tutti i casi però, la struttura della MPB viene completamente ricoperta dal film, non permettendo l'individuazione dei solidi lamellari depositati sulla superficie. L'analisi SEM è stata quindi effettuata anche sui campioni ottenuti con sola acqua (nello specifico prova A4), e in questo caso è possibile osservare la co-presenza di filamenti di collagene e dell'idrotalcite, depositata in modo uniforme su di essi. La conferma della natura di queste componenti è stata ottenuta tramite analisi EDX. In Figura 49 si può osservare la presenza di due distinte porzioni del campione in base alla composizione elementare: una a base di C e N (fibre del PB) e una a base di Mg e Al (idrotalcite). Essendo questi elementi presenti in modo esclusivo in una o nell'altra componente del provino, è stato possibile identificare con certezza quali fossero le fibre di PB e quali i granuli di idrotalcite ed è stato possibile osservare una distribuzione omogenea del solido lamellare sulla superficie della MPB.

L'analisi XRD dei provini mostra sulla membrana del campione D1 (in blu in Figura 47) la presenza dei segnali riconducibili all'idrotalcite $\text{MgAl}(\text{CO}_3)$ (in nero) e in particolare del picco a $11,4^\circ 2\theta$ (corrispondente alla $d = 7,7 \text{ \AA}$), a differenza della membrana tal quale (in rosso), che non presenta tale segnale, confermando l'adesione dei solidi lamellari alla MPB.

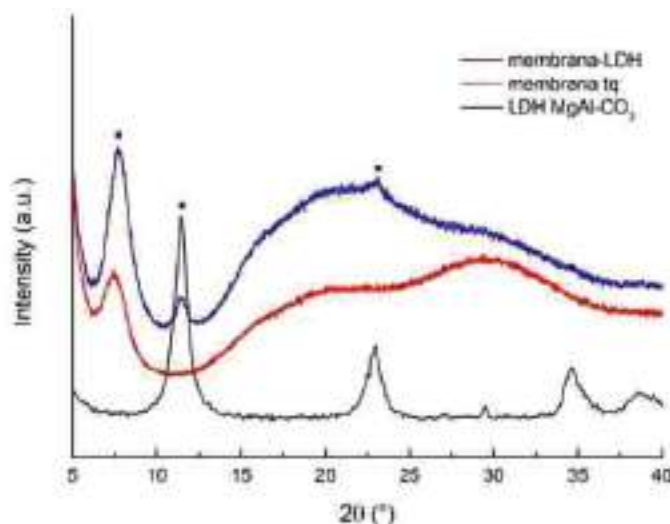
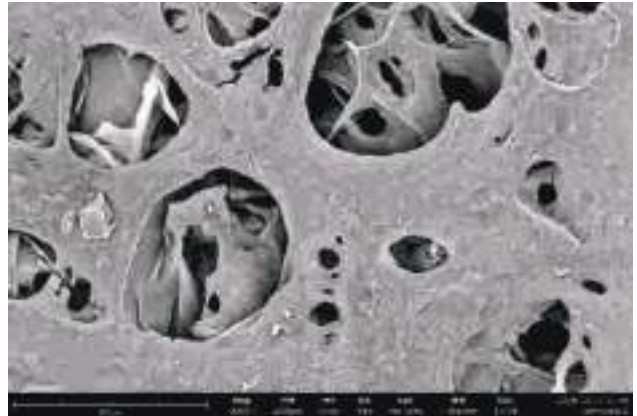
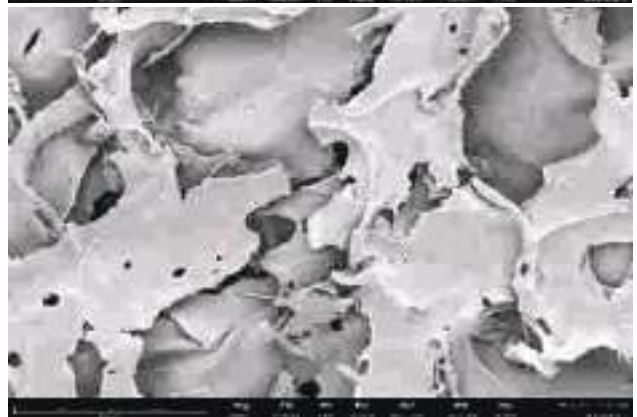
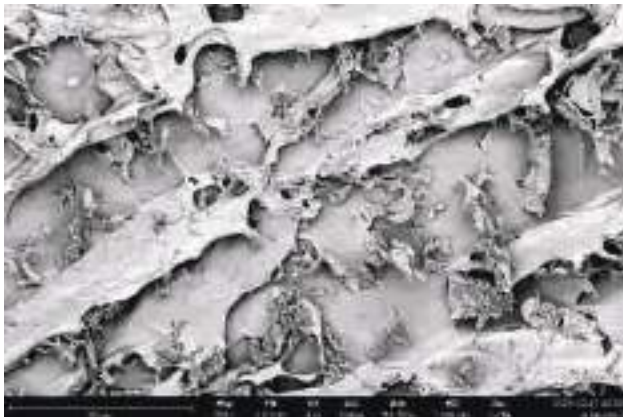


Figura 47. Spetti XRD del campione D1 (blu), dell'idrotalcite $\text{MgAl}(\text{CO}_3)$ (nero) e della membrana tal quale (rosso) a confronto

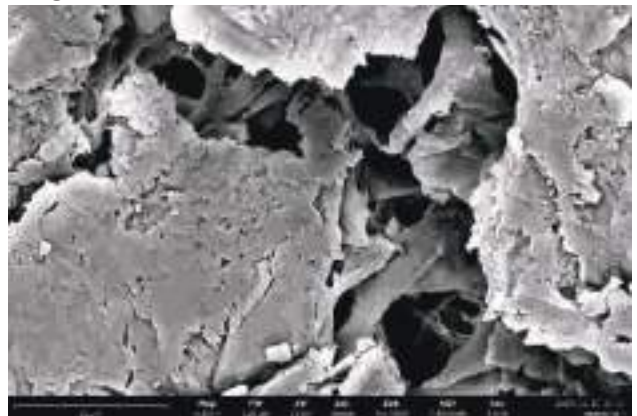
Gocciolamento

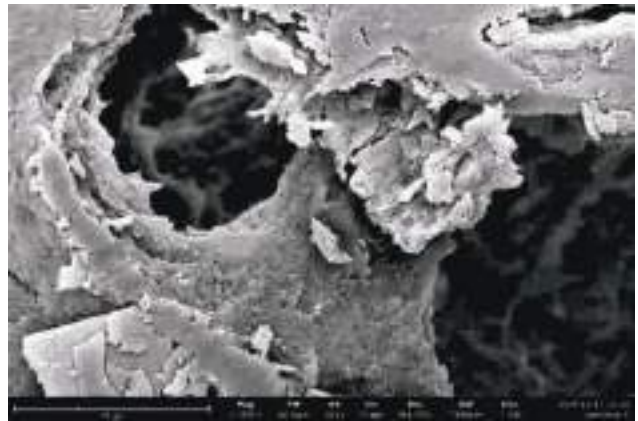
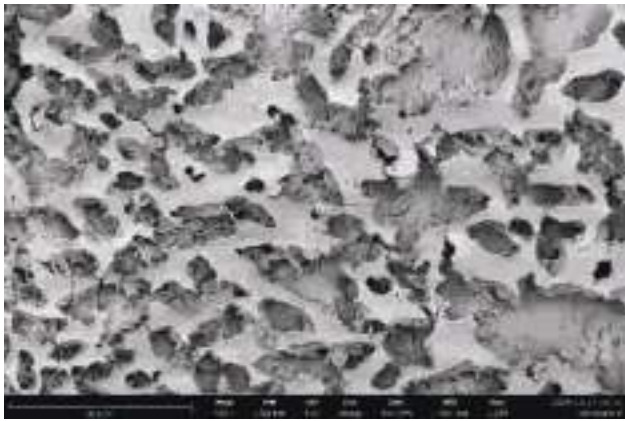


Immersione



Bar-coating





Filtrazione con sola acqua (A4)

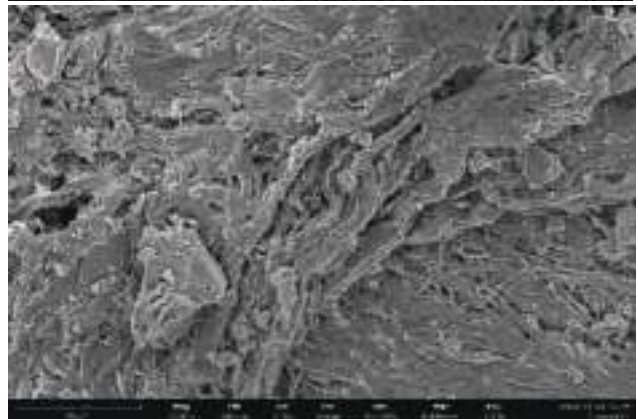
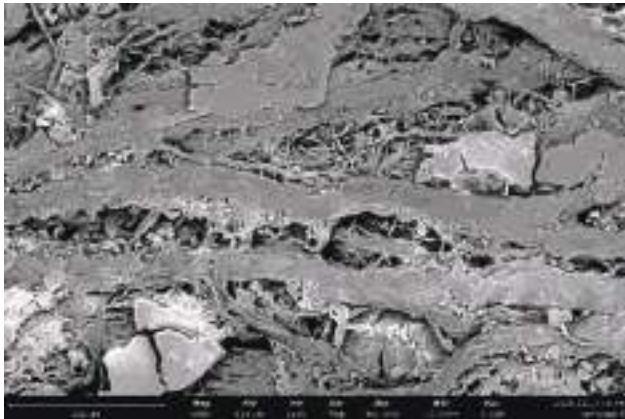




Figura 41. Immagini SEM dei campioni ottenuti dai test di adesione tramite gocciolamento, immersione, bar-coating e filtrazione con sola acqua

Filtrazione con sola acqua (A4)

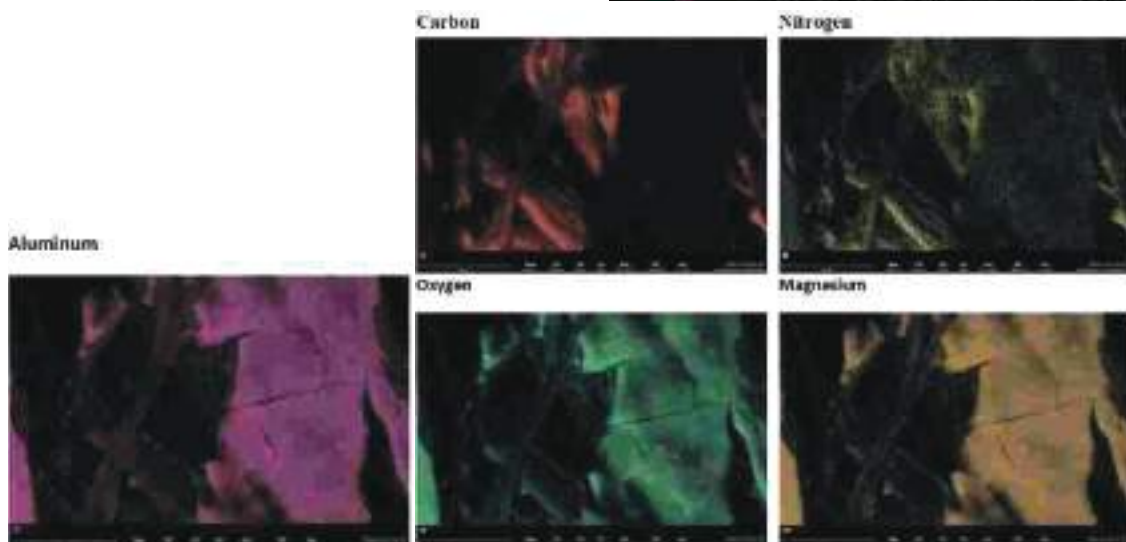
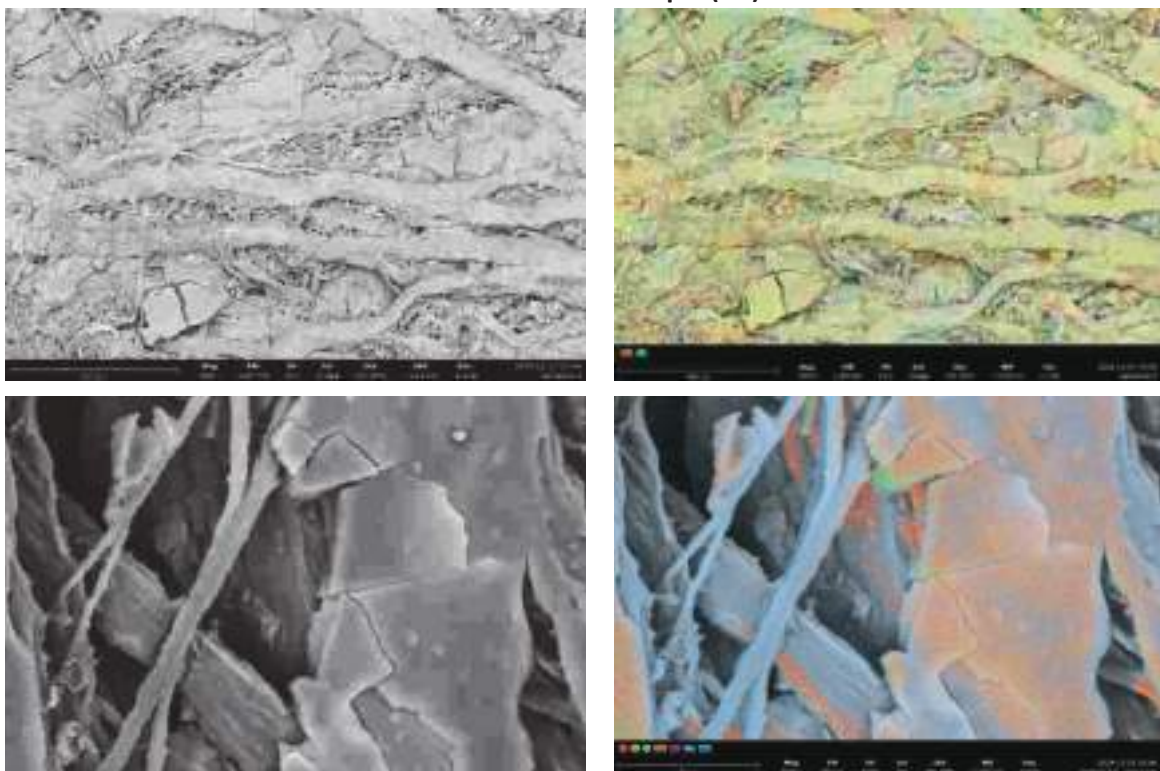


Figura 49. Analisi EDX dei campioni ottenuti dai test di adesione tramite filtrazione con sola acqua (A4)

3.3.3.2 Scelta della biocolle

In Tabella 16 sono riportati i risultati dei test di deposizione con le biocolle. Sono state valutate tutte quelle risultate positive ai test al paragrafo 3.6.3.2 (e già riportate in Tabella 14). In tutti i casi la concentrazione di chitosano è sempre 2% con acido acetico 1%. Dai risultati ottenuti valutando i parametri 1-5, sono state selezionate come migliori biocolle dal punto di vista del mantenimento della flessibilità delle MPB, dell'adesione del film polimerico e dell'omogeneità e della stabilità di adesione dei solidi a secco, il CH MMW e HMW, da solo o con 0,5% COL, a vari MW (evidenziati in arancione in Tabella 16).

Tabella 16. Prove effettuate sulle biocolle, parametri valutati e relativo punteggio

Parametro		1	2	3	4	5
Soluzioni di bioadesivo	Biocolle	flessibilità MPB	adesione film polimerico a MPB	omogeneità solidi adesi	stabilità a secco	adesione solidi sollecitazione meccanica
1*	CH LMW pH 4,5	3	3	2	2	2
2*	CH LMW pH 5,5	3	3	2	2	2
3*	CH LMW pH 6,5	3	3	2	2	2
5*	CH MMW	3	3	3	3	3
7*	CH HMW	3	3	3	3	3
9*	CH LMW - COL 0,5%	3	3	2	2	2
12*	CH MMW - COL 0,5%	3	3	2	3	3
15*	CH HMW - COL 0,5%	3	3	3	3	3
18*	CH LMW- GEL 0,25%	2	1	2	1	1
19*	CH MMW- GEL 0,25%	1	1	2	2	1
20*	CH HMW- GEL 0,25%	1	1	2	2	1
24*	COL 0,5%	2	1	1	1	1
27*	GEL 0,5%	2	1	1	1	1

3.3.3.3 Scelta delle condizioni dei solidi lamellari

In Tabella 17 sono riportati i risultati dei test di deposizione con i solidi lamellari a diversa concentrazione e composizione. Di tutte le biocolle selezionate al punto precedente sono state testate solo CH MMW e CH MMW – COL 0,5% perché nei test antibiofilm (vedi paragrafo 3.6.5.1) è stata riscontrata maggiore attività del chitosano a medio MW rispetto ad alto e basso.

Tabella 17. Prove effettuate sui solidi lamellari a diversa concentrazione e composizione, parametri valutati e relativo punteggio

Tipo solidi	[solidi] nella soluzione (% w/v)	1 bontà dispersione	2 facilità stesura	3 omogeneità film depositato	4 Stabilità a secco	5 adesione sollecitazione meccanica	6 solidi in umido 24h	7 carico solidi (%)
CH MMW (Soluzione 5*)								
MgAlCO₃	1	3	3	3	3	3	3	3
	9	3	2	2	2	2	1	15
	13	2	1	1	1	1	1	20
α-ZrP	1	3	3	3	3	3	3	2
	5	3	3	3	3	3	2	4
	9	3	3	3	3	3	1	11
	13	3	3	3	3	3	1	21
	23	3	3	3	2	3	1	32
	33	3	2	3	2	3	1	39
	37	2	2	2	1	2	1	45

ZrP nano	3	2	2	3	3	3	3	6
	5	2	2	3	3	3	3	12
	8	2	1	2	2	2	1	18
ZrP-tris	6	3	3	3	3	3	3	10
	9	3	3	3	3	3	3	18
	12	3	2	2	2	2	1	24
mix	15	3	3	3	3	3	3	28
	18	3	3	3	3	3	3	39
	23	2	2	2	2	2	1	54
CH MMW – COL 0,5% (Soluzione 12*)								
MgAlCO ₃	1	3	3	3	3	3	3	2
	9	2	2	3	2	2	1	8
	13	2	1	2	1	1	1	13
α-ZrP	1	3	3	3	3	3	3	1
	5	3	3	3	3	3	3	2
	9	3	3	3	3	3	3	8
	13	3	3	3	3	3	1	11
	23	2	2	3	3	2	1	16
	33	2	2	3	2	2	1	18
	37	2	2	2	2	2	1	20
ZrP nano	3	2	2	3	3	3	3	6
	5	2	2	3	3	3	3	12
	8	2	2	1	1	1	1	18
ZrP-tris	6	3	3	3	3	3	3	10
	9	3	3	3	3	3	3	18
	12	3	2	1	2	1	1	24
mix	15	3	3	3	3	3	3	28
	18	3	3	3	3	3	3	39
	23	2	2	1	1	1	1	54

Dalla Tabella 17 si può evincere che, all'aumentare del carico di solidi nella dispersione (e di conseguenza sulla membrana) si ha generalmente maggiore difficoltà di stesura tramite bar-coating, a causa dell'aumento della viscosità della dispersione biocolla-solido. Si ha anche minore stabilità di adesione, sia a secco che in umido, perché il carico di solidi sulla membrana è così elevato che l'azione della biocolla non è più sufficiente a tenerli adesi. Nel caso della biocolla a base di CH, i massimi carichi di solidi lamellari ottenuti – stabili a 24 h - sono: 3% MgAlCO₃, 2% α-ZrP, 12% ZrP nano, 18% ZrP-tris, 39% del mix dei solidi (vedi Figura 50). Gli stessi risultati si ottengono per la biocolla CH – COL 0,5%, tranne che nel caso dello α-ZrP il cui massimo carico stabile su membrana è dell'8%.

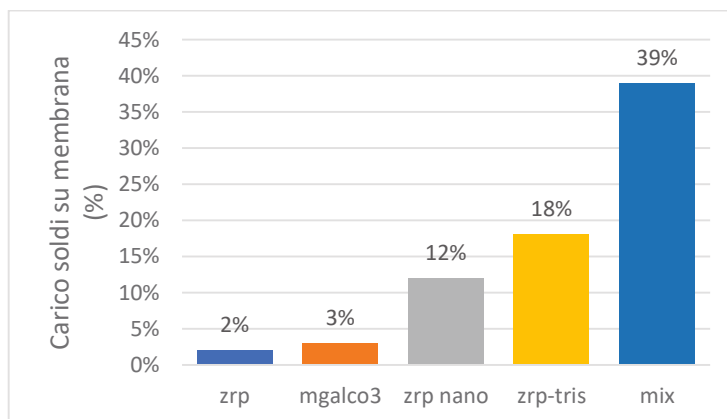


Figura 50. Massimi carichi dei solidi ottenuti con la biocolla CH 2%

Le immagini della valutazione di alcune membrane a secco e in soluzione fisiologica sono riportate in Figura 51.

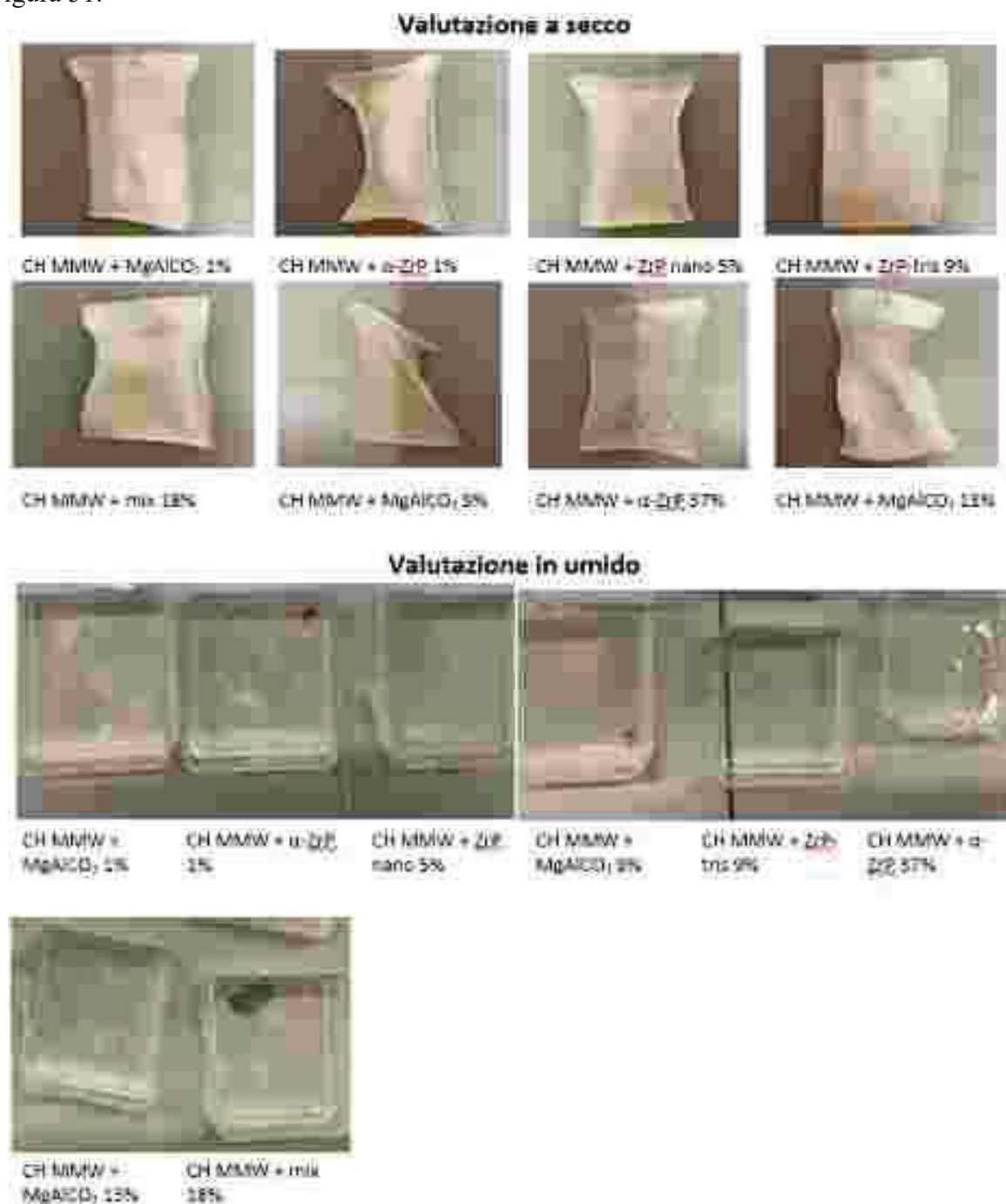


Figura 5142. Valutazione a secco e in umido di MPB con diverse concentrazioni e combinazioni di solidi dispersi in CH MMW

3.4 Studio della cinetica di uptake e rilascio degli API antimicrobici e antibiofilm

3.4.1 Prove preliminari di intercalazione

Come si può osservare dalla Figura 52a, lo spettro XRD del prodotto ZrP-CLO (in nero) mostra una variazione della d da $7,7 \text{ \AA}$ ($12^\circ 2\theta$), tipica dello $\alpha\text{-ZrP}$ acido (in blu), a $21,8 \text{ \AA}$ ($4^\circ 2\theta$), ad indicare l'avvenuta formazione del composto di intercalazione tra ZrP e CLO DG. Nel prodotto di intercalazione è presente anche il segnale relativo a $d/2$ ($10,7 \text{ \AA}$), mentre quello relativo a $d/3$ ($7,6 \text{ \AA}$) è coperto dal segnale dello ZrP acido. L'analisi termo gravimetrica (Figura 52b) mostra una perdita di peso del composto ZrP-CLO (in nero) pari al 33,6%, indicando quindi la presenza di molecole

organiche nel composto rispetto allo α -ZrP (in blu, perdita del 10,7%). La DSC (Figura 52c) mostra in corrispondenza della perdita di peso per ZrP-CLO (in nero) una transizione di stato endotermica intorno a 400 °C, riconducibile con ogni probabilità ad un passaggio di stato della clorexidina. Tale transizione non si osserva invece in α -ZrP (in blu).

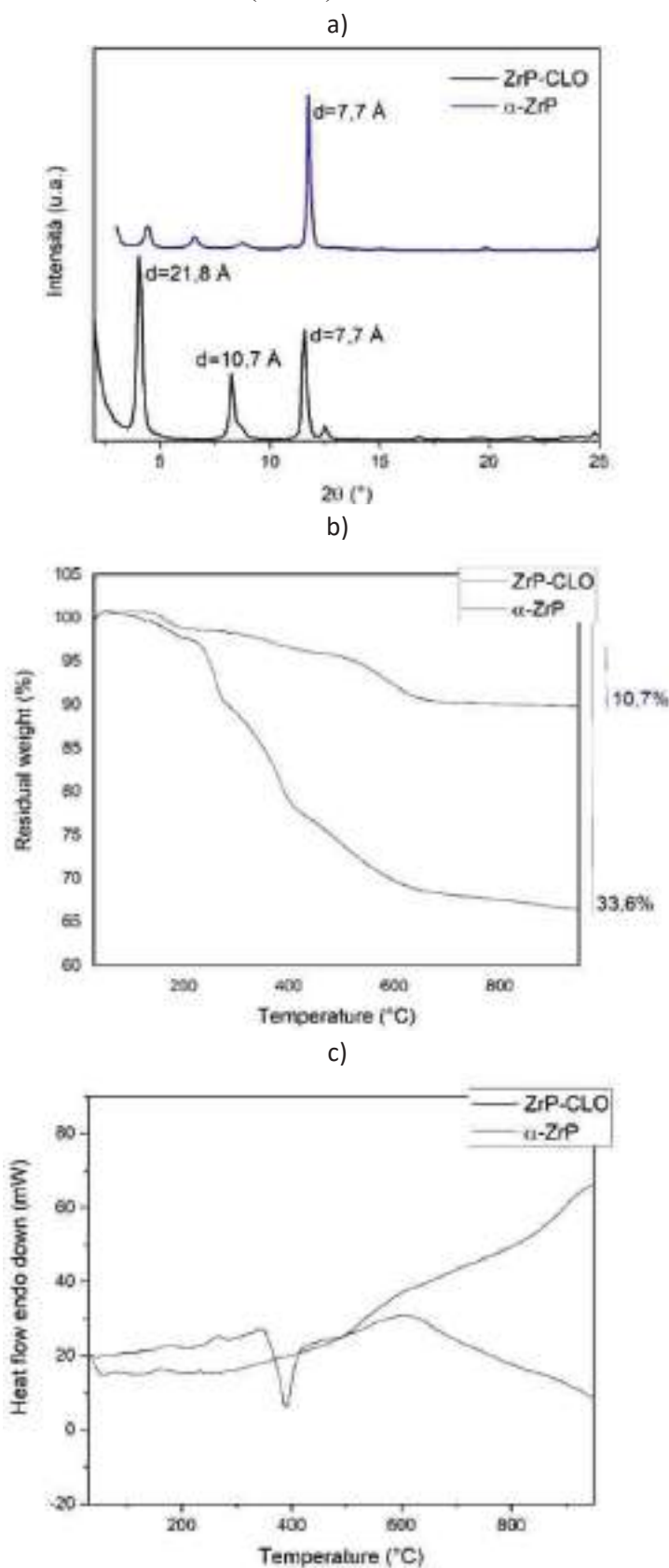
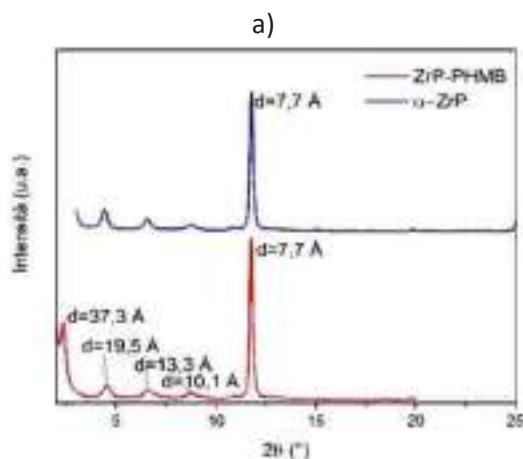


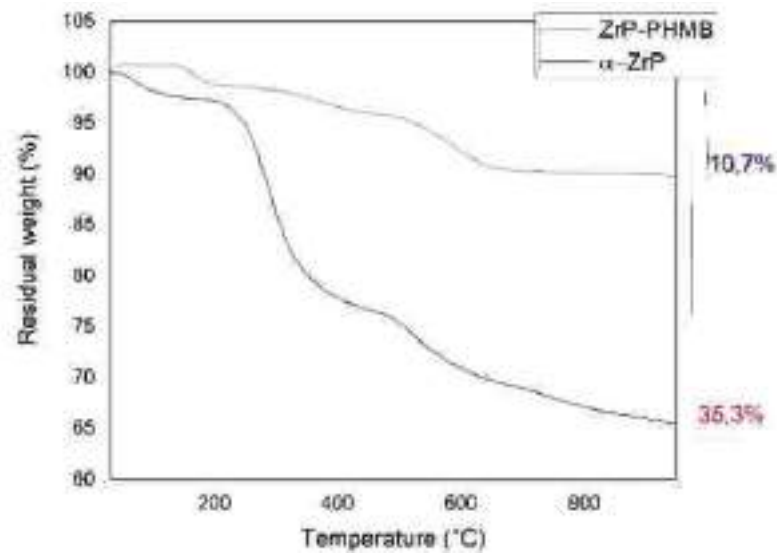
Figura 52. a) XRD, b) TGA e c) DSC dei prodotti di intercalazione tra α -ZrP e CLO DG

Dalla Figura 53a, si può osservare come lo spettro XRD di ZrP-PHMB (in rosso) mostri un pattern di segnali riconducibile all'intercalazione del principio attivo PHMB: sono visibili il primo riflesso a 37,3 Å (d), il secondo a 19,5 Å (d/2), il terzo a 13,3 Å (d/3) e il quarto a 10,1 Å (d/4). È visibile anche il riflesso dello α -ZrP di partenza (in blu, d=7,7 Å), ad indicare un'intercalazione parziale. ZrP nano (in verde, in Figura 53d) mostra un segnale intorno a 7,5 Å, ma è molto amorfo, così come il prodotto di intercalazione (in rosso) e in quanto tale non è possibile trarre ulteriori informazioni dallo spettro XRD. ZrP-tris (Figura 53g) mostra un pattern di segnali diverso tra la fase gel esfoliata con Tris (in azzurro, picchi a 16,3 Å, 8,1 Å e 5,4 Å) e la fase dopo contatto con PHMB (in rosso, picchi a 20,4 Å, 6,5 Å e 3,2 Å), ad indicazione di una modifica della distanza interlamellare dovuta all'intercalazione del PHMB; la bassa cristallinità del materiale è dovuta all'uso di un esfoliato. In conclusione, le analisi XRD mostrano α -ZrP come candidato più idoneo per l'intercalazione della specie PHMB. L'analisi termo gravimetrica (Figura 53b) mostra una perdita di peso del composto ZrP-PHMB (in rosso) pari al 35,3%, indicando quindi la presenza di molecole organiche nel composto rispetto allo α -ZrP (in blu, perdita del 10,7%). La DSC (Figura 53c) conferma i dati della TGA mostrando una transizione endotermica tra i 300 e i 600 °C per ZrP-PHMB (in rosso), assente invece per il solo α -ZrP (in blu) e dovuta quindi al PHMB intercalato.

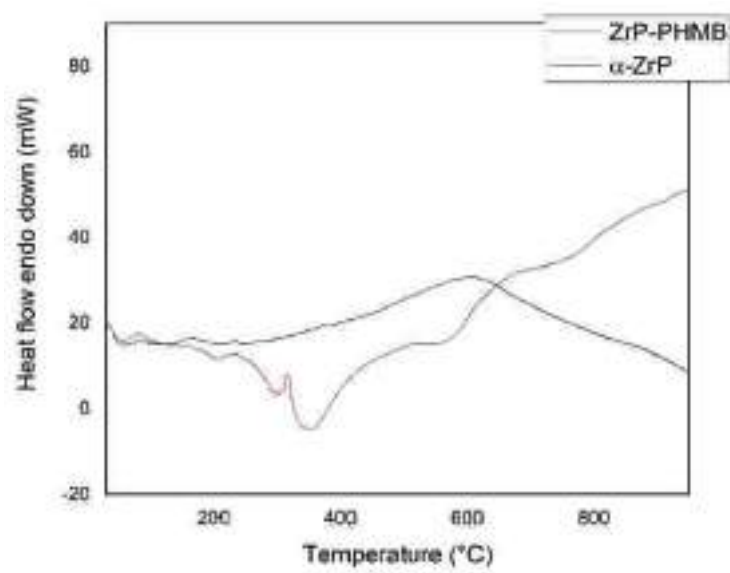
Dalla TGA in Figura 53e si può osservare per ZrP nano e ZrP nano-PHMB, una perdita totale di peso rispettivamente di 82,1% (in verde) e 40,1% (in rosso). Tali valori sono spiegabili con il fatto che ZrP nano è utilizzato in dispersione acquosa e non da secco. A seguito dell'isoterma a 110 °C per 30' e ricalcolando le perdite di peso percentuali in base al peso ottenuto dopo la completa evaporazione dell'acqua, si ottiene una perdita di 15,1% per ZrP nano e di 61,3% per ZrP nano-PHMB, ad indicare la presenza di organico intercalato nel secondo composto. La DSC in Figura 53f conferma tali dati mostrando una transizione esotermica nel caso di ZrP nano-PHMB (in rosso), assente nel solido puro (in verde). Allo stesso modo, dalla TGA in Figura 53h si può osservare per ZrP-tris e ZrP-tris-PHMB, una perdita totale di peso rispettivamente di 88,1% (in azzurro) e 57,4% (in rosso). Anche ZrP-tris è usato in dispersione acquosa e ricalcolando le perdite di peso percentuali in base al peso ottenuto dopo l'isoterma a 110 °C, ottiene una perdita di 48,8% per ZrP-tris e di 44,0% per ZrP-tris-PHMB. In questo caso non possono essere fatte deduzioni dalla TGA in quanto anche ZrP-tris contiene molecole organiche e perciò non si può discriminare il contributo nel prodotto d'intercalazione dovuto al tris da quello dovuto al PHMB. La DSC in Figura 53i mostra due diverse transizioni: una endotermica nel caso dello ZrP-tris-PHMB (in rosso) e una esotermica nel caso di ZrP-tris (in azzurro).



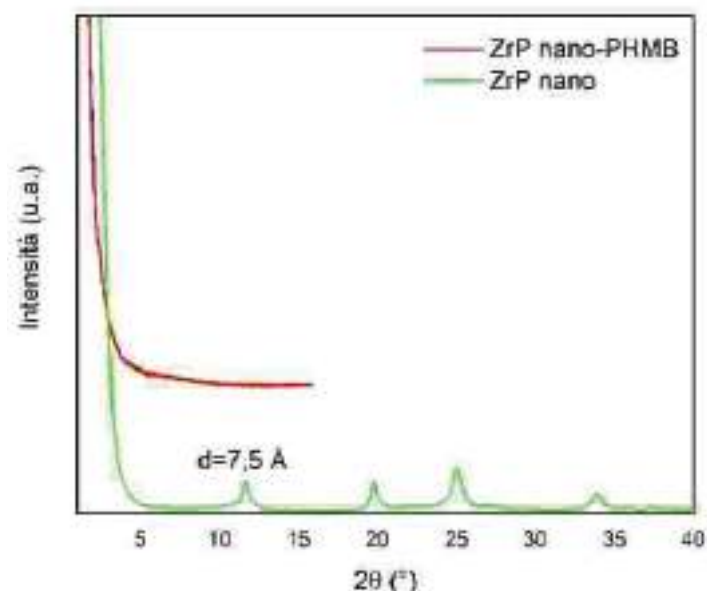
b)



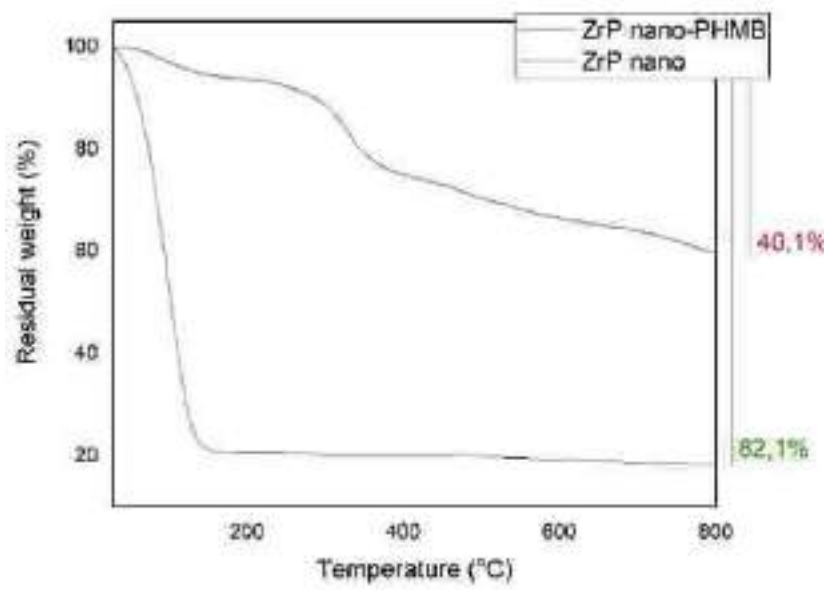
c)



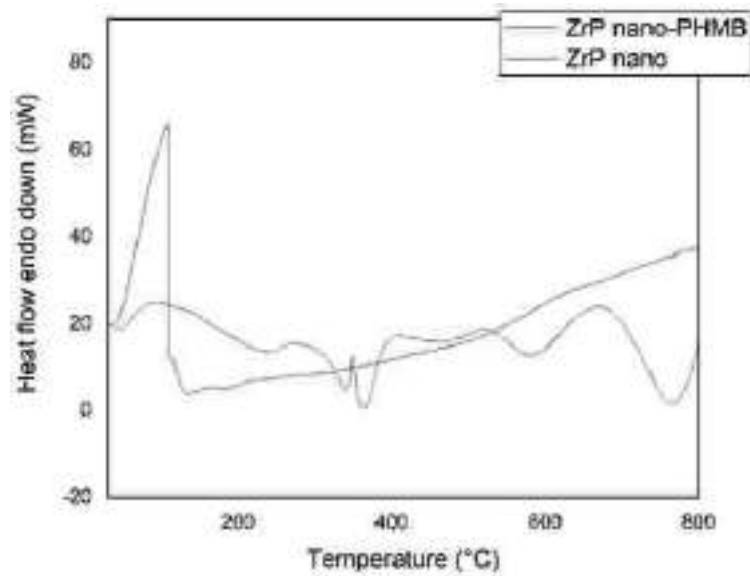
d)



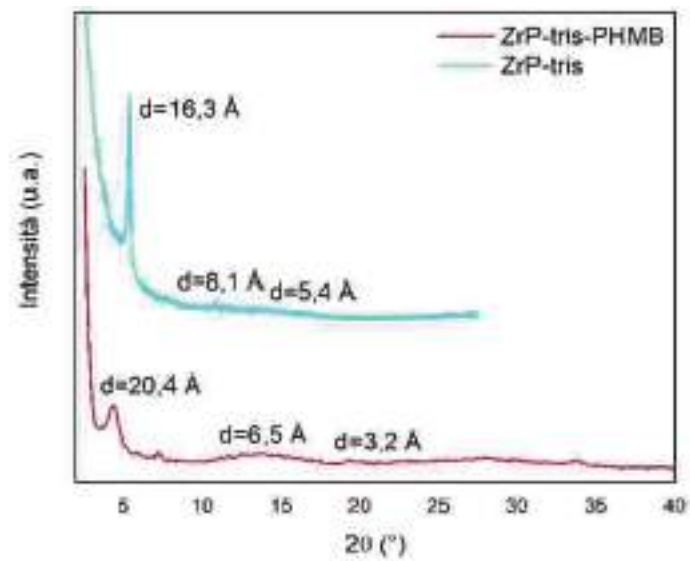
e)



f)



g)



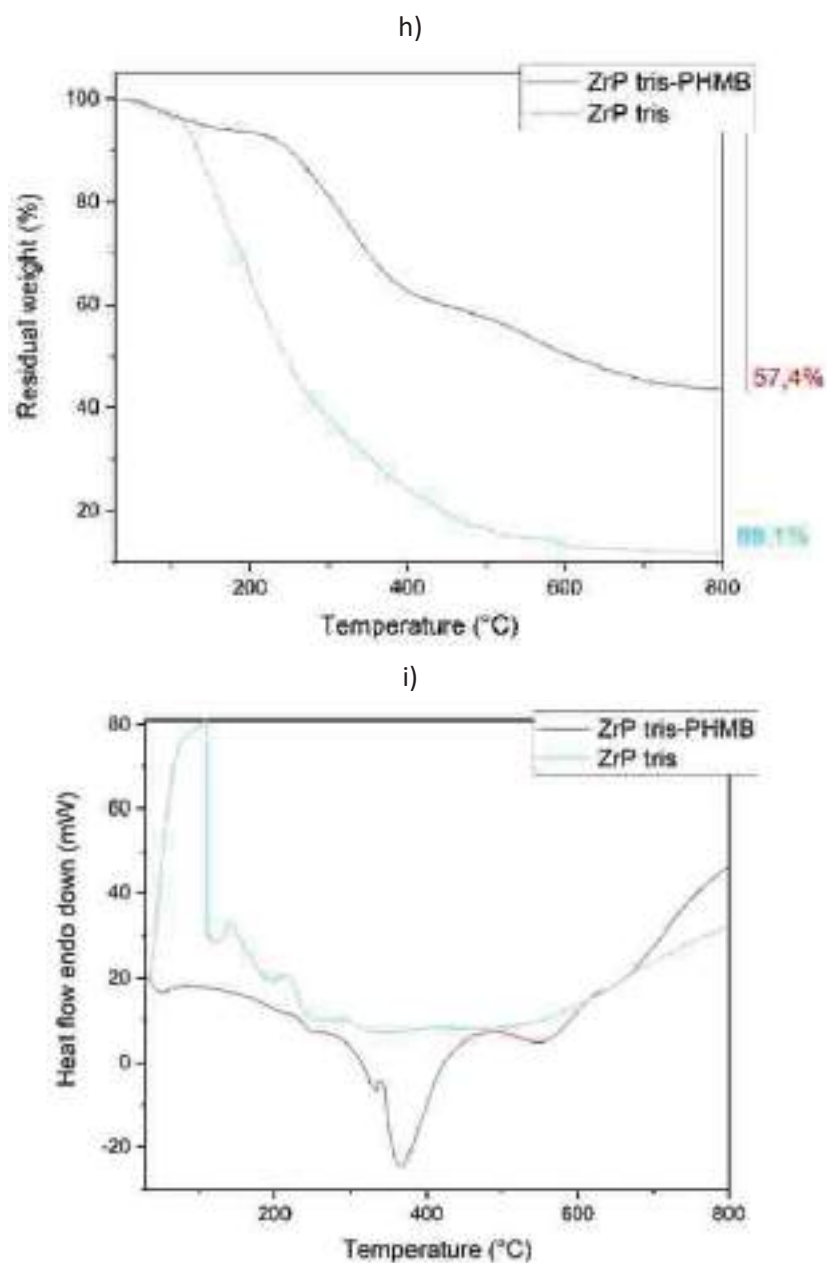


Figura 53. a) XRD, b) TGA e c) DSC dei prodotti di intercalazione tra α -ZrP e Preventia®; d) XRD, e) TGA e f) DSC dei prodotti di intercalazione tra ZrP nano e Preventia®; g) XRD, h) TGA e i) DSC dei prodotti di intercalazione tra ZrP-tris e Preventia®.

3.4.2 Uptake e il rilascio degli API

3.4.2.1 Uptake

In Figura 54 e 55 alcune immagini della procedura di uptake di CLO DG e Vanco da parte dei campioni analizzati.



Figura 54. Campioni pre, durante e post procedura di uptake di CLO DG

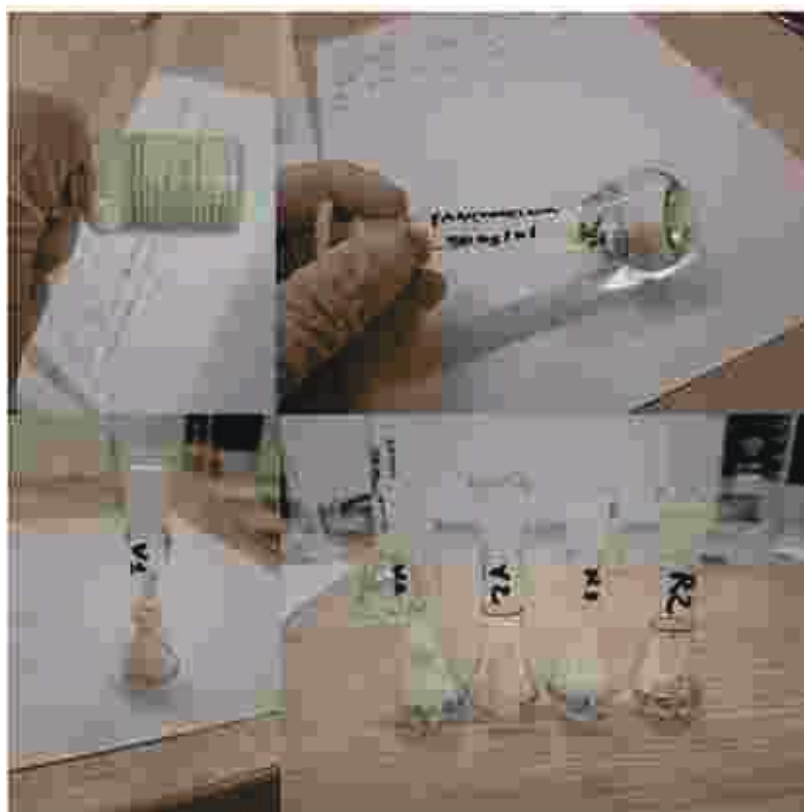


Figura 55. Procedura di uptake di Vanco

I carichi di API ottenuti nei test di uptake per i vari campioni sono riportati in Tabella 18, espressi come quantitativo di API assorbito per unità di area di membrana.

Tabella 18. Risultati in termini di uptake (mg di API assorbiti per cm² di membrana)

Campione	CLO DG (mg/cm ²)	PHMB (mg/cm ²)	Vanco (mg/cm ²)
m tq	17,87±1,6	18,02±1,5	18,50±0,5
m CH	7,15±0,7	8,01±0,6	-
m ZrP	7,17±0,8	8,39±0,7	-
m ZrP nano	6,85±0,6	7,65±0,6	-
m ZrP-tris	5,97±0,5	6,58±0,7	-
m mix	7,37±0,6	6,43±0,6	24,01±0,6

I risultati ottenuti per CLO DG mostrano che ognuno dei prototipi analizzati (MPB con CH e con CH e solidi lamellari) è efficace nel caricare un quantitativo di specie antimicrobica superiore a 1,0 mg/cm². Il quantitativo di CLO DG caricato dalle membrane funzionalizzate con i solidi lamellari, singoli o mix, o con la sola biocolla è inferiore rispetto a quello caricato dalla membrana tal quale, fenomeno spiegabile con il fatto che le membrane con deposta la biocolla e i solidi possono risultare in parte “saturate” nella loro capacità di assorbire liquidi.

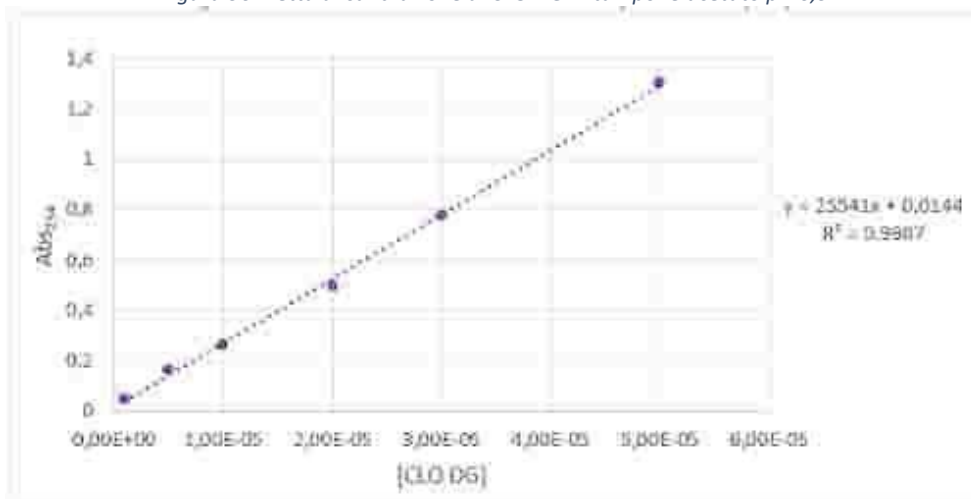
Anche nel caso del PHMB l’uptake ha prodotto risultati simili a quelli ottenuti per CLO DG, con maggiore carico da parte della membrana tal quale rispetto a quelle funzionalizzate.

Per quanto riguarda la vancomicina, in questo caso il prototipo di MPB con CH e solidi lamellari è efficace nel caricare un quantitativo di specie antibiotica pari a 24 mg/cm², maggiore rispetto a quello caricato dal controllo (MPB tal quale), cioè 18,50 mg/cm².

3.4.2.2 Ottenimento della retta di taratura per la rilevazione UV-vis degli API

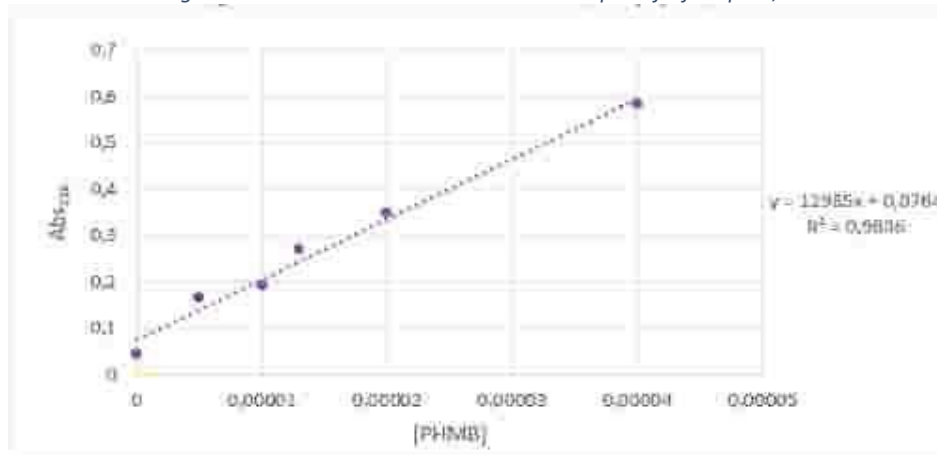
Di seguito sono riportate le rette di fitting, le relative equazioni e gli indici di correlazione R^2 ottenuti per CLO DG (Figura 56), PHMB (Figura 57) e Vanco (Figura 58). Come si può osservare dalle rette, la sensibilità analitica è per CLO DG $=1 \cdot 10^{-6}$ M, per PHMB 0,0005% e per Vanco 0,01 mg/ml.

Figura 56. Retta di calibrazione di CLO DG in tampone acetato pH 6,5



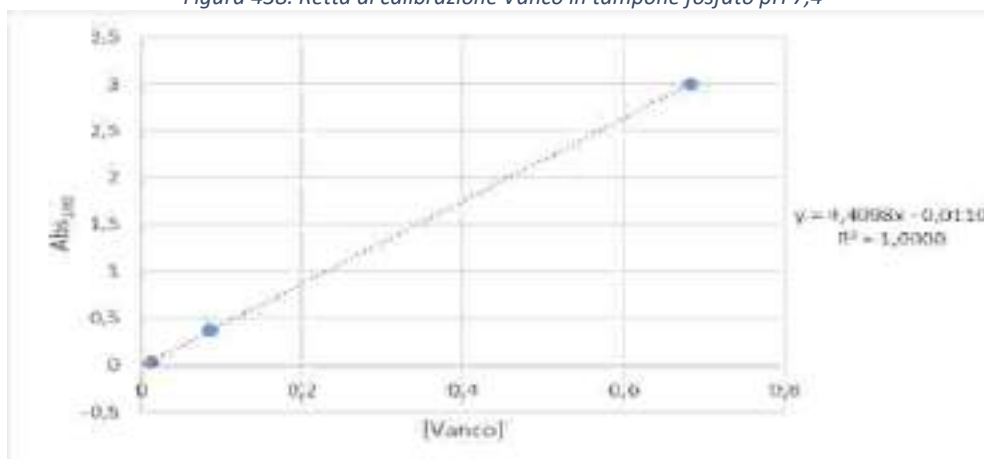
$$Abs_{254} = 25541 \cdot [CLO DG] + 0,0144$$

Figura 57. Retta di calibrazione PHMB in tampone fosfato pH 7,4



$$Abs_{236} = 12985 \cdot [PHMB] + 0,0764$$

Figura 438. Retta di calibrazione Vanco in tampone fosfato pH 7,4



$$Abs = 4,4098 \cdot [Vanco] - 0,011$$

3.4.2.3 Rilascio

I risultati dei test di rilascio di CLO sono riportati in Tabella 19, espressi come quantitativo di API rilasciato per unità di volume di rilascio (mg/ml), area di membrana (mg/cm²), quantitativo totale (mg), quantitativo normalizzato rispetto all'uptake (%) e rilascio teorico giornaliero (mg/die/cm²).

Tabella 19. Risultati del test di rilascio per CLO espressi come mg/ml, % sull'uptake, mg effettivi rilasciati, mg/cm² di membrana e mg/die/cm² per m tq, m CH, m ZP, m ZrP nano, m ZrP-tris e m mix

Campione	m tq	m CH	m ZrP	m ZrP nano	m ZrP-tris	m mix
Concentrazione (mg/ml)						
giorno 1	19,25±1,62	7,06±0,78	6,93±0,66	6,62±0,40	5,82±1,07	6,71±0,93
giorno 2	1,88±0,32	1,10±0,11	1,13±0,08	1,17±0,20	1,00±0,13	1,36±0,28
giorno 3	0,26±0,08	0,28±0,10	0,34±0,07	0,26±0,06	0,22±0,02	0,46±0,21
giorno 4	0,06±0,04	0,08±0,02	0,10±0,02	0,09±0,02	0,07±0,002	0,16±0,05
giorno 5	0,01±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01	0,04±0,01	0,03±0,001	0,07±0,02
giorno 6	0,004±0,004	0,02±0,005	0,03±0,005	0,02±0,01	0,01±0,001	0,04±0,01
giorno 7	0,001±0,002	0,01±0,004	0,03±0,002	0,02±0,01	0,01±0,002	0,04±0,01
tot	21,45±2,06	8,58±1,04	8,60±0,84	8,22±0,70	7,16±1,23	8,84±1,50
Percentuale dell'uptake (%)						
giorno 1	89,75±7,53%	82,31±9,13%	80,56±7,63%	80,51±4,85%	81,27±14,90%	75,92±10,55%
giorno 2	8,75±1,48%	12,82±1,29%	13,12±0,96%	14,25±2,39%	14,01±1,87%	15,34±3,14%
giorno 3	1,19±0,38%	3,25±1,20%	3,96±0,77%	3,19±0,71%	3,05±0,30%	5,19±2,33%
giorno 4	0,26±0,17%	0,92±0,28%	1,19±0,18%	1,04±0,22%	0,92±0,03%	1,80±0,58%
giorno 5	0,03±0,04%	0,39±0,12%	0,51±0,11%	0,50±0,10%	0,37±0,02%	0,81±0,23%
giorno 6	0,02±0,02%	0,18±0,05%	0,33±0,05%	0,28±0,11%	0,19±0,02%	0,50±0,09%
giorno 7	0,01±0,01%	0,12±0,04%	0,32±0,03%	0,22±0,08%	0,18±0,03%	0,44±0,08%
tot	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Quantitativo totale (mg)						
giorno 1	384,98±32,31	141,30±15,68	138,59±13,13	132,44±7,98	116,39±21,33	134,21±18,65
giorno 2	37,53±6,36	22,01±2,21	22,58±1,65	23,43±3,94	20,07±2,68	27,12±5,55
giorno 3	5,11±1,63	5,58±2,06	6,81±1,33	5,25±1,17	4,36±0,43	9,18±4,12
giorno 4	1,11±0,73	1,58±0,47	2,05±0,30	1,71±0,36	1,32±0,05	3,18±1,02
giorno 5	0,13±0,15	0,67±0,20	0,88±0,19	0,83±0,17	0,53±0,03	1,43±0,41
giorno 6	0,07±0,08	0,31±0,09	0,58±0,09	0,47±0,18	0,28±0,03	0,88±0,16
giorno 7	0,03±0,03	0,21±0,07	0,55±0,05	0,37±0,13	0,26±0,04	0,77±0,14
tot	428,96±41,31	171,66±20,79	172,04±16,74	164,49±13,92	143,21±24,58	176,78±30,04
Quantitativo su area di membrana (mg/cm²)						
giorno 1	16,04±1,35	5,89±0,65	5,77±0,55	5,52±0,33	4,85±0,9	5,59±0,78
giorno 2	1,56±0,26	0,92±0,09	0,94±0,07	0,98±0,16	0,84±0,11	1,13±0,23
giorno 3	0,21±0,07	0,23±0,08	0,28±0,05	0,22±0,05	0,18±0,02	0,38±0,17
giorno 4	0,05±0,003	0,07±0,02	0,09±0,01	0,07±0,01	0,05±0,002	0,13±0,04
giorno 5	0,01±0,006	0,03±0,01	0,04±0,008	0,03±0,007	0,02±0,001	0,06±0,02
giorno 6	0,03±0,003	0,01±0,003	0,02±0,004	0,02±0,008	0,01±0,001	0,04±0,01
giorno 7	0,01±0,003	0,01±0,003	0,02±0,002	0,02±0,005	0,01±0,002	0,03±0,01
tot	17,87±0,24	7,15±0,12	7,17±0,99	6,85±0,08	5,97±0,15	7,37±0,18
Quantitativo giornaliero su area di m (mg/die/cm²)						
tot	2,55±0,03	1,02±0,02	1,02±0,14	0,98±0,01	0,85±0,02	1,05±0,02

I risultati dei rilasci espressi in mg/cm², in % sull'uptake e in mg/ml sono riportati per maggiore comprensione nei grafici in Figura 59. Come si può osservare, il quantitativo di CLO rilasciato nel tempo è più alto nelle prime 24h per la membrana tal quale rispetto a quelle caricate con i solidi o con il solo CH, dato in linea con i risultati del test di uptake, che vedeva la m tq quella a maggiore

loading. Nei punti successivi però, cioè da 48h a 7 giorni, i quantitativi di CLO rilasciati dai vari campioni hanno un livello assolutamente paragonabile.

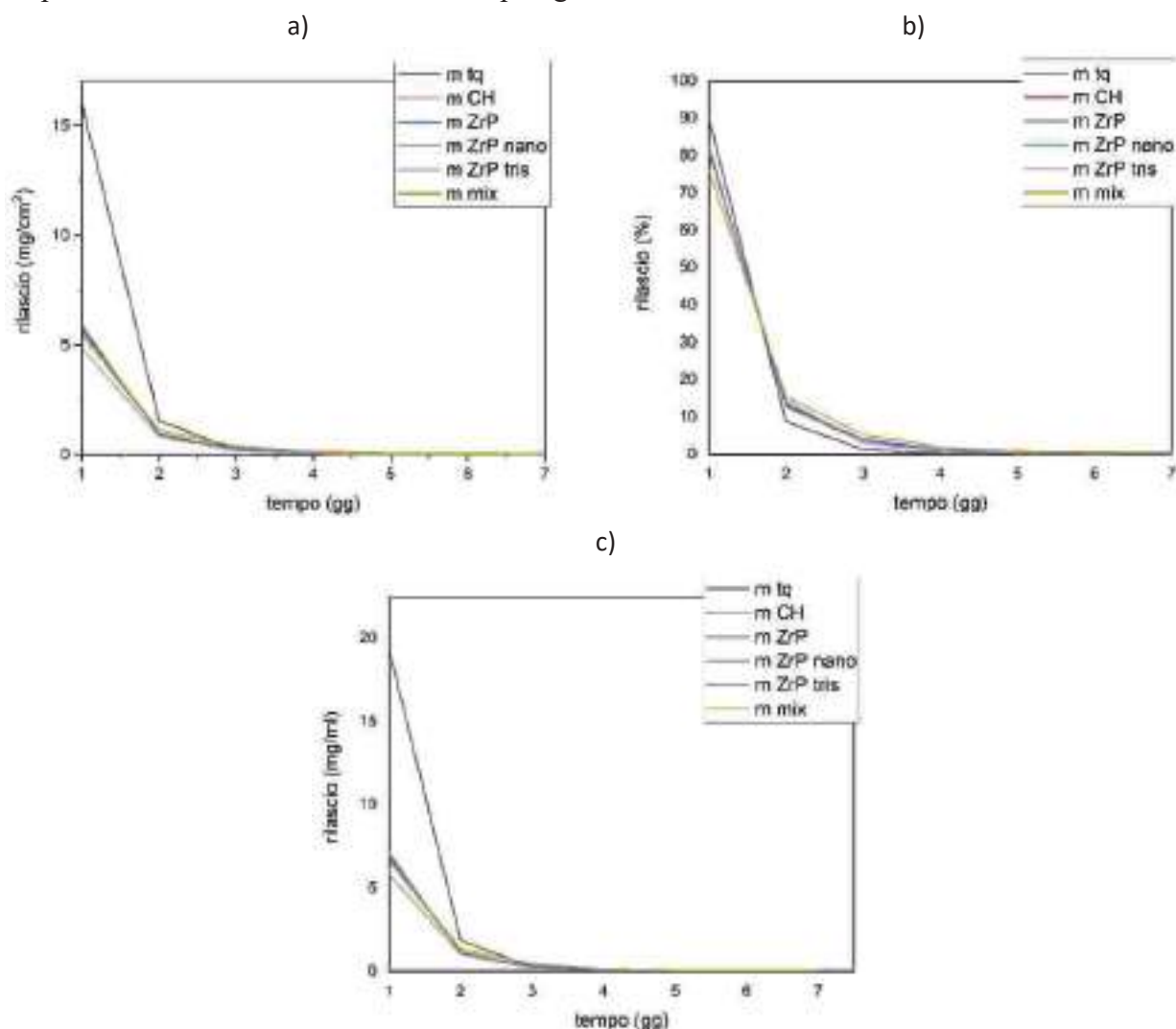


Figura 59. Cinetiche di rilascio osservate per CLO espresse come a) mg/cm² di membrana e come b) % di rilascio e c) mg/ml in funzione del tempo da parte di: m tq (in nero), m CH (in blu), m ZrP (in arancio), m ZrP nano (in rosa), m ZrP-tris (in verde) e m mix (in ocra)

La cinetica di rilascio tra i vari prototipi mostra quindi una certa somiglianza nell'andamento, con un maggiore rilascio a 24 h e poi una diminuzione del quantitativo rilasciato di un fattore 10 ad ogni successivo punto. Si può osservare come fino al giorno 7 il livello di CLO rilasciato sia superiore a 0,01 mg/cm², rendendo quindi i prototipi efficaci del rilasciare un quantitativo di questa specie antimicrobica ampiamente superiore alla sua MIC (145 µg/ml verso *S. epidermidis* e < 145 µg/ml verso *C. albicans*) [141]. Quindi, sebbene la membrana tal quale rilasci inizialmente un quantitativo di CLO maggiore rispetto a quelle caricate con CH/solidi nelle condizioni sperimentali studiate, i prototipi rilasciano un quantitativo di API perfettamente efficace in termini di attività antibiofilm verso le specie considerate.

Il quantitativo effettivo (in mg) di CLO rilasciata è riportato nel grafico in Figura 60. Da questi valori emerge che la m CH, m ZrP, m ZrP nano, m ZrP-tris e m mix rilasciano complessivamente 171,66±20,79, 172,04±16,74, 164,49±13,92, 143,21±24,58 e 176,78±30,04 mg di CLO, a fronte dei 428,96±41,31 mg rilasciati dalla m tq, e quindi con valori inferiori del 33-41% rispetto al controllo.

Dal grafico in Figura 60 si osserva che per tutti i campioni il rilascio è massiccio nelle prime 24 h, per diminuire di un fattore 10 nei giorni successivi.

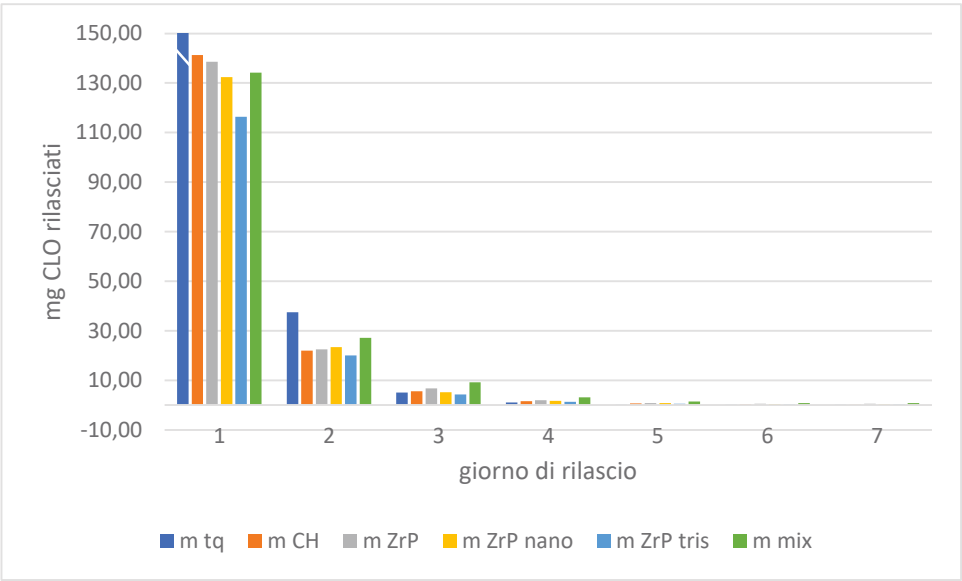


Figura 6044. Quantitativo effettivo di CLO (mg) rilasciato nel tempo da parte di: m tq (in nero), m CH (in blu), m ZrP (in arancio), m ZrP nano (in rosa), m ZrP-tris (in verde) e m mix (in ocra)

Per quanto riguarda il rilascio teorico giornaliero, si evidenziano valori di 1,02 mg/die/cm² per m CH e m ZrP, 0,98 per ZrP nano, 0,85 per m ZrP-tris, 1,05 per m mix e 2,55 per m tq. È interessante infine notare infine come dalla somma dei rilasci (mg/cm²) nell’arco dei 7 giorni (vedi Tabella 19) per ogni campione si ottiene un valore che è identico – e va a confermare - il dato di uptake ottenuto precedentemente.

Per quanto riguarda i risultati dei rilasci con PHMB, purtroppo non è stato possibile sviluppare un metodo analitico idoneo alla determinazione del polimero nei campioni di rilascio. L’assorbanza del principio attivo si è infatti rivelata troppo bassa per consentirne il monitoraggio. Sono stati esplorati diversi approcci, tra cui metodi di complessazione con metalli (nichel, ferro, rame, cobalto) finalizzati a generare cromofori e incrementare la sensibilità di rilevazione, ma tali tentativi non hanno fornito risultati soddisfacenti. Anche la determinazione del PHMB mediante HPLC non ha portato a esiti positivi. Alla luce di queste difficoltà, lo studio del rilascio di PHMB dalle membrane viene rimandato a una fase di sviluppo successiva, in cui sarà necessario implementare e validare metodiche analitiche più adeguate tra cui quella più promettente è LC-MS.

I risultati dei test di rilascio di Vanco sono riportati in Tabella 20, espressi come quantitativo di API rilasciato per unità di volume di rilascio (mg/ml), area di membrana (mg/cm²), quantitativo totale (mg), quantitativo normalizzato rispetto all’uptake (%) e rilascio teorico giornaliero (mg/die/cm²).

Tabella 20. Risultati del test di rilascio per Vanco espressi come mg/ml, % sull’uptake, mg effettivi rilasciati, mg/cm² di membrana e mg/die/cm² per m tq e m mix

Campione	m mix	m tq	m mix	m tq	m mix	m tq
	Concentrazione		Percentuale dell’uptake		Quantitativo totale	
	(mg/ml)		(%)		(mg)	
punto 1	3,60±0,40	3,20±0,48	14,71%	17%	10,6±1,2	8,1±0,8
punto 2	5,19±1,66	3,32±0,26	21,21%	18%	13,3±1,1	9,5±0,8
punto 3	3,99±1,25	2,92±0,19	16,31%	16%	12,2±1,2	9,0±1,0
punto 4	3,81±0,68	3,25±0,40	15,57%	18%	11,8±1,0	10,7±1,0
punto 5	4,04±0,65	3,00±0,70	16,51%	16%	12,3±1,3	10,4±1,1

punto 6	2,27±0,24	1,59±0,09	9,28%	9%	7,9±0,8	5,7±0,7
punto 7	1,17±0,23	0,79±0,09	4,78%	4%	4,1±0,4	2,9±0,3
punto 8	0,40±0,19	0,38±0,09	1,63%	2%	1,2±0,2	1,5±0,1
tot	24,47±0,66	18,45±0,29	100%	100%	73,4±5,1	57,8±4,5
	Quantitativo su area di membrana (mg/cm²)		Quantitativo giornaliero su area di m (mg/die/cm²)			
punto 1	0,25±0,1	0,16±0,1				
punto 2	0,31±0,1	0,19±0,1				
punto 3	0,29±0,1	0,18±0,1				
punto 4	0,28±0,2	0,21±0,1				
punto 5	0,29±0,1	0,20±0,1				
punto 6	0,19±0,1	0,11±0,1				
punto 7	0,10±0,1	0,06±0,002				
punto 8	0,03±0,002	0,03±0,001				
tot	1,13±0,1	1,73±0,1	0,057±0,001	0,086±0,001		

I risultati dei rilasci espressi in mg/cm², in % sull'uptake e in mg/ml sono riportati per maggiore comprensione nei grafici in Figura 61. Come si può osservare, sia per la membrana caricata con i solidi lamellari e il CH (m mix) che per quella di controllo (m tq), il quantitativo di Vanco rilasciato nel tempo è abbastanza costante nei primi 5 punti (fino al giorno 12), per poi diminuire negli ultimi 3 (giorni 15-20). La cinetica di rilascio tra i due campioni mostra anche in questo caso una certa somiglianza nell'andamento. In tutti i punti sperimentali analizzati si osserva un quantitativo di farmaco rilasciato maggiore da parte della membrana funzionalizzata rispetto alla tal quale. I dati ottenuti indicano che la m mix ha rilasciato complessivamente 1,73 mg/cm² di vancomicina, rispetto agli 1,13 mg/cm² della m tq, con un incremento pari al 53%. Nel caso della membrana prototipo, fino al punto 6 (giorno 15) il livello di Vanco rilasciata è superiore alla MIC (2 µg/ml) [135], rendendola effettivamente in grado di rilasciare un quantitativo di API perfettamente efficace in termini di attività antibiofilm verso le specie considerate.

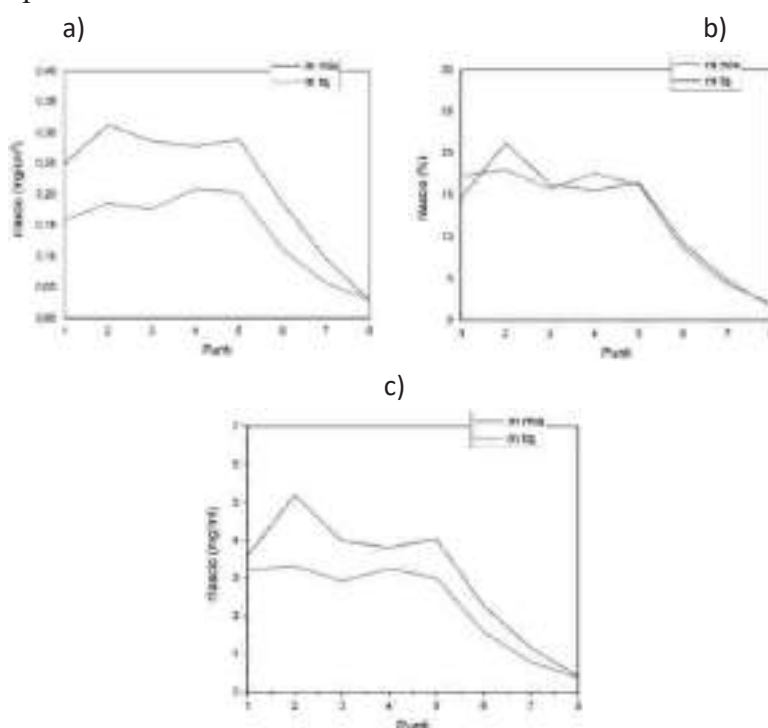


Figura 61. Cinetiche di rilascio osservate per Vanco espresse come a) mg/cm² di membrana e come b) % di rilascio e c) mg/ml in funzione del tempo da parte di: m tq (in arancio) e m mix (in blu)

Il quantitativo effettivo (in mg) di Vanco rilasciata è riportato nel grafico in Figura 62. Da questi valori emerge che la m mix rilascia complessivamente $73,4 \pm 5,1$ mg di vancomicina, a fronte dei $57,8 \pm 4,5$ mg rilasciati dalla m tq. Nel complesso, la membrana prototipo garantisce quindi un rilascio superiore del 27% rispetto al controllo.

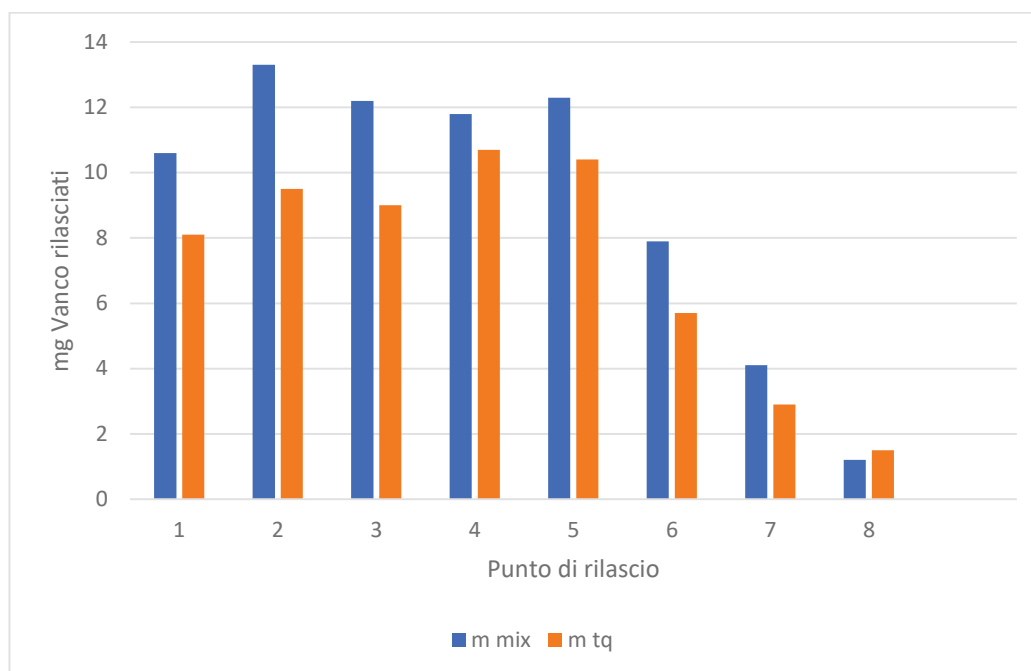


Figura 62. Quantitativo effettivo di Vanco (mg) rilasciato nel tempo da parte di: m tq (in arancio) e da m mix (in blu)

Per quanto riguarda il rilascio teorico giornaliero, si evidenziano valori di $0,057 \text{ mg/die/cm}^2$ per la membrana di riferimento e di $0,086 \text{ mg/die/cm}^2$ per la membrana prototipo. Anche in questo caso dalla somma dei rilasci (mg/cm^2) nell'arco degli 8 punti (vedi Tabella 20) per ogni campione si ottiene un valore che è identico – e va a confermare – il dato di uptake ottenuto precedentemente.

3.5 Studio dell'attività antibiofilm complessiva del prototipo ottenuto

3.5.1 Test antibiofilm verso *Candida parapsilosis*

Di seguito i risultati ottenuti per i test antibiofilm verso *C. parapsilosis* sui campioni in Tabella 6. In Figura 63 sono riportate le immagini delle piastre multiwell con a) i provini immersi dopo 24 h di incubazione, b) i provini post lavaggio e c) i fondi dei pozzetti colorati con cristal violetto; dove la serie A rappresenta la MPB tal quale, la serie B la MPB con CH HMW 2%, la serie C la MPB con CH MMW 2% e la serie D la MPB con CH LMW 2%.

Come si può osservare dalla Figura 63a, il terreno dopo 24 h di incubazione con il provino assume sfumature di colore leggermente diverse rispetto alla membrana tal quale (campione A) e ai controlli (ctrl), ad indicare una parziale solubilizzazione del CH (B-C-D), ma non si osserva dispersione dei solidi depositati. Le caratteristiche ottiche dei provini post incubazione rimangono uguali a quelle pre trattamento (Figura 63b). Dalla colorazione con cristal violetto (Figura 63c), si può osservare che i pozzetti più intensamente colorati, cioè quelli in cui si ha avuta la massima crescita microbica rispetto ai controlli sono quelli relativi ai campioni A, ovvero le MPB tal quali. A seguire, la crescita microbica (e la colorazione) diminuisce passando dalle membrane con CH HMW (B), per diventare praticamente incolore per i campioni con CH MMW (C) LMW (D), e indicando così una potenziale attività antimicrobica del chitosano a medio e basso MW, rispetto a quello ad alto.

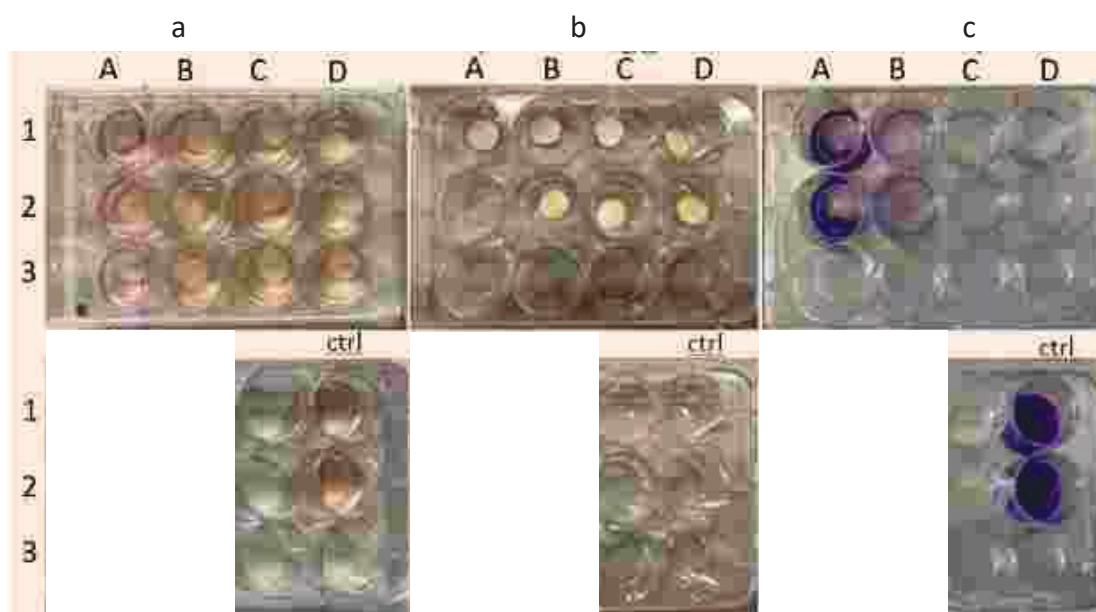


Figura 63. Pozzetti dei campioni A-D e ctrl a) con provini dopo 24 h di inoculo, b) con provini dopo lavaggio e c) dopo colorazione

Il trend di crescita sui dischetti sopra espresso è rilevabile in modo analogo anche sul fondo dei pozzetti corrispondenti, come si può evincere in Figura 64 (foto al microscopio ottico): si osserva la maggiore crescita microbica rispetto ai controlli (ctrl) sul pozzetto corrispondente alla membrana tal quale (A), minore su quello corrispondente alla membrana con CH HMW (B) e ancora più bassa su quello della membrana con CH MMW (C) e LMW (D).

L'attività filmogena di *C. parapsilosis* potrebbe essere anche inibita dalla semplice presenza fisica del dischetto di campione sul fondo del pozzetto, e per questo la crescita potrebbe risultare più blanda nei campioni A-D rispetto ai controlli. Tuttavia, la variabilità osservata all'interno del gruppo campioni indica che la crescita microbica è contrastata non solo dalla presenza fisica del campione sul fondo del pozzetto ma anche dal tipo di campione, e quindi dovuta in qualche modo alla presenza di CH di vari MW e/o dei solidi.

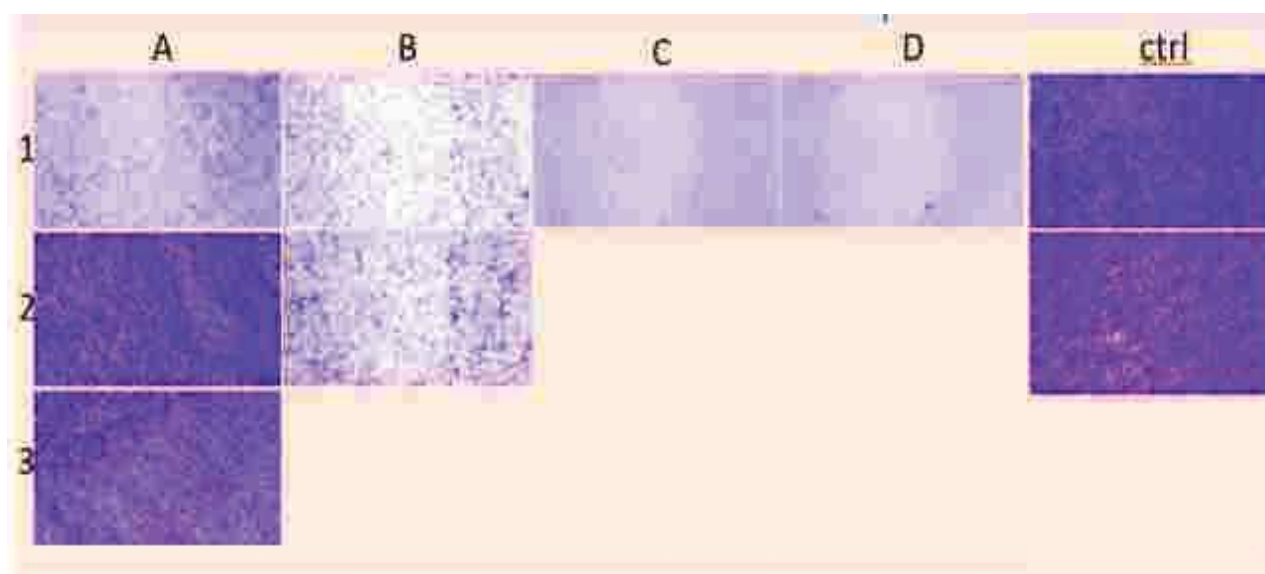


Figura 64. Foto al MO dei fondi dei pozzetti per i campioni A-D e ctrl

Per confermare questa ipotesi, è stata verificata la crescita microbica in sospensione nel terreno tramite lettura della OD. Dai dati spettrofotometrici dei vari pozzetti, riportati in Tabella 21, e colorati

a seconda del valore (OD<0,06 verde chiaro, OD<0,1 verde, OD<0,14 verde oliva, OD<0,22 giallo, OD<0,24 ocra, OD<0,28 arancio, OD<0,6 rosso, OD>0,6 rosso scuro) è emerso che la crescita microbica in sospensione è maggiore nei controlli e poi progressivamente minore nei pozzetti con: MPB tal quali, CH HMW, CH MMW e CH LMW, indicando una concordanza con i dati ottenuti al MO e confermando l’effetto del MW del CH sulla crescita microbica, in sospensione o forma biofilm adeso ai provini.

Tabella 21. Lettura della OD sui terreni dei vari pozzetti a seguito di 24 h di incubazione con i provini

	A	B	C	D	ctrl	plastica
1	0,1514	0,1654	0,0775	0,1182	0,6383	0,04
2	0,1011	0,2525	0,0812	0,0556	0,5464	
3	0,2225	0,1536	0,0733	0,0785		

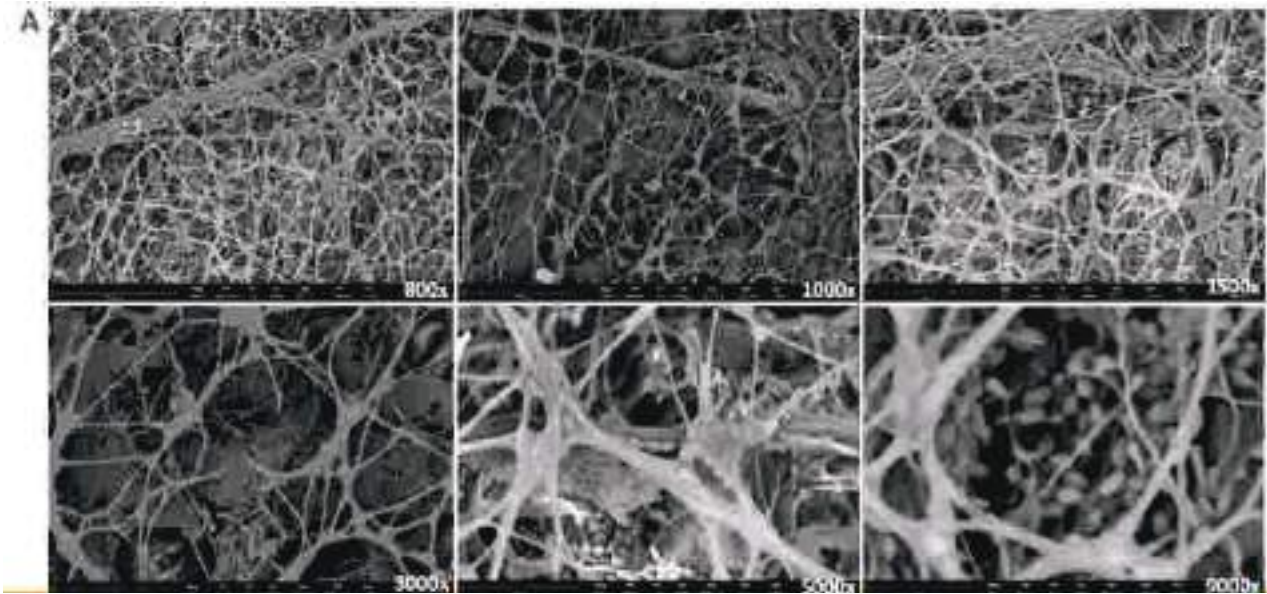


Figura 65. Immagini SEM del campione A (MPB tal quale) a vari ingrandimenti

Di seguito le immagini SEM delle MPB tal quali (Figura 65), con CH HMW (Figura 66), MMW (Figura 67) e LMW (Figura 68).

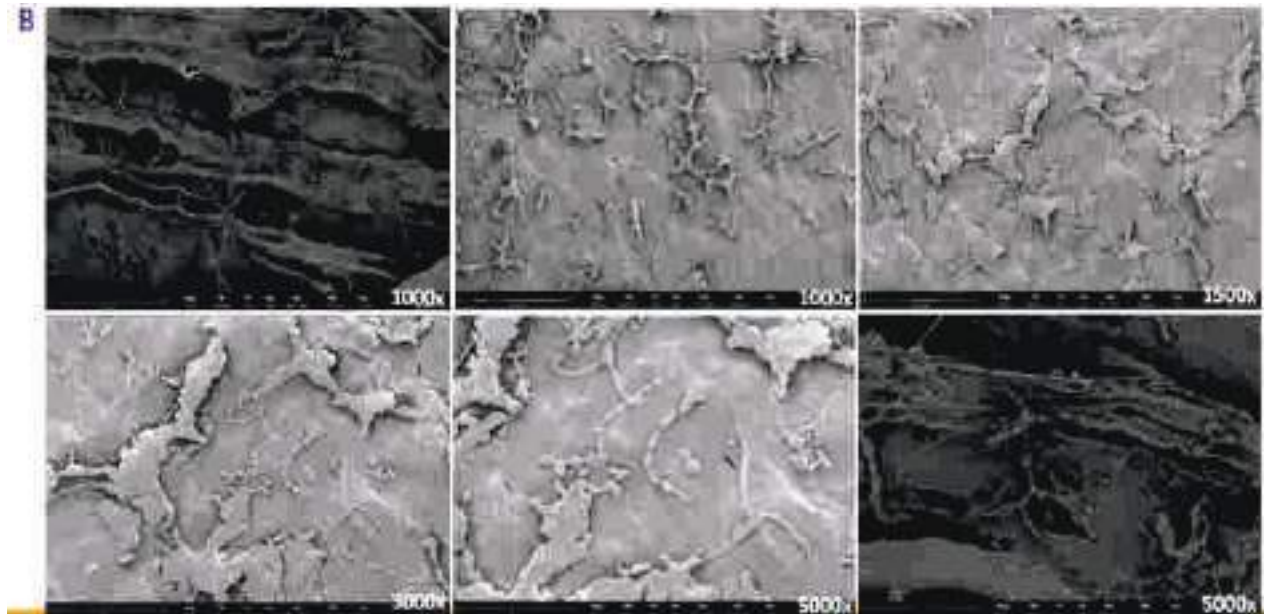


Figura 66. Immagini SEM del campione B (MPB + CH 2% HMW) a vari ingrandimenti

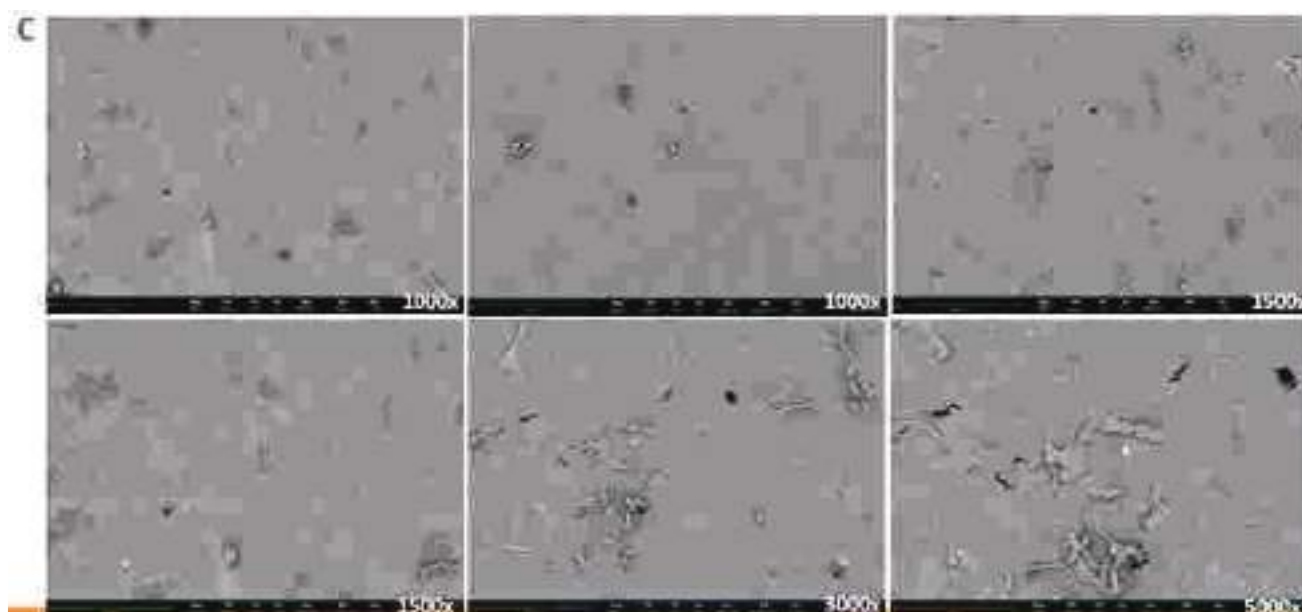


Figura 67. Immagini SEM del campione C (MPB + CH 2% MMW) a vari ingrandimenti

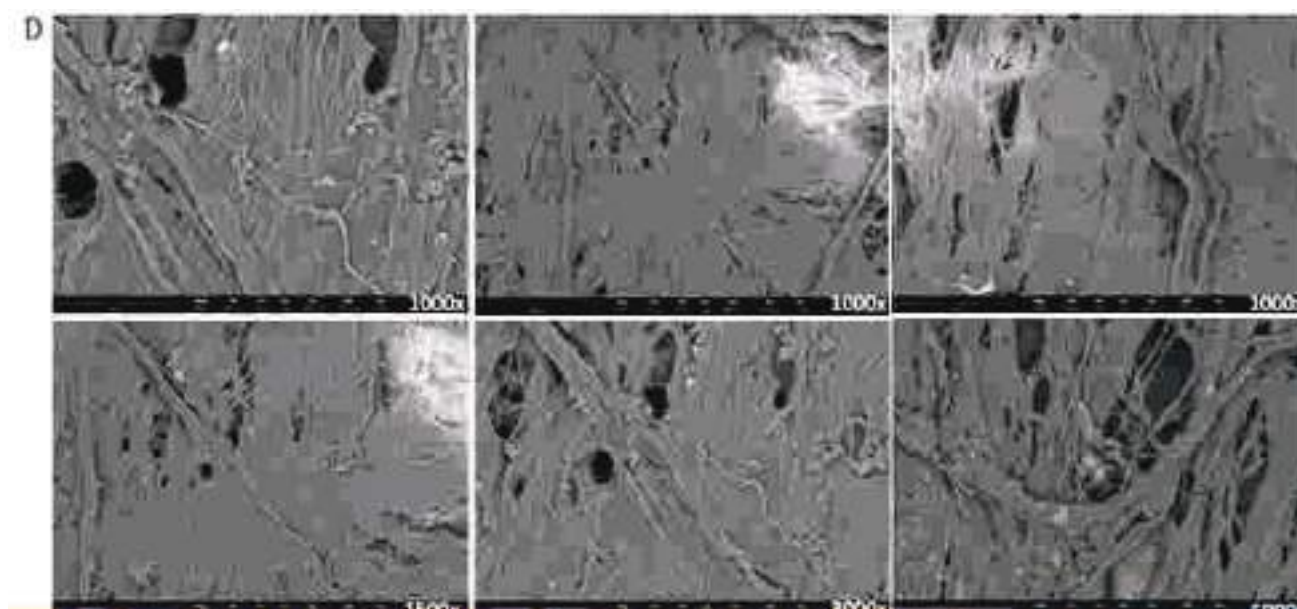


Figura 6845. Immagini SEM del campione D (MPB + CH 2% LMW) a vari ingrandimenti

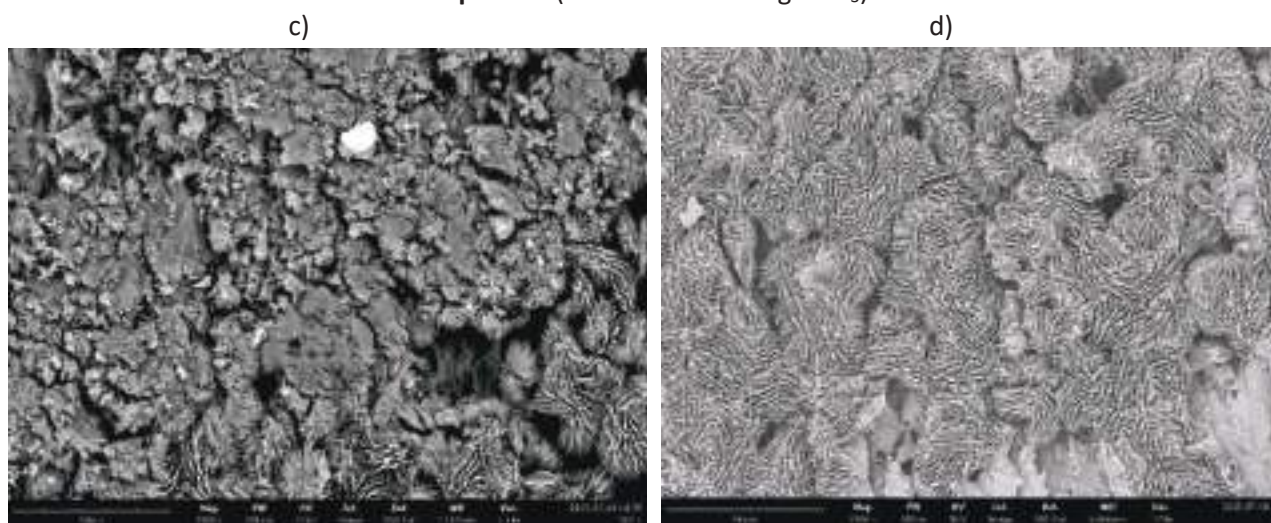
Dalle immagini SEM è possibile osservare come, in linea con l'ipotesi precedentemente espressa, la crescita microbica sia massima nelle membrane tal quali, con le cellule che vanno ad occupare ogni anfratto tra le fibre della membrana stessa. Tale crescita è decisamente inferiore nel caso delle membrane con CH HMW, dove si possono osservare ampi gruppi cellulari adesi alle sporgenze delle fibre e nelle cavità, ma non la copertura riscontrata nel caso precedente; mentre è del tutto trascurabile nel caso del CH MMW, che praticamente forma un film impenetrabile in superficie con pochissime rappresentanze di *C. parapsilosis*. La membrana con CH LMW presenta una situazione di scarsa crescita cellulare, ma maggior rispetto a quella del campione con MMW.

I risultati del test antibiofilm effettuato sui campioni A-D hanno mostrato che mentre la MPB tal quale è un buon substrato per la crescita del biofilm, le membrane trattate con chitosano a medio e basso peso molecolare sono molto meno propense dalla colonizzazione da parte delle cellule microbiche di *C. parapsilosis*.

Risultati diversi sono stati ottenuti nel caso dei campioni prodotti con il metodo del bar-coating (E,F,G,H,I,L) anziché immersione (B,C,D), come si può osservare dalle immagini SEM in Figura 69. Le membrane deposte con chitosano e solidi via bar-coating presentano – a differenza di quelle prodotte per immersione (Figure 65-68) vari gradi di crescita microbica. In particolare, nei campioni con $MgAlCO_3$ (Figura 69 a,b) e α -ZrP (e,f), si possono osservare numerose cellule microbiche tra le lamelle di solido lamellare. Nei campioni con ZrP nano (i,j) il gel non è ben visibile sulla superficie della MPB, mentre nel caso dello ZrP-tris (m,n) sono presenti agglomerati e non sono visibili le singole particelle di solidi lamellari, ma anche in questi due casi si osserva un'intensa colonizzazione microbica, come nel caso della membrana con solo chitosano (u,v). Nel caso invece del campione con il mix dei solidi (q,r) la grande copertura della membrana da parte dei solidi lamellari sembra non aver permesso colonizzazione microbica probabilmente per un effetto di impedimento fisico, ma non essendo le cellule ben distinguibili dai solidi, non è possibile trarre conclusioni definitive. In tutti i campioni a seguito di uptake di clorexidina invece si osserva una crescita microbica praticamente trascurabile e la presenza dei cristalli di clorexidina (formazioni sferiche) sulla superficie dei provini (Figura 69 c,d,g,h,l,o,p,s,t). Le scarsissime cellule, singole e non formanti strutture pseudo-biofilm sono in particolar modo visibili in Figura 69 k,w e x, dove si può notare una totale assenza di proliferazione cellulare anche nelle zone cave o con morfologia di fatto più soggetta a colonizzazione.



Campione E (MPB + CH 2% + $MgAlCO_3$)



Campione EC (MPB + CH 2% + $MgAlCO_3$ + CLO DG)

e)

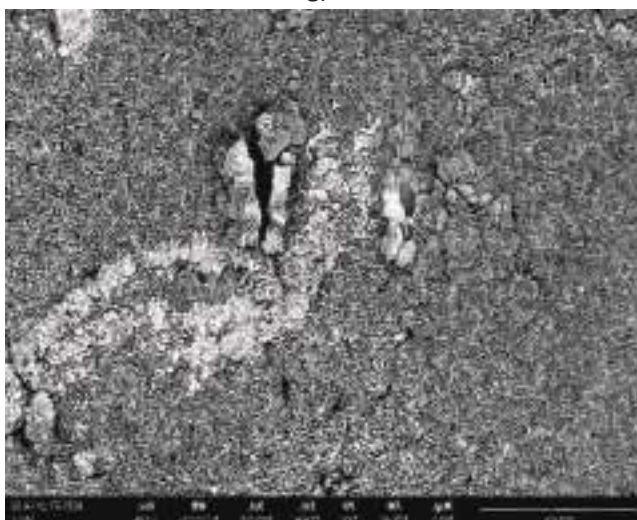


f)

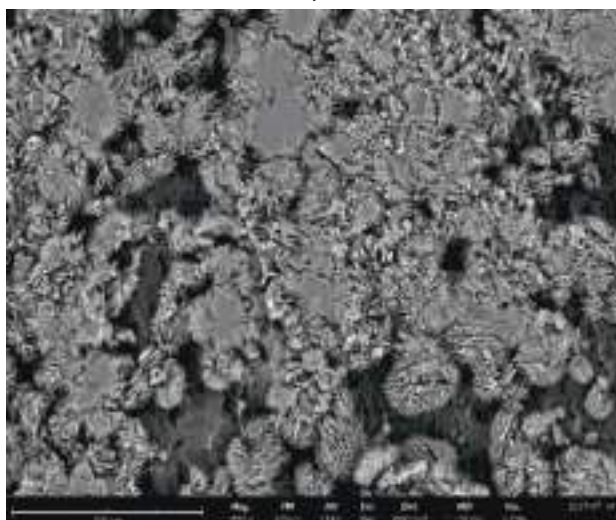


Campione F (MPB + CH 2% + α -ZrP)

g)

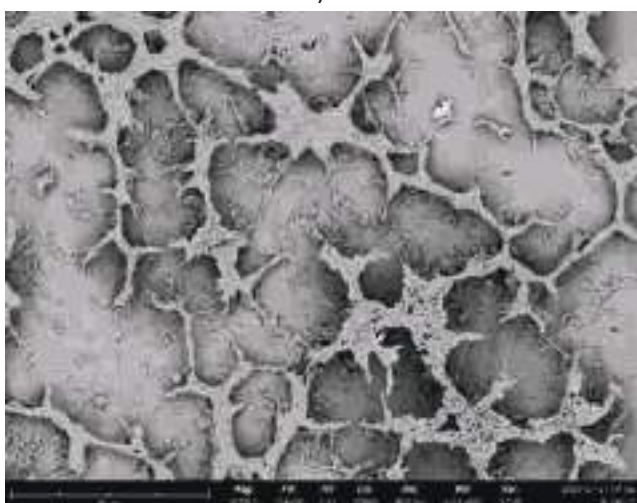


h)



Campione FC (MPB + CH 2% + α -ZrP + CLO DG)

i)

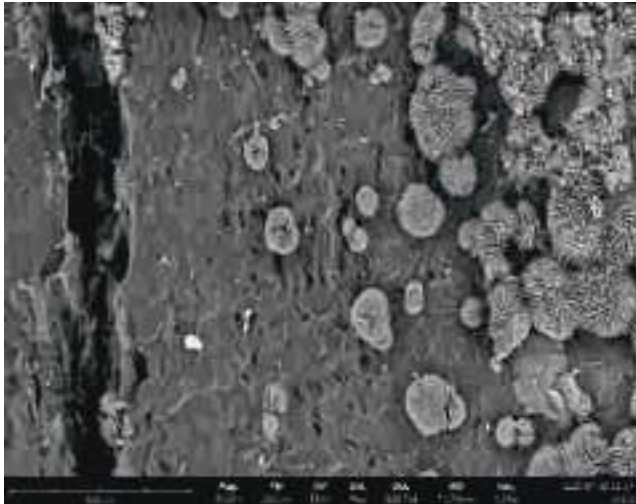


j)

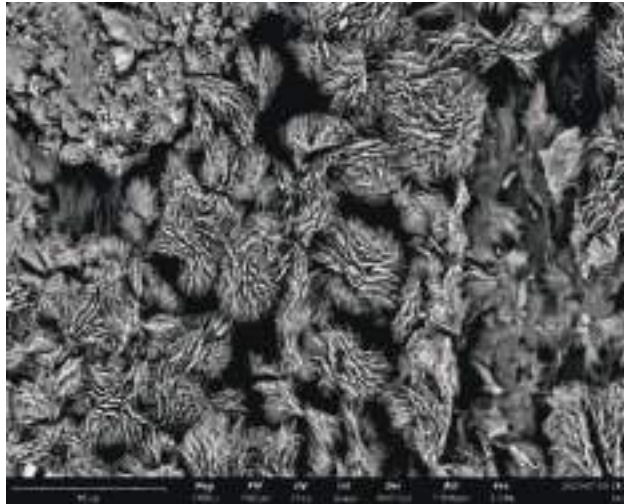


Campione G (MPB con CH 2% + ZrP nano)

k)

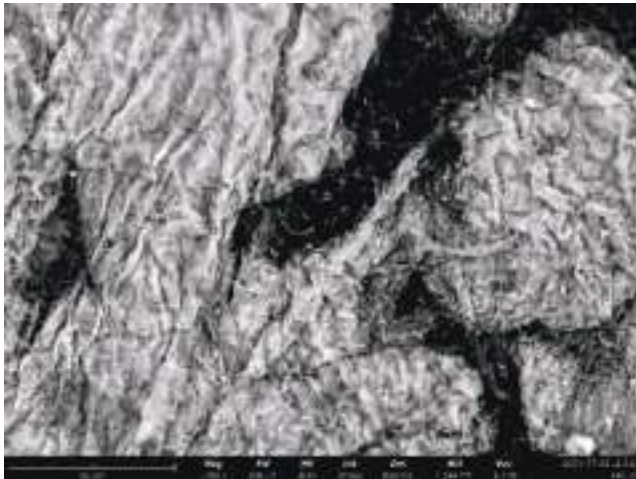


l)



Campione GC (MPB con CH 2% + ZrP nano + CLO DG)

m)

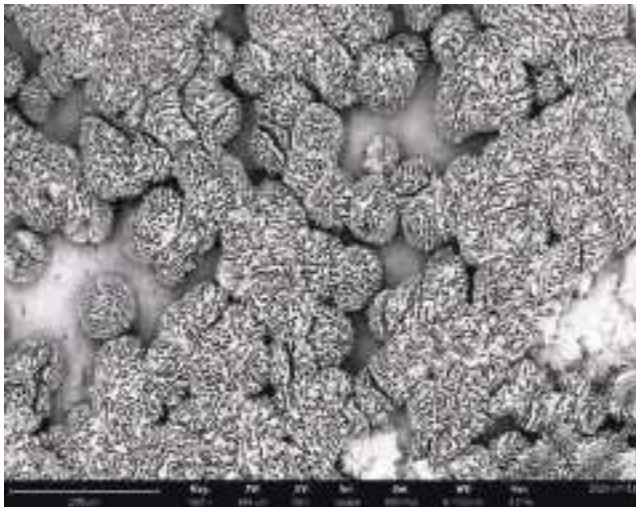


n)



Campione H (MPB con CH 2% + ZrP-tris)

o)



p)



Campione HC (MPB con CH 2% + ZrP-tris + CLO DG)

q)

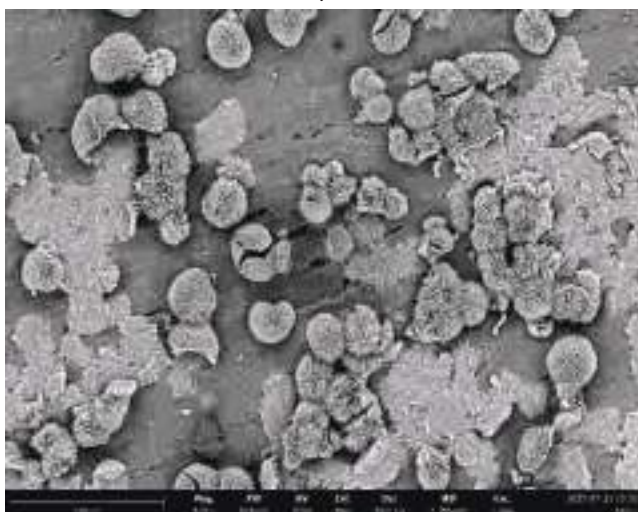


r)

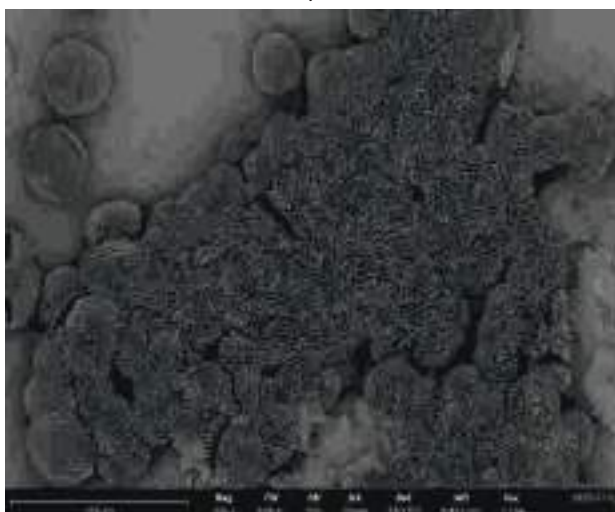


Campione I (MPB con CH 2% + mix solidi)

s)

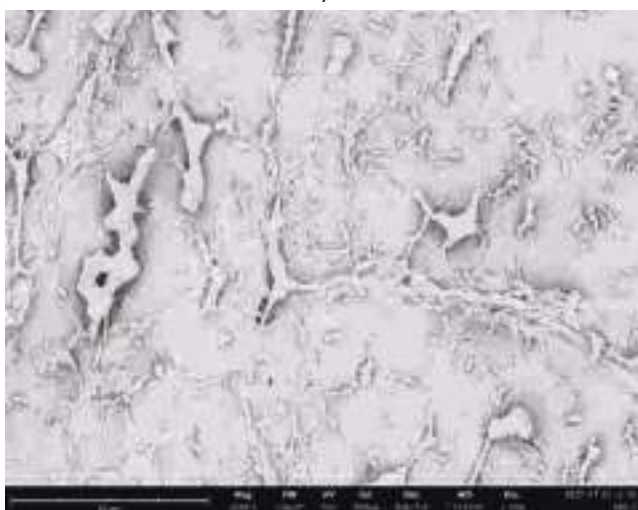


t)



Campione IC (MPB con CH 2% + mix solidi + CLO DG)

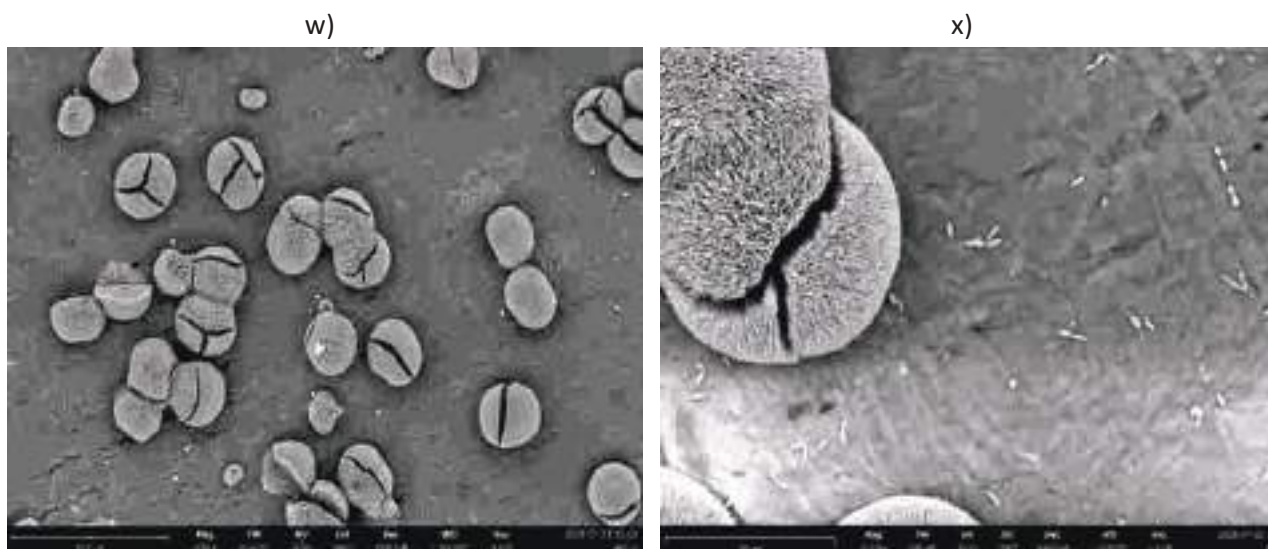
u)



v)



Campione L (MPB con CH 2%)

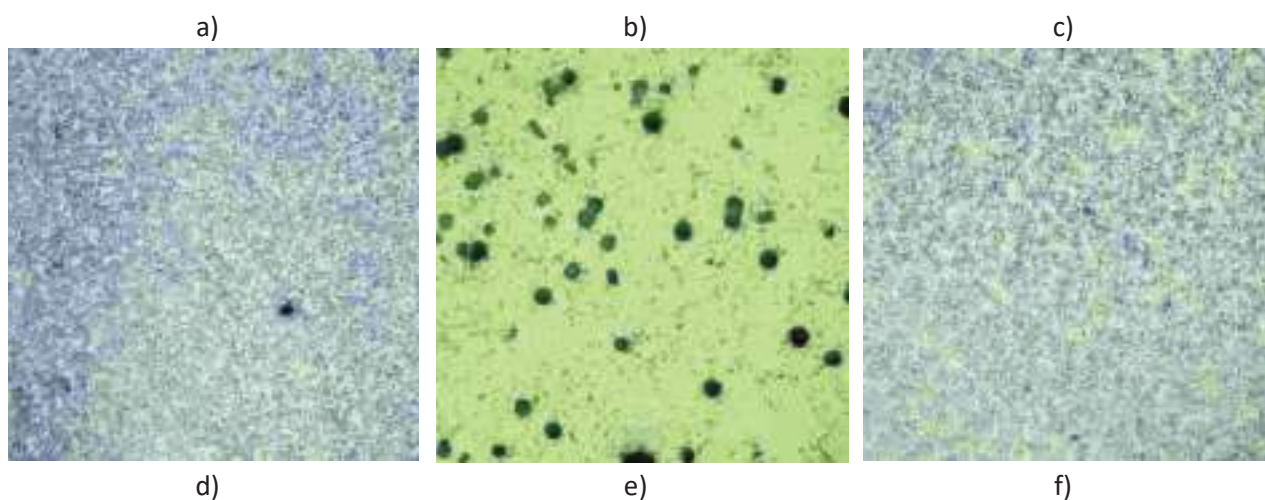


Campione LC (MPB con CH 2% + CLO DG)

Figura 69. Immagini SEM dei campioni a e b) E, c e d) EC, e e f) F, g e h) FC, i e j) G, k e l) GC, m e n) H, o e p) HC, q e r) I, s e t) IC, u e v) L, w e x) LC a vari ingrandimenti

In conclusione, tutti i campioni dove è stato realizzato l'uptake di clorexidina non mostrano presenza di biofilm di *C. parapsilosis*, confermando che la membrana ingegnerizzata con i solidi lamellari e le biocolle una volta imbibita con l'antisettico mostra inibizione dell'adesione del biofilm. I prototipi non imbibiti con l'antisettico invece, nel caso in cui il chitosano è depositato per immersione presentano attività anti-biofilm (nel caso di chitosano a medio e basso MW), mentre quelli ottenuti via bar-coating non presentano tale attività intrinseca, di fatto facendo ipotizzare che il metodo di deposizione delle soluzioni a base di CH sia fondamentale nella attività antibiofilm del prototipo, probabilmente per via della natura di schermatura fisica del CH verso la crescita microbica.

Risultati sul trend di crescita microbica in accordo con le immagini SEM sono stati ottenuti dalla analisi in microscopia ottica dei fondi dei pozzetti, riportate in Figura 70, dove è possibile osservare anche i cristalli di CLO (formazioni sferiche scure). Come previsto, in tutti i campioni con CLO (b,d,f,h,j) la crescita microbica è nettamente inferiore rispetto a quelli senza antisettico (a,c,e,g,i), i quali presentano invece crescita del tutto simile al controllo, cioè alla MPB tal quale (k).



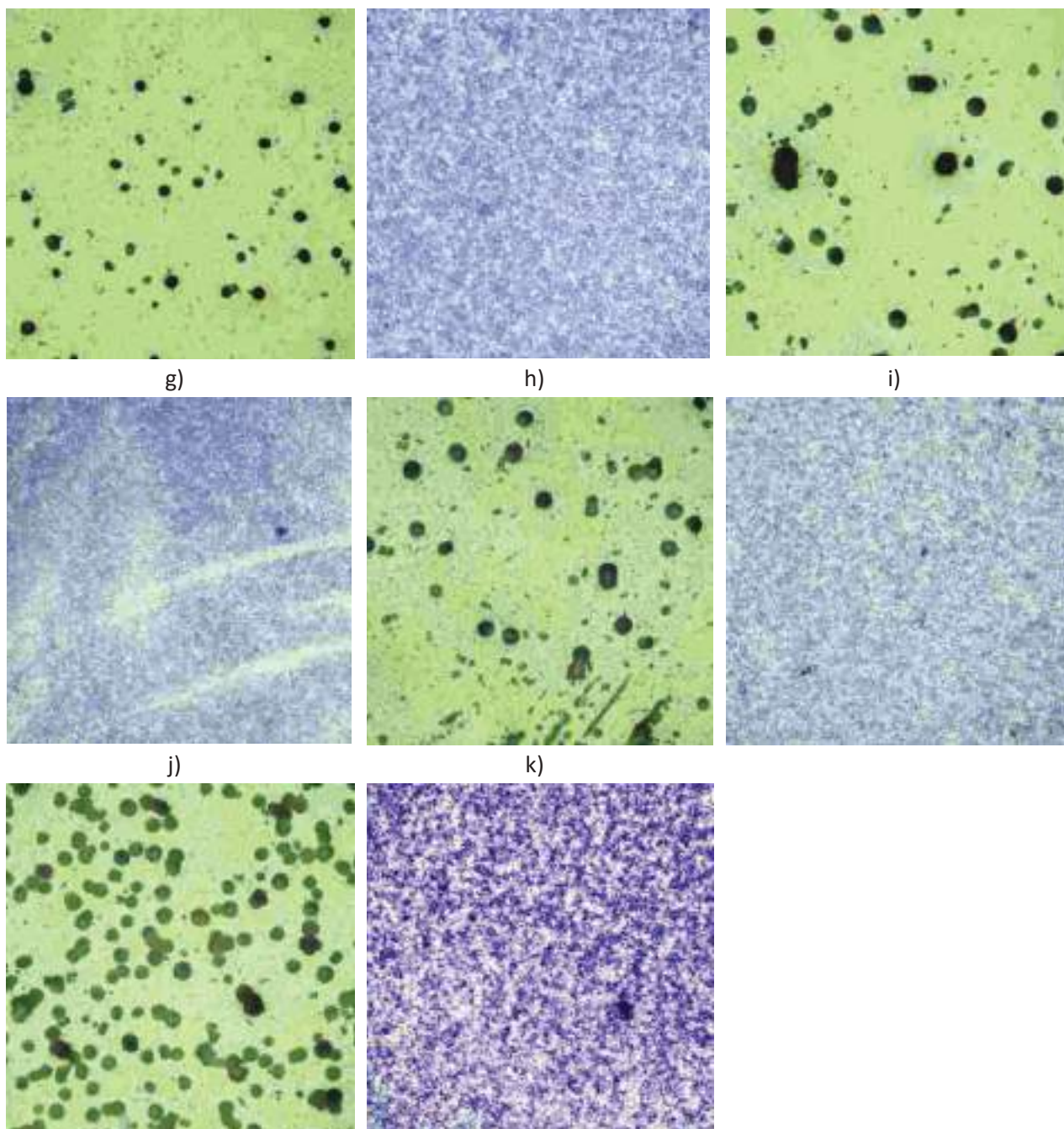


Figura 70. Immagini al MO dei campioni a) F, b) FC, c) G, d) GC, e) H, f) HC, g) I, h) IC, i) L, j) LC, k) ctrl.

3.5.2 Test antibiofilm verso *Staphylococcus epidermidis*

I dati indicati in Tabella 21 mostrano il titolo del ceppo al momento dell'inoculo nei pozzetti e il titolo dell'inoculo ottenuto dopo le 48 ore di incubazione a 37°C. La condizione di validità del test indicata dalla norma ISO 4768:2023 è soddisfatta quindi il test eseguito è ritenuto valido.

Tabella 21. Titolo del ceppo microbico in CFU/ml

	CFU/ml
Inoculo iniziale	$6,6 \times 10^4$
Titolo dopo 48 h incubazione	$7,9 \times 10^7$

In Tabella 22 sono riportati i valori delle misurazioni allo spettrofotometro (OD_{600}) dei campioni trattati con il ceppo (M e RIF) o con il solo terreno di coltura (M_0 e RIF_0), ognuno come media di tre misurazioni. Vengono riportati anche i dati del bianco.

Tabella 22. Misurazioni allo spettrofotometro della OD600 dei campioni testati

Campione M ₀				Campione RIF ₀			bianco
Media ± Dev st	Pozzetto 1	Pozzetto 2	Pozzetto 3	Pozzetto 1	Pozzetto 2	Pozzetto 3	-
	0,4810	0,5220	0,4550	0,2990	0,3570	0,4260	0,0450
	0,5450	0,4800	0,5240	0,3220	0,3790	0,4430	0,0470
	0,5130	0,5010	0,4895	0,3105	0,3680	0,4345	0,0460
	0,5012 ± 0,0277			0,3710 ± 0,0545			-
Campione M			Campione RIF			bianco	
Media ± Dev st	Pozzetto 1	Pozzetto 2	Pozzetto 3	Pozzetto 1	Pozzetto 2	Pozzetto 3	-
	0,7520	1,0330	1,0810	0,4010	0,6980	0,5570	0,5570
	0,8940	1,1700	1,2050	0,3610	0,7480	0,5790	0,5790
	0,8230	1,1015	1,1430	0,3810	0,7230	0,5680	0,5680
	1,0225 ± 0,1616			0,5573 ± 0,1493			-

In Tabella 23 è possibile osservare come il valore di inibizione percentuale del biofilm ottenuto per il campione M indichi che non c'è per questo campione attività anti-biofilm nei confronti del ceppo *Staphylococcus epidermidis* nelle condizioni di test.

Tabella 23. Valori di OD₆₀₀ del campione trattato e non trattato dopo sottrazione dei bianchi e percentuale di inibizione del biofilm

A (M-M ₀)	B (RIF-RIF ₀)	Inibizione %
0,4753	0,1403	-240%

Anche in questo caso quindi, come già visto nei test antibiofilm verso *C. parapsilosis*, i campioni prodotti via bar-coating non mostrano attività antibiofilm intrinseca, confermando l'importanza della modalità di deposizione del coating a base di chitosano per ottenere questa funzionalità nei prototipi.

Conclusioni

Il progetto della presente tesi ha avuto come obiettivo la messa a punto di materiali e protocolli innovativi per il conferimento di struttura 3D stabile in ambiente umido e per la riduzione della contaminazione microbica e la prevenzione della formazione di biofilm su membrane in pericardio bovino utilizzate come dispositivi biomedicali. I risultati ottenuti hanno permesso di validare approcci originali e di aprire nuove prospettive di sviluppo, confermando la rilevanza applicativa e industriale delle soluzioni proposte.

Per quanto riguarda la messa a punto di metodi per il conferimento della struttura 3D alla MPB, la ricerca di modalità di essiccamento adeguate ha portato alla selezione della liofilizzazione come metodo di elezione, in quanto è l'unico che permette alle membrane di mantenere inalterata la loro integrità strutturale: in tutti gli altri casi analizzati invece (essiccamento con acetone, P_2O_5 , condizioni ambientali), si osserva un'eccessiva disidratazione delle fibre, con collasso della microstruttura, come mostrato dalle immagini SEM e confermato dalla percentuale di umidità relativa ottenuta tramite analisi termo gravimetrica (UR = 12% nel caso della liofilizzazione, UR > 16% negli altri casi). Inoltre, il processo di liofilizzazione delle membrane direttamente su dima ha permesso di osservare come esse, da secche, mantengano la struttura 3D conferitagli. È stata inoltre confermata l'idoneità dei materiali usati per le dime (acciaio inox e plastica PA12) nel mantenimento delle proprietà strutturali del PB.

Per quanto riguarda invece la messa a punto di metodi per la reticolazione delle membrane, utili per mantenerne la forma 3D in ambiente umido come quello biologico, il trattamento delle MPB con TPP ha dato dei risultati intermedi (357%), in termini di assorbimento di acqua, tra la GLU (325%) e i controlli (362%), indicando una reticolazione più blanda di quella con GLU, ma che permette di avere risultati migliori in termini di assorbimento di acqua rispetto ai campioni non trattati. Considerando invece i dati ottenuti per le MPB rivestite con coating polimerico a base di chitosano, si hanno risultati migliori in termini di assorbimento di acqua (minore aumento di peso %) per le membrane trattate con CH (HMW, 329% e MMW, 344% nel caso del TPP) rispetto a quelle non rivestite (357%), ad indicare un effetto sinergico della reticolazione del collagene di membrana e del chitosano del coating.

In conclusione, si è ottenuto che il TPP ha un effetto sull'assorbimento di acqua da parte dei campioni migliorativo rispetto ai controlli, anche se più blando rispetto alla GLU, e non dà criticità a livello di variazione delle proprietà meccaniche ed elastiche del tessuto e della citotossicità, a differenza della GLU. Se si accoppia il trattamento con TPP con l'utilizzo della biocolle chitosano, i risultati in termini di assorbimento di acqua sono anche migliori. Tuttavia, il mancato riscontro a livello di mantenimento della forma 3D in ambiente umido per 24h, poiché nessuno dei campioni mantiene la forma conferitagli dalla dima in queste condizioni, rende questo metodo non particolarmente informativo del grado di cross-linking e rende necessari ulteriori studi sulle condizioni d'uso del TPP e sulla sua valutazione, anche tramite tecniche quali FTIR, TGA e SEM.

La sperimentazione riguardante l'adesione dei solidi lamellari alle membrane per renderle dei substrati proattivi al caricamento con API anti-biofilm, ha portato alla selezione delle specie $MgAlCO_3$ 3:1, α -ZrP, ZrP-tris, ZrP nano come solidi lamellari di elezione, per le loro caratteristiche di biocompatibilità e di elevata capacità di caricamento con specie farmaceutiche, quest'ultima dovuta

anche alla loro elevata area superficiale e al pre-allargamento delle lamelle. Tali solidi sono stati sintetizzati e caratterizzati dal punto di vista dimensionale, morfologico e di composizione.

La sperimentazione relativa alle biocolle ha portato al testing di varie soluzioni di adesione a base di CH, COL, GEL e CEL, o di combinazioni di queste biocolle, e sono state selezionate quelle a base di chitosano a medio peso molecolare e della combinazione chitosano - collagene come soluzioni più idonee. Le loro caratteristiche intrinseche, tra cui pH e viscosità, rendono infatti queste soluzioni conciliabili con la stabilità dei solidi lamellari, come risultato dalle analisi XRD e ICP; compatibili con il mantenimento delle proprietà di membrana inalterate, come ottenuto dalle analisi SEM; e correlate ai migliori risultati in termini di flessibilità delle membrane, stabilità di adesione del film polimerico sulle membrane, omogeneità e stabilità dei solidi adesi a secco e in seguito a sollecitazione meccanica (strofinio). Inoltre, il trattamento con le soluzioni scelte non solo non modifica sostanzialmente le proprietà strutturali e funzionali delle membrane e dei solidi lamellari, ma ben si combina con il processo di liofilizzazione, fornendo anzi un supporto al mantenimento della loro forma 3D, se conferitagli prima della liofilizzazione.

A seguito delle prove sui protocolli di deposizione e della valutazione e caratterizzazione dei provini ottenuti, è stata selezionata come tecnica di elezione il bar-coating, per via delle sue caratteristiche di riproducibilità, semplicità di esecuzione ed efficienza, e poiché ha permesso di ottenere i risultati migliori in termini di omogeneità della distribuzione dei solidi in superficie, come ottenuto dalle analisi XRD, SEM ed EDX, e di tenacità dell'adesione del film e dei solidi sulla superficie dei provini. Sono state determinate le condizioni ottimali (diversa concentrazione di solido, diversa composizione di solidi, diverso numero di stesure, uno o due lati di stesura) per il protocollo di bar-coating. È stato ottenuto un prototipo di MPB con biocolle a base di CH e solidi lamellari, stabile in ambiente umido a 24 h, con carichi massimi di solidi pari alle seguenti percentuali (in peso rispetto al peso della membrana anidra): 3% per MgAlCO_3 , 2% per $\alpha\text{-ZrP}$, 12% per ZrP nano, 18% per ZrP-tris, 39% per il mix dei solidi (w/w). Gli stessi risultati sono stati ottenuti con la biocolle CH – COL 0,5%, tranne che nel caso dello $\alpha\text{-ZrP}$, il cui massimo carico stabile su membrana è risultato essere dell'8% (w/w). Poiché l'intervallo previsto inizialmente per il carico dei solidi su membrana era compreso tra lo 0,5 e il 10%, le attività sperimentali hanno portato in alcuni casi a risultati superiori all'atteso, e in particolare hanno dimostrato che le strategie di deposizione dei solidi lamellari influenzano in modo critico sia l'adesione che l'omogeneità del carico e hanno confermato il ruolo chiave e l'ambivalenza funzionale del chitosano, in quanto esso può sia agire da biocolle favorendo l'adesione dei solidi lamellari alla membrana, sia può aumentare la rigidità della membrana tramite reticolazione.

Le prove di intercalazione degli API di interesse nei solidi lamellari selezionati, svolte in via preliminare, hanno mostrato come $\alpha\text{-ZrP}$ sia un candidato idoneo per l'intercalazione (nei tempi desiderati e compatibili con le procedure di sala operatoria) sia di clorexidina che di PHMB, come si può dedurre dalle analisi XRD, TGA e DSC dei prodotti di intercalazione. Le analisi XRD infatti mostrano una modifica della distanza inter-lamellare tra la fase iniziale del solido e quella a seguito di contatto con l'API, dovuta all'intercalazione della specie attiva; mentre le analisi TGA e DSC mostrano rispettivamente un incremento nella perdita di peso percentuale e una variazione nelle transizioni termiche tra la fase iniziale del solido e il composto di intercalazione, ad indicare la presenza di molecole organiche in quest'ultimo. Per ZrP-tris non è stato possibile trarre risultati dall'analisi TGA, a causa della presenza dell'esfoliante organico tris nella fase iniziale, mentre per ZrP nano, essendo amorfo, non è stato possibile ottenere informazioni dallo spettro XRD. Tuttavia,

sia XRD per ZrP-tris che TGA per ZrP nano, hanno permesso di rilevare la presenza dell'API nel composto finale, confermando come questi due solidi lamellari siano anch'essi idonei per l'intercalazione di PHMB. Non è stata sperimentata l'intercalazione di vancomicina nell'idrotalcite poiché già ampiamente descritta in letteratura [151].

Dall'attività sperimentale portata avanti per l'uptake degli API da parte dei prototipi è stato ottenuto un protocollo semplice, funzionale e facilmente adattabile alle condizioni di sala operatoria, grazie ai tempi di contatto ridotti e all'utilizzo di concentrazioni clinicamente rilevanti, in linea con la pratica chirurgica. L'obiettivo della sperimentazione era il caricamento su membrana di un quantitativo di API maggiore di 1,0 mg/cm². La sperimentazione ha mostrato che, nel caso della clorexidina, i prototipi analizzati (a diversa composizione e concentrazione di solidi lamellari) sono tutti efficaci nel caricare un quantitativo di antisettico per unità di membrana maggiore di tale valore, e che tale quantitativo è, nel caso della membrana tal quale, circa 2 volte e mezzo superiore rispetto ai prototipi analizzati, fatto dovuto con ogni probabilità alla "saturazione" dei siti disponibili delle membrane trattate con la biocolla e i solidi rispetto alle tal quali, che di fatto si traduce in una minore imbibizione con la soluzione di API. La differenza osservata tra i vari prototipi suggerisce invece che il meccanismo di uptake nelle membrane funzionalizzate non sia puramente fisico, ma mediato anche dalle interazioni chimiche tra API e solidi lamellari. Tali interazioni, pur limitando la capacità di imbibizione, sono funzionali a un rilascio controllato e prolungato. Anche nel caso del PHMB l'uptake ha prodotto risultati simili a quelli ottenuti per clorexidina, con maggiore carico da parte della membrana tal quale rispetto a quelle funzionalizzate, mentre per quanto riguarda la vancomicina, in questo caso il prototipo di MPB con CH e solidi lamellari è efficace nel caricare un quantitativo di specie antibiotica maggiore rispetto a quello caricato dal controllo, che è paragonabile ai quantitativi osservati per le altre due specie antimicrobiche per le membrane tal quali.

Per quanto riguarda i test di rilascio, per tutti gli API oggetto di sperimentazione (tranne PHMB) è stato messo a punto un protocollo riproducibile e in grado di simulare condizioni simili a quelle *in vivo*. L'obiettivo della sperimentazione era ottenere un quantitativo di rilascio di API superiore alla MIC per il periodo più lungo possibile, in modo da garantire una quantità locale rilasciata di API sufficiente ad esercitare l'azione antimicrobica e a prevenire l'insorgenza di biofilm. Obiettivo del test di rilascio era anche ottenere un rilascio pari ad almeno 10 mg/die di specie antimicrobica e un rilascio medio giornaliero superiore a 0,05 mg/cm²,

Per quanto riguarda la clorexidina, la cinetica di rilascio mostra un titolo più elevato nelle prime 24 ore per la membrana tal quale, in linea con l'uptake inizialmente maggiore, tuttavia, nei giorni successivi (48 h – 7 giorni) i quantitativi rilasciati dai diversi prototipi (compresa la membrana tal quale) risultano paragonabili, dimostrando la capacità degli stessi di garantire un rilascio sostenuto e controllato. La concentrazione (mg/ml) di clorexidina rilasciata è superiore alla MIC verso *Staphylococcus epidermidis* (2 µg/ml) [148] per tutti e 7 i giorni di analisi e per tutti i campioni tranne la membrana tal quale; tale concentrazione è invece superiore alla MIC verso *Candida spp.* (< 145 µg/ml) [141] solo fino al giorno 3, nel caso della membrana con CH e mix di solidi fino al giorno 4. Si può quindi concludere che almeno fino al giorno 4 del test i prototipi sono efficaci nel rilasciare un quantitativo di antisettico sufficiente a garantire attività antimicrobica verso *S. epidermidis* e *Candida spp.* Il quantitativo complessivo di antisettico rilasciato dai prototipi nell'arco di 7 giorni varia nel range 143-177 mg, contro i 429 mg rilasciati dalla membrana di riferimento, con un decremento nella quantità del 33-41%. Da questi dati si può ottenere che i mg/die rilasciati sono circa

20-25 per tutti i prototipi analizzati (e 61 per la membrana tal quale), rientrando pienamente negli obiettivi prefissati. Il rilascio medio giornaliero per unità di area di membrana è risultato essere pari a 2,55 mg/die/cm² per la membrana tal quale e da 0,85 a 1,05 mg/die/cm² per le membrane prototipo, risultati in linea con gli obiettivi prefissati (valori superiori a 0,05 mg/cm²).

Nel caso della Vancomicina, la cinetica di rilascio è simile nell'andamento tra la membrana prototipo e il controllo, mostrano un valore abbastanza costante fino al giorno 12, per poi diminuire nei giorni 15-20. In ogni caso si osserva un quantitativo di farmaco rilasciato maggiore da parte della membrana funzionalizzata rispetto alla tal quale. La concentrazione (mg/ml) di vancomicina rilasciata è superiore alla MIC verso *Staphylococcus epidermidis* (2 µg/ml) [150] per tutta la durata del test (20 giorni) sia per il prototipo che per la membrana tal quale, rendendo il prototipo efficace nel rilasciare un quantitativo di antibiotico sufficiente ad inibire la crescita di *S. epidermidis*. Il quantitativo complessivo di antibiotico rilasciato dai prototipi nell'arco di 20 giorni è pari a 73,4 mg, contro i 57,8 mg della membrana di riferimento, con un incremento nella quantità del 27%. Da questi dati si può ottenere che i mg/die rilasciati sono circa 3,63 per il prototipo analizzato e 2,89 per la membrana tal quale, risultando più bassi di quelli prefissati inizialmente ma comunque promettenti per efficacia. Normalizzando i dati per superficie, la membrana trattata ha rilasciato 1,70 mg/cm² rispetto a 1,13 mg/cm² della membrana di riferimento (+53%). Il rilascio medio giornaliero per unità di area di membrana è risultato essere pari a 0,086 mg/die/cm² per la membrana prototipo e 0,057 mg/die/cm² per la membrana tal quale, risultati in linea con gli obiettivi prefissati (valori superiori a 0,05 mg/cm²).

Per il PHMB non è stato possibile ottenere risultati quantitativi di rilascio per l'assenza di un metodo analitico idoneo; i tentativi effettuati (complessazione con metalli per aumentare la sensibilità e HPLC) non hanno dato esito positivo. Vista la grande versatilità in ambito chirurgico di questo composto, sviluppi futuri della presente sperimentazione prevedranno sicuramente lo sviluppo di metodiche alternative, con particolare interesse verso la LC-MS, considerata la più promettente.

In sintesi, i risultati conseguiti dimostrano che i prototipi di membrane funzionalizzate con chitosano e solidi lamellari sono in grado di assorbire e rilasciare API in quantità clinicamente rilevanti e teoricamente efficaci in termini di attività antibiofilm verso le specie considerate. Si è osservato che il rilascio di tali specie antimicrobiche dai prototipi è più graduale e costante nel tempo rispetto alle membrane tal quali, aspetto funzionale per garantire un effetto terapeutico prolungato e un migliore controllo antibiofilm.

La valutazione dei prototipi non si è basata solo sulla cinetica di rilascio ma ha consistito nell'integrazione dei dati relative all'attività antimicrobica e antibiofilm. Sono stati messi a punto protocolli di valutazione dell'attività antibiofilm, strutturati su due specie microbiche modello: il fungo *Candida parapsilosis* e il batterio *Staphylococcus aureus epidermidis*. Le prove si sono basate sul contatto diretto delle specie con i supporti analizzati e sulla successiva quantificazione della crescita. Questo ha consentito di disporre sia di un'analisi semi-quantitativa (nel caso di *C. parapsilosis*) sia di un'analisi quantitativa (*S. epidermidis*).

Dall'integrazione dei dati ottenuti (SEM, MO, OD) è emerso che le MPB caricate con chitosano mostrano attività antibiofilm nei confronti di *C. parapsilosis*, in particolare quando si utilizzano chitosani a medio e basso peso molecolare, probabilmente per le loro proprietà filmogene, mentre l'effetto risulta meno marcato con il chitosano ad alto peso molecolare. È stato inoltre evidenziato che l'efficacia dipende fortemente dalle modalità di deposizione: l'immersione consente

probabilmente la formazione di uno strato di maggiore spessore e risulta più performante rispetto al metodo del bar-coating. Ciò rende necessario un approfondimento delle condizioni e dei metodi di stesura, al fine di massimizzare l'effetto antibiofilm e di conferire ai prototipi attività biofilm intrinseca oltre a quella fornita dall'antisettico/antibiotico, fornendo così un doppio livello di protezione contro le SSI.

Le immagini SEM dei campioni sottoposti ad up-take di clorexidina hanno confermato l'assenza di proliferazione di *C. parapsilosis* in tutti i campioni, confermando l'efficacia dei prototipi con chitosano e solidi lamellari nell'essere sistemi proattivi al caricamento con antimicrobici. Resta tuttavia da chiarire la durata dell'effetto antimicrobico una volta che la MPB funzionalizzata e imbibita con antisettico venga inserita in un sistema biologico.

In conclusione, l'attività di ricerca ha dimostrato la capacità del sistema di inibire la formazione e la crescita di alcune specie di biofilm patogeni su substrati chirurgici, evidenziandone il potenziale di applicazione nel campo della rigenerazione tissutale e della prevenzione delle infezioni nosocomiali ed ha portato alla definizione di nuove piattaforme ibride lamellari e biopolimeriche per la veicolazione di attivi farmaceutici, con potenziali applicazioni nei settori nutraceutico, cosmetico, farmaceutico e dei dispositivi medici.

Dalla sperimentazione è confermato il ruolo chiave del chitosano e la sua multivalenza funzionale che gli permette di agire sia da biocollo, favorendo l'adesione dei solidi lamellari alla membrana, sia da agente favorente la reticolazione, aumentando l'effetto dei cross-linker, sia di contribuire all'attività antibiofilm del dispositivo medico.

Riferimenti

- [1] *Chitin and chitosan: Properties and applications*. Rinaudo M. **Progress in Polymer Science**, 2006, Vol. 31 (7), 603-632.
- [2] *Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications*. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. **Progress in Polymer Science**, 2011, Vol. 36 (8), 981-1014.
- [3] *A review of chitin and chitosan applications*. Kumar MNVR. **Reactive and Functional Polymers**, 2000, Vol. 46 (1), 1-27.
- [4] *Chitosan and its antimicrobial potential*. Raafat D, Sahl HG. **Microbial Biotechnology**, 2009, Vol. 2, 186–201.
- [5] *Chitosan based bioadhesives for biomedical applications: A review*. Hamed H, Moradi S, Hudson SM, Tonelli AE, Kin MW. **Carbohydrate Polymers**, 2022, Vol. 282.
- [6] *Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship*. Sahariah P, Másson M. **Biomacromolecules**, 2017.
- [7] *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review*. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. **International Journal of Food Microbiology**, 2010, Vol. 144, 51-63.
- [8] *Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action*. Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. **Biomacromolecules**, 2003, Vol. 4 (6).
- [9] *A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan*. Goy RC, De Britto D, Assis OBG. **Polimeros: Ciencia y Tecnologia**, 2009, Vol. 19 (3), 241-247.
- [10] *Antimicrobial Degrees Activity of Acetylation of Chitosan and with Molecular Different Weights*. Omura Y, Shigemoto M, Akiyama T, Saimoto H, Shigemasa Y, Nakamura I, Tsuchido T. **Biocontrol Science**, 2003, Vol. 8 (1), 25-30.
- [11] *Chitosan-based membranes with different ionic crosslinking density for pharmaceutical and industrial applications*. Gierszewska-Drużyńska M, Ostrowska-Czubenko J. **Carbohydrate Polymers**, 2016, Vol. 153, 501-511.
- [12] *Studies on Effect of pH on Cross-linking of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note*. Bhumkar DR, Pokharkar VB. **AAPS PharmSciTech**, 2006, Vol. 7 (2).
- [13] *Antibacterial and Antibiofilm Effect of Low Viscosity Chitosan against Staphylococcus epidermidis*. Dragland IS, Rukke HV, Stenhagen ISR, Lonn-Stensrud J, Kopperud HM. **International Journal of Microbiology**, 2016.
- [14] *Antibacterial, Antibiofilm, and Antiadhesive Properties of Different Quaternized Chitosan Derivatives*. Piras AM, Esin S, Fabiano A, Zambito Y, Benedetti A, Maisetta G, Batoni G. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019, Vol. 20, 6297.
- [15] *Polymeric Bioadhesive Patch Based on Ketoprofen-Hydrotalcite Hybrid for Local Treatments*. Pagano C, Latterini L, Puglia D, Ricci M, Di Michele A, Luzi F, Viseras Iborra CA, Perioli L. **Pharmaceutics**, 2020, Vol. 12, 733.
- [16] *Ionically Crosslinked Chitosan Membranes Used as Drug Carriers for Cancer Therapy Application*. Alecsandra Ferreira Tomaz A, Sobral de Carvalho SM, Cardoso Barbosa R, Silva SML, Gutierrez MAS, De Lima AGB, Fook MVL. **Materials**, 2018, Vol. 11, 2051.

- [17] *Development and Characterization of Xanthan Gum and Alginate Based Bioadhesive Film for Pycnogenol Topical Use in Wound Treatment*. Pagano C, Puglia D, Primavilla S, Luzi F, Ceccarini MR, Di Michele A, Beccari T, Scuota S, Viseras Iborra CA, Ramella D, Ricci M, Perioli L. **Pharmaceutics**, 2021, Vol. 13, 324.
- [18] *Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Chitosan Nanoparticles Against Staphylococcus aureus Strains Isolated from Bovine Mastitis Milk*. Godoy CA, Balic I, Moreno AA, Larenas TB, Gamboa A, Diaz O, Colarte CA, Carofuentes N. **Pharmaceutics**, 2025, Vol. 17, 186.
- [19] *Chitosan and Hydroxyapatite Based Biomaterials to Circumvent Periprosthetic Joint Infections*. Costa-Pinto AR, Lemos AL, Kekhasharú Tavaría F, Pintado M. **Materials**, 2021, Vol. 14, 804.
- [20] *Preparation and Characterization of TPP-Chitosan Crosslinked Scaffolds for Tissue Engineering*. Silvestro I, Francolini I, Di Lisio V, Martinelli A, Scotto d'Abusco A, Scoppio A, Piozzi A. **Materials**, 2020, Vol. 13, 3577.
- [21] *Chitosan and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria*. Khan F, Nguyen Phamb DT, Folarin Oloketuyic S, Manivasagana P, Ohd J, Kim YM. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2020, Vol. 185.
- [22] *A Sponge-Like Double-Layer Wound Dressing with Chitosan and Decellularized Bovine Amniotic Membrane for Promoting Diabetic Wound Healing*. Yang Y, Zhang Y, Yan Y, Ji Q, Dai Y, Jin S, Liu Y, Chen J, Teng L. **Polymers**, 2020, Vol. 12, 535.
- [23] *Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan*. Ke CL, Deng FS, Chuang CY, Lin CH. **Polymers**, 2021, Vol. 13, 904.
- [24] *Optimization of Chitosan Glutaraldehyde-Crosslinked Beads for Reactive Blue 4 Anionic Dye Removal Using a Surface Response Methodology*. Galan J, Trilleras J, Zapata PA, Grande-Tovar CD. **Life**, 2021, Vol. 11, 85.
- [25] *An In Vitro Study of Chitosan-Coated Bovine Pericardium as a Dural Substitute Candidate*. Al Fauzi A, Fauza J, Widiyanti P, Suroto H, Parenrengi MA, Suryaningtyas W, Suroto NS, Utomo B, Firda Y. **Journal of Functional Biomaterials**, 2023, Vol. 14, 488.
- [26] *Chitosan-Based Antibacterial Films for Biomedical and Food Applications*. Khubiev OM, Egorov AR, Kirichuck AA, Khrustalev VN, Tskhovrebov AG, Kritchenkov AS. **International Journal of Molecular Sciences**, 2023, Vol. 24, 10738.
- [27] *Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co crosslinked chitosan gel beads*. Mi FW, Sung HW, Shyu SS, Su CC, Peng CK. **Polymer**, 2003, Vol. 44, 6521–6530.
- [28] *Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan*. Kean T, Thanou M. **Advanced Drugs Delivery**, 2010, Vol. 62 (1), 3–11.
- [29] *Photocrosslinkable chitosan: an effective adhesive with surgical applications*. Ishiharaa M, Onob K, Saitoc Y, Yurac H, Hattoria H, Matsuiia T, Kuritaa A. **International Congress Series**, 2001, Vol. 1223, 251–257.
- [30] *Experimental evaluation of photocrosslinkable chitosan as a biologic adhesive with surgical applications*. Ono K, Ishihara M, Ozeki Y, Deguchi H, Sato M, Saito Y, Yura H, Sato M, Kikuchi M, Kurita A, Maehara T. **Surgery**, 2001, Vol.130 (5), 844-850.
- [31] *Chitosan as an adhesive*. Mati-Baouchea N, Elchinger PH, De Baynast H, Pierre G, Delattre C, Michaud P. **European Polymer Journal**, 2014, Vol. 60, 198-212.

- [32] *Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive*. Ono K, Saito Y, Yura H, Ishikawa K, Kurita A, Akaike T, Ishihara M. **Journal of Biomedical Materials Research**, 2000.
- [33] *Analysis of clinical trials on biomaterial and therapeutic applications of chitosan: A review*. Kantak MN, Bharate SS. **Carbohydrate Polymers**, 2022, Vol. 268.
- [34] *Mechanical, Bioadhesive Strength and Biological Evaluations of Chitosan films for Wound Dressing* Khan TA, Peh KK, Ch'ng HS. **Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences**, 2000. Vol. 3 (3), 303-311.
- [35] *Effect of Selected Crosslinking and Stabilization Methods on the Properties of Porous Chitosan Composites Dedicated for Medical Applications*. Biernat et al. **Polymers**, 2023, Vol. 15, 2507.
- [36] *Bovine Pericardium-Chitosan As A Biomaterial Prospect For Substitute and Accelerate Tissue Healing of Dural Defect: A Review*. Al Fauzi A, Suroto H, Widiyanti P, Suroto NS, Fauza J, Thamrin AMH, Bella FR. **Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences**, 2021, Vol. 17(SUPP6): 102-109.
- [37] *Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Chitosan on the Oral Pathogen Candida albicans*. Costa, E, Sara S, Tavaría F, Pintado E. **Pathogens**, 2014, Vol. 3, 908-919.
- [38] *Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications*. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2004, Vol. 57 (1), 35-52.
- [39] *Anti-biofilm properties of chitosan coated surfaces*. Carlson RP, Taffs R, Davison WM, Stewart PS. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, 2008, Vol. 19 (8), 1035-1046.
- [40] *Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives*. Li J, Zhuang S. **European Polymer Journal**, 2020, Vol. 138.
- [41] *The extracellular matrix as a biologic scaffold material*. Badylak SF. **Biomaterials**, 2007, Vol. 28 (25), 3587-93.
- [42] *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Crapo PM; Gilbert TW, Badylak SF. **Biomaterials**, 2011, Vol. 32 (12) 3233-3243.
- [43] *Tripolyphosphate-Crosslinked Chitosan/Gelatin Biocomposite Ink for 3D Printing of Uniaxial Scaffolds*. Fischetti T, Celikkin N, Contessi Negrini N, Farè S, Swieszkowski W. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2020, Vol. 8.
- [44] *Chitosan Adsorption on the Collagen Tissue of the Bovine Pericardium from Solutions in Carbonic Acid: Role of Pressure*. Chaschin IS, Badun GA, Chernysheva MG, Bakuleva NP. **Physical Chemistry**, 2016, Vol. 472, 32-35.
- [45] *Significantly Accelerated Wound Healing of Full-Thickness Skin Using a Novel Composite Gel of Porcine Acellular Dermal Matrix and Human Peripheral Blood Cells*. Kuna VK, Padma AM, Hakansson J, Nygren J, Sjöback R, Petronis S, Sumitran-Holgersson S. **Cell Transplantation**, 2017, Vol. 26, 293-307.
- [46] *Bovine pericardium: effect of lyophilization*. **ASAIO Bioengineering Abstracts**.
- [47] *Lyophilized (freeze-dried) bovine pericardium*. **ASAIO Bioengineering/Tissue Engineering Abstracts**.
- [48] *Thermo-Mechanical and Adhesive Properties of Polymeric Films Based on ZnAl-Hydrotalcite Composites for Active Wound Dressings*. Perioli L, Dorigato A, Pagano C, Leoni M, Pegoretti A. **Polymer engineering and science**, 2018.

- [49] *Plasma-deposited membranes for controlled release of antibiotic to prevent bacterial adhesion and biofilm formation*. Hendricks SK, Kwok C, Shen M, Horbett TA, Carlson BD, Bryers JD. **Journal of Biomedical Materials Research**, 2000, Vol. 50 (2):160-70.
- [50] *Electrophoretic Deposition of Gentamicin-Loaded Silk Fibroin Coatings on 3D-Printed Porous Cobalt–Chromium–Molybdenum Bone Substitutes to Prevent Orthopedic Implant Infections*. Han C, Yao Y, Cheng X, Luo J, Luo P, Wang Q, Yang F, Wei Q, Zhang Z. **Biomacromolecules**, 2017.
- [51] *Copolymer/Clay Nanocomposites for Biomedical Applications*. Murugesan S, Scheibel T. *Advanced Functional Materials*, 2020, Vol. 30.
- [52] *Solid-State Supramolecular Chemistry: Two and Three dimensional Inorganic Networks*. Alberti G, Bein T et Al. Pergamon, Elsevier Science Ltd Press, 1996, Chap. 1, Vol. 7.
- [53] *Formation region and structural model of γ -zirconium phosphate*. Yamanaka S, Tanaka M. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, 1979, Vol. 41 (1), 45-48.
- [54] *Inorganic ion-exchange pellicles obtained by delamination of α -zirconium phosphate crystals*. Alberti G, Casciola M, Costantino U. **Journal of Colloid and Interface Science**, 1985, Vol. 107 (1), 256-263.
- [55] *Ac conductivity of anhydrous pellicular zirconium phosphate in hydrogen form*. Alberti G, Casciola M, Costantino U, Leonardi M. **Solid State Ionics**, 1984, Vol. 14 (4), 289-295.
- [56] *Preparation, proton transport properties and use in gas sensors of thin films of zirconium phosphate with γ -layered structure*. Alberti G, Cherubini F, Palombari R. **Sensors and Actuators**, 1995, B24-25, 270.
- [57] Manasse E, **Atti Società Toscana Scienze Naturali**, Proc. Verb., 1915, 24, 92.
- [58] *Solid-State Supramolecular Chemistry: Two and Three dimensional Inorganic Networks*. Alberti G, Bein T et Al. Pergamon, Elsevier Science Ltd Press, 1996, Chap. 8, Vol. 7.
- [59] *Zur Kenntnis der Doppelhydroxyde und basischen Doppelsalze III. Über Magnesium-Aluminiumdoppelhydroxyd*. Feitknecht W, Gerber M. **Helvetica Chimica Acta**, 1942, Vol. 25, 131.
- [60] *Zum Mechanismus der Fällung und Alterung schwerlöslicher Niederschläge. Fällung und Alterung basischer Zinkverbindungen*. Feitknecht W, Weidmann H. **Helvetica Chimica Acta**, 1942, Vol. 25, 555.
- [61] *Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications*. Cavani F, Trifirò F, Vaccari A. **Catalysis Today**, 1991, Vol. 11 (2), 173-301.
- [62] *Structural Aspects of Layered Double Hydroxides*. Evans DG, Slade RCT. 2006, Vol. 119, 1–87.
- [63] *Layered Double Hydroxides*, Duan X, Evans DG. Springer, 2006.
- [64] *Layered double hydroxide as novel antibacterial drug delivery system*. Ryu SJ, Jung H, Oh JM, Lee JK, Choy JH. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, 2010, Vol. 71, 685-688.
- [65] *The crystal structure of pyroaurite*. Allmann R. **Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry**, 1968, B24, 972.
- [66] *Segregation and cation-ordering in sjögrenite and pyroaurite*. H.F.W. Taylor, **Mineralogical Magazine**, 1969, Vol. 37, 338.
- [67] *Doppelschichtstrukturen mit brucitähnlichen Schichtionen $[Me(II)_{1-x}Me(III)_x(OH)_2]^{x+}$* . Allmann R, **Chimia**, 1970, Vol. 24, 99.

- [68] *A crystal-chemical study of Mg,Al and Ni,N hydroxy-perchlorates and hydroxycarbonates*. Brindley GW, Kikkawa S. **American Mineralogist**, 1979, Vol. 64, 836-843.
- [69] *A New Route to Obtain Well Crystallized Layered Double Hydroxides*. Delmas C, Borthomieu Y. **Journal of Solid State Chemistry**, 1993, Vol. 104(2), 345-352.
- [70] *Thermal decomposition of hydrotalcites. An infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopic study*. Rey F, Fornés V, Rojo JM. **Journal of Chemical Society**, 1992, Vol. 88, 2233-2238.
- [71] *New route to layered double hydroxides intercalated by organic anions: precursors to polyoxometalate-pillared derivatives*. Dimotakis ED, Pinnavaia TJ. *Inorganic Chemistry*, 1990, Vol. 29 (13), 2393.
- [72] *Progress in Layered Double Hydroxides - from Synthesis to New Applications*. Costantino U, Nocchetti M. 2022, Edizioni World Scientific, Vol.8.
- [73] *Polyvinyl Alcohol Coatings Containing Lamellar Solids with Antimicrobial Activity*. Bastianini M, Sisani M, Pietrella D, Escudero García R, Di Guida I, Russo C, Narducci R. **Physchem**, 2024, Vol. 4, 272–284.
- [74] *Effect of layered double hydroxide, expanded graphite and ammonium polyphosphate additives on thermal stability and fire performance of polyisocyanurate insulation foam*. Asimakopoulou E, Zhang J, McKee M, Wieczorek K, Krawczyk A, Andolfo M, Kozlecki T, Scatto M, Sisani M, Bastianini M, Karakassides A, Papakonstantinou P. **Thermochimica Acta**, 2020, Vol. 693.
- [75] *Composite membranes based on polyvinyl alcohol and lamellar solids for water decontamination*. Bastianini M, Sisani M, Naryyev E, Petracci A, Di Guida I, Narducci R. **New Journal of Chemistry**, 2024, Vol. 48, 2128–2139.
- [76] *Layered Double Hydroxide-Based Catalysts: Recent Advances in Preparation, Structure, and Applications*. Xu M, Wei M. **Advanced Functional Materials**, 2018, Vol. 28 (47).
- [77] *Intercalation of Perylenediimide Dye into LDH Clays: Enhancement of Photostability*. Chancal C, Kausik D, Sudip M. **The Journal of Physical Chemistry**, 2010, Vol. 115 (5).
- [78] *Hybrid Materials Based on Magnetic Layered Double Hydroxides: A Molecular Perspective*. Abellan G, Martí-Gastaldo C, Ribera A, Coronado E. **Accounts of Chemical Research**, 2015, Vol. 48 (6).
- [79] *Cellular Uptake Mechanism of an Inorganic Nanovehicle and Its Drug Conjugates: Enhanced Efficacy Due To Clathrin-Mediated Endocytosis*. Oh JM, Choi SJ, Kim ST, Choy JH. **Bioconjugate Chemistry**, 2006, Vol. 17 (6).
- [80] *Assessing the biocompatibility of layered double hydroxide by intramuscular implantation: histological and microcirculation evaluation*. Rodrigues Cunha VR, Barbosa de Souza R, Rebello Pinto da Fonseca Martins AMC, Hong Jun Koh I, Leopoldo Constantino VR. **Scientific Reports**, 2016, Vol. 6.
- [81] *Preformulation studies on host–guest composites for oral administration of BCS class IV drugs: HTlc and furosemide*. Perioli L, Ambroggi V, Nocchetti M, Sisani M, Pagano C. **Applied Clay Science**, 2011, Vol. 53, 696-703.
- [82] *LDH Nanocontainers as Bio-Reservoirs and Drug Delivery Carriers*. Oh JM, Park DH, Choi SJ, Choy JH. By Jae-Min Oh, Dae-Hwan Park, Soo-Jin Choi and Jin-Ho Choy. **Recent Patents on Nanotechnology**, 2012, Vol. 6 (3), 200-217.
- [83] *Layered double hydroxide nanoparticles in gene and drug delivery*. Ladewig K, Xu ZP, Lu GQ. **Expert Opinion on Drug Delivery**, 2009, Vol. 6 (9), 907-922.

- [84] *Layered Double Hydroxide-Based Nanocarriers for Drug Delivery*. Bi X, Zhang H, Dou L. **Pharmaceutics**, 2014, 6(2), 298-332.
- [85] *Caffeic Acid-layered Double Hydroxide Hybrid: A New Raw Material for Cosmetic Applications*. Bastianini M, Faffa C, Sisani M, Petracci A. **Cosmetics**, 2018, Vol.5 (51).
- [86] *Caffeine vehiculation into alpha-zirconium phosphate: a multifunctional intercalation product and its application for modified topical release*. Bastianini M, Sisani M, Petracci A, Di Guida I, Faffa C, Cardellini F. **Materials Advances**, 2021, 4.
- [87] *Optimisation of phenol extraction from wine using layered double hydroxides and technological evaluation of the bioactive-rich powder*. Pagano C, Perioli L, Blasi F, Bastianini M, Chiesi C, Cossignani L. **International Journal of Food Science and Technology**, 2017.
- [88] *Hydrotalcite: a smart technology for innovative active ingredients*. Sisani M, Bastianini M, Petracci A. **H&PC Today - Household and Personal Care**, 2018, Vol. 13(3), 55-58.
- [89] *Use of hydrotalcites and clay materials in cosmetics: an overview*. Sisani M, Bastianini M, Petracci A. **H&PC Today - Household and Personal Care**, 2018, Vol. 13(6), 46-50.
- [90] *Ascorbyl Tetraisopalmitate Inclusion into γ -Cyclodextrin and Mesoporous SBA-15: Preparation, Characterization and In Vitro Release Study*. Sisani M, Bastianini M, Petracci A. **Cosmetics**, 2017, Vol. 4 (21).
- [91] *Screening of different lamellar solids for the adsorption of phenolic compounds from grape pomace*. Mangiapelo L, Cossignani L, Ianni F, Blasi F, Bastianini M, Spogli R. **Food Chemistry**, 2025, Vol. 471.
- [92] *Solid-Phase Adsorption of Curcumin from Turmeric Extracts by Lamellar Solids and Magnesium Oxide and Hydroxide*. Fiorito S, Epifano F, Preziuso F, Palumbo L, Marchetti L, Bastianini M, Cardellini F, Spogli R, Genovese S. **Food Analytical Methods**, 2021, Vol. 14, 1133–1139.
- [93] *3D additive manufactured composite scaffolds with antibiotic-loaded lamellar fillers for bone infection prevention and tissue regeneration*. Camara-Torres M, Duarte S, Sinha R, Egizabal A, Alvarez N, Bastianini M, Sisani M, Scopece P, Scatto M, Bonetto A, Marcomini A, Sanchez A, Patelli A, Mota C, Moroni L. **Bioactive Materials**, 2021, Vol. 6, 1073-1082.
- [94] *Gallic acid released by a layered double hydroxide-coated scaffold of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate inhibits the osteoclast formation In Vitro*. Suvieri C, Bastianini M, Leonardi L, Pagano S, Conte C, Marinucci L, Pallotta MT, Ambrogio V, Fioretti B, Traina G, Sisani M, Belladonna ML. **Biomaterials and Biosystems**, 2025, Vol. 19.
- [95] *Additive Manufactured Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Physical Characterization of Thermoplastic Composites with Functional Fillers*. Sinha R, Sanchez A, Camara-Torres M, Uriszar-Aldaca IN, Calore AR, Harings J, Gambardella A, Ciccarelli L, Vanzanella V, Sisani M, Scatto M, Wendelbo R, Perez S, Villanueva S, Matanza A, Patelli A, Grizzuti N, Mota C, Moroni L. **Applied Polymer Materials**, 2021, Vol. 3, 3788-3799.
- [96] *Innovative Composites Based on Organic Modified Zirconium Phosphate and PEOT/PBT Copolymer*. Bastianini M, Scatto M, Sisani M, Scopece P, Patelli A, Petracci A. **Journal of Composites Science**, 2018, Vol. 2 (31).
- [97] *Crystalline insoluble salts of polybasic metals - II. Synthesis of crystalline zirconium or titanium phosphate by direct precipitation*. Alberti G, Torracca E. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, 1968, Vol.30 (1), 317-318.

- [98] Clearfield A, Stynes JA. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, 1969, Vol. 26, 117.
- [99] Clearfield A, Troup JM. **Inorganic Chemistry**, 1977, Vol. 16, 3311.
- [100] Clearfield A, Blessing RH, Stynes JA. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, 1969, Vol. 30, 2249.
- [101] Christensen A, Krogh Andersen E, Krogh Andersen IG, Alberti G, Nielsen N, Lehmann M. **Acta Chemica Scandinavica**, 1990, Vol. 44, 865.
- [102] Clearfield A, Ion Exchange Materials, C.R.C. Press, Boca Ranton, FL 1982, Chap. 1, Chap. 2.
- [103] Alberti G, Casciola M, Costantino U. Solid State Proton Conductors III, J.B. Goodenough, J. Jensen, A. Potier Eds., (Odense University Press, 1985), p. 215.
- [104] Adams DM, Inorganic Solids, J. Wiley, New York, 1981, p. 41.
- [105] Kijima J, Sekikawa T, Veno ES. **Journal of Chemical Society Dalton Transactions**, 1982, 2499.
- [106] Costantino U, Massucci MA, La Ginestra A, Tarola AM, Zampa AL. **Journal of Inclusion Phenomena**, 1986, Vol. 4, 147.
- [107] Kijima J, Matsui Y. **Nature**, 1980, Vol. 322, 6070, 533.
- [108] *Breast cancer statistics 2024*. Angela N Giaquinto AN, Sung H, Newman LA, Freedman RL, Smith RA, Star J, Jemal A, Siegel RL. **A Cancer Journal for Clinicians**, 2024, Vol. 74 (6), 477-495.
- [109] *European cancer mortality predictions for the year 2025 with focus on breast cancer*. Santucci C, Mignozzi S, Levi F, Malvezzi M, Boffetta P, Negri E, La Vecchia C. **ESMO Annals of Oncology**, 2025, Vol. 36 (4), 460-468.
- [110] *Advanced breast conservation and partial breast reconstruction – a review of current available options for oncoplastic breast surgery*. Alder L, Zaidi M, Zeidan B, Mazari FAK. **The Annals of The Royal College of Surgeons of England**, 2022, Vol. 104 (5).
- [111] *Conservative mastectomy: extending the idea of breast conservation*. Veronesi U, Stafyla V, Petit JY, Veronesi P. **The Lancet: Oncology**, 2012, Vol. 13 (7), 311-317.
- [112] *Optimized method of bovine pericardium decellularization for tissue engineering*. Shchotkina NV, Sokol AA, Galkin OY, Yemets GI, Dolinchuk LV, Rudenko NM, Yemets IM. **Wiad Lek**, 2021, Vol. 74.
- [113] *Bovine pericardium membrane, gingival stem cells and ascorbic acid: a novel team in regenerative medicine*. Pizzicannella J, Marconi GD, Pierdiomenico SD, Cavalcanti MFXB, Diomedea F, Trubiani O. **Eur J Histochem**, 2019, Vol. 63.
- [114] *3D Human Periodontal Stem Cells and Endothelial Cells Promote Bone Development in Bovine Pericardium-based Tissue Biomaterial*. Pizzicannella J, Pierdomenico SD, Piattelli A, Varvara G, Fonticoli L, Trubiani O, Diomedea F. **Materials**, 2019, Vol. 12.
- [115] *A narrative review of microbial biofilm in postoperative surgical site infections: clinical presentation and treatment*. Edmiston CE, McBain AJ, Kiernan M, Leaper DJ, **Journal of Wound Care**, 2016, Vol. 25 (12).
- [116] *Antibiotic-Loaded Synthetic Calcium Sulfate Beads for Prevention of Bacterial Colonization and Biofilm Formation in Periprosthetic Infections*. Howlin RP, Brayford MJ, Webb JS, Cooper JJ, Aiken SS, Stoodley P. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2015, 59(1), 111-120.

- [117] Veritas® bovine pericardium for immediate breast reconstruction: a xenograft alternative to acellular dermal matrix products. Mofid MM, Meininger MS, Lacey MS. **European Journal of Plastic Surgery**, 2012, Vol. 35, 717–722.
- [118] Use of bovine pericardium (Tutopatch®) graft for surgical repair of deep melting corneal ulcers in dogs and corneal sequestra in cats. Dulaurent T, Azoulay T, Goulle F, Dulaurent A, Mentek M, Peiffer RL, Isard PF. **Veterinary Ophthalmology**, 2013.
- [119] A Head to Head Comparison Between SurgiMend® – Fetal Bovine Acellular Dermal Matrix and Tutomesh® – A Bovine Pericardium Collagen Membrane in Breast Reconstruction in 45 Cases. Eichler C, Efremova J, Brunner K, Kurbacher CM, Gluz O, Puppe J, Warm M. In vivo, 2017, Vol. 31, 677-682.
- [120] Clinical outcome and patient satisfaction with the use of bovine-derived acellular dermal matrix (SurgiMend™) in implant based immediate reconstruction following skin sparing mastectomy: A prospective observational study in a single centre. Headon H, kasem A, Manson A, Choy C, Carmichael AR, Mokbel K. **Surgical Oncology**, 2016, Vol. 25 (2), 104-110.
- [121] Characterization of a new decellularized bovine pericardial biological mesh: Structural and mechanical properties. Bielli A, Bernardini R, Varvaras D, Rossi P, Di Blasi G, Petrella G, Buonomo OC, Mattei M, Orlandi A. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2018, Vol. 78, 420-426.
- [122] **Gulf Journal of Oncology – Supplement**. Abstracts of the 3rd EUASSO Congress: “Innovations and New technologies in Surgical Oncology” - January 2017.
- [123] Regolamento (UE) 2017/745 del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 5 aprile 2017, relativo ai dispositivi medici, che modifica la direttiva 2001/83/CE, il regolamento (CE) n. 178/2002 e il regolamento (CE) n. 1223/2009 e che abroga le direttive 90/385/CEE e 93/42/CEE del Consiglio.
- [124] Cytotoxicity of Xenogeneic Pericardium Preserved by Epoxy Cross-Linking Agents. Bondarenko NA, Surovtseva MA, Lykov AP, Kim II, Zhuravleva IY, Poveschenko OV. **Sovrem Tekhnologii Med**, 2021, Vol. 13.
- [125] Cross-linking method using pentaepoxide for improving bovine and porcine bioprosthetic pericardia: A multiparametric assessment study. Zhuravleva, Yu I. *Materials Science and Engineering: C* 118 (2021): 111473.
- [126] Cell-free xenogenic vascular grafts fixed with glutaraldehyde or genipin: in vitro and in vivo studies. Yen C. **Journal of biotechnology**, 2005, Vol. 120 (2), 207-219.
- [127] Chitosan Hydrogels and their Glutaraldehyde-Crosslinked Counterparts as Potential Drug Release and Tissue Engineering Systems - Synthesis, Characterization, Swelling Kinetics and Mechanism. Akakuru OU, Isiuku BO. **Journal of Physical Chemistry & Biophysics**, 2017, VOL. 7 (3).
- [128] Riboflavin mediated UV crosslinking of chitosan-gelatin cryogels for loading of hydrophobic bioactive compounds. Mihai B, Dumitriu RP, Pamfil D, Butnaru E, Stoleru E. **Carbohydrate Polymers**, 2024, Vol. 324.
- [129] <https://register.epo.org/application?number=EP22195794>
- [130] Breast Implant Infections: An Update. Lalani T. **Infectious Disease Clinics of North America**, 2018, Vol. 32 (4), 877-884.
- [131] Postoperative Staphylococcus aureus Infections in Patients With and Without Preoperative Colonization. Troeman DPR, Hazard D, Timbermont L, Malhotra-Kumar S, van Werkhoven CH, Wolkewitz M, Ruzin A, Goossens H, Bonten MJM, Harbarth S, Sifakis F, Kluytmans JAJW. **JAMA Network Open**, 2023, Vol. 6 (10).

- [132] *Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics*. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. **Canadian Journal of Veterinary Research**, 2002, Vol. 66 (2), 86–92.
- [133] *Staphylococcus epidermidis biofilm in inflammatory breast cancer and its treatment strategies*. Allen-Taylor D, Boro G, Cabato PM, Mai C, Nguyen K, Rijal G. **Biofilm**, 2024, Vol. 8.
- [134] *Impact of duration of antibiotic prophylaxis on rates of surgical site infection (SSI) in patients undergoing mastectomy without immediate reconstruction, comparing a single prophylactic dose versus continued antibiotic prophylaxis postoperatively: a multicentre, double- blinded randomised control trial protocol*. Sattar AK, Zahid N, Shahzad H, Soomro R, Saleem O, Mahmood SF. **BMJ Open**, 2021, Vol. 11.
- [135] *The Duration of Postoperative Antibiotics in Autologous Breast Reconstruction: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Aldarragi A, Farah N, Warner C M, et al. **Cureus**, 2023, Vol. 15 (6).
- [136] *Use of Local Antibiotic Delivery Systems in Tissue Expander and Implant-Based Breast Reconstruction: A Systematic Review of the Literature*. Makarewicz N, Lipman K, Johnstone T, Shaheen M, Krupa Shah J, Nazerali R. **Eplasty**, 2023.
- [137] *Evidence for the use of peri- and post- operative antibiotic prophylaxis in autologous breast reconstruction: A systematic review*. Rijckx MEP, Klein DO, van Mens SP, Hommes JE, van Kuijk SMJ, van der Hulst RVJ, Heuts EM, Piatkowski AA. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, 2023, Vol. 83, 404–414.
- [138] *Extended Prophylactic Antibiotics for Mastectomy with Immediate Breast Reconstruction: A Meta-analysis*. Hai Y, Chong W, Lazar MA. **PRS Global Open**, 2020.
- [139] *Pharmacokinetics of Locally Applied Antibiotic Prophylaxis for Implant-Based Breast Reconstruction*. Hemmingsen MN, Bennedsen AK, Bismark Kullab R, Barksov Norlin C et Al. **JAMA Network Open**, 2023.
- [140] *Surveillance and Prevention of Surgical Site Infections in Breast Oncologic Surgery with Immediate Reconstruction*. Olsen MA, Nickel KB, Fox IK. **Curr Treat Options Infect Dis**, 2017, Vol. 9, 155–172.
- [141] *Chlorhexidine activity against bacterial biofilms*. Cordenonsi Bonez P, Filippi dos Santos Alves C, Vendruscolo Dalmolin T, Agertt VA, Rigon Mizdal C, da Costa Flores V, Baggiotto Marques J, Vianna Santos RC, Anraku de Campos MM. **American Journal of Infection Control**, 2013, Vol. 41, 119-122.
- [142] *Anti-biofilm Activity of Povidone-Iodine and Polyhexamethylene Biguanide: Evidence from In Vitro Tests*. Gryson L, Meaume S, Feldkaemper I, Favalli F. **Current Microbiology**, 2023, Vol. 80.
- [143] *Comparison of antibiofilm activity of low-concentrated hypochlorites vs polyhexanide-containing antiseptic*. Paleczny J, Junka AF, Czajkowska PKJ, Kramer A, Benkhail H, Żyfka-Zagrodzińska E, Bartoszewicz M. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, 2023 Vol. 13.
- [144] *In vitro microbicidal, anti-biofilm and cytotoxic effects of different commercial antiseptics*. Ortega-Peña R, Hidalgo-González R, Robson MC, Krötzsch E. **International Wound Journal**, 2016, 470-479.
- [145] *Update on the role of antiseptics in the management of chronic wounds with critical colonisation and/or biofilm*. Alves PJ, Barreto RT, Barrois BM, Gryson LG, Meaume S, Monsrey SJ. **International Wound Journal**, 2021, Vol. 18, 342–358.
- [146] *The Assessment of Activity of Antiseptic Agents against Biofilm of Staphylococcus aureus Measured with the Use of Processed Microscopic Images*. Grzegorz Krasowski G, Migdał P, Woroszyło M, Fijałkowski K, Chodaczek G, Czajkowska J, Dudek B, Nowicka J, Oleksy-Wawrzyniak M, Junka A. **International Journal of Molecular Sciences**, 2022, Vol. 23 (21).

- [147] *Comparison of antimicrobial efficacy and therapeutic index properties for common wound cleansing solutions, focusing on solutions containing PHMB*. Watson F, Chen R, Saint Bezar J, Percival S. **GMS Hygiene and Infection Control**, 2024, Vol. 19.
- [148] *Susceptibility to chlorhexidine amongst multidrug-resistant clinical isolates of Staphylococcus epidermidis from bloodstream infections*. Hijazi K, Mukhopadhyay I, Abbott F, Milne K, Al-Jabri ZJ, Oggioni MR, Gould IM. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2016, Vol. 48, 86-90.
- [149] *The Activity of PHMB and Other Guanidino Containing Compounds against Acanthamoeba and Other Ocular Pathogens*. Ratnayake D, Ansah M, Al Ani E, Heaselgrave W. **Microorganisms**, 2022, Vol. 10(7), 1375.
- [150] *Decreased susceptibility to vancomycin and other mechanisms of resistance to antibiotics in Staphylococcus epidermidis as a therapeutic problem in hospital treatment*. Szemraj M, Glazner P, Sienkiewicz M. **Scientific Reports**, 2023, Vol. 13, 1362.
- [151] *Uptake/release of vancomycin on/from Mg–Al layered double hydroxides*. Lopez NA, Luengo CV, Avena MJ. **Adsorption**, 2019, Vol. 25, 1349–1360.
- [152] ISO 4768:2023 Measurement method of anti-biofilm activity on plastic and other non-porous surfaces.
- [153] UNI EN 12353:2021 Disinfettanti chimici e antisettici - Conservazione degli organismi per i test al fine della determinazione dell'attività: battericida (*Legionella* inclusa), micobattericida, sporicida, fungicida e virucida (inclusi i batteriofagi).

SCUOLA SUPERIORE "G. d'Annunzio"

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMOLECOLARI E FARMACEUTICHE

CICLO XXXVIII

**Sviluppo di un sistema composito a base di solidi lamellari,
membrane biologiche e chitosano come dispositivo medico
innovativo nell'abito della ricostruzione mammaria post-
mastectomia**

Dipartimento di SCIENZE MEDICHE, ORALI E BIOTECNOLOGICHE

Settore Scientifico Disciplinare CHEM-07/A

Dottorando

CATERINA FAFFA



Coordinatore

PROF. ASSUNTA PANDOLFI

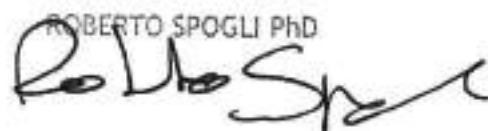
Tutor

PROF. SALVATORE GENOVESE



Tutor aziendale

ROBERTO SPOGLI PhD



Sommario

Abbreviazioni	1
Il chitosano come piattaforma polimerica funzionale.....	3
1. Biomateriali e ingegneria tissutale: contesto generale	3
2. Il chitosano	3
2.1 Origine, struttura chimica e parametri fondamentali del chitosano	4
2.1.1 Comportamento del chitosano in soluzione: ruolo di pH e forza ionica	5
2.1.2 Organizzazione supramolecolare e cristallinità	6
2.1.3 Reattività chimica e possibilità di funzionalizzazione del chitosano	7
2.1.4 Reticolazione del chitosano	7
2.1.5 Chitosano come famiglia di molecole e suo ruolo nella presente tesi	10
2.2 Dal polimero al materiale: forme fisiche e comportamento del chitosano	11
2.2.1 Membrane e film di chitosano	11
2.2.2 Idrogel di chitosano	12
2.2.3 Micro- e nanoparticelle di chitosano.....	13
2.2.4 Spugne e scaffold porosi.....	14
2.2.5 Stabilizzazione del chitosano	14
2.3 Il chitosano nei dispositivi biomedicali	15
2.3.1 Il chitosano come materiale d'interfaccia con le superfici biologiche	15
2.3.2 Il chitosano come bioadesivo	16
2.3.3 Il chitosano come materiale antimicrobico e antibiofilm.....	18
2.3.4 Sinergia tra funzione bioadesiva e funzione antibatterica del chitosano	20
2.3.5 Il chitosano come piattaforma ingegnerizzabile per applicazioni biomedicali	21
Le membrane biologiche come biomateriali.....	23
1. Struttura e caratteristiche generali della ECM di origine animale	23
2. Il pericardio bovino come modello di membrana biologica	24
2.1 Struttura e comportamento meccanico del pericardio bovino.....	24
2.2 Utilizzo del pericardio bovino come biomateriale.....	25
3. Trattamenti di stabilizzazione delle membrane biologiche	26
3.1 Reticolazione delle membrane biologiche.....	26
3.2 Decellularizzazione delle membrane biologiche	27
3.3 Trattamenti fisici	27
3.4 Funzionalizzazione	27
3.5 Interazione tra trattamenti e proprietà finali del materiale	28

4. Ingegnerizzazione delle membrane biologiche	28
4.1 Coating polimerici	28
5. Progettazione modulare dei biomateriali	29
I solidi lamellari.....	30
1. Generalità dei solidi lamellari.....	30
1.1 Classificazione dei solidi lamellari	30
1.2 Intercalazione.....	31
2. Idrotalciti	32
2.1 Struttura delle idrotalciti	32
2.2 Elementi caratterizzanti le idrotalciti	34
2.3 La natura dell'anione e acqua di idratazione.....	34
2.4 Metodi di sintesi	34
2.5 Effetto memoria.....	35
2.6 Caratteristiche macroscopiche	35
2.7 Applicazioni delle idrotalciti	36
2.7.1 Le idrotalciti come piattaforme per il drug delivery nanostrutturato.....	37
3. Fosfati di zirconio di tipo α	38
3.1 Struttura dei fosfati di zirconio di tipo α.....	39
3.2 Metodi di sintesi	39
3.3 Caratteristiche macroscopiche	40
3.4 Scambio ionico e applicazioni dei fosfati di zirconio	40
4. I solidi lamellari come piattaforme chimiche funzionali	40
Sistemi compositi a base di membrane biologiche, solidi lamellari e chitosano	41
1. Integrazione strutturale e ruolo dell'interfaccia.....	41
2. Integrazione del modulo LDH nel coating polimerico	41
3. Moderne tendenze della ricerca sui dispositivi biomedicali	42
4. Scalabilità e trasferibilità tecnologica	42
5. Obiettivo della presente tesi	43
Applicazione: membrane in pericardio bovino funzionalizzate con chitosano e solidi lamellari per chirurgia mammaria	44
1. Introduzione.....	44
1.1 Ambito di intervento del progetto	44
1.2 Scopo e obiettivi del progetto	45
1.3 Potenziale innovativo del progetto.....	47
1.4 Stato dell'arte dei dispositivi biomedicali a base di pericardio bovino	48
1.5 Membrana biologica in pericardio bovino BioRipar®	48

1.6 Attività sperimentale	49
1.6.1 Caratterizzazione chimico-fisica e funzionale della MPB	50
1.6.2 Ricerca e sviluppo di metodi per il conferimento alla MPB di struttura 3D.....	50
1.6.3 Ricerca e sviluppo di metodi per l'adesione alla MPB di solidi lamellari	51
1.6.4 Studio della cinetica di uptake e rilascio degli API antimicrobici e antibiofilm	52
1.6.5 Studio dell'attività antibiofilm complessiva del prototipo ottenuto.....	56
2. Materiali e metodi	57
2.1 Materiali	57
2.2 Tecniche analitiche e strumenti	57
2.3 Metodi	59
2.3.1 Caratterizzazione chimico-fisica e funzionale della MPB	59
2.3.2 Metodi per il conferimento alla MPB di struttura 3D	59
2.3.3 Metodi per l'adesione alla MPB di solidi lamellari	60
2.3.4 Metodi per lo studio della cinetica di uptake e rilascio degli API antimicrobici e antibiofilm ...	63
2.3.5 Metodi per lo studio dell'attività antibiofilm complessiva del prototipo ottenuto	65
3. Risultati e discussione	67
3.1 Caratterizzazione chimico-fisica e funzionale della MPB	67
3.2 Ricerca e sviluppo di metodi per il conferimento alla MPB di struttura 3D.....	70
3.3 Ricerca e sviluppo di metodi per l'adesione alla MPB di solidi lamellari	78
3.4 Studio della cinetica di uptake e rilascio degli API antimicrobici e antibiofilm	91
3.5 Studio dell'attività antibiofilm complessiva del prototipo ottenuto.....	103
3.5.1 Test antibiofilm verso Candida parapsilosis	103
3.5.2 Test antibiofilm verso Staphylococcus epidermidis	112
Conclusioni	114
Riferimenti	119

Abbreviazioni

3D	Three dimensional
Abs	Assorbanza
API	Principi attivi farmaceutici
BET	Brunauer Emmet Teller
BSE	Bovine Spongiform Encefalopatya
CEL	Cellulosa rigenerata
CH	Chitosano
CLO	Clorexidina
CLO DG	Clorexidina digluconato
COL	Collagene
DD	Degree of deacetylation
DLS	Dynamic light scattering
DOPA	3,4-diidrossifenilalanina
DP	Derma porcino
DSC	Differential scanning calorimetry
DTA	Differential thermal analysis
ECM	Extracellular matrix
EDC	1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimide cloridrato
EDX	Energy Dispersive X-ray Analysis
EGDE	Etilene glicole diglicidil etere
EPS	Extracellular polimeric substance
FE-SEM	Field emission scanning electron microscopy
GEL	Gelatina Lapi
GEN	Genipina
GLU	Glutaraldeide
HMW	High molecular weight
HPLC	High performance liquid chromatography
HTLc	Hydrotalcite-like compounds
ICP/OES	Inductively coupled plasma optical emission spectrometry
LC-MS	Liquid chromatography mass spectrometry
LDH	Layered double hydroxides
LMW	Low molecular weight
MBD	Membrana biologica decellularizzata
MD	Medical device
MDP	Membrana in derma porcino
MES	Acido 2-morfolinoetano sulfonico
MIC	Minimum inhibitory concentration
MMW	Medium molecular weight
MPB	Membrana in pericardio bovino
MW	Molecular weight
NHS	N-idrossisuccinimide

OD	Optical density
PB	Pericardio bovino
PBS	Phosphate buffer saline
PHMB	Poli-esametilen-biguanide
SDS	Sodio dodecil solfato
SSI	Surgical site infections
RT	Room temperature
TGA	Thermogravimetric analysis
TPP	Tripolifosfato
TRIS	Tris(idrossimetil)aminometano
TSB	Tryptic soy broth
UR	Umidità relativa
UV-VIS	Radiazione ultravioletta-visibile
VAN	Vanillina
VANCO	Vancomicina
XRD	X-ray diffraction
ZrP	Zirconium phosphate

Il chitosano come piattaforma polimerica funzionale

1. Biomateriali e ingegneria tissutale: contesto generale

Lo sviluppo di biomateriali avanzati rappresenta uno dei pilastri fondamentali della moderna bioingegneria e della medicina rigenerativa. L'obiettivo primario di questo settore è la progettazione di materiali in grado di interagire in modo controllato e sicuro con i tessuti biologici, supportando processi complessi quali la riparazione, la rigenerazione o la sostituzione di strutture danneggiate. Un biomateriale ideale deve soddisfare una serie di requisiti stringenti, tra cui: biocompatibilità, stabilità chimica, adeguate proprietà meccaniche, capacità di integrazione con i tessuti ospiti e, in molti casi, biodegradabilità controllata [1].

Nel corso degli ultimi decenni, l'approccio alla progettazione dei biomateriali si è progressivamente spostato da una concezione puramente strutturale a una visione funzionale e bioattiva, in cui il materiale non svolge soltanto un ruolo passivo di supporto, ma partecipa attivamente ai processi biologici locali. Questo cambiamento di paradigma ha portato allo sviluppo di materiali in grado di modulare la risposta cellulare, favorire l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare, nonché di veicolare molecole bioattive quali fattori di crescita o farmaci [2].

In questo contesto, i polimeri naturali hanno acquisito un ruolo di primo piano rispetto ai materiali puramente sintetici, grazie alla loro intrinseca affinità con i sistemi biologici. Materiali quali collagene, gelatina, alginato, acido ialuronico e chitosano sono stati ampiamente studiati e utilizzati in una vasta gamma di applicazioni biomediche, tra cui medicazioni avanzate per ferite, scaffold per ingegneria tissutale, sistemi di rilascio controllato e adesivi biologici [3].

Tra le molteplici sfide ancora aperte nel campo dei biomateriali, una delle più rilevanti riguarda la gestione delle interfacce tra materiali artificiali e tessuti biologici. In numerose applicazioni cliniche, infatti, è necessario garantire un'adesione efficace e duratura del materiale al tessuto ospite, spesso in condizioni ambientali sfavorevoli caratterizzate da elevata umidità, presenza di sangue o fluidi biologici e continua sollecitazione meccanica. Tali condizioni rendono inefficaci molti adesivi convenzionali di uso industriale e impongono lo sviluppo di bioadesivi specificamente progettati per l'ambiente fisiologico [3].

2. Il chitosano

Il chitosano rappresenta uno dei biopolimeri più studiati e utilizzati in ambito biomedico, insieme ai poliesteri alifatici (policaprolattone, acido polilattico e acido poliglicolico) e agli uretani. Questo è dovuto alla combinazione estremamente favorevole di caratteristiche quali biocompatibilità, biodegradabilità, bassa tossicità, versatilità chimica (capacità di formare film, membrane, idrogel, spugne e scaffold porosi) e attività biologica intrinseca (attività antimicrobica). Inoltre, il chitosano mostra una notevole affinità per i tessuti biologici, dovuta sia alle interazioni elettrostatiche tra i suoi gruppi amminici protonati e le componenti anioniche della matrice extracellulare, sia alla possibilità di formare legami a idrogeno e interazioni secondarie con proteine e glicoproteine di superficie [1-5]. Queste caratteristiche hanno portato al suo utilizzo in numerosi ambiti della bioingegneria, in

particolare nelle medicazioni avanzate per ferite, nei sistemi di rilascio controllato e nei materiali per ingegneria tissutale.

2.1 Origine, struttura chimica e parametri fondamentali del chitosano

Il chitosano è ottenuto per deacetilazione della chitina, un polisaccaride strutturale tra i più diffusi in natura: è presente negli esoscheletri dei crostacei, negli insetti, nelle pareti cellulari dei funghi, nelle alghe, nei molluschi e anche in alcuni fossili. Dal punto di vista strutturale, la chitina è un polimero lineare costituito da unità ripetitive di N-acetil-D-glucosamina (2-acetamido-2-deossi-D-glucopiranosio) legate tra loro da legami β -(1 $\rightarrow$ 4) glicosidici.

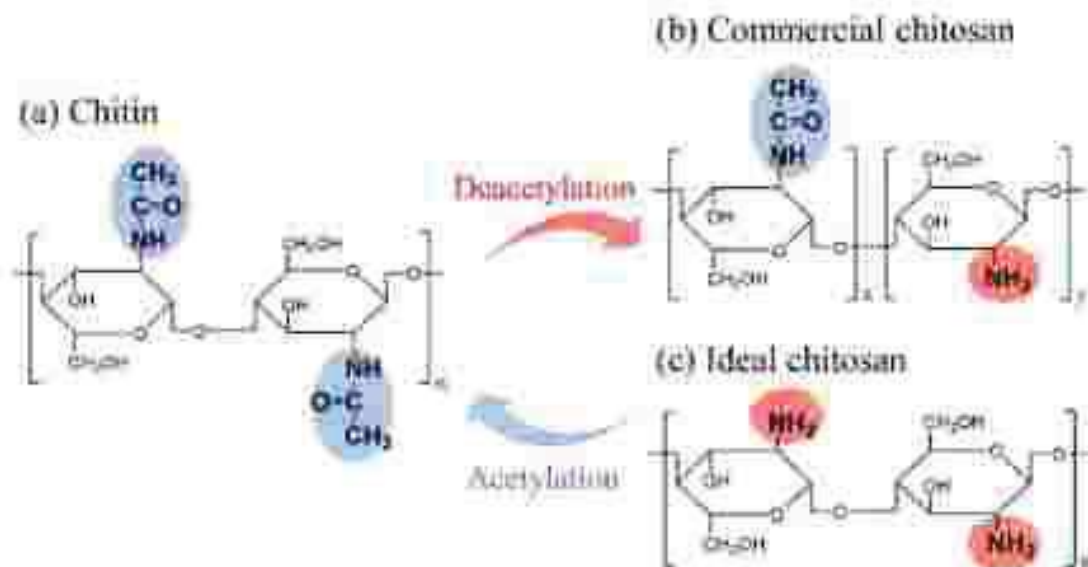


Figura 1. Formule di struttura di chitina e chitosano

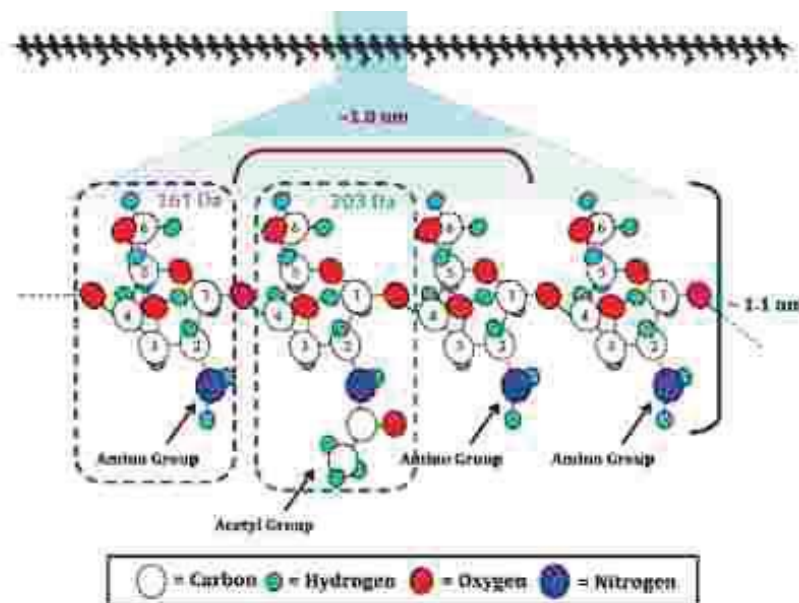


Figura 2. Porzione ingrandita di una molecola di chitosano

La deacetilazione di questo polisaccaride prevede, per via chimica o enzimatica, la rimozione parziale o quasi completa dei gruppi acetilici dalle unità monomeriche della chitina. Dal punto di vista strutturale, il chitosano è costituito quindi da unità di N-acetil-D-glucosamina e di D-glucosamina (2-ammino-2-deossi-D-glucopiranosio) sempre legate tra loro da legami β -(1 $\rightarrow$ 4) glicosidici, in modo analogo alla cellulosa, ma con la presenza dei gruppi amminici primari lungo la catena polimerica

(vedi Figure 1 e 2). Questi gruppi amminici primari in ambiente acido risultano protonati, conferendo al materiale una carica positiva netta, rendendolo solubile in ambiente acido e modificandone in modo sostanziale il comportamento chimico e biologico rispetto alla chitina [1,3]. Questa proprietà rende il chitosano di estremo interesse tra i polisaccaridi naturali, in quanto lo rende l'unico della sopracitata categoria ampiamente disponibile e con comportamento policationico e costituisce il fondamento di gran parte delle sue proprietà chimico-fisiche e della sua interazione con cellule, proteine, matrici extracellulari e superfici caricate negativamente, determinandone il comportamento biologico peculiare [1-7].

Il chitosano è quindi un copolimero, e le sue proprietà chimico-fisiche e biologiche sono fortemente dipendenti da due parametri fondamentali: il **grado di deacetilazione (DD)** e il **peso molecolare medio (MW)**.

Il grado di deacetilazione (DD - degree of deacetylation) è frazione molare di unità glucosaminiche presenti lungo la catena polimerica, ed è solitamente compreso tra il 60 e il 95%. Per convenzione, quando il grado di deacetilazione supera il 50%, si parla di chitosano e non più di chitina. Il grado di deacetilazione è direttamente rappresentativo della densità di gruppi amminici protonabili lungo la catena polimerica e quindi della densità di carica del polimero in ambiente acido e, di conseguenza, da esso dipendono la solubilità, la carica, la reattività chimica e le interazioni con i sistemi biologici da parte del polisaccaride [1-4]. Valori elevati di DD comportano una maggiore densità di gruppi amminici liberi lungo la catena polisaccaridica e sono pertanto associati a: maggiore idrofilicità, solubilità in ambiente acido, maggiore reattività chimica e a una più marcata capacità di interazione elettrostatica con superfici caricate negativamente, quali membrane cellulari, proteoglicani e componenti della matrice extracellulare. Materiali con DD più basso presentano invece una minore densità di gruppi amminici e perciò un carattere più simile alla chitina, con maggiore cristallinità e minori idrofilicità, solubilità e reattività [1-2-4-8].

Il peso molecolare, d'altra parte, influenza in modo determinante la viscosità delle soluzioni, le proprietà meccaniche, la cinetica di degradazione e il comportamento biologico del chitosano. Molecole di chitosano ad alto peso molecolare tendono a formare strutture più coese e meccanicamente resistenti, ma presentano una minore solubilità e una maggiore viscosità in soluzione; al contrario frazioni a basso peso molecolare o oligomeriche mostrano maggiore mobilità molecolare, migliore diffusività nei sistemi biologici e, in alcuni casi, un'attività biologica più marcata, in particolare per quanto riguarda gli effetti antimicrobici [2-5,7].

È importante sottolineare che i processi industriali di estrazione della chitina e di deacetilazione alcalina portano inevitabilmente a una distribuzione polidispersa dei pesi molecolari e a variazioni del DD, rendendo necessario un attento controllo e una caratterizzazione accurata del materiale destinato ad applicazioni biomediche [2,9]. Questa possibilità di modulare in modo relativamente indipendente il grado di deacetilazione e il peso molecolare rende il chitosano non un singolo materiale, ma una vera e propria famiglia di polimeri con proprietà regolabili su un ampio intervallo [1-4].

2.1.1 Comportamento del chitosano in soluzione: ruolo di pH e forza ionica

Il comportamento del chitosano in soluzione acquosa è strettamente legato alla protonazione dei suoi gruppi amminici primari, il cui pKa è generalmente riportato in un intervallo compreso tra 6.2 e 6.5, a seconda del DD e del contesto chimico locale [2,10].

Di conseguenza, al di sotto di questo valore di pH, essi risultano protonati, conferendo al polimero una carica positiva netta (*polielettrolita cationico*) e rendendolo solubile in soluzioni acide diluite (tipicamente acido acetico, lattico o cloridrico) [1,11,12]. In queste condizioni, il chitosano è in grado di interagire fortemente con polianioni (proteine, glicosaminoglicani, DNA, acido ialuronico, alginato, ecc.), di formare reticolazione con anioni multivalenti come il tripolifosfato e di interagire con superfici biologiche cariche negativamente, attraverso una combinazione di interazioni elettrostatiche e legami a idrogeno [1,2,11]. Questo comportamento polielettrolitico è quindi di grande rilevanza per le applicazioni biomediche.

All'aumentare del pH invece, la progressiva deprotonazione dei gruppi amminici comporta una drastica riduzione della solubilità e una crescente importanza delle interazioni intermolecolari, che possono portare a fenomeni di aggregazione, precipitazione o gelificazione del materiale [1,11,12]. Questo comportamento, che potrebbe apparire come un limite, costituisce in realtà uno degli strumenti più potenti per la progettazione di sistemi funzionali a base di chitosano, poiché consente di indurre transizioni di stato e processi di strutturazione semplicemente modulando le condizioni chimico-fisiche dell'ambiente [2,11].

Anche la forza ionica ha un importante effetto sul comportamento del chitosano. In soluzione acida infatti, il chitosano assume una conformazione estesa a causa della repulsione elettrostatica tra le cariche positive lungo la catena, con conseguenze importanti sulla viscosità e sulle proprietà reologiche delle soluzioni. L'aggiunta di sali e l'aumento della forza ionica del mezzo schermano tali interazioni elettrostatiche, inducendo una contrazione della catena e una riduzione della viscosità [13,14].

2.1.2 Organizzazione supramolecolare e cristallinità

Allo stato solido, il chitosano presenta una struttura semi-cristallina, il cui grado di ordine dipende dal DD, dal MW e dalla storia termica e meccanica del materiale. Le regioni cristalline sono stabilizzate da una fitta rete di legami a idrogeno tra gruppi ossidrilici e amminici intra- e intermolecolari, mentre le regioni amorfe conferiscono al materiale una certa flessibilità e capacità di assorbire acqua, rendendo nel complesso il chitosano un insieme di domini più o meno ordinati [1,11,13].

In particolare, l'aumento del contenuto di unità deacetilate tende a favorire una maggiore densità di legami a idrogeno e una più forte coesione intermolecolare, mentre la presenza di gruppi acetilici residui introduce disordine strutturale e riduce il grado di organizzazione cristallina [1,13].

La presenza di regioni cristalline e amorfe coesistenti influenza in modo diretto le proprietà meccaniche (la resistenza meccanica dei film e delle membrane), la solubilità (la permeabilità all'acqua e ai soluti), il comportamento viscoelastico (il rigonfiamento o *swelling* in ambiente acquoso), la velocità di degradazione enzimatica e idrolitica e la processabilità di tale materiale [2,6,9,11,13].

Questa delicata interazione tra struttura chimica e organizzazione supramolecolare spiega in larga misura l'ampia variabilità delle proprietà osservate nei diversi tipi di chitosano commerciali e sperimentali [1–3]. Un controllo mirato della cristallinità attraverso processi di dissoluzione, rigenerazione, orientamento o reticolazione consente quindi di modulare finemente le proprietà del materiale in funzione dell'applicazione desiderata.

2.1.3 Reattività chimica e possibilità di funzionalizzazione del chitosano

La presenza simultanea di gruppi amminici e ossidrilici liberi rende il chitosano un materiale chimicamente molto reattivo e facilmente funzionalizzabile in diversi loci e con diversi gruppi funzionali, come mostrato in Figura 3 [6]. Sono state descritte numerose strategie di modifica chimica, tra cui acilazione, alchilazione, quaternizzazione, grafting di catene laterali e reticolazione, che consentono di modulare in modo fine solubilità, carica, affinità biologica, stabilità e comportamento meccanico del materiale [2–4,13].

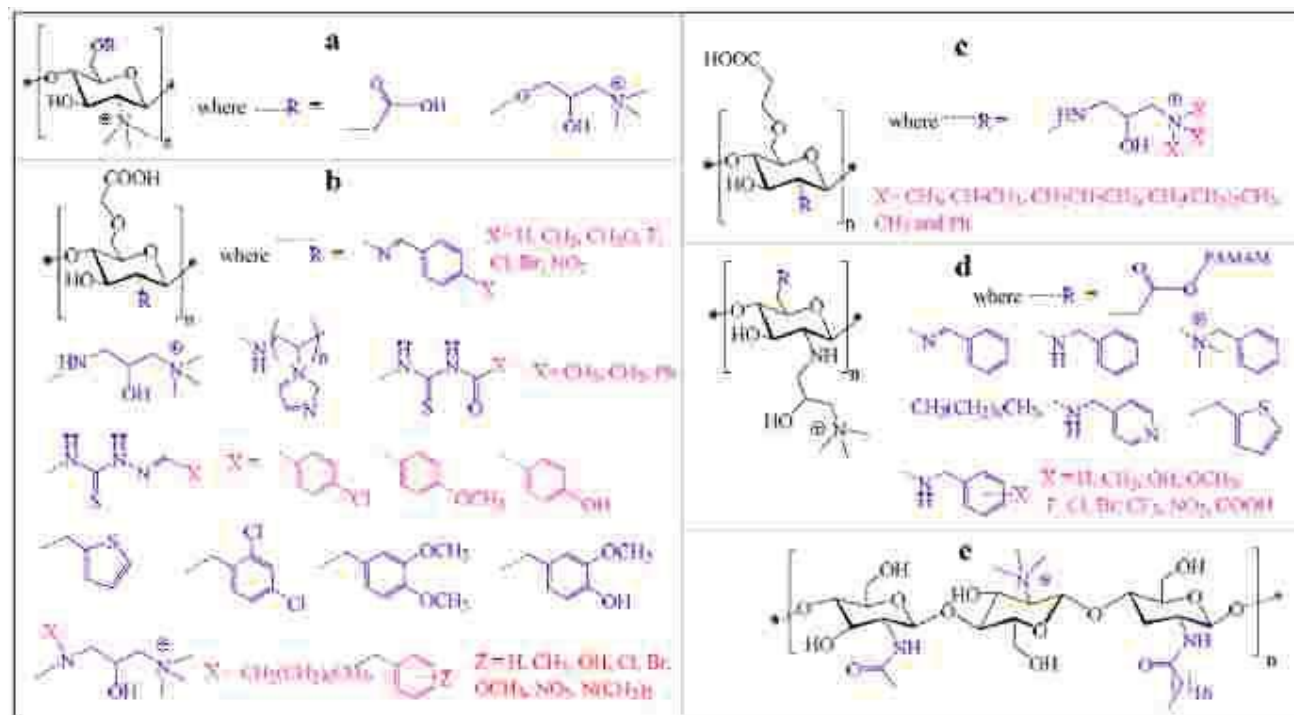


Figura 3. Schema sintetico delle funzionalità derivatizzabili e dei derivati del chitosano [6]

2.1.4 Reticolazione del chitosano

La reticolazione, o *cross-linking*, è una delle procedure di elezione per l'ingegnerizzazione del chitosano, in quanto conferisce a questo materiale maggiore integrità strutturale e stabilità dimensionale, migliore resistenza al rigonfiamento (riduzione del grado di swelling), migliori proprietà meccaniche (aumento del modulo elastico e della resistenza meccanica), minore solubilità, controllo della permeabilità e della diffusività dei soluti e rallentamento della degradazione del materiale; caratteristiche tutte quante desiderate nel settore delle applicazioni biomedicali.

Per questo motivo, il cross-linking consente di trasformare il chitosano da polimero idrosolubile o fortemente rigonfiabile a una rete tridimensionale stabile con proprietà modulabili. Il crosslinking rappresenta quindi il principale strumento ingegneristico per adattare il chitosano a requisiti applicativi molto diversi: film sottili e flessibili vs membrane strutturali, idrogel altamente permeabili vs barriere selettive, rivestimenti temporanei vs coating stabili di lunga durata.

La *densità di reticolazione* rappresenta il parametro chiave che governa l'equilibrio tra stabilità meccanica, flessibilità, permeabilità e biocompatibilità del sistema.

Le molecole cross-linker presentano una doppia funzionalità che si lega ai gruppi amminici delle catene del chitosano, formando dei ponti tra le varie catene e creando così una rete tridimensionale stabile. I legami inter-catena possono essere di diverso tipo, come mostrato in Figura 4 [13,15-19].

Cross-linking chimico

Si ottiene tramite formazione di legami covalenti tra i gruppi amminici del polimero e le specie cross-linker. Tra queste specie la glutaraldeide (GLU) è uno dei più antichi e più utilizzati agenti di reticolazione per il chitosano. Essa reagisce principalmente con i gruppi amminici primari del polimero formando legami di tipo imminico (basi di Schiff). I materiali a base di chitosano reticolati con GLU mostrano elevata stabilità in acqua e in ambiente fisiologico, forte riduzione del grado di swelling, significativo aumento del modulo elastico e della resistenza meccanica. Tuttavia, l'uso della glutaraldeide è accompagnato da notevoli problemi di biocompatibilità, dovuti alla citotossicità di questa specie, all'irrigidimento eccessivo del materiale e alla potenziale risposta infiammatoria dei tessuti. Per questo motivo, nonostante la GLU sia ancora molto utilizzata a livello sperimentale come strumento di riferimento, il suo impiego clinico diretto è fortemente limitato.

La genipina è un agente di reticolazione estratto dal frutto di *Gardenia jasminoides*, che reagisce con i gruppi amminici del chitosano formando legami covalenti stabili. Rispetto alla glutaraldeide, la genipina presenta citotossicità drasticamente inferiore, migliore compatibilità biologica e maggiore gradualità nel processo di reticolazione. I materiali di chitosano reticolati con genipina mostrano buone proprietà meccaniche, elevata stabilità in ambiente acquoso, colore blu-verde caratteristico e ottima tolleranza cellulare. Per queste ragioni, la genipina è oggi considerata uno dei crosslinker più promettenti per applicazioni biomediche del chitosano.

Altri agenti di reticolazione chimica per il chitosano sono dialdeidi aromatiche (ad esempio vanillina), epossidi, carbodimmidi, anidridi e isocianati in contesti più chimicamente aggressivi.

Questi approcci consentono una fine modulazione delle proprietà meccaniche e di degradazione, ma richiedono un attento bilanciamento tra efficienza di reticolazione, condizioni di reazione e mantenimento della biocompatibilità del sistema.

Cross-linking elettrostatico

Si ottiene tramite formazione di legami ionici tra i gruppi amminici protonati del polimero e le specie cross-linker, quali citrati, solfati, fosfati e ossalati.

Una delle strategie più eleganti e biocompatibili per la stabilizzazione del chitosano è rappresentata dalla reticolazione ionotropica mediante polianioni multivalenti, in particolare il tripolifosfato di sodio (TPP). In questo caso, la reticolazione avviene per mezzo dei gruppi fosfato negativi del TPP, come mostrato in Figura 5. La reticolazione con TPP è ampiamente documentata in letteratura per la preparazione di nanoparticelle e microsfele di chitosano, membrane e idrogel stabilizzati, sistemi per il rilascio controllato di farmaci. Dal punto di vista strutturale, il grado di reticolazione può essere modulato variando il rapporto chitosano/TPP, il pH, la forza ionica del mezzo; consentendo un controllo fine su dimensione dei pori, swelling, rigidità meccanica, cinetica di rilascio delle molecole incorporate.

I vantaggi principali di questo approccio sono condizioni di preparazione blande (acquose, a temperatura ambiente), assenza di reagenti tossici ed elevata biocompatibilità del sistema risultante [12,15,17,18,20].

Cross-linking fisico

Si ottiene tramite formazione di legami a idrogeno, interazioni idrofobiche, complessi polielettrolitici con polimeri anionici (alginato, acido ialuronico, carragenina) tra il polimero e le specie cross-linker.

In questi sistemi, il materiale che si ottiene è meno stabile rispetto ai sistemi chimicamente reticolati ma spesso più dinamico e bio-mimetico. Queste reti fisiche sono particolarmente interessanti per la preparazione di idrogel iniettabili, sistemi auto-riparanti e materiali temporanei per applicazioni di wound healing.

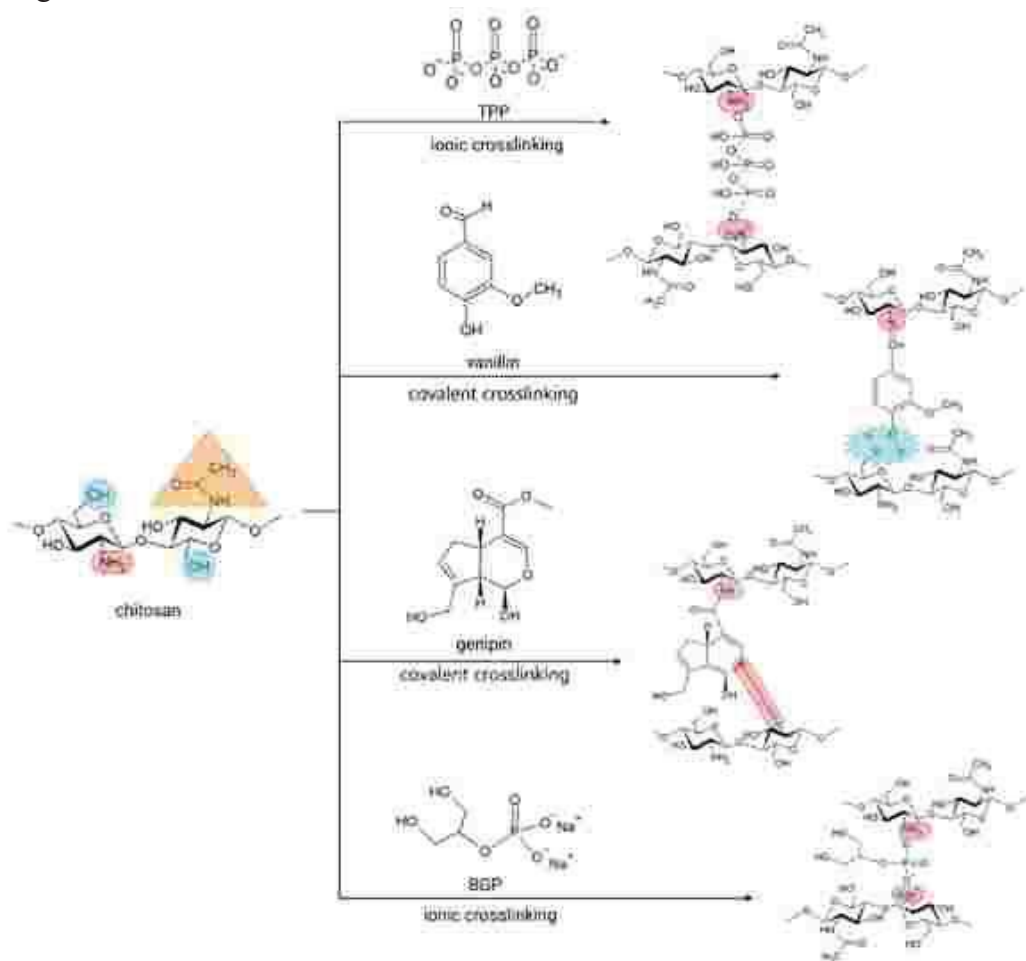


Figura 4. Tipi di cross-linking del chitosano: ionico con TPP e BGP e covalente con vanillina e genipina

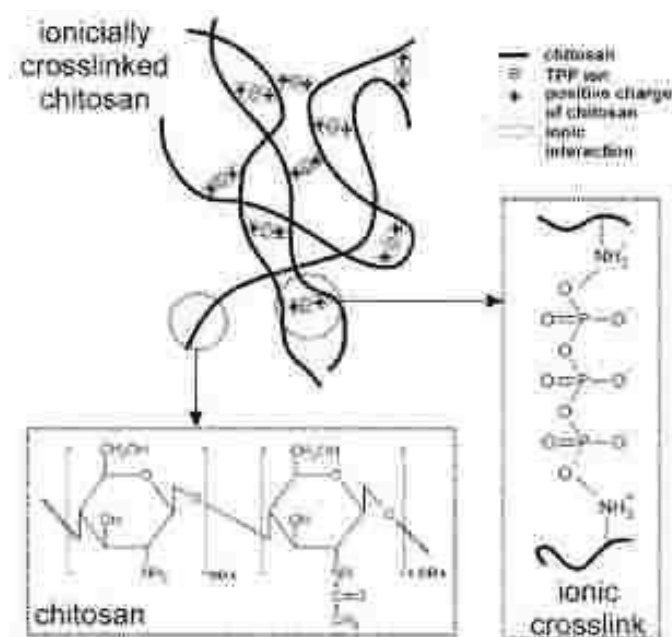


Figura 5. Rappresentazione schematica del cross-linking ionico tra chitosano e TPP

2.1.5 Chitosano come famiglia di molecole e suo ruolo nella presente tesi

La straordinaria flessibilità chimica del chitosano, sintetizzata in Figura 6, permette di considerare questa molecola non semplicemente come un materiale unico e invariabile, ma come una famiglia di polimeri le cui proprietà sono finemente regolabili variando parametri strutturali quali il grado di deacetilazione, il peso molecolare e l'organizzazione supramolecolare, nonché modificandone ad hoc la struttura tramite gruppi funzionali o molecole cross-linker [1–4]. Il chitosano può essere considerato quindi come una vera e propria piattaforma molecolare ingegnerizzabile, sulla quale è possibile costruire sistemi con proprietà mirate per applicazioni specifiche in ambito farmaceutico, biomedicale e bioingegneristico [2–4].

Per quanto riguarda la reticolazione del chitosano, nel contesto della presente tesi, questa assume un significato particolarmente critico. Quando il chitosano viene utilizzato come strato funzionale su una membrana biologica di origine bovina è infatti necessario che il coating sia sufficientemente stabile in ambiente fisiologico e non venga rapidamente dilavato o degradato, e che mantenga al tempo stesso flessibilità, compatibilità meccanica con il substrato biologico e biocompatibilità elevata, nonché resistenza meccanica, permeabilità e degradabilità controllata. Inoltre, la reticolazione del chitosano non serve solo a stabilizzare il polimero, ma anche a fissare e immobilizzare fasi secondarie all'interno della matrice, come nanoparticelle, principi attivi farmaceutici e solidi lamellari. In questi sistemi compositi, la rete di chitosano reticolato svolge il ruolo di matrice continua e fase di interfaccia tra il substrato biologico e la fase inorganica funzionale.

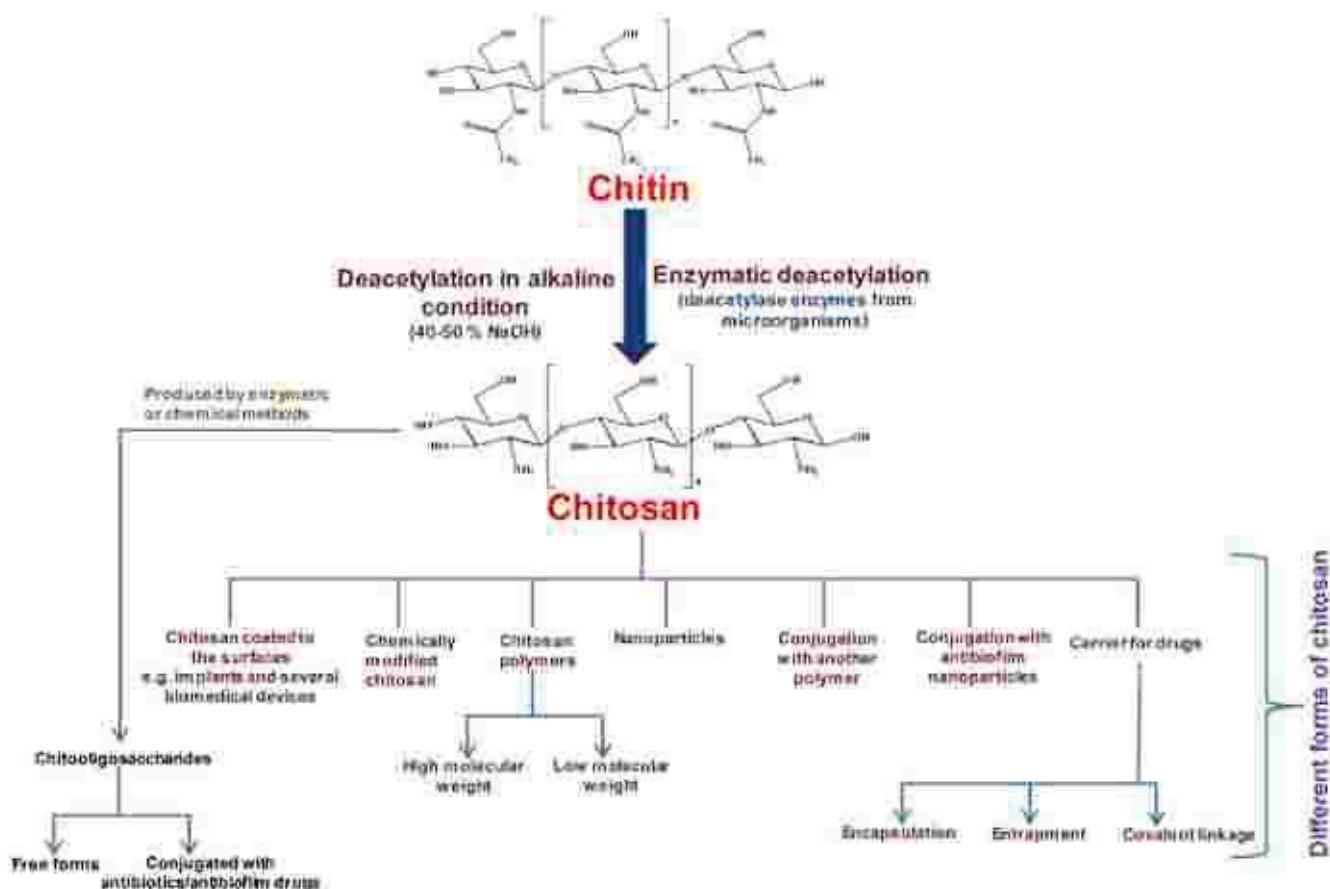


Figura 6. Diagramma delle diverse forme di chitosano e dei loro derivati [21]

2.2 Dal polimero al materiale: forme fisiche e comportamento del chitosano

Il chitosano, grazie alla presenza simultanea di gruppi amminici primari e gruppi ossidrilici lungo la catena polisaccaridica, e quindi grazie al suo comportamento polielettrolitico in ambiente acido, rappresenta una piattaforma polimerica estremamente versatile dal punto di vista chimico, in grado di essere trasformata in un'ampia varietà di forme fisiche [1–4].

Per quanto riguarda le proprietà reologiche invece, soluzioni di chitosano mostrano un comportamento non newtoniano di tipo pseudoplastico, cioè con una viscosità che diminuisce all'aumentare del gradiente di velocità. La viscosità dipende in modo marcato dalla concentrazione, dal MW, dal DD e dalla forza ionica del mezzo. Queste caratteristiche reologiche sono di grande importanza pratica, poiché consentono di processare il chitosano in soluzione e di indurlo successivamente la gelificazione o la precipitazione controllata attraverso variazioni di pH, aggiunta di agenti reticolanti, additivi, plasticizzanti, fasi inorganiche disperse o specie polianioniche [1,2,11,12].

Dal punto di vista bio-ingegneristico, la straordinaria versatilità chimica, morfologica e processuale del chitosano lo rende un polimero di grande interesse nel campo biomedico consentendo di adattarlo a contesti applicativi molto diversi. A partire dallo stesso polimero di base è infatti possibile ottenere un'ampia gamma di forme fisiche, che vanno da: film sottili e membrane, a spugne porose e scaffold tridimensionali, a microsfeere e nanoparticelle, a idrogel iniettabili; semplicemente variando il metodo di preparazione (casting, elettrofilatura, stampa 3D ecc), le condizioni di processo e l'eventuale presenza di agenti reticolanti o fasi secondarie [1–4].

2.2.1 Membrane e film di chitosano

Le membrane e i film di chitosano, di cui un'immagine in Figura 7, sono generalmente ottenuti via *solvent-casting*. In questo approccio, il polimero viene disciolto in una soluzione acida diluita (tipicamente acido acetico o lattico), la soluzione viene colata su un supporto piano e il solvente viene lasciato evaporare lentamente e in modo controllato, portando alla formazione di un film continuo omogeneo e trasparente [2,11,13,16,19,22,23].

Le proprietà finali del film dipendono in modo critico da numerosi parametri, quali la concentrazione della soluzione polimerica, il tipo e concentrazione dell'acido, il peso molecolare e il grado di deacetilazione del chitosano, la velocità di evaporazione del solvente, l'eventuale presenza di plasticizzanti (come glicerolo o sorbitolo) e di trattamenti post-formazione (neutralizzazione, reticolazione, essiccamento controllato).

Dal punto di vista microstrutturale, questi materiali sono costituiti da una rete polimerica densa, stabilizzata da una fitta trama di legami a idrogeno intra- e intermolecolari, con un grado di cristallinità parziale, una distribuzione di porosità molto bassa e ricchi di gruppi funzionali esposti in superficie [1,2,13].

Queste caratteristiche favoriscono la loro interazione con i sistemi biologici e quindi li rendono particolarmente adatti come barriere fisiche, rivestimenti protettivi o strati di interfaccia su superfici biologiche e materiali compositi. Per questi motivi tali materiali sono particolarmente interessanti per applicazioni biomedicali quali medicazioni avanzate, rivestimenti e membrane funzionali [2,16,18,19,24].

I film di chitosano presentano generalmente una buona resistenza meccanica, ma anche una certa fragilità. Le proprietà meccaniche dei film di chitosano (modulo elastico, resistenza a trazione e allungamento a rottura), sono fortemente dipendenti dal peso molecolare, dal grado di cristallinità e dal contenuto d'acqua del materiale. In generale tipi di chitosano ad alto MW e con maggiore cristallinità producono film più rigidi e resistenti. L'aggiunta di plasticizzanti aumenta la flessibilità ma riduce la resistenza meccanica di tali film, mentre l'assorbimento di acqua porta a un comportamento più duttile.

In ambiente acquoso i film di chitosano presentano ovviamente un comportamento fortemente idrofilo, con significativo rigonfiamento (swelling) e una marcata transizione verso un comportamento viscoelastico simile a quello dei tessuti molli [11,13,16,19]. La stabilità in acqua può essere modulata tramite reticolazione, che riduce la solubilità e controlla la mobilità delle catene [11,15-19].

Dal punto di vista funzionale, un aspetto cruciale è rappresentato dalle proprietà di trasporto, in particolare: la permeabilità all'acqua e al vapore acqueo, a ioni e molecole di piccole dimensioni e il rigonfiamento (swelling) in ambiente acquoso [6,13,14,20].

Queste proprietà sono di fondamentale importanza nelle applicazioni biomedicali, poiché determinano la capacità del materiale di mantenere un ambiente umido favorevole alla guarigione delle ferite, la possibilità di fungere da barriera selettiva contro agenti patogeni e la cinetica di rilascio di farmaci o molecole bioattive eventualmente incorporate nella matrice [13,14,16,22].

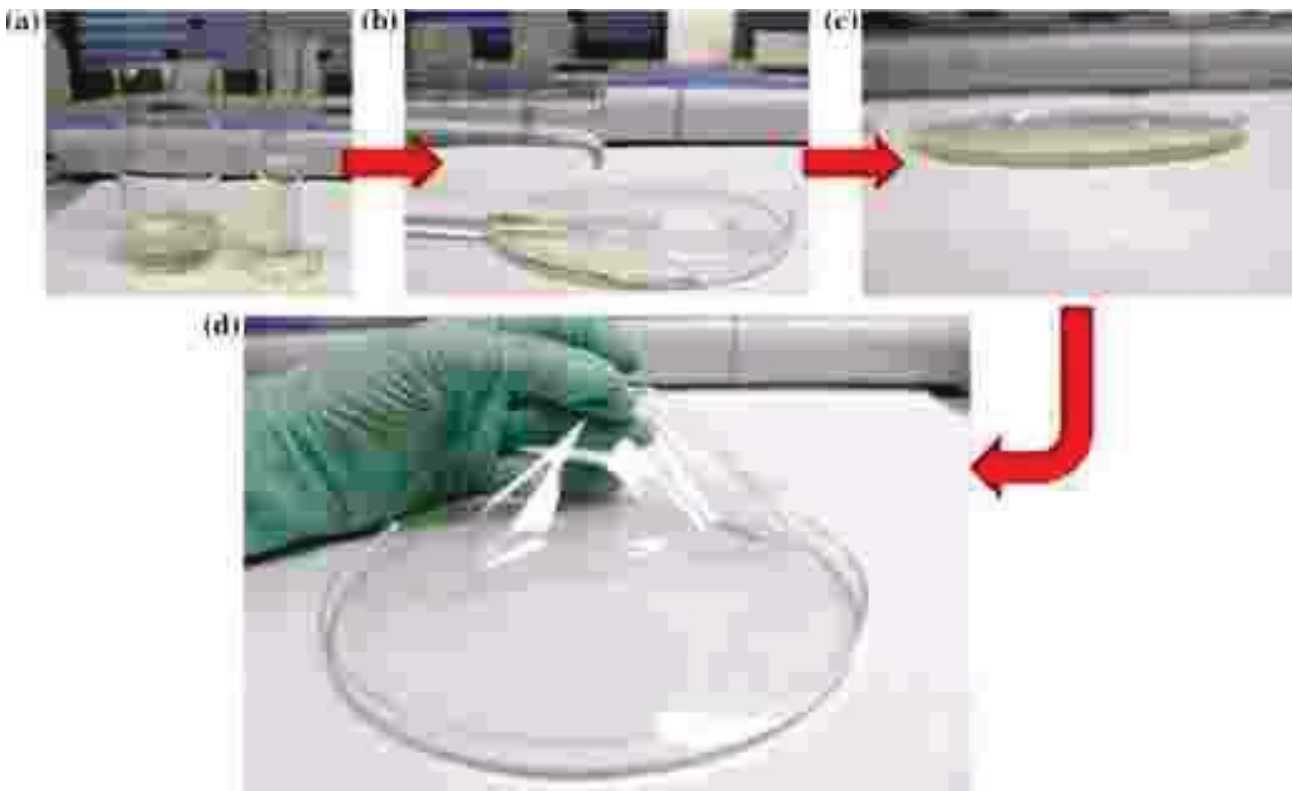


Figura 7. Film a base di chitosano

2.2.2 Idrogel di chitosano

Gli idrogel, come si evince dalla Figura 8, rappresentano un'evoluzione tridimensionale delle membrane e film di chitosano. Sono costituiti da reti polimeriche capaci di incorporare e trattenere grandi quantità di acqua mantenendo una struttura solida e coerente [13,15-19,24,25].

Essi possono essere ottenuti mediante reticolazione covalente (ad esempio con glutaraldeide, genipina o carbodiimmidi), reticolazione ionica (ad esempio con tripolifosfato), interazioni fisiche o combinazione di questi 3 meccanismi [12,15-20].

A livello microstrutturale, gli idrogel sono costituiti da una rete polimerica porosa e altamente idratata. La densità di reticolazione è il parametro fondamentale degli idrogel, in quanto direttamente responsabile delle proprietà meccaniche, del grado di rigonfiamento e della permeabilità dell'idrogel, della diffusività dei soluti e della velocità di degradazione del materiale [13,15-19].

Tali sistemi sono ampiamente studiati come matrici per l'ingegneria tissutale, come veicoli per il rilascio controllato di farmaci e come piattaforme per la realizzazione di interfacce morbide con i tessuti utili nei campi delle medicazioni avanzate per ferite e come matrici per la crescita cellulare [2,15,17-19,24,25].



Figura 8. Idrogel a base di chitosano

2.2.3 Micro- e nanoparticelle di chitosano

Le micro- e nanoparticelle di chitosano, di cui un'immagine SEM in Figura 9, sono sistemi di dimensioni controllate generalmente ottenuti mediante processi di gelificazione ionica, complessazione polielettrolitica o precipitazione controllata [12,14,15,20,26].

Nel caso più comune, l'aggiunta di una soluzione di TPP a una soluzione di chitosano porta alla formazione spontanea di particelle reticolate per interazione elettrostatica [12,15,17,18,20]. La dimensione delle particelle, la loro distribuzione granulometrica e la loro stabilità colloidale dipendono in modo critico dal peso molecolare del polimero, dal grado di deacetilazione, dal rapporto chitosano/reticolante e dalle condizioni di miscelazione [12,14,15,20,26].

Dal punto di vista strutturale, queste particelle possono essere descritte come reti polimeriche densamente reticolate su scala nanometrica o micrometrica, caratterizzate da elevata area superficiale e da una significativa densità di carica positiva residua [14,15,17,18,24-26]. Queste caratteristiche conferiscono alle micro- e nanoparticelle una buona capacità di interazione con membrane biologiche e la possibilità di incapsulare o complessare una vasta gamma di molecole terapeutiche, incluse piccole molecole, proteine e acidi nucleici [14,15,17,18,24-26]. Inoltre, la loro carica superficiale positiva favorisce l'adesione a superfici biologiche cariche negativamente e può migliorare la ritenzione locale del sistema nel sito di applicazione. Dal punto di vista applicativo, le particelle di chitosano sono oggi ampiamente studiate come vettori per il rilascio controllato di specie attive, rilascio che può essere governato da diffusione, degradazione della matrice o variazioni di pH, consentendo di progettare sistemi con profili di rilascio adattati alle esigenze cliniche, in particolare per applicazioni locali [2,14,15,17,18,26].

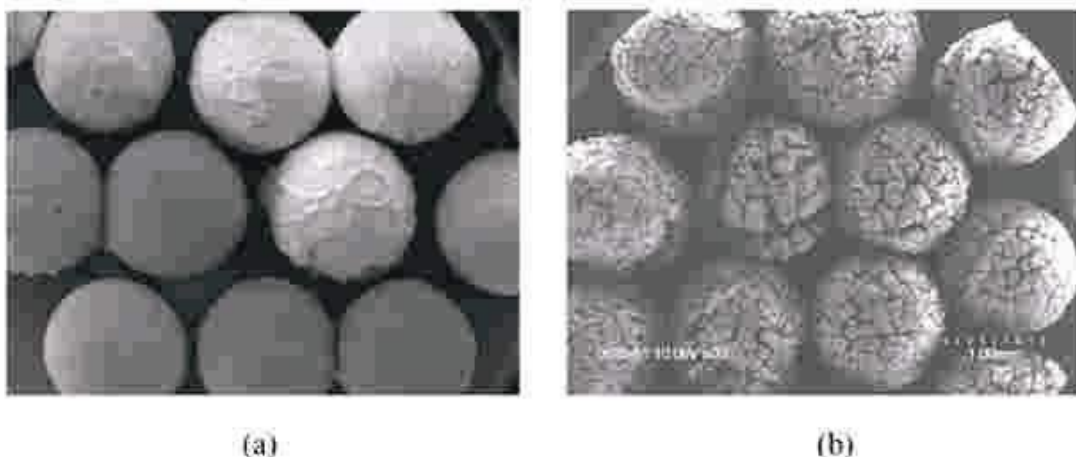


Figura 9. Immagini SEM di microparticelle di chitosano cross-linkate con TPP e genipina [27]

2.2.4 Spugne e scaffold porosi

Attraverso tecniche quali liofilizzazione (freeze-drying), gas foaming, porogen leaching, elettrofilatura e stampa 3D, il chitosano può essere trasformato in scaffold tridimensionali altamente porosi (Figura 10), progettati per imitare in modo approssimativo la struttura della matrice extracellulare naturale.

In questi sistemi, parametri quali dimensione e interconnessione dei pori, rigidità meccanica, biodegradabilità, bagnabilità e chimica di superficie sono cruciali per determinare l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare.

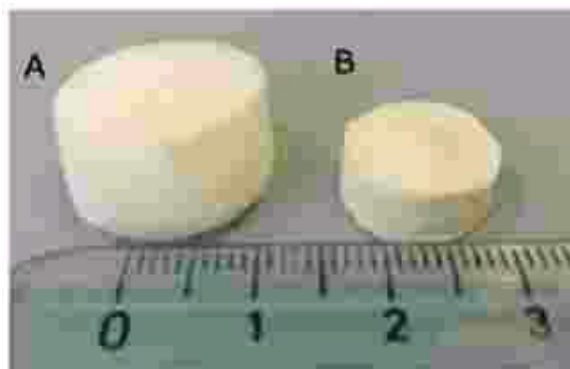


Figura 10. Scaffold porosi a base di chitosano

2.2.5 Stabilizzazione del chitosano

La possibilità di modulare MW, DD, funzionalizzazione, grado di reticolazione del chitosano, la possibilità di variare le condizioni del mezzo (pH, additivi di varia natura, forza ionica) e la possibilità di trattare il chitosano con diversi processi, rendono il chitosano un materiale altamente ingegnerizzabile, capace di coprire un ampio spettro di comportamenti per applicazioni biomediche avanzate, soprattutto nel drug delivery, nell'ingegneria tissutale e nell'ambito di patch e medicazioni [2,14-18,22,24,25].

Tuttavia, senza un'adeguata stabilizzazione, i materiali a base di chitosano non sarebbero idonei ad un utilizzo in ambiente fisiologico poiché:

- troppo solubili,
- troppo permeabili all'acqua ed eccessivamente rigonfiabili,
- soggetti a perdita della loro integrità meccanica,

- soggetti a degradazione enzimatica, mediata da lisozima e altre idrolasi in grado di scindere i legami β -(1 $\rightarrow$ 4) glicosidici. La velocità di degradazione dipende dal DD, dal MW e dal grado di organizzazione cristallina del materiale: in generale, chitosani più deacetilati e più cristallini risultano più resistenti alla degradazione [11,13,16,19].

Perciò, per le applicazioni biomediche un aspetto cruciale è rappresentato dalle modifiche strutturali volte alla stabilizzazione del chitosano, in particolare la reticolazione. Tali modifiche consentono di ridurre la solubilità, controllare la permeabilità e il grado di rigonfiamento, migliorare la resistenza meccanica e modulare la velocità di degradazione del chitosano, rendendone possibile la transizione da materiale solubile a biomateriale strutturale [13,15-19].

Spesso inoltre, in tali applicazioni, è richiesto un compromesso tra stabilità meccanica e biodegradabilità controllata.

2.3 Il chitosano nei dispositivi biomedicali

Nel loro insieme, le caratteristiche funzionali del chitosano (dipendenti da pochi parametri chiave come DD, MW, stato ionico, cristallinità, eventuali funzionalizzazioni, densità di reticolazione, condizioni del mezzo e tipo di processamento del materiale), rendono il chitosano un materiale straordinariamente flessibile dal punto di vista progettuale e consentono di adattarlo a un'ampia gamma di applicazioni in campo biomedicale.

2.3.1 Il chitosano come materiale d'interfaccia con le superfici biologiche

In particolare, la combinazione di capacità filmogena, affinità per le superfici biologiche e possibilità di fungere da matrice per l'incorporazione di fasi funzionali (come solidi lamellari o specie d'interesse farmaceutico), costituisce il fondamento razionale per il suo impiego come materiale di interfaccia tra tessuti biologici (come le membrane di origine bovina) e componenti funzionali inorganici.

Le superfici di chitosano, sia sotto forma di film che di idrogel che di scaffold, presentano una chimica di superficie favorevole all'interazione con i sistemi biologici. La presenza di gruppi amminici e ossidrilici consente infatti l'adsorbimento di proteine della matrice extracellulare, l'interazione con glicoproteine e proteoglicani e la modulazione dell'adesione cellulare. In molti casi, tuttavia, il chitosano mostra una bioattività relativamente moderata nei confronti di alcune linee cellulari, rendendo vantaggiosa la sua combinazione con altre biomolecole tra cui collagene, gelatina e acido ialuronico al fine di migliorare ulteriormente la risposta biologica.

La possibilità di ottenere materiali sotto forma di film e membrane è di cruciale importanza per la sua applicazione come rivestimento superficiale (coating) di substrati biologici o sintetici, proprietà ricercata in patch e medicazioni avanzate per ferite e nei supporti per la rigenerazione tissutale, dove il chitosano funge da strato di interfaccia in sistemi compositi e da barriera selettiva e membrana semipermeabile.

Per quanto riguarda l'utilizzo del chitosano per il rilascio controllato di farmaci (*drug delivery*), le forme preferenziali che fungono da vettori sono micro e nano-particelle e idrogel. In questi sistemi infatti il rilascio può essere governato da diversi meccanismi, tra cui la diffusione del principio attivo attraverso la matrice, la degradazione del polimero o variazioni di pH che alterano lo stato di ionizzazione del materiale. Questa molteplicità di meccanismi consente di progettare sistemi con profili di rilascio adattati alle esigenze cliniche, in particolare per applicazioni locali, nelle quali è

possibile ottenere elevate concentrazioni di farmaco nel sito di interesse riducendo al minimo gli effetti collaterali sistemici [2,14,15,17,18,24-26].

È importante sottolineare come le proprietà macroscopiche dei materiali a base di chitosano — in termini di resistenza meccanica, rigonfiamento, permeabilità e stabilità — siano strettamente legate alla loro microstruttura e al tipo di reticolazione adottato [11,13,15-19]. La densità di crosslinking, la distribuzione delle zone reticolate e la presenza di eventuali domini più o meno ordinati influenzano in modo diretto sia il comportamento meccanico sia la cinetica di rilascio di molecole incapsulate [13,15-19]. Questa stretta correlazione tra struttura e funzione rende evidente la necessità di un approccio ingegneristico alla progettazione dei materiali a base di chitosano, nel quale la scelta delle condizioni di preparazione e di stabilizzazione non può essere lasciata al caso, ma deve essere guidata dalle prestazioni richieste per l'applicazione finale [2,15-19].

Applicazioni biomedicali del chitosano quale rivestimento antibatterico e bioadesivo sono di tale importanza applicativa da meritare di essere spiegati più dettagliatamente.

2.3.2 Il chitosano come bioadesivo

I bioadesivi sono definiti come materiali in grado di unire due superfici, di cui almeno una è costituita da un tessuto biologico, senza la necessità di supporti meccanici aggiuntivi quali suture o graffe metalliche. Essi trovano applicazione in numerosi ambiti clinici, tra cui la chiusura delle ferite chirurgiche, il controllo delle emorragie, la sigillatura di perdite d'aria o di fluidi corporei e il fissaggio di dispositivi come patch, stabilizzazione di dispositivi impiantabili quali innesti e scaffold ai tessuti.

Un bioadesivo ideale dovrebbe soddisfare una serie di requisiti fondamentali:

- a) essere biocompatibile e non tossico,
- b) poter essere applicato facilmente in situ e solidificare rapidamente,
- c) possedere adeguata forza adesiva e coesione interna,
- d) mantenere le proprie prestazioni in ambiente umido,
- e) degradarsi in modo controllato senza generare sottoprodotti dannosi,
- f) contribuire ai processi di guarigione e rigenerazione tissutale [6].

L'adesione di un materiale polimerico a un tessuto biologico può avvenire attraverso una combinazione di diversi meccanismi:

- Interblocco meccanico: penetrazione del materiale nelle micro- e nano-irregolarità della superficie tissutale.
- Interazioni elettrostatiche (ad esempio tra polimeri cationici e superfici biologiche anioniche), legami a idrogeno (ad esempio tra gruppi polari del polimero e gruppi funzionali delle proteine e polisaccaridi della superficie tissutale), interazioni idrofobiche e di Van der Waals, legami covalenti (nei sistemi più avanzati e reattivi).

Nei sistemi bioadesivi reali, l'adesione osservata è quasi sempre il risultato di una combinazione sinergica di più meccanismi.

L'adesione ai tessuti biologici rappresenta una delle sfide più complesse e critiche in ambito biomedico. A differenza dei sistemi ingegneristici convenzionali, le superfici biologiche sono infatti umide, oltre che chimicamente eterogenee e meccanicamente deformabili. Queste caratteristiche rendono inefficaci molti adesivi sintetici tradizionali, progettati per funzionare in ambiente secco e

su superfici rigide. Per questo motivo, lo sviluppo di bioadesivi capaci di funzionare in ambiente fisiologico rappresenta un tema di ricerca di primaria importanza.

Attualmente, diversi tipi di adesivi biologici sono utilizzati o in fase di sviluppo clinico. Tra questi, le colle a base di cianoacrilato offrono un'elevata forza adesiva e una rapida polimerizzazione, ma presentano problemi di citotossicità e rigidità, che possono compromettere la guarigione dei tessuti [109]. Le colle di fibrina, basate sulla cascata della coagulazione fisiologica, sono ampiamente utilizzate grazie alla loro eccellente biocompatibilità, ma soffrono di limitazioni legate alla debolezza meccanica, al costo e ai rischi connessi all'origine biologica dei componenti [8].

Queste limitazioni hanno stimolato un intenso sforzo di ricerca volto allo sviluppo di nuovi bioadesivi polimerici, in grado di combinare sicurezza biologica e prestazioni meccaniche adeguate. In questo scenario, un ruolo di crescente importanza è stato assunto dai materiali ispirati ai sistemi di adesione naturali, come quelli osservabili in alcuni organismi marini, in particolare i mitili, capaci di aderire con elevata resistenza a superfici bagnate e irregolari [3]. I mitili marini sono in grado di risolvere questo problema attraverso la secrezione di proteine adesive ricche di 3,4-diidrossifenilalanina (DOPA), un amminoacido contenente gruppi catecolici responsabili di interazioni forti e versatili con una grande varietà di superfici [28]. I gruppi catecolici possono stabilire legami a idrogeno, interazioni di coordinazione con ioni metallici, interazioni π - π e, in condizioni ossidative, legami covalenti con nucleofili presenti sulle superfici biologiche. Questa pluralità di meccanismi di interazione è alla base dell'eccezionale capacità adesiva dei sistemi ispirati ai mitili, anche in presenza di acqua o fluidi biologici [28].

Negli ultimi anni, numerosi polimeri naturali e sintetici sono stati studiati come materiali bioadesivi. Tra questi, il chitosano possiede una serie di caratteristiche che lo rendono naturalmente predisposto all'uso come bioadesivo, in quanto, oltre ad essere biocompatibile, presenta altre proprietà, di seguito elencate [1-5,16,19, 29-33].

1. È policationico in ambiente fisiologico acido, e perciò può stabilire forti interazioni elettrostatiche con le superfici biologiche, incluse le membrane extracellulari, il collagene e molte glicoproteine, che presentano in genere una carica netta negativa a pH fisiologico [1-3,11,16,19,34]; queste interazioni costituiscono uno dei principali contributi all'adesione iniziale.
2. Presenta un'elevata densità di gruppi funzionali polari ($-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$) eventualmente funzionalizzabili con gruppi catecolici per potenziarne l'adesività.
3. È in grado di bagnare efficacemente le superfici biologiche tramite diversi meccanismi che sfruttano l'eterogeneità chimica di queste strutture: tramite legami a idrogeno, interazioni secondarie e un certo grado di interpenetrazione fisica delle catene polimeriche nelle strutture superficiali della ECM, che contribuisce alla stabilità meccanica dell'interfaccia formata [16,31,34].
4. Mostra una buona deformabilità meccanica: a differenza degli adesivi sintetici rigidi, il chitosano in ambiente idratato si comporta come un *bioadesivo morbido*, caratterizzato da un modulo elastico relativamente basso e da un comportamento viscoelastico che gli consente di adattarsi alla topografia del substrato e di seguire le sue deformazioni senza generare elevate concentrazioni locali di tensione [16,19,34]. Questo aspetto è di particolare rilevanza per applicazioni su tessuti molli e dinamici, nei quali una interfaccia troppo rigida porterebbe rapidamente a delaminazione o a danneggiamento del substrato biologico [34-36].

Dal punto di vista chimico-strutturale, l'efficacia adesiva del chitosano dipende in modo critico dal grado di deacetilazione, dal peso molecolare e dallo stato di reticolazione del materiale [1–3,11,13]. Un elevato grado di deacetilazione aumenta la densità di carica positiva e quindi il contributo elettrostatico all'adesione, mentre il peso molecolare governa sia la coesione interna dello strato adesivo sia la sua capacità di formare un film continuo e meccanicamente stabile [2,11,13,16,19].

Numerosi studi hanno dimostrato sperimentalmente la capacità del chitosano di aderire a diversi tipi di tessuti biologici, tra cui pelle, mucose, cartilagine, vasi sanguigni, membrane collageniche (tra cui pericardio).

Tuttavia, per superare i classici limiti classici del chitosano in ambiente fisiologico (swelling, degradazione, perdita di integrità meccanica) [11,13,16,19] e migliorarne le prestazioni come bioadesivo, sono state sviluppate numerose strategie di modificazione chimica e strutturale del chitosano. Tra queste si ha la reticolazione, che consente di aumentare la coesione interna del materiale, ridurre il rigonfiamento e stabilizzare l'interfaccia adesiva senza eliminare la flessibilità intrinseca del polimero [12,15-20]. In questo modo è possibile progettare strati adesivi che mantengano un comportamento "morbido" ma presentino una stabilità meccanica e chimica adeguata all'impiego in ambiente fisiologico [16,19,34]. Un'altra strategia è la funzionalizzazione con gruppi catecolici, ispirata ai meccanismi di adesione dei mitili marini. Un altro metodo di grande interesse consiste nello sviluppo di sistemi di chitosano fotoreticolabili o chimicamente reattivi in situ, che possono essere applicati in forma fluida o semifluida, adattarsi perfettamente alla geometria del tessuto ed essere induriti direttamente in loco mediante irradiazione o reazione chimica controllata. Questi sistemi sono stati applicati a tessuti quali aorta, trachea e polmone.

2.3.3 Il chitosano come materiale antimicrobico e antibiofilm

Uno dei principali problemi clinici associati all'uso di biomateriali e dispositivi medici impiantabili è rappresentato dalle infezioni correlate al dispositivo. Queste infezioni sono spesso difficili da trattare, croniche e soggette a recidive, poiché nella maggior parte dei casi sono mediate dalla formazione di biofilm microbici sulla superficie del materiale.

Un biofilm può essere definito come una comunità strutturata di microrganismi aderente a una superficie e inglobata in una matrice extracellulare polimerica (EPS) autoprodotta. All'interno del biofilm, i microrganismi mostrano una resistenza agli antibiotici drasticamente superiore rispetto alle forme planctoniche (circa 10 volte superiore), sono meno accessibili al sistema immunitario e possono persistere per lunghi periodi fungendo da serbatoio di infezione cronica [4,37,38].

Per questi motivi, la prevenzione della adesione microbica iniziale e della successiva maturazione del biofilm è oggi considerata una delle strategie più efficaci per aumentare la sicurezza e la durata dei biomateriali. Le strategie per conferire proprietà antibatteriche ai biomateriali possono essere suddivise, in modo semplificato, in due grandi categorie:

- approcci passivi, che mirano a ridurre l'adesione batterica modificando la topografia superficiale, idrofilicità / idrofobicità superficiale, carica superficiale, energia superficiale;
- approcci attivi, che prevedono il rilascio controllato di agenti antibatterici (antibiotici, ioni metallici, biocidi) oppure l'uso di materiali intrinsecamente antibatterici.

Il chitosano rientra in questa seconda categoria, in quanto possiede un'attività antimicrobica intrinseca, che lo rende particolarmente interessante per applicazioni biomediche in cui è richiesto un

controllo attivo della contaminazione microbica. Numerosi studi hanno dimostrato che il chitosano è attivo contro un'ampia gamma di microrganismi, tra cui:

- batteri Gram-positivi (ad esempio *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*),
- batteri Gram-negativi (ad esempio *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*),
- funghi e lieviti (ad esempio *Candida albicans*) [4,23,37,38].

L'efficacia del chitosano è stata osservata sia in soluzione sia in forma di film, coating, idrogel e nanoparticelle, rendendo questo polimero estremamente versatile per la progettazione di superfici e materiali antibatterici. Nonostante l'ampia mole di dati sperimentali, i meccanismi esatti dell'azione antimicrobica del chitosano non sono completamente univoci e probabilmente non sono riconducibile a un singolo, ma a una combinazione di effetti [4,38]. Sono stati proposti diversi meccanismi principali, che possono agire in modo sinergico, di seguito specificati e rappresentati in Figura 11.

Interazione elettrostatica con la membrana cellulare

Il meccanismo più comunemente accettato prevede l'interazione elettrostatica tra i gruppi amminici protonati del chitosano e i componenti anionici della parete e della membrana cellulare (Gram+ (acidi teicoci della parete dei batteri Gram+, lipopolisaccarde della membrana batterica dei Gram- e mannosio-6-fosfato della parete fungina). Questa interazione può portare a destabilizzazione della membrana con aumento della sua permeabilità, perdita di integrità strutturale, fuoriuscita di componenti intracellulari essenziali finanche alla morte cellulare [4,37,38].

Penetrazione intracellulare e interazione con il DNA

In presenza di frazioni di chitosano a basso peso molecolare, è stata inoltre proposta la possibilità di penetrazione intracellulare del polimero e di interferenza con i processi di replicazione del DNA e di sintesi proteica e di inibizione delle funzioni mitocondriali e della sintesi dell'ATP [4,37].

Chelazione di ioni e inibizione enzimatica

Un ulteriore contributo può derivare dalla capacità del chitosano di chelare ioni metallici e nutrienti essenziali per il metabolismo batterico [4,37]. La sottrazione di tali ioni può inibire l'attività di enzimi chiave, alterare l'equilibrio osmotico e contribuire ulteriormente all'effetto batteriostatico o battericida.

L'attività antibatterica del chitosano non è una proprietà fissa, ma dipende in modo critico dai suoi parametri chimici e da fattori ambientali. Un più elevato grado di deacetilazione implica maggiore densità di carica positiva, interazioni elettrostatiche più forti con le superfici microbiche e, in molti casi, un aumento dell'attività antimicrobica. Chitosani ad alto MW tendono ad agire prevalentemente a livello di superficie cellulare, mentre chitosani a basso MW possono penetrare più facilmente nella cellula. Inoltre, poiché l'attività del chitosano dipende dalla protonazione dei gruppi amminici, essa è più marcata in ambiente acido o debolmente acido, mentre è ridotta in condizioni in cui il polimero è meno carico o in presenza di elevata forza ionica che scherma le interazioni elettrostatiche, rendendo le proprietà antimicrobiche del chitosano dipendenti dalle condizioni di pH e forza ionica del mezzo.

Oltre all'effetto sui microrganismi planctonici, il chitosano mostra una notevole attività antibiofilm [4,7,8-10,21,37-39,40], che si manifesta a due livelli principali:

- 1) Inibizione dell'adesione iniziale dei microrganismi alla superficie.
- 2) Interferenza con la struttura e la stabilità dei biofilm già formati.

Nel primo caso, la presenza di chitosano su una superficie modifica la carica e la chimica superficiale, rende l'adesione microbica energeticamente sfavorevole e può esercitare un effetto batteriostatico

locale. Nel secondo caso, il chitosano può interagire con la matrice extracellulare del biofilm (EPS) destabilizzandone la struttura e aumentando la permeabilità del biofilm ad agenti antimicrobici; in alcuni casi può inoltre indurre una parziale dispersione del biofilm stesso.

Questo duplice effetto — preventivo e attivo — è di particolare importanza applicativa, poiché la prevenzione della formazione del biofilm risulta generalmente molto più efficace della sua eradicazione una volta che la struttura è completamente maturata [4,37]. Grazie a queste proprietà, il chitosano è stato ampiamente studiato come coating antibatterico per applicazioni implantari e ricostruttive, componente di film e membrane antibatteriche e matrice per il rilascio controllato di antibiotici o agenti antimicrobici, in cui la sua attività antibiofilm e quella di drug delivery agiscono in sinergia [37,38]. Rispetto a molti sistemi basati esclusivamente sul rilascio di farmaci, il chitosano offre il vantaggio di fornire una prima linea di difesa intrinseca contro la colonizzazione microbica, ridurre la dipendenza da antibiotici e potenzialmente limitare l'insorgenza di resistenze.

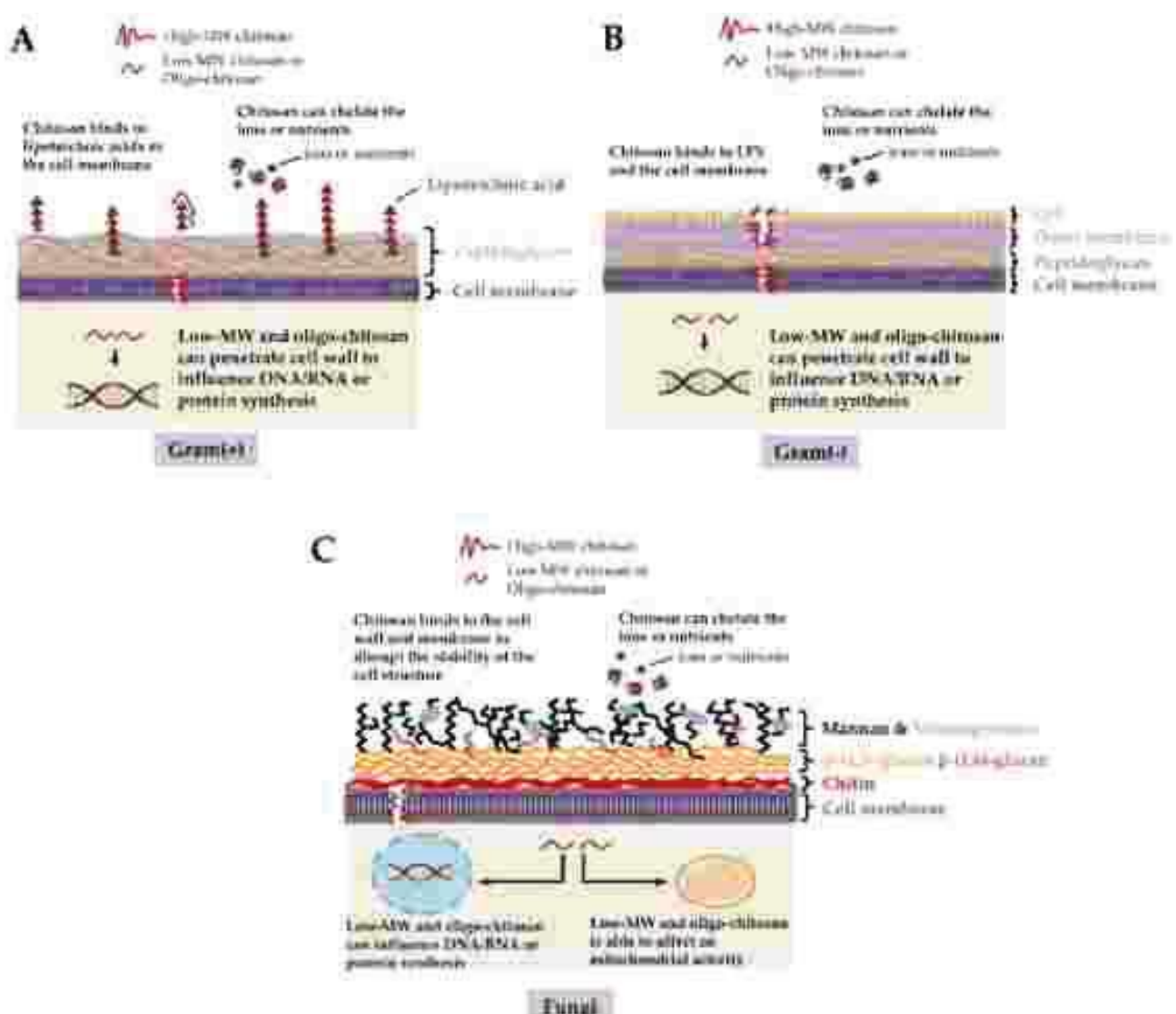


Figura 11. Attività antimicrobica del chitosano verso a) batteri Gram+, b) batteri Gram- e c) funghi [23]

2.3.4 Sinergia tra funzione bioadesiva e funzione antibatterica del chitosano

Alla luce di quanto discusso nei paragrafi 2.3.2 e 2.3.3, emerge chiaramente che il chitosano possieda una duplice natura funzionale, essendo contemporaneamente un eccellente materiale di interfaccia

bioadesivo e un agente antibatterico/antibiofilm intrinseco. Questa combinazione unica di proprietà rende il chitosano particolarmente adatto come strato di collegamento tra membrane biologiche e materiali funzionali e come componente attivo per aumentare la sicurezza e la durabilità del sistema.

Un aspetto di particolare interesse del chitosano è che la funzione di bioadesione e quella antibatterica (e antibiofilm) non sono indipendenti, ma possono agire in modo sinergico. Da un lato, l'adesione stabile del coating al substrato può garantire la persistenza nel tempo della funzione antibatterica sulla superficie del dispositivo; dall'altro, la riduzione della colonizzazione microbica può contribuire a preservare l'integrità dell'interfaccia e a prevenire fenomeni di degradazione biologica precoce [4,16,19,37,38].

2.3.5 Il chitosano come piattaforma ingegnerizzabile per applicazioni biomedicali

Nel contesto dei biomateriali avanzati quindi, il chitosano non deve quindi essere interpretato semplicemente come un materiale volumetrico, ma come un vero e proprio strato funzionale di interfaccia e come matrice per l'integrazione di moduli nano-funzionali in sistemi compositi altamente ingegnerizzati per applicazioni biomediche e farmaceutiche nei quali esso non svolge un singolo ruolo, ma integra contemporaneamente funzioni strutturali (adesione meccanicamente compatibile), biologiche (interazione biochimica con il tessuto) e protettive (protezione antibatterica) in un'unica piattaforma polimerica ingegnerizzabile [16,19,34], rendendolo un materiale strategico per la progettazione di biomateriali avanzati (Figura 12).

In conclusione, il chitosano presenta una straordinaria combinazione di proprietà, quali:

- versatilità strutturale e processuale [2,13,16,19],
- capacità di essere stabilizzato e ingegnerizzato tramite funzionalizzazioni e reticolazione [12,14,15,20,26],
- funzione di interfaccia bioadesiva [16,19,34],
- attività antibatterica e antibiofilm [4,37,38].

Questo insieme di caratteristiche giustifica il crescente interesse per il suo impiego come elemento chiave nei sistemi compositi per applicazioni chirurgiche, ricostruttive e implantari e costituisce il fondamento scientifico e tecnologico per il suo impiego nel settore dei biomateriali.

In questo scenario, il chitosano:

- garantisce l'adesione al substrato biologico,
- fornisce una matrice stabile per l'immobilizzazione della fase inorganica,
- contribuisce alla biocompatibilità del sistema,
- presenta funzionalità biologiche proprie (come l'attività antibatterica e antibiofilm).

Il chitosano rappresenta quindi un candidato ideale come “ponte molecolare” e materiale di interfaccia tra tessuti biologici e materiali funzionali inorganici e per questo è stato selezionato come elemento chiave di collegamento tra il substrato biologico (pericardio bovino) e la fase funzionale inorganica (solidi lamellari) nelle due diverse applicazioni-prototipo trattate nella presente tesi.

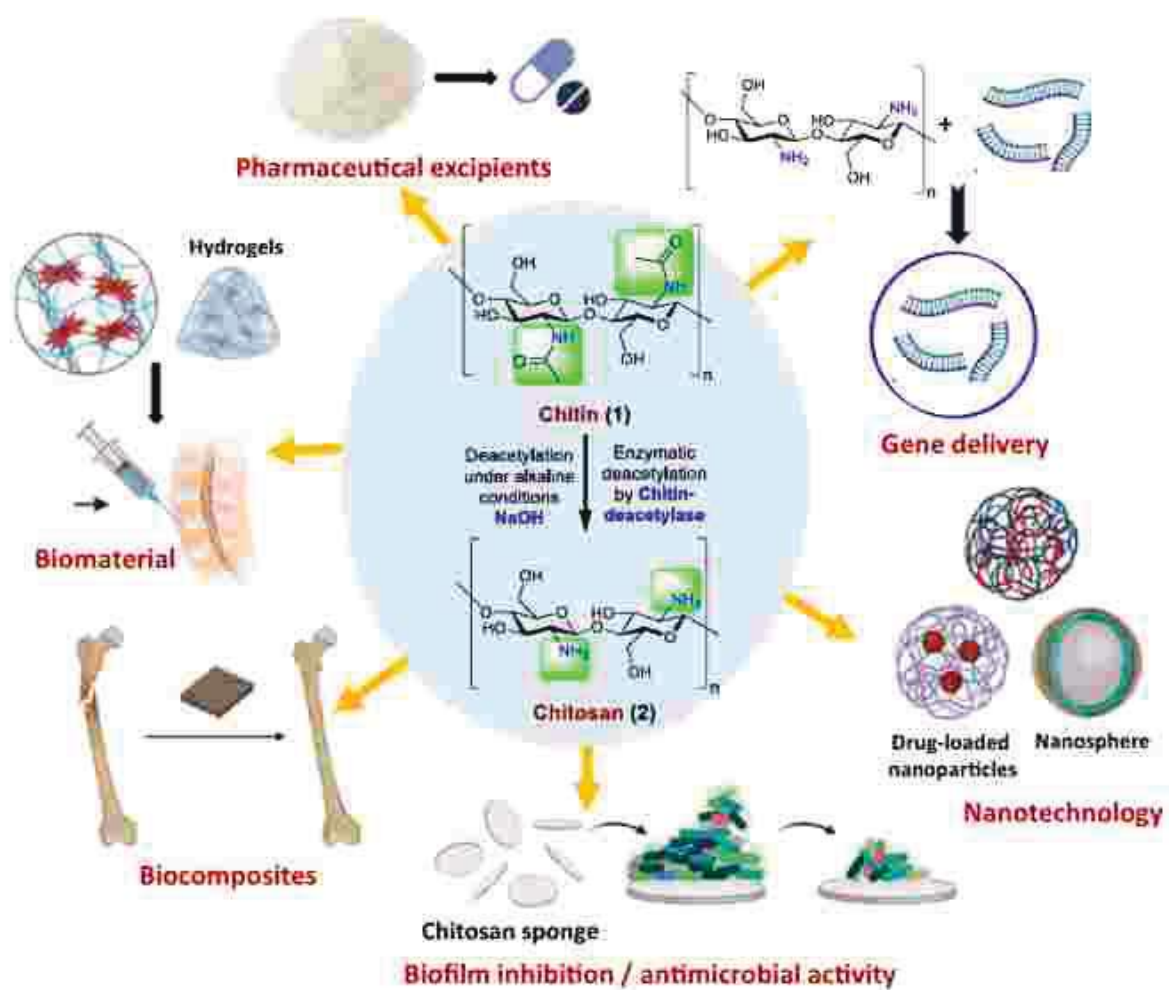


Figura 12. Schema rappresentativo delle applicazioni farmaceutiche del chitosano [33]

Le membrane biologiche come biomateriali

Le membrane biologiche e, più in generale, le matrici extracellulari (ECM) di origine animale occupano una posizione di rilievo tra i biomateriali per applicazioni chirurgiche e ricostruttive per due motivi principali: la loro intrinseca biocompatibilità e la loro affinità strutturale con i tessuti dell'ospite [41,42].

Derivando direttamente da tessuti animali, queste matrici presentano una composizione biochimica altamente compatibile con l'organismo e conservano l'architettura gerarchica della ECM, che gli consente di avere buona resistenza a trazione, elevata tenacità e comportamento viscoelastico simile a quello dei tessuti naturali, proprietà molto favorevoli per l'uso clinico. Inoltre, mantenendo una micro-struttura già ottimizzata dall'evoluzione per l'interazione con le cellule e avendo una chimica di superficie ricca di sequenze peptidiche bioattive, queste matrici favoriscono l'adesione e la proliferazione cellulare, mostrando quindi un'elevata capacità di integrazione con il tessuto ospite.

Tra le varie fonti animali, i tessuti di origine bovina (in particolare pericardio, derma e altri tessuti ricchi in collagene) rivestono un ruolo di primo piano grazie alla loro ampia disponibilità, buona riproducibilità delle proprietà e consolidata esperienza clinica.

Tali materiali sono ampiamente utilizzati in applicazioni quali: patch chirurgiche, sostituti tissutali, supporti per la rigenerazione guidata, duraplastica e chirurgia cardiovascolare e ricostruttiva.

1. Struttura e caratteristiche generali della ECM di origine animale

La matrice extracellulare (ECM) è una rete tridimensionale complessa costituita da una base fibrosa portante (prevalentemente collagene di tipo I), una fase elastica (elastina) e una matrice amorfa idratata di proteoglicani e glicoproteine (come fibronectina e laminina), come mostrato in Figura 13.

Nel caso del pericardio bovino e di molte altre membrane biologiche utilizzate come biomateriali, il collagene rappresenta il principale componente strutturale, responsabile della resistenza meccanica, della flessibilità e della stabilità dimensionale del tessuto. L'organizzazione strutturale è tipicamente gerarchica, con fibre e fibrille di collagene orientate, e questa caratteristica conferisce ai tessuti una combinazione di resistenza meccanica, flessibilità e funzionalità che risulta estremamente difficile da replicare con materiali sintetici convenzionali [41,43].

Le porosità presenti tra le fibre invece sono responsabili del trasporto di nutrienti e metaboliti.

Per questa sua natura la ECM può essere interpretata come un composito naturale multiscale [41-43]. Dal punto di vista funzionale, la ECM non rappresenta soltanto un supporto strutturale, ma un vero e proprio microambiente biochimico e biomeccanico in grado di influenzare il comportamento cellulare, la migrazione, la proliferazione e la differenziazione [41,42].

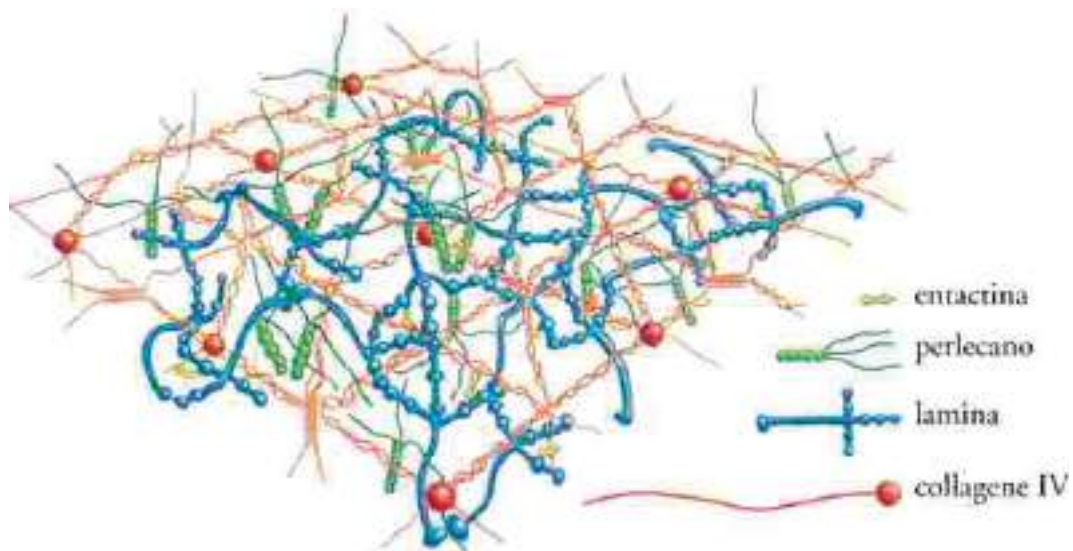


Figura 13. Rappresentazione della struttura della ECM

2. Il pericardio bovino come modello di membrana biologica

Il pericardio bovino (Figura 14) è un tessuto connettivo fibroso altamente specializzato, caratterizzato da una architettura gerarchica complessa che ne determina le peculiari proprietà meccaniche e funzionali come biomateriale strutturale [35,36,41,44,45].

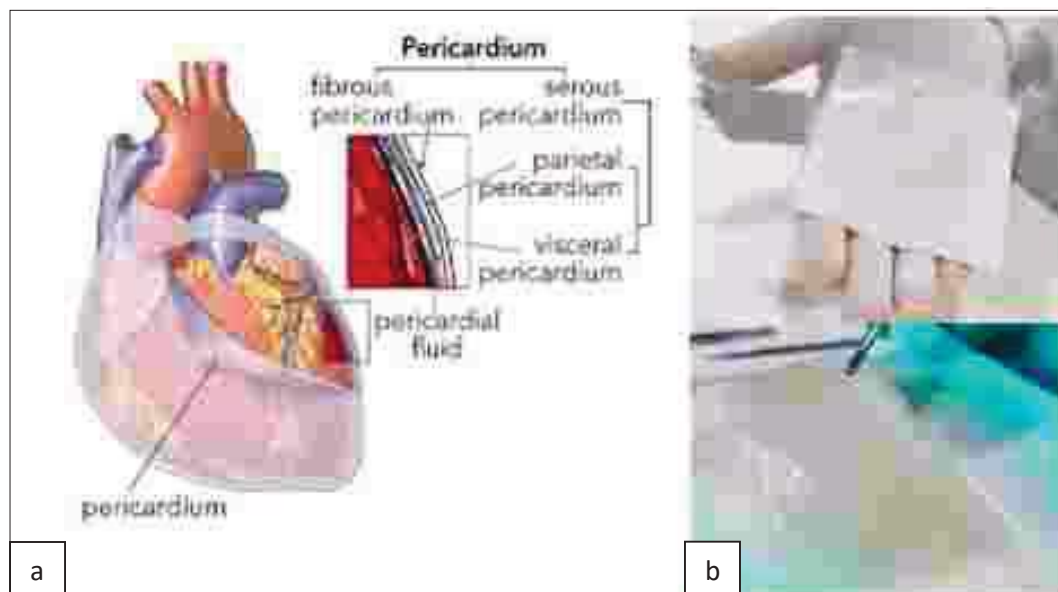


Figura 14. a) Collocazione del pericardio bovino in natura e b) foglietti di pericardio bovino opportunamente trattati per applicazioni biomedicali

2.1 Struttura e comportamento meccanico del pericardio bovino

Dal punto di vista compositivo, esso è costituito prevalentemente da collagene di tipo I, con contributi minori di collagene di tipo III ed elastina, immersi in una matrice amorfa ricca di proteoglicani e glicoproteine [35,44,45]. Su scala microscopica (Figura 15), il tessuto presenta una rete di fasci di fibre collageniche organizzati in modo intrecciato e parzialmente orientato, con una marcata anisotropia strutturale che riflette la direzione preferenziale delle sollecitazioni fisiologiche [36,44,45]. Questa organizzazione multilivello può essere descritta come un composito naturale, nel

quale le fibre di collagene svolgono il ruolo di fase portante, mentre la matrice interstiziale contribuisce alla dissipazione dell'energia e alla distribuzione delle tensioni [41,43,44].

A livello submicrometrico, le fibrille di collagene sono organizzate in fasci ondulati (“crimped”), la cui progressiva distensione sotto carico è responsabile della tipica risposta meccanica non lineare del tessuto, caratterizzata da una fase iniziale a bassa rigidità seguita da un rapido incremento del modulo elastico [44,45]. La presenza di una porosità intrinseca, distribuita in modo eterogeneo tra i fasci fibrosi, contribuisce inoltre alla capacità del pericardio di deformarsi, reidratarsi e adattarsi a variazioni di carico senza subire danni strutturali immediati [36,45]. Questa architettura consente al tessuto di dissipare energia e di adattarsi a sollecitazioni complesse, rendendolo particolarmente adatto a contesti fisiologici caratterizzati da carichi ciclici e deformazioni ripetute.

Questa complessa organizzazione gerarchica, che si estende dalla scala molecolare del collagene fino alla scala macroscopica del tessuto, è alla base della combinazione di elevata resistenza a trazione, flessibilità e compatibilità meccanica con i tessuti molli circostanti che rende il pericardio bovino un substrato particolarmente adatto per applicazioni biomedicali avanzate [35,36,44,45].

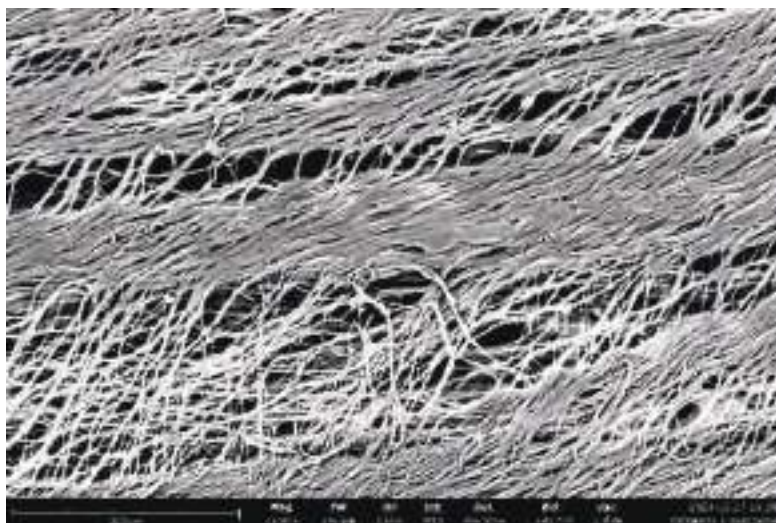


Figura 15. Immagine SEM di pericardio bovino

2.2 Utilizzo del pericardio bovino come biomateriale

Tra le varie membrane biologiche utilizzate in ambito clinico e bioingegneristico, il pericardio bovino rappresenta uno dei materiali più studiati e più ampiamente impiegati come patch chirurgico, supporto per protesi valvolari e membrana di rinforzo tissutale [35,36,44,45]. Il suo successo applicativo è legato a una combinazione di disponibilità, proprietà meccaniche e buona tollerabilità biologica.

In particolar modo per quanto concerne le proprietà meccaniche, la combinazione di elevata resistenza a trazione, flessibilità e compatibilità meccanica con i tessuti molli circostanti rende il pericardio bovino un eccellente candidato per applicazioni in cui il biomateriale deve integrarsi in un ambiente dinamico senza introdurre discontinuità meccaniche significative [35,36,44,45]. Numerosi studi sperimentali hanno evidenziato come le proprietà meccaniche del pericardio dipendano, oltre che dalla sua struttura intrinseca, anche dallo stato di idratazione del tessuto [36,44,45] e da eventuali trattamenti di conservazione e preparazione, come la liofilizzazione o altri processi fisici, che possono modificare in modo non trascurabile la microstruttura e, di conseguenza, il comportamento meccanico del materiale [46,47].

Perciò, nell'utilizzo del pericardio bovino come biomateriale, è fondamentale utilizzare trattamenti di conservazione, stabilizzazione e varia funzionalizzazione che preservino il più possibile la sua complessa organizzazione strutturale e di riflesso le sue proprietà meccaniche. In questo senso, il pericardio può essere visto non semplicemente come un “materiale di partenza”, ma come un substrato già altamente ottimizzato dalla natura, che può essere ulteriormente migliorato e funzionalizzato mediante interventi mirati sulla superficie e sull'interfaccia con l'ambiente biologico [35,36,44,45] come una base strutturale su cui costruire un materiale composito più complesso, nel quale le funzioni di interfaccia e terapeutiche verranno introdotte attraverso strati funzionali aggiuntivi. Questo approccio consente di sfruttare al massimo le qualità intrinseche del tessuto naturale, integrandole in una progettazione razionale di biomateriale avanzato.

3. Trattamenti di stabilizzazione delle membrane biologiche

Come tutti i tessuti biologici, le membrane presentano una stabilità limitata in ambiente fisiologico, dovuta a diversi fenomeni [35,41,42,45,48]:

1. Essendo suscettibili a degradazione enzimatica e a una serie di stress meccanici ciclici e all'ambiente umido come quello biologico, possono presentare una progressiva perdita di integrità strutturale e meccanica nel tempo, con deformazione e deterioramento della matrice collagenica
2. Possono essere soggette a infezione e colonizzazione batterica, soprattutto in contesti chirurgici complessi o in presenza di dispositivi impiantabili.
3. Possono andare incontro a calcificazione nel caso di dispositivi impiantabili a lungo termine e trattati con glutaraldeide
4. Possono subire un'integrazione incompleta o fibrosi, che può compromettere la funzionalità del tessuto riparato.

Per questi motivi è necessario stabilizzare le membrane biologiche (e anche il pericardio bovino) come biomateriali strutturali a medio e lungo termine (a seconda di un utilizzo come dispositivo riassorbibile o meno), è quindi necessario ricorrere a strategie di stabilizzazione opportune che mirino principalmente a ridurre la suscettibilità del collagene alla degradazione e a preservare le proprietà meccaniche del tessuto [11,45,48].

3.1 Reticolazione delle membrane biologiche

In questo contesto, la reticolazione (crosslinking) del collagene rappresenta l'approccio più diffuso e consolidato. La reticolazione del collagene si basa sull'introduzione di legami chimici addizionali tra le catene proteiche, con l'obiettivo di aumentare la stabilità strutturale, ridurre la solubilità e rallentare i processi di degradazione enzimatica [11,48]. Storicamente, la glutaraldeide è stata l'agente di crosslinking più utilizzato per il trattamento del pericardio e di altri tessuti biologici destinati a impieghi biomedicali [48].

Il trattamento con glutaraldeide è altamente efficace nel migliorare la resistenza meccanica e la stabilità del tessuto; tuttavia, il suo utilizzo è associato a ben noti effetti collaterali, tra cui citotossicità residua, rigidificazione progressiva del materiale e una marcata tendenza alla calcificazione in vivo [11,48]. Queste limitazioni hanno stimolato una vasta attività di ricerca volta allo sviluppo di strategie alternative o complementari.

Tra gli agenti di crosslinking alternativi, la genipina e i sistemi basati su carbodiimmidi (come EDC) e genipina hanno ricevuto particolare attenzione grazie alla loro minore citotossicità rispetto alla

glutaraldeide [11,48]. Questi approcci consentono di ottenere un buon livello di stabilizzazione del tessuto mantenendo al contempo una maggiore compatibilità biologica e, in alcuni casi, proprietà meccaniche più vicine a quelle del tessuto nativo. Tuttavia, anche questi metodi presentano compromessi tra grado di stabilizzazione, rigidità del materiale e stabilità a lungo termine, rendendo evidente come la scelta della strategia di crosslinking debba essere attentamente bilanciata in funzione dell'applicazione specifica [11,48].

3.2 Decellularizzazione delle membrane biologiche

La decellularizzazione è un trattamento che mira a rimuovere le componenti cellulari mantenendo il più possibile intatta l'architettura della matrice extracellulare [41-43]. Questo processo è essenziale per ridurre l'immunogenicità del tessuto e migliorare la sua integrazione con l'organismo ospite [41,42]. Il risultato della decellularizzazione è una scaffold biologico acellulare che mantiene la microstruttura e la composizione dell'ECM, ma è più sicuro dal punto di vista immunologico.

I processi di decellularizzazione possono però presentare dei limiti quali l'alterazione parziale delle proprietà meccaniche e la modifica della chimica di superficie, che può influenzare in modo indesiderato la risposta biologica.

Per questo motivo un protocollo di decellularizzazione ben progettato deve trovare un delicato equilibrio tra efficacia nella rimozione delle cellule e preservazione della microstruttura della ECM, poiché un trattamento eccessivamente aggressivo può compromettere in modo significativo le proprietà funzionali del tessuto [41-43].

3.3 Trattamenti fisici

Per facilitare la conservazione delle membrane biologiche, accanto ai trattamenti chimici, vengono spesso impiegati anche trattamenti fisici come la liofilizzazione (freeze-drying) [46,47]. Questo trattamento prevede una fase di congelamento seguita da sublimazione e consente di ottenere materiali facilmente stoccabili e reidratibili, ma può anche introdurre modifiche nella microstruttura della membrana, nella sua orosità e nel comportamento meccanico del tessuto [46,47].

Diversi studi hanno mostrato che il ciclo di congelamento e sublimazione può portare a una riorganizzazione delle fibre collageniche e a variazioni nella rigidità e nella resistenza a trazione del pericardio [46,47]. Per questo motivo, l'uso di tali trattamenti deve essere attentamente valutato nel contesto dell'applicazione finale e integrato in una strategia complessiva di preparazione del biomateriale.

Altro trattamento fisico per stabilizzare le membrane è poi costituito dall'irradiazione con raggi gamma (gammatura) per un determinato periodo e con una determinata intensità, in modo da sterilizzare il tessuto senza comprometterne l'integrità.

3.4 Funzionalizzazione

La modifica e funzionalizzazione delle superfici delle membrane biologiche costituisce un altro sistema vantaggioso per migliorarne le prestazioni in vivo. Tra le strategie di funzionalizzazione figurano: rivestimenti polimerici bioattivi, immobilizzazione di molecole antibatteriche o antinfiammatorie, modificazione chimica della superficie e integrazione con fasi inorganiche funzionali. L'obiettivo comune di questi approcci è trasformare una membrana biologica "passiva" in un biomateriale attivo e multifunzionale.

3.5 Interazione tra trattamenti e proprietà finali del materiale

È importante sottolineare che i diversi trattamenti — decellularizzazione, crosslinking, liofilizzazione, gammatrice, funzionalizzazione — non agiscono in modo indipendente, ma interagiscono tra loro nel determinare le proprietà finali del materiale [11,41-43,48]. La sequenza dei trattamenti, le condizioni operative e i parametri di processo possono influenzare in modo significativo sia la microstruttura sia il comportamento meccanico e biologico del pericardio trattato. Da un punto di vista ingegneristico, questo implica che la preparazione di una membrana biologica destinata a essere ulteriormente funzionalizzata deve essere considerata come un processo integrato, nel quale ogni passaggio contribuisce alla definizione delle prestazioni finali del sistema [42,43,48].

La scelta e l'ottimizzazione di tali trattamenti costituiscono perciò un passaggio chiave per garantire la riuscita del sistema composito finale, nel quale il substrato biologico deve mantenere le proprie proprietà meccaniche pur fungendo da supporto per ulteriori livelli funzionali.

4. Ingegnerizzazione delle membrane biologiche

È ormai ampiamente riconosciuto che, nei biomateriali, è la superficie, e non il bulk, la vera interfaccia biologica, cioè la parte che determina in larga misura l'interazione con l'ambiente biologico, governando fenomeni quali l'adsorbimento proteico, l'adesione cellulare, l'attivazione della risposta infiammatoria e la colonizzazione batterica [6,49,50]. Di conseguenza, materiali con proprietà volumetriche simili possono mostrare comportamenti biologici profondamente diversi se differiscono anche solo per poche caratteristiche della struttura superficiale [106,152,153]. Questo concetto è particolarmente rilevante nel caso delle membrane biologiche, nelle quali il substrato di partenza è già intrinsecamente biocompatibile, ma non necessariamente ottimizzato per resistere a processi di colonizzazione microbica o per svolgere funzioni terapeutiche attive [35,36,49].

L'ingegnerizzazione delle superfici può essere definita come l'insieme delle strategie volte a modificare in modo controllato le proprietà chimiche, fisiche e biologiche dello strato più esterno di un materiale senza alterarne in modo significativo le caratteristiche meccaniche globali [6,41-51,49]. Questo approccio consente di disaccoppiare, almeno in parte, le funzioni strutturali da quelle biologiche e funzionali, permettendo una progettazione modulare del biomateriale [4,49,51]. Nel contesto dei biomateriali avanzati, l'obiettivo dell'ingegnerizzazione non è semplicemente quello di ottenere materiali inerti e tollerati, ma di progettare superfici attive, capaci di interagire in modo selettivo con l'ambiente biologico e di svolgere funzioni specifiche [6,50,51].

Le principali strategie di modifica superficiale delle membrane biologiche devono necessariamente rispettare alcuni prerequisiti: non danneggiare la microstruttura della membrana e non alterare in modo irreversibile le proprietà meccaniche del tessuto [35,36,51]. Questi metodi includono approcci fisici, chimici e l'applicazione di rivestimenti (*coating*) polimerici o compositi [6,49,51].

4.1 Coating polimerici

Il coating polimerico rappresenta probabilmente una delle soluzioni più efficaci ed eleganti per introdurre nuove funzionalità senza compromettere le qualità intrinseche del substrato biologico [6,34,50,51]. I coating polimerici infatti possono adattarsi a un substrato viscoelastico e spesso permanentemente idratato [34-36], producendo rivestimenti conformi che seguono la topografia e le deformazioni del tessuto, realizzando un'interfaccia continua e meccanicamente compatibile [34]. Poiché, a differenza dei substrati rigidi, i tessuti biologici sono deformabili e viscoelastici,

l'interfaccia tra coating e substrato non può quindi essere concepita come una giunzione rigida, ma come una interfaccia graduale e meccanicamente compatibile, in grado di distribuire le tensioni e di adattarsi alle deformazioni senza generare concentrazioni locali di stress [34,35].

L'uso di polimeri morbidi e idratibili, come il chitosano, consente di realizzare questo tipo di interfaccia, nella quale lo strato funzionale non si comporta come un rivestimento estraneo, ma come una prosecuzione funzionale della superficie del tessuto [16,19,34].

I coating polimerici consentono quindi di modificare profondamente la chimica superficiale e le interazioni biologiche di un substrato mantenendo sostanzialmente inalterato il comportamento meccanico del materiale sottostante [6,34,50,51].

Un coating destinato a una membrana biologica deve inoltre soddisfare una serie di requisiti stringenti [34-36]: deve aderire stabilmente in ambiente acquoso, deve essere sufficientemente flessibile da seguire le deformazioni del substrato senza delaminare, non deve occludere eccessivamente la porosità naturale del tessuto, deve mantenere la propria integrità nel tempo e, dal punto di vista funzionale, dovrebbe introdurre proprietà aggiuntive, come attività antibatterica o capacità di rilascio di molecole terapeutiche, senza compromettere la biocompatibilità complessiva del sistema [6,50,51].

In questo contesto, il chitosano si inserisce perfettamente come materiale d'elezione per il coating di membrane biologiche, grazie alle sue proprietà che rispecchiano esattamente i requisiti sopra citati, e come descritto in dettaglio al paragrafo 2.3.5.

Nello specifico, l'interazione tra chitosano e collagene delle ECM è favorita dalla complementarità di carica (chitosano cationico vs collagene parzialmente anionico), dall'abbondanza di gruppi funzionali capaci di formare legami a idrogeno e dalla possibile inter-penetrazione superficiale delle catene polimeriche del chitosano nella membrana. Queste interazioni consentono di avere la formazione di rivestimenti stabili e conformi senza necessità di trattamenti chimici aggressivi e preservando la microstruttura del tessuto biologico.

5. Progettazione modulare dei biomateriali

Le membrane biologiche, e in particolare il pericardio bovino, non sono semplici supporti passivi, ma elementi strutturali centrali di un sistema composito ingegnerizzato, la cui superficie viene razionalmente modificata per introdurre nuove funzioni senza comprometterne le proprietà meccaniche di base [6,34-36,50,51]. Esse rappresentano un substrato ideale per la costruzione di biomateriali funzionali, ma necessitano di una funzionalizzazione intelligente per superarne i limiti intrinseci.

L'ingegnerizzazione è quell'insieme di processi che consentono di trasformare una membrana biologica strutturale in una piattaforma multifunzionale, capace di svolgere ruoli attivi quali la prevenzione delle infezioni, il rilascio locale di farmaci o la modulazione della risposta cellulare [6,34,50,51]. Questo approccio si inserisce nel più ampio concetto di progettazione modulare dei biomateriali, nel quale ogni livello del sistema è responsabile di una funzione specifica e può essere ottimizzato in modo relativamente indipendente [34,51].

Nel contesto della presente tesi, il pericardio bovino costituisce il modulo strutturale, il coating polimerico a base di chitosano rappresenta il modulo di interfaccia e funzionalizzazione, mentre il modulo funzionale vero e proprio è costituito dai solidi lamellari.

I solidi lamellari

I solidi lamellari costituiscono una vasta classe di materiali caratterizzati da una struttura cristallina anisotropa, nella quale unità bidimensionali si impilano lungo una direzione preferenziale mantenendo una coesione garantita da interazioni relativamente deboli. Questa architettura conferisce proprietà peculiari quali elevata anisotropia, tendenza all'intercalazione di specie ioniche o molecolari e notevole flessibilità chimica nella progettazione delle funzionalità [52].

All'interno di questa famiglia, i Layered Double Hydroxides (LDH) e i fosfati di zirconio occupano una posizione di particolare rilievo per la combinazione di una struttura inorganica ordinata e di una chimica interlamellare modulabile, che li rende materiali "programmabili" a livello nanometrico [52].

1. Generalità dei solidi lamellari

Un solido lamellare [52] è un solido nel quale si verifica la condizione per cui i legami tra gli atomi dello stesso piano sono molto più forti delle interazioni tra gli atomi appartenenti a piani adiacenti, rendendo perciò possibile una struttura detta "a strati". In genere, nello stesso piano si osservano legami covalenti tra gli atomi, mentre tra atomi di piani adiacenti si verificano interazioni di Van der Waals. Un singolo strato può essere perciò visto come una macromolecola planare, mentre il solido può essere considerato come un cristallo molecolare formato dall'impacchettamento di tali macromolecole bidimensionali. Appartengono alla categoria dei solidi lamellari grafite, argille, fosfati di metalli tetravalenti.

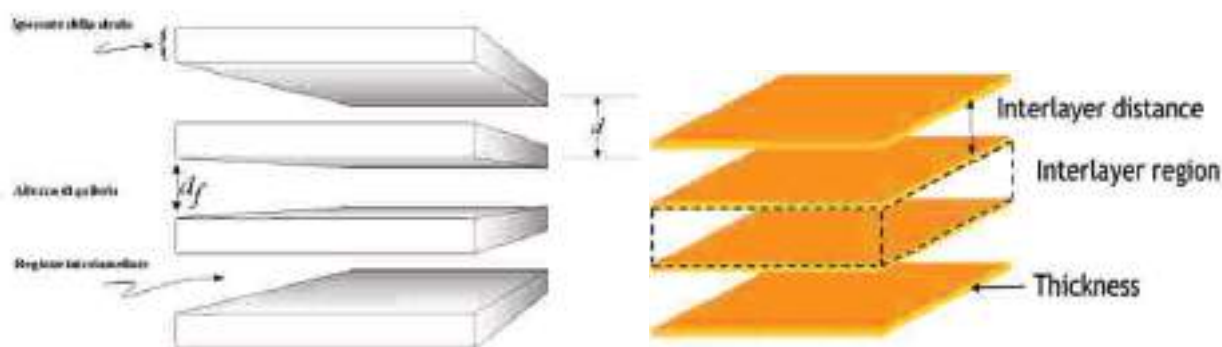


Figura 16. Illustrazione schematica dei parametri strutturali di un solido lamellare [89]

Una rappresentazione schematica di un solido lamellare è riportata in Figura 16.

Si definiscono: d , *distanza interlamellare* o *distanza interstrato*, la distanza tra i baricentri di due lamelle adiacenti; d_f , *altezza di galleria*, la distanza libera tra strati adiacenti, definita come la differenza tra la distanza interlamellare e lo spessore della lamella; *regione interlamellare*, lo spazio libero tra due lamelle adiacenti; S_t , *area specifica superficiale* di una lamella, cioè l'area superficiale di un grammo di solido, considerato come un'unica macrolamella.

1.1 Classificazione dei solidi lamellari

Ci sono molti modi in cui i solidi lamellari possono essere classificati [52].

Una prima classificazione è quella basata sulla natura della lamella, che può essere interamente organica, interamente inorganica oppure mista.

Un'altra classificazione può essere fatta in base alla presenza o meno di cariche fisse sulla superficie della lamella, quindi i solidi possono essere suddivisi in due grandi categorie: solidi lamellari carichi

e solidi lamellari non carichi. I solidi con lamelle neutre possono essere ulteriormente classificati in base alla loro conducibilità in isolanti e conduttori. Un esempio di solidi lamellari non carichi è la grafite. I solidi lamellari carichi possono essere a loro volta distinti in due classi, a seconda della natura della carica fissa della lamella: se positiva, sono detti “a scambio anionico”, come le idrotalciti; se negativi sono invece detti “a scambio cationico”, come i fosfati e fosfonati di zirconio, le argille e i silicati lamellari. Per i solidi lamellari che presentano cariche fisse si definisce il parametro *densità di carica dello strato* come il numero di cariche elementari per cm^2 , espresso in $\mu\text{C}/\text{cm}^2$.

Un’ultima classificazione è infine effettuata in base allo spessore delle lamelle: se costituite da un monostrato atomico (ad esempio la grafite), da uno spessore di pochi atomi (ad esempio dicalcogenuri), oppure da uno strato di molti atomi (ad esempio argille e fosfati di metalli tetravalenti). Lo spessore delle lamelle è direttamente correlato alla rigidità degli strati costituenti, che è una delle caratteristiche più importanti nei solidi lamellari.

1.2 Intercalazione

I solidi lamellari sono di notevole interesse applicativo in quanto sono in grado di dare luogo al processo di *intercalazione* [52], cioè di inserzione reversibile di una specie ospite (detta *guest*) nella regione interstrato di un composto lamellare ospitante (detto *host*), mantenendo in genere inalterata la struttura degli strati (vedi Figure 17 e 18). Il processo inverso, per il quale la specie *guest* si disinscrive dalla regione interstrato è detta *deintercalazione*.

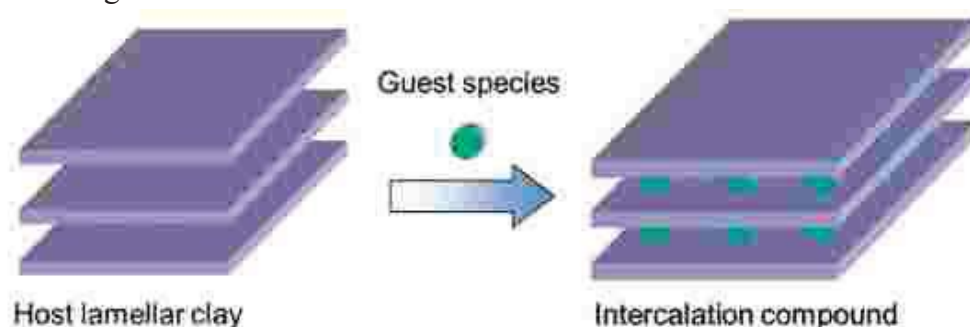


Figura 17. Schema di un processo di intercalazione in un solido lamellare [96]



Figura 18. Schema di un processo di intercalazione in un idrotalcite [88]

L’intercalazione ha una duplice valenza: da una parte, il *guest*, se intercalato, può subire la modifica delle sue proprietà chimiche, catalitiche, elettroniche e ottiche rispetto a se non intercalato; dall’altra parte, l’*host*, al variare del *guest*, può essere modificato nelle sue proprietà macroscopiche. La possibilità di intercalazione di un *guest* in un *host* lamellare dipende da vari fattori:

- interazioni chimiche *host-guest* (che rappresentano la driving force del processo),
- interazioni topologiche dovute alle caratteristiche strutturali degli strati (ad esempio la loro rigidità),
- ingombro sterico del *guest*
- capacità di riorganizzarsi strutturalmente se intercalato, da parte del *guest*.

Nel caso di solidi lamellari carichi, questi possono intercalare specie ioniche, tramite un processo di *scambio ionico*, o specie neutre polari attraverso interazioni dipolo-dipolo, legami a idrogeno, formazione di complessi a trasferimento di carica. Nel caso di solidi lamellari non carichi, l'intercalazione può avvenire per reazione di *sostituzione*.

Altre metodologie di intercalazione sono poi le reazioni di *grafting* (in cui la molecola ospite reagisce con un gruppo funzionale ancorato sulla superficie della lamella formando legami covalenti), lo *scambio topotattico* e la formazione di *composti di coordinazione* [53].

Un importante fenomeno che si osserva quando il processo di intercalazione viene spinto fino al limite estremo è l'*esfoliazione* del cristallo. Alcuni solidi lamellari, come i fosfati e fosfonati di zirconio, se intercalati con propilammina e metilammina, possono dare la formazione di dispersioni colloidali di singole lamelle o di pacchetti di poche lamelle, quando si raggiunge il 50% o il 100% di intercalazione [54]. Ciò può essere spiegato con il fatto che l'intercalazione comporta un allontanamento delle lamelle e quindi una diminuzione delle interazioni deboli esistenti tra lamelle adiacenti, inoltre si instaurano interazioni idrofobiche deboli tra le catene alchiliche di ammine legate a strati adiacenti. Se le molecole d'acqua sono in grado di diffondere nella regione interstrato e solvatare i gruppi carichi e quelli neutri e se l'energia di solvatazione riesce a vincere le interazioni esistenti tra gli strati, allora gli strati stessi si allontaneranno infinitamente formando una dispersione colloidale. Queste dispersioni colloidali possono essere utilizzate per ottenere membrane con elevata conducibilità protonica, o per ottenere sensori a stato solido per alcuni gas, oppure per coprire materiali vari con sottili pellicole [55,56].

2. Idrotalciti

Ci si riferisce comunemente con il termine "idrotalciti" ad un tipo di solidi lamellari con carica positiva di lamella. Questo gruppo di solidi deve il suo nome al suo precursore, l'idrotalcite naturale, un idrossicarbonato di Mg e Al [57]. Le idrotalciti sono dette anche *argille anioniche* [58], per distinguerle da quelle cationiche; a differenza di queste ultime sono poco diffuse in natura e sono in più larga parte di sintesi, perciò sono anche chiamate composti lamellari del tipo idrotalcite (*hydrotalcite-like compounds* - HTlc) e *idrossidi doppi lamellari* (*layered double hydroxides* - LDH) [59,60].

2.1 Struttura delle idrotalciti

Le idrotalciti possono essere considerati derivati strutturali della *brucite*, minerale lamellare neutro di formula $Mg(OH)_2$, nella quale ogni catione Mg^{2+} coordina sei ioni OH^- , identificando così degli ottaedri che condividono gli spigoli per formare infiniti piani elettricamente neutri, come mostrato in Figura 19°_b. Questi piani sono impaccati gli uni con gli altri e sono tenuti insieme da forze di Van der Waals (Figura 19c,e) [61-64]. La sostituzione isomorfa e casuale di una frazione dei cationi bivalenti (Mg^{2+}) con cationi trivalenti (M^{3+}) genera una carica positiva netta sugli strati, che viene compensata dalla presenza di anioni presenti nella regione interstrato, dove è presente anche l'acqua di cristallizzazione.

Le lamelle rimangono distanti le une dalle altre a causa della repulsione delle cariche positive, ma, grazie alle interazioni ioniche tra lamelle cariche positivamente e specie anioniche delle regioni interstrato, le lamelle non segregano del tutto, dando origine a una struttura tridimensionale a strati (Figura 19d) [61-64].

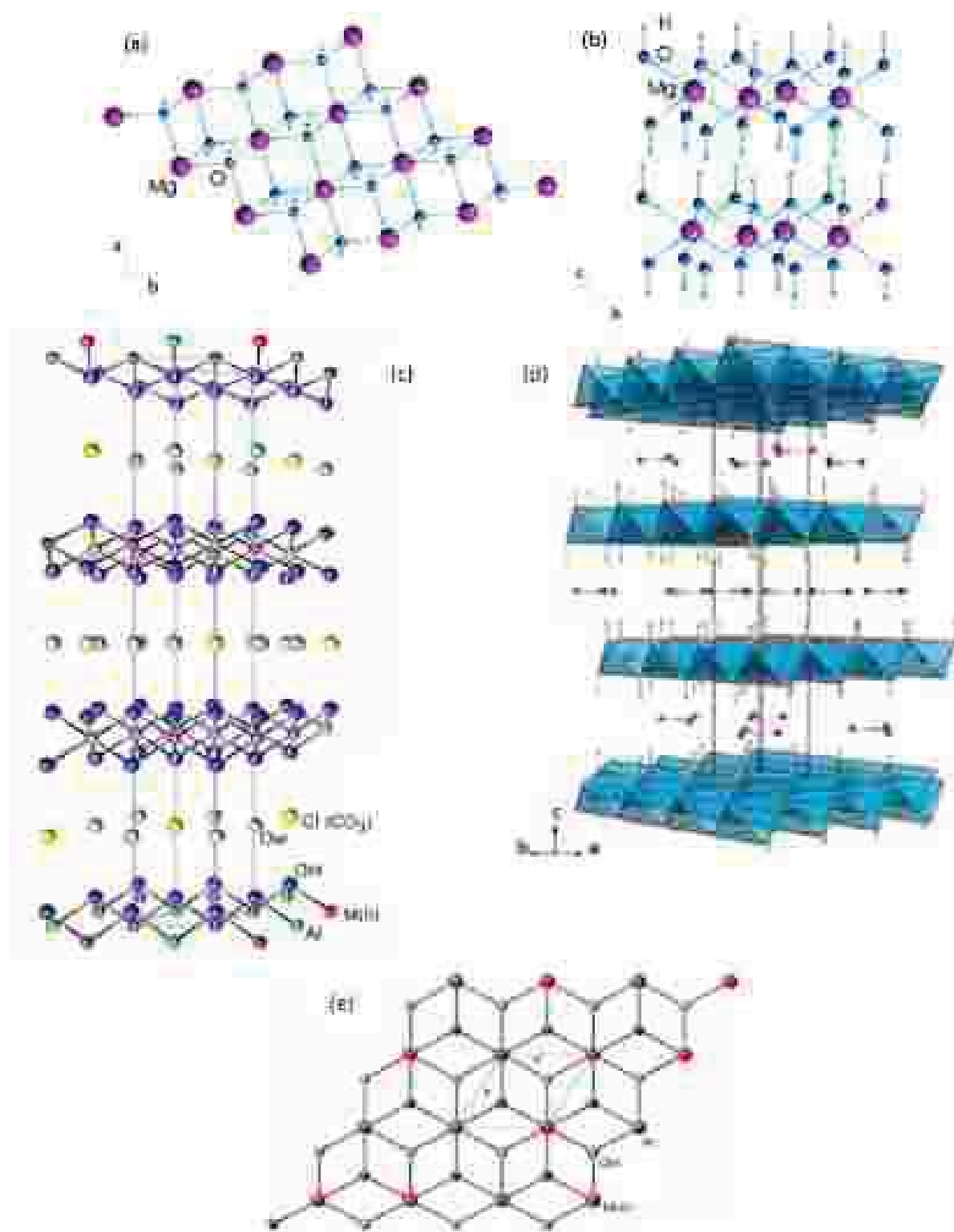


Figura 19. a) Visione di una lamella idrotalcitica lungo gli assi cristallografici ab e (b) visione lungo gli assi cristallografici bc; rappresentazione della struttura a strati di un composto idrotalcite-simile d) lungo gli assi bc e e) lungo gli assi ab e d) struttura di un'idrotalcite MgAl con anioni CO₃²⁻ nelle regioni interstrato [88]

I composti sintetici di tipo idrotalcite presentano la seguente formula generale [65-67]:



La formula racchiusa tra le parentesi quadre indica la composizione delle lamelle, mentre la restante parte quella della regione interstrato. M(II) e M (III) sono cationi metallici, A è un anione interlamellare, X è la frazione molare. Nei composti naturali il valore della frazione molare, X, è

generalmente 0.25 e l'anione più comune è il carbonato. In quelli di sintesi X è generalmente compresa tra 0.25 e 0.33.

Per valori di X minori di 0.33 gli ottaedri dell'alluminio sono sufficientemente lontani. Per valori di X molto più alti aumenta il numero di ottaedri di $\text{Al}(\text{OH})_6$ e la struttura tende a segregare la specie $\text{Al}(\text{OH})_3$; similmente, per valori di X minori di 0.2 l'alta densità del magnesio porta alla formazione del $\text{Mg}(\text{OH})_2$ [68].

La formula generale evidenzia la straordinaria flessibilità composizionale di questi materiali, nei quali è possibile variare sia la natura dei cationi metallici M(II) e M(III) costituenti gli strati, sia la loro quantità relativa, cioè la frazione molare X dei cationi, sia la natura degli anioni intercalati, sia la quantità di acqua di idratazione, modulando così struttura, stabilità, distanza basale, grandezza e morfologia dei cristalli e proprietà funzionali [61-64].

Lo spazio interlamellare delle idrotalciti non rappresenta quindi un semplice volume vuoto, ma una vera e propria nanocamera chimica nella quale specie ioniche e molecolari possono essere ospitate, organizzate e scambiate in modo reversibile.

2.2 Elementi caratterizzanti le idrotalciti

I cationi metallici tipici che danno struttura brucitica, e quindi per mezzo dei quali è possibile sintetizzare idrotalciti in laboratorio, sono quelli che danno coordinazione ottaedrica, e questa capacità dipende fondamentalmente dal loro raggio ionico. Tali cationi metallici sono per lo più i metalli bivalenti Mg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} e i metalli trivalenti come Al^{3+} , Ga^{3+} , Ni^{3+} , Co^{3+} , Fe^{3+} , Mn^{3+} , Cr^{3+} , come mostrato in Tabella 1.

Tabella 1. Raggio ionico di alcuni cationi bivalenti e trivalenti espresso in Å

M(II)	Be	Mg	Cu	Ni	Co	Zn	Fe	Mn	Cd	Ca
	0.30	0.65	0.69	0.72	0.74	0.74	0.76	0.80	0.97	0.98
M(III)	Al	Ga	Ni	Co	Fe	Mn	Cr	V	Ti	In
	0.50	0.62	0.62	0.63	0.64	0.66	0.69	0.74	0.76	0.81

2.3 La natura dell'anione e acqua di idratazione

Nelle idrotalciti sintetiche la carica positiva delle lamelle è bilanciata generalmente dalle seguenti specie:

- 1) anioni inorganici: F^- , Cl^- , Br^- , I^- , $(\text{ClO}_4)^-$, $(\text{NO}_3)^-$, $(\text{ClO}_3)^-$, $(\text{IO}_3)^-$, $(\text{OH})^-$, $(\text{CO}_3)^{2-}$, $(\text{SO}_4)^{2-}$, $(\text{S}_2\text{O}_3)^{2-}$, $(\text{WO}_4)^{2-}$, $(\text{CrO}_4)^{2-}$, $[\text{SiO}(\text{OH})_3]^-$;
- 2) isopolianioni ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$, $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$, ecc.) ed eteropolianioni ($\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$, $\text{PW}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ ecc.);
- 3) complessi anionici ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, ecc.) e complessi organometallici,
- 4) anioni di acidi organici con funzionalità carbossilica, solfonica, fosforica, ecc.

Il numero, la grandezza, l'orientazione e la forza dei legami tra l'anione e il gruppo idrossido determinano la distanza interstrato. Le molecole di acqua sono localizzate in quei siti non occupati dagli anioni e la quantità di acqua presente viene usualmente determinata attraverso misure termogravimetriche di perdita in peso [61-64].

2.4 Metodi di sintesi

Esistono vari metodi di sintesi delle idrotalciti, di seguito illustrati [69-71].

- 1) *Coprecipitazione* di due metalli tramite il raggiungimento di condizioni di supersaturazione; o tramite evaporazione (metodo fisico) o più comunemente tramite variazione del pH (metodo

chimico). In questo secondo caso, il pH di precipitazione deve essere maggiore o uguale di quello al quale precipita l'idrossido più solubile.

- 2) *Sintesi idrotermale e invecchiamento*. Consiste nel trattare miscele di idrossidi precipitati o miscele meccaniche di ossidi con acqua (possibilmente in presenza di altri anioni) in modo da ottenere la formazione delle argille anioniche e la trasformazione dei precipitati amorfi in cristallini. Sono usate due condizioni di trattamento idrotermale: a $T < 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, per il quale si parla di invecchiamento; e a $T > 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ sotto pressione in autoclave. I tempi di reazione sono molto lunghi.
- 3) *Soft Chemistry*. Con questo nome vengono indicate tutte quelle sintesi inorganiche condotte in condizioni blande cioè utilizzando una bassa temperatura e semplici reazioni, per esempio metodi elettrochimici.
- 4) *Metodo dell'urea*. Consiste nella precipitazione di solidi lamellari da una soluzione omogenea di sali dei metalli M(II) e M(III), sfruttando come agente precipitante l'urea, una base debole molto solubile in acqua, la cui velocità di idrolisi può essere facilmente controllata regolando la temperatura di reazione. Il meccanismo di idrolisi si sviluppa passando attraverso un primo stadio lento che porta alla formazione di cianato di ammonio: $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \rightarrow \text{NH}_4\text{CNO}$, seguito dalla veloce idrolisi dell'ammonio cianato a carbonato di ammonio $\text{NH}_4\text{CNO} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Gli equilibri acido-base dello ione ammonio ad ammoniaca e dello ione carbonato a idrogeno carbonato producono un pH di circa 9 nella soluzione, condizione adatta per la precipitazione di un gran numero di idrossidi di metalli. Regolando le condizioni di sintesi (temperatura, concentrazione dei sali, tempo, rapporto molare urea/M(III)) è possibile ottenere idrotalciti di diversa cristallinità, dimensione e morfologia.

Sulla base delle considerazioni strutturali si può affermare che il metodo dell'urea sia quello migliore per preparare le idrotalciti, in quanto porta alla formazione di solidi con un buon grado di cristallinità, particelle di dimensioni dell'ordine del micron e con una stretta distribuzione delle dimensioni e un elevato rapporto superficie-volume.

2.5 Effetto memoria

Un aspetto particolarmente interessante dal punto di vista applicativo è il cosiddetto “memory effect”, per cui, dopo decomposizione termica via calcinazione con formazione di ossidi misti, l'idrotalcite è in grado di ricostruire spontaneamente la struttura lamellare originaria in presenza di acqua e anioni appropriati [61-64].

Dopo la decomposizione termica viene mantenuta infatti la microstruttura lamellare del solido, permettendo la ricostituzione della struttura idrotalcitica. In soluzione acquosa e sotto forte agitazione, si ha un notevole rigonfiamento dei microcristalli. L'aggiunta di un acido provoca la ricomposizione delle lamelle a seguito della reazione di neutralizzazione tra gli acidi e gli ossidrilici dell'idrotalcite [71].

Questo metodo è utilizzato per intercalare anioni senza passare per lo scambio ionico. Questa proprietà è fortemente dipendente dalla temperatura di calcinazione del LDH [70].

2.6 Caratteristiche macroscopiche

Dal punto di vista morfologico, le idrotalciti si presentano tipicamente sotto forma di piastrine sottili con spessore nanometrico e dimensioni laterali che possono variare da poche decine a diverse centinaia di nanometri, in funzione delle condizioni di sintesi e di trattamento (vedi Figura 20). Il

grado di cristallinità, la dimensione delle particelle e la presenza di difetti strutturali influenzano in modo significativo sia la stabilità del materiale sia il suo comportamento in dispersione e in sistemi compositi. In particolare, la riduzione delle dimensioni delle particelle e l'aumento dell'area superficiale specifica favoriscono le interazioni con matrici polimeriche e con l'ambiente biologico, ma possono anche aumentare la reattività e la velocità di dissoluzione parziale del materiale [61-64].

2.7 Applicazioni delle idrotalciti

Come si evince dalla loro descrizione, è possibile ottenere un gran numero di idrotalciti sintetiche che variano per la natura dei cationi costituenti, per cristallinità, per dimensioni e per area superficiale. Inoltre, le idrotalciti possono essere variamente funzionalizzate cambiando la natura dell'anione interstrato e in questo modo è possibile introdurre nuove proprietà senza sacrificare le loro speciali caratteristiche. L'elevata variabilità dei parametri che controllano il tipo di solidi ottenibili rende possibile creare quindi sistemi su misura per diverse applicazioni, delle quali le principali sono di seguito descritte.

Le idrotalciti possono essere utilizzate come precursori e supporti di catalizzatori, scambiatori anionici, assorbenti, additivi, antiacidi, stabilizzatori chimici, dispositivi magnetici, filler di compositi polimerici, ma anche e soprattutto per l'incorporazione e il rilascio di specie biologicamente attive, nei campi ambientale, nutraceutico, farmaceutico e biomedicale [72].

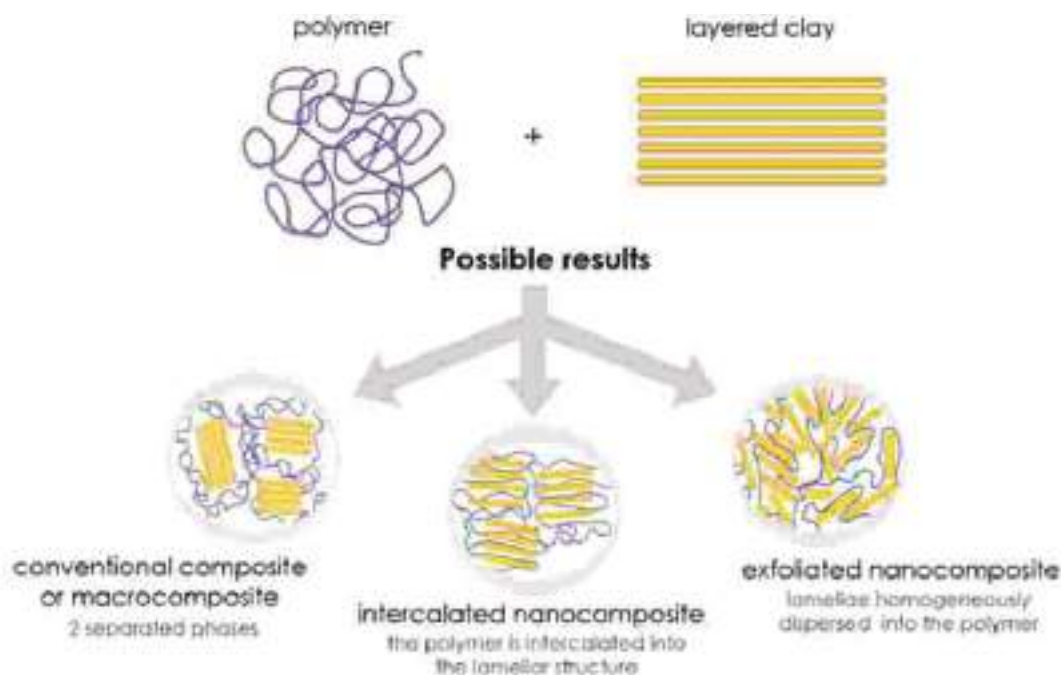


Figura 20. Illustrazione della morfologia di una dispersione di idrotalcite in una matrice polimerica

Le idrotalciti sono incorporabili in matrici polimeriche con formazione di *nanocompositi* (vedi Figura 20) grazie alla loro capacità di essere funzionalizzate nella regione interstrato con gruppi anionici organici, che ne aumentano la compatibilità con i polimeri, producendo un'ottimale dispersione del filler inorganico idrotalcitico nella matrice polimerica. La dispersione a livello nanometrico di un basso carico di tali particelle inorganiche in polimeri organici in molti casi produce nuovi materiali compositi con proprietà meccaniche, di barriera a gas e liquidi, ritardo alla fiamma, stabilità chimica, migliori rispetto al polimero tal quale. Inoltre, se prodotte con particolari metalli e disperse in opportune matrici polimeriche, le idrotalciti possono anche indurre nuove proprietà ottiche, catalitiche, elettriche o magnetiche, risultando così essere dei veri e propri filler attivi [73-75].

Se calcinate, gli ossidi ottenuti assumono proprietà interessanti quali elevata area superficiale, basicità, formazione di una miscela omogenea di ossidi con dimensioni molto piccole dei cristalli, che per riduzione formano piccoli cluster metallici stabili termicamente e finemente dispersi, che li rendono degli ottimi attori nel campo della catalisi eterogenea [76].

L'introduzione di specie contenenti particolari gruppi funzionali, quali coloranti azoici, permettono invece l'utilizzo delle idrotalciti anche come coloranti e pigmenti nei settori tessile, alimentare, delle vernici e inchiostri [77].

L'inserimento di particolari metalli nella struttura conferisce alle argille anioniche proprietà magnetiche, aprendo le porte per questi materiali ad un utilizzo per la produzione di carte di credito, tessere, nastri e dispositivi magnetici [78].

2.7.1 Le idrotalciti come piattaforme per il drug delivery nanostrutturato

Grazie alla loro struttura lamellare e alla presenza di uno spazio interlamellare accessibile e chimicamente attivo, i Layered Double Hydroxides (LDH) si sono affermati come piattaforme estremamente promettenti per il drug delivery, in particolare per molecole anioniche, tipo principi attivi farmaceutici (API) con carica negativa e biomolecole come acidi nucleici. A differenza di molti altri sistemi di trasporto, gli LDH consentono un vero e proprio confinamento strutturale del principio attivo all'interno di una matrice inorganica ordinata, con importanti implicazioni in termini di stabilità e controllo del rilascio [64,72].

Il caricamento del principio attivo può avvenire mediante diversi approcci, tra cui intercalazione diretta durante la sintesi, scambio anionico post-sintesi o sfruttando il già citato memory effect dopo calcinazione [69-71]. La scelta del metodo influenza in modo significativo la quantità di farmaco incorporato, la sua distribuzione nello spazio interlamellare e la stabilità del complesso ottenuto.

L'inserimento nella regione interstrato di specie biologicamente attive presenta diversi vantaggi [72]:

- Il confinamento del farmaco nello spazio interlamellare può garantire **protezione della specie attiva** dall'ossidazione, dalla fotolisi, da degradazione chimica o enzimatica, schermando il farmaco dall'ambiente esterno fino al momento del suo rilascio e migliorandone quindi la stabilità durante lo stoccaggio e dopo la somministrazione. Questo aspetto è particolarmente rilevante per molecole sensibili come alcuni antibiotici, antinfiammatori o acidi nucleici.
- Il farmaco viene immagazzinato nello spazio interlamellare e rilasciato solo al momento desiderato e nel sito target, garantendo un **rilascio controllato** dello stesso (un'illustrazione esplicativa in Figura 21). Questo è possibile poiché il rilascio del principio attivo da sistemi a base di LDH è governato principalmente da due meccanismi: lo scambio ionico con gli anioni presenti nei fluidi biologici e la parziale dissoluzione delle idrotalciti in ambiente acido. In condizioni fisiologiche neutre, lo scambio ionico rappresenta spesso il meccanismo dominante, mentre in ambiente leggermente acido, come quello gastrico, endosomiale o dei tessuti infiammati, la dissoluzione della matrice solida lamellare può accelerare in modo significativo il rilascio del principio attivo. Questa duplice modalità di rilascio conferisce ai sistemi LDH una certa sensibilità al pH, che può essere sfruttata per ottenere profili di rilascio selettivi o accelerati in specifici microambienti biologici.
- Nel caso di principi attivi poco biodisponibili, poiché parte del farmaco è presente in soluzione e parte è immagazzinata nei solidi lamellari e gradualmente rilasciata a livello locale secondo le

condizioni di equilibrio, si ha un aumento della solubilità apparente della specie attiva e di conseguenza **un aumento della biodisponibilità del farmaco**.

- L'incorporazione di un principio attivo in un'idrotalcite ne **modifica la cinetica di rilascio**, permettendo di modularla a piacimento in un senso o nell'altro (velocizzandola o rallentandola), agendo su diversi parametri del sistema quali composizione dell'idrotalcite, morfologia e dimensione delle particelle, grado di cristallinità e presenza di una matrice polimerica circostante.

La regione interstrato delle idrotalciti può quindi essere considerata come un micro-container dove le specie ospiti vengono immagazzinate, protette e rilasciate al momento giusto e con la cinetica desiderata. Per questo le idrotalciti sono di grande interesse in vari settori dell'area biomedica.

Le dimensioni tipiche delle particelle di LDH destinate ad applicazioni biomedicali si collocano generalmente nell'intervallo nanometrico o sub-micrometrico, consentendo l'interazione con le cellule e, in alcuni casi, l'internalizzazione per endocitosi. Una volta internalizzati, i sistemi LDH possono rilasciare il carico in ambiente endosomiale o lisosomiale, sfruttando l'acidificazione di questi compartimenti cellulari per attivare la dissoluzione parziale degli strati [79].

Diversi studi hanno mostrato che gli LDH presentano una biocompatibilità complessivamente buona, con profili di citotossicità dipendenti da composizione, dimensione delle particelle e dose [80].

Le idrotalciti trovano perciò grande campo di utilizzo in applicazioni farmaceutiche [81-84], cosmetiche [85-90], nutraceutiche [91,92] e dei dispositivi biomedicali [93-96], come dimostrato dalla vastissima letteratura a riguardo. Nel contesto della presente tesi, le idrotalciti vengono utilizzate quindi come **modulo nanostrutturato funzionale** per il drug delivery, integrato in un sistema composito più ampio, formato dal polimero e dalla membrana biologica.

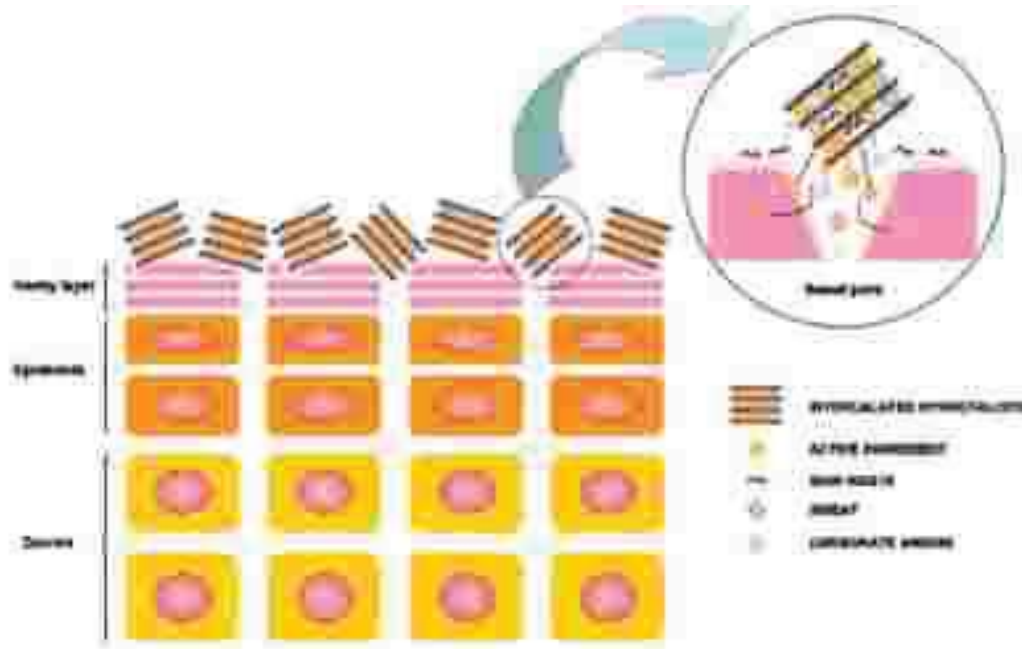


Figura 21. Meccanismo di rilascio controllato di specie attive intercalate in un LDH [89]

3. Fosfati di zirconio di tipo α

I fosfati di zirconio sono materiali lamellari che, a differenza degli LDH, ospitano delle specie cationiche nei loro spazi interstrato. Essendo dotati di interessanti proprietà di caricamento di specie

attive, ma essendo orientati verso specie diverse da quelle di destinazione degli LDH, sono anche questi dei materiali di estremo interesse in vari campi, tra cui il biomedicale.

3.1 Struttura dei fosfati di zirconio di tipo α

I fosfati di zirconio di tipo α (per distinguerli da quelli di tipo γ , aventi diversa struttura cristallina, formula e distanza interstrato) sono caratterizzati dalla formula generale $\text{Zr(IV)}\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_8\text{Ns}$ (dove S rappresenta le molecole intercalate nella regione interlamellare). Sono costituiti da pacchetti di lamelle, ognuna formata da atomi di Zirconio, metallo tetravalente, ognuno coordinante 6 gruppi idrogeno fosfato a formare degli ottaedri. La struttura della lamella è quindi costituita da una disposizione planare di atomi di Zr(IV) con simmetria pseudoesagonale al centro dello strato e da gruppi tetraedrici O_3POH posti alternativamente sopra e sotto il piano, che coordinano ciascuno tre diversi atomi metallici (Figura 22).

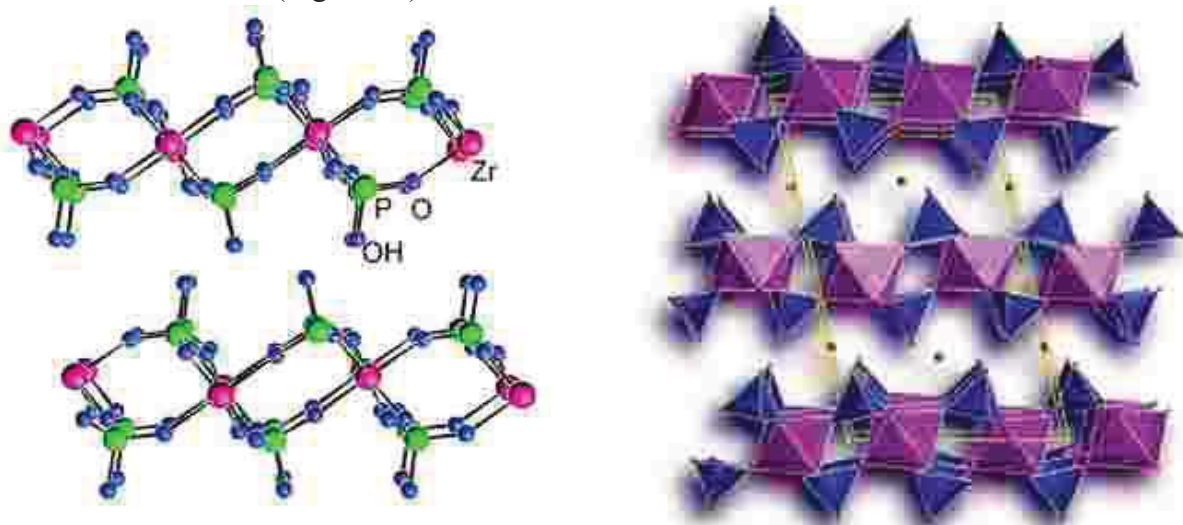


Figura 22. Rappresentazione a) schematica e b) tridimensionale della struttura di $\alpha\text{-Zr(HPO}_4)_2$ [89]

La struttura lamellare è dovuta all'impilamento dei macroanioni planari $[\text{Zr(PO}_4)_2]_2^-$ in cui le cariche negative su un ossigeno di ogni gruppo fosfato sono bilanciate da protoni. L'impacchettamento delle lamelle crea delle cavità di tipo zeolitico, in rapporto 1:1 con gli atomi di Zr, delimitate dagli atomi di ossigeno dei gruppi idrogenofosfato, ognuna delle quali è occupata da una molecola di acqua.

Non sono presenti legami a idrogeno fra lamelle adiacenti, che sono tenute insieme soltanto da forze di Van der Waals. I legami a idrogeno tra l'acqua di cristallizzazione e i gruppi OH degli strati si sviluppano solo all'interno della stessa lamella. Viste quindi le deboli forze tra strati adiacenti si deduce la facilità con cui i protoni negli spazi interstrato possono essere sostituiti da altri cationi in una reazione di scambio ionico [97-99].

3.2 Metodi di sintesi

La sintesi del fosfato acido di zirconio cristallino può essere portata avanti tramite due metodi.

Il primo consiste nella precipitazione veloce del prodotto amorfo e quindi nella digestione del precipitato a caldo per lungo tempo, in presenza di un eccesso di H_3PO_4 , fino ad ottenere la cristallizzazione. Il grado di cristallinità è funzione del tempo di digestione del precipitato e della concentrazione dell'acido [100].

Il secondo metodo prevede la formazione di complessi fluoridrici dello zirconio (ZrF_6)⁻ di elevata solubilità, l'aggiunta dell'acido fosforico e la graduale de-complessazione dello zirconio per evaporazione dell'acido fluoridrico. Lo zirconio così liberato può combinarsi con il fosfato presente in soluzione, per formare il fosfato acido di zirconio lamellare. La velocità di formazione del

precipitato può essere semplicemente controllata dalla velocità di allontanamento di HF, ed il grado di cristallinità è tanto più elevato quanto più lenta è la decomplessazione [101].

3.3 Caratteristiche macroscopiche

Il fosfato di zirconio è molto insolubile, è pertanto difficile ottenerlo in cristalli di grandi dimensioni. È tuttavia possibile ottenere polveri con un buon grado di cristallinità utilizzando un agente complessante, allo scopo di avere sempre in soluzione una bassa concentrazione di metallo libero (Figura 25).

3.4 Scambio ionico e applicazioni dei fosfati di zirconio

Nei fosfati di zirconio acidi la presenza di protoni in grado di diffondere attraverso il reticolo conferisce a tali materiali proprietà di scambio ionico [102] e di trasporto protonico [103].

Per i fosfati di zirconio non si parla in senso stretto, come per i LDH, di processi di scambio ionico, quanto di formazione di *composti di intercalazione*. Dato che nella regione interstrato sono presenti gruppi acidi, la driving force del processo di intercalazione è la protonazione della molecola guest o la formazione di legami ad idrogeno fra la molecola guest ed il gruppo acido del reticolo della molecola host. Composti di intercalazione sono tipicamente ottenuti con molecole facilmente protonabili quali alcoli ed ammine [104].

Questo rende i fosfati di zirconio degli ottimi precursori per la preparazione di composti di intercalazione anche con specie di interesse farmaceutico quali amminoacidi, ciclodestrine, imidazolo, benzilimidazolo [105-107], rendendo questi solidi lamellari dei veicoli per principi attivi farmaceutici nel campo biomedicale.

4. I solidi lamellari come piattaforme chimiche funzionali

Nel contesto della presente tesi, i solidi lamellari, rappresentati dalle categorie di LDH e fosfati di zirconio di tipo α , vengono utilizzati come modulo nanostrutturato funzionale per il drug delivery, integrato in un sistema composito più ampio, formato dal polimero chitosano e dalla membrana biologica. Questa configurazione consente di combinare la funzione di serbatoio nanostrutturato con la funzione di interfaccia e di adesione fornita dal chitosano, ottenendo un sistema nel quale il rilascio del farmaco è confinato spazialmente al sito di interesse e temporalmente modulabile. In particolare, l'integrazione degli LDH in matrici polimeriche, come quelle a base di chitosano, consente di introdurre un ulteriore livello di controllo, nel quale il rilascio non è governato solo dalle proprietà intrinseche del solido lamellare, ma anche dalla diffusione attraverso la matrice e dal suo eventuale rigonfiamento o degradazione.

I Layered Double Hydroxides rappresentano quindi in questo contesto una piattaforma inorganica altamente versatile per l'ingegnerizzazione di biomateriali multifunzionali. La loro integrazione con il chitosano e con membrane biologiche apre la strada a sistemi di rivestimento avanzati, superfici intelligenti e biomateriali a funzionalità multipla.

Sistemi compositi a base di membrane biologiche, solidi lamellari e chitosano

L'accoppiamento tra chitosano, LDH e membrane biologiche porta alla costituzione di un materiale composito gerarchico e multifunzionale, in cui ogni componente svolge un ruolo specifico e complementare [8,32-34,51]. Questa organizzazione riflette un approccio di progettazione modulare, nel quale ciascun livello è ottimizzato per una specifica funzione, pur mantenendo una forte integrazione fisica e funzionale con gli altri [34,51]. I livelli principali che costituiscono tali sistemi compositi sono perciò i seguenti:

- a) membrana biologica (in pericardio bovino), che rappresenta il substrato biologico e fornisce il *modulo strutturale* del composito, biocompatibile e ben integrabile nei tessuti in vivo;
- b) coating a base di chitosano, che rappresenta lo strato intermedio polimerico e funge da *modulo di interfaccia*, strato adesivo e anche da matrice funzionale, essendo dotato di attività antibatterica e antibiofilm intrinseca che lo rendono una prima linea di difesa verso le infezioni;
- c) solidi lamellari, che rappresentando la fase inorganica e il *modulo funzionale*, avendo capacità di carico e di rilascio controllato di specie attive antimicrobiche e antibiofilm e rappresentando così la seconda linea di difesa.

1. Integrazione strutturale e ruolo dell'interfaccia

Uno degli aspetti più delicati nella realizzazione di sistemi compositi multistrato è la progettazione dell'interfaccia tra materiali con proprietà meccaniche e chimiche molto diverse. Nel caso in esame, è necessario garantire una adesione stabile tra un substrato biologico viscoelastico e uno strato polimerico idratante, evitando la formazione di discontinuità meccaniche che potrebbero portare a delaminazione o danneggiamento del tessuto [32,34-36]. L'impiego del chitosano come strato di interfaccia consente di realizzare una transizione graduale tra il tessuto naturale e il modulo funzionale, grazie alla sua capacità di adattarsi alla topografia del substrato, di formare legami multipli con la superficie biologica e di mantenere un comportamento meccanico compatibile in ambiente idratato [16,19,32,34].

Dal punto di vista ingegneristico, il sistema deve mantenere un equilibrio tra flessibilità e stabilità. Lo strato di coating non deve irrigidire in modo eccessivo il substrato biologico, ma allo stesso tempo deve possedere una coesione interna sufficiente a resistere a rigonfiamento, sollecitazioni meccaniche e stress chimici in ambiente fisiologico [32,34-36]. La scelta delle condizioni di reticolazione del chitosano e del contenuto di fase inorganica consente di modulare in modo fine queste proprietà, dimostrando ancora una volta come la progettazione del materiale debba essere guidata da una visione sistemica e non dalla semplice ottimizzazione di un singolo componente [16,19,32,51].

2. Integrazione del modulo LDH nel coating polimerico

L'inclusione degli LDH all'interno del coating polimerico non rappresenta una semplice aggiunta di carica inerte, ma un elemento centrale della progettazione funzionale del sistema [8,32,33]. È necessario controllare con precisione:

- la quantità di fase inorganica incorporata,

- la sua dispersione nella matrice di chitosano,
- l'accessibilità del mezzo fisiologico alle particelle,
- e la stabilità complessiva del composito in ambiente acquoso.

Una dispersione omogenea e una buona interazione tra fase polimerica e fase inorganica sono condizioni essenziali per garantire sia la riproducibilità delle proprietà meccaniche sia un comportamento di rilascio controllato e prevedibile [32,33,51].

Il modulo LDH rappresenta il cuore funzionale del sistema composito, determinato dalla capacità di fornire un rilascio terapeutico locale controllato. In questa architettura, il farmaco è confinato nel modulo LDH e il suo rilascio è ulteriormente modulato dalla presenza della matrice polimerica sovrastante [8,32,33]. Questo doppio livello di controllo — nanostrutturale e macroscopico — consente di ottenere profili di rilascio più stabili, prolungati e adattabili alle esigenze cliniche rispetto a sistemi più semplici [8,33]. Inoltre, la localizzazione del rilascio al sito di impianto consente di massimizzare l'efficacia terapeutica riducendo al minimo l'esposizione sistemica [33].

3. Moderne tendenze della ricerca sui dispositivi biomedicali

I compositi di questo tipo si inseriscono pienamente nelle moderne tendenze della ricerca sui biomateriali, che vanno oltre la creazione di semplici strutture passive di sostegno, ma mirano a sviluppare materiali attivi e multifunzionali, capaci non solo di sostituire o supportare un tessuto, ma anche di interagire attivamente con l'ambiente biologico, modulare le risposte cellulari supportando la rigenerazione tissutale e prevenire complicanze come le infezioni.

Nel sistema proposto, il chitosano non è semplicemente un rivestimento, né solo un agente antibatterico, né solo un adesivo, ma rappresenta l'elemento strutturale e funzionale chiave che connette il mondo biologico con quello inorganico.

All'interno della matrice di chitosano, i solidi lamellari (LDH) non sono concepiti come semplici cariche inerti, ma come moduli funzionali attivi.

In questo modo, il sistema diventa una *piattaforma multifunzionale ingegnerizzata*. Rispetto a semplici membrane biologiche non funzionalizzate o rivestimenti polimerici passivi, il sistema composito proposto offre:

- maggiore resistenza alla colonizzazione microbica e riduzione del rischio di infezione e biofilm,
- possibilità di integrare funzioni terapeutiche aggiuntive,
- mantenimento della biocompatibilità del substrato naturale,
- approccio modulare e adattabile a diverse applicazioni cliniche.

4. Scalabilità e trasferibilità tecnologica

Un ulteriore aspetto di grande importanza è la potenziale scalabilità del sistema. Le tecniche di fabbricazione basate su coating, immersione e reticolazione sono intrinsecamente semplici e compatibili con processi industriali, rendendo il concetto di materiale sviluppato non solo scientificamente interessante, ma anche potenzialmente trasferibile verso applicazioni reali [8,34,51]. Questo elemento è fondamentale per collocare il lavoro non solo nel contesto della ricerca di laboratorio, ma anche in una prospettiva di sviluppo tecnologico e applicazione clinica.

Dal punto di vista bio-ingegneristico, il sistema sviluppato in questa tesi si basa su alcuni principi chiave: la progettazione per strati funzionali (layer-by-layer); la separazione dei ruoli (struttura - membrana biologica, interfaccia - chitosano, funzione avanzata – LDH); la possibilità di modulare ciascun livello in modo relativamente indipendente per ottimizzare le proprietà globali del sistema. Questo approccio rende il sistema scalabile, flessibile e adattabile a diversi tipi di tessuti, applicazioni e requisiti clinici.

5. Obiettivo della presente tesi

Alla luce di questo, nella presente tesi verranno esposti due dispositivi biomedici compositi, seguendo questo iter:

1. Sviluppo e caratterizzazione di un rivestimento a base di chitosano su membrane biologiche di origine bovina,
2. Stabilizzazione di tale rivestimento mediante opportune strategie di crosslinking,
3. Integrazione dei solidi lamellari (LDH) nella matrice di chitosano,
4. Valutazione delle proprietà fisico-chimiche e meccaniche del sistema, della sua stabilità in ambiente acquoso/fisiologico, e delle sue prestazioni antibatteriche e antibiofilm.
5. Analisi del potenziale del sistema come piattaforma multifunzionale per applicazioni biomediche.

In conclusione, il lavoro presentato in questa tesi si prefigge come obiettivo quello di sviluppare un prototipo di sistema bio-ibrido multifunzionale, capace di combinare integrazione biologica, protezione antibatterica e funzionalità avanzate in un'unica piattaforma.

Applicazione: membrane in pericardio bovino funzionalizzate con chitosano e solidi lamellari per chirurgia mammaria

1. Introduzione

Il progetto della presente tesi di Dottorato industriale ha consistito nella ricerca e sviluppo di un prototipo di dispositivo medico basato su una membrana biologica decellularizzata in pericardio bovino, opportunamente ingegnerizzata tramite chitosano e solidi lamellari, per l'utilizzo come supporto delle protesi mammarie negli interventi di chirurgia ricostruttiva del seno. Lo sviluppo di tale prototipo è stato portato avanti nell'ambito del progetto BIOLOAD (Anti-Biofilm Biological Prostheses in 3D Conformation), in collaborazione tra Prolabin & Tefarm srl e Assut Europe spa, una delle più importanti aziende a livello europeo per la produzione e commercializzazione di dispositivi medici di alta qualità per le diverse specializzazioni chirurgiche.

1.1 Ambito di intervento del progetto

Il cancro al seno è la neoplasia più diffusa tra le donne, e si manifesta con la frequenza di 2,3 milioni di nuovi casi ogni anno del mondo, di cui 50-60 mila solo in Italia, secondo l'aggiornamento biennale dell'*American Cancer Society* [108], i cui dati provengono dal *National Cancer Institute* e dai *Centers for Disease Control and Prevention*. Si stima che una donna su 8 si ammali di questa patologia nel corso della vita, e la sopravvivenza netta a 5 anni dalla diagnosi è stimata dal report dell'88% [109]. Il carcinoma mammario ha un tasso di crescita dello 0,5% (registrato nel 2022), minore rispetto a quello della decade precedente (2012-2021). In contrasto con l'aumento dell'incidenza, il tasso complessivo di mortalità per carcinoma mammario ha mostrato una riduzione continua nel periodo 1989–2022, con un decremento complessivo del 44%, corrispondente a circa 517.900 decessi evitati [108].

Oltre ai progressi nella riduzione dell'impatto del carcinoma mammario tramite opportuni programmi di screening, negli ultimi decenni sono stati compiuti molti passi in avanti nel trattamento della malattia, che comprendono la riduzione del numero di interventi, l'uso di *medical devices* (MDs) più performanti tra cui protesi e miglioramento delle modalità ricostruttive [110].

In particolare, la chirurgia del tumore della mammella ha compiuto negli anni progressi notevolissimi, passando dai primi interventi di tipo demolitivo (mastectomia) ai recenti interventi detti "conservativi" poiché prevedono una mastectomia seguita dalla ricostruzione chirurgica con il posizionamento di espansore prima e successivamente della protesi [111]. La tecnica classica prevede che dopo la mastectomia, alla paziente sia inserito un espansore per rendere ampia e stabile la tasca dove troverà alloggio la protesi futura. Tale tasca è localizzata al di sotto della cute della mammella ed è formata dal muscolo pettorale, dalla fascia del muscolo obliquo esterno e da una parte del piccolo pettorale. La protesi vera e propria viene inserita in un secondo intervento, a distanza di un tempo variabile dai 3 ai 6 mesi a seconda che siano necessari o meno cicli di radio e/o di chemioterapia.

È stata messa a punto recentemente una nuova tecnica che, grazie a membrane biologiche di origine animale (in pericardio bovino - MPB o derma porcino - MDP), consente invece la mastectomia e la ricostruzione della mammella nello stesso intervento [112,113]. La *membrana biologica*

decellularizzata (MBD) permette di creare infatti, agganciandola al muscolo pettorale, una tasca temporanea idonea alla protesi nello stesso intervento in cui avviene l'asportazione del tumore. Dopo la sua applicazione, l'organismo reagisce all'introduzione di collagene iniziando il processo di riparazione dei tessuti danneggiati, liberando un gran numero di citochine, fattore di crescita e sostituendo gradualmente il materiale impiantato con i tessuti sani. La membrana viene quindi riassorbita lasciando spazio alla creazione di nuovi tessuti da parte dell'organismo, mentre la protesi vera e propria chiaramente rimane permanentemente. Questa soluzione consente alla paziente, dopo quindici giorni dall'intervento, di tornare alla vita precedente alla diagnosi del tumore, con una buona resa estetica, senza cicatrici evidenti. Questo approccio porta ad un vantaggio enorme per la paziente dal punto di vista psico-fisico in quanto essa viene sottoposta ad una sola seduta operatoria invece che ad una serie, e nello stesso tempo non sperimenta la privazione della sua integrità fisica ed estetica.

Tuttavia, ad oggi, questo tipo d'intervento presenta due importanti criticità:

- 1) A questo tipo d'intervento può essere sottoposta solo una piccola percentuale delle donne trattate, ovvero quelle che presentano caratteristiche dimensionali ed anatomiche idonee all'alloggiamento di tali membrane, non facilmente adattabili all'anatomia di tutte le pazienti. È opinione diffusa dei chirurghi disporre, in un prossimo futuro, di membrane in configurazione 3D idonea per un più agevole posizionamento in situ [114].
- 2) Inoltre, data l'elevata incidenza nel panorama dei dispositivi medici impiantabili delle infezioni post-operatorie (SSI – *surgical site infections*) da biofilm, con la conseguente necessità di re-intervento o di trattamenti antibiotici debilitanti [115], sarebbe auspicabile in questo settore, come sta cominciando ad avvenire nel settore ortopedico, disporre di membrane che possano essere caricate con farmaci prima dell'impianto e che rilascino gradualmente gli stessi nel post intervento, per ridurre l'incidenza di tali infezioni.

La tecnica chirurgica che fa utilizzo di MBD quindi ha ancora ampi spazi di miglioramento. Il lavoro di questa tesi si inserisce esattamente in questa tematica proponendo di sviluppare delle protesi innovative per l'applicazione in chirurgia mammaria per il trattamento del tumore al seno, basate su sistemi compositi costituiti da membrane biologiche decellularizzate opportunamente ingegnerizzate con un coating polimerico e con solidi lamellari in modo da superare le criticità associate a questo trattamento.

1.2 Scopo e obiettivi del progetto

Il lavoro di questa tesi si inserisce nell'ambito sovraesposto proponendo lo sviluppo di un sistema composito basato su una MBD in PB, funzionalizzata e ingegnerizzata in modo opportuno per conseguire due obiettivi principali:

- 1) dotare le protesi di una forma 3D anatomica (vedi Figura 23), che ne faciliti il posizionamento chirurgico in situ, al fine di mantenere la forma desiderata e di essere adattabile a quante più pazienti possibili;
- 2) rendere le protesi dotate di funzionalità anti-biofilm per ridurre il rischio di SSI e garantire il successo di quanti più interventi chirurgici possibili.

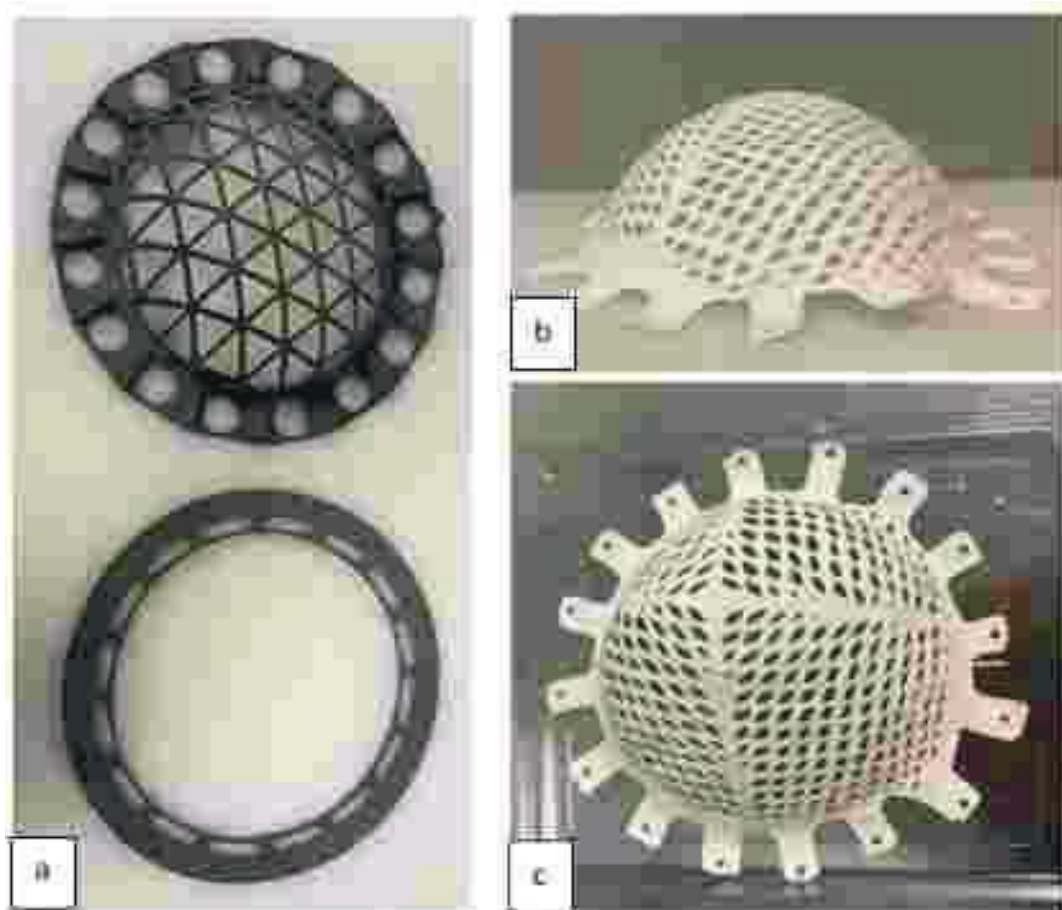


Figura 23. Immagini della a) dima utilizzata per il conferimento della forma anatomica 3D alla MPB, b e c) della MPB con forma 3D

Il primo obiettivo vuole essere raggiunto rivestendo la MBD con un coating a base di chitosano, materiale di note biocompatibilità, biodegradabilità, affinità per le superfici biologiche e capacità filmogena. Inoltre, la sua capacità di fungere da matrice per l'incorporazione di fasi funzionali lo rende il candidato ottimale anche per l'adesione di solidi lamellari alla MBD.

Il secondo obiettivo vuole essere conseguito funzionalizzando la MBD tramite solidi lamellari adesi in modo stabile, rendendo così la membrana un substrato proattivo al caricamento con principi attivi farmaceutici (API) antimicrobici e antibiofilm. L'utilizzo di solidi lamellari infatti permette al dispositivo di essere caricato in fase pre-operatoria con gli API d'interesse, che sono poi gradualmente rilasciati in fase di post-intervento, agendo in modo da evitare l'insorgenza di infezioni post-operatorie.

La ricerca di casi simili di DM impiantabili caricati direttamente con API in sala operatoria ha portato all'individuazione in commercio di un unico prodotto che si avvale di una tecnologia simile, ovvero di StimulanTM, utilizzato però in ambito ortopedico. È un prodotto dell'azienda britannica Biocomposites Ltd. e consiste in dei pellets di solfato di calcio di grado farmaceutico che possono essere miscelati con antibiotici nella fase pre-impianto. È riassorbibile e approvato per la rigenerazione ossea e contro i biofilm, se miscelato con vancomicina, gentamicina e tobramicina [116].

L'adesione dei solidi lamellari alla membrana è operata tramite l'utilizzo di biocolle, in primis del chitosano appunto, che viene perciò ad assumere un duplice ruolo: quello di coating per la funzionalizzazione 3D e quello di bioadesivo per i LDH. Il rilascio degli API è stimolato

dall'ambiente in cui il dispositivo si trova impiantato, è progettato per essere a lungo termine in modo da proteggere l'ospite dalle SSI per un ampio intervallo di tempo e può essere addirittura stimolato in caso di infezione, grazie all'aumento della temperatura locale e all'aumento di ioni nella ECM, con una risultante reazione responsiva contrastante l'infezione.

In ultima analisi, ma non per importanza, il chitosano, possedendo un'intrinseca e documentata attività antimicrobica (4,7,8-10,21,37-39,40) opera in modo sinergico con gli API caricati sui solidi lamellari, fornendo un ulteriore livello di difesa, per abbattere lo sviluppo di infezioni da biofilm sul dispositivo stesso.

Lo scopo ultimo di questo lavoro è quindi quello di mettere a punto un sistema innovativo e integrato di DM in supporto alla rigenerazione del tessuto muscolare mammario, che sia in grado di influire positivamente sull'impianto e sul processo di guarigione e che possa esercitare un'azione terapeutica personalizzata, attraverso il rilascio di antibiotici.

Il raggiungimento degli obiettivi di progetto, potrebbe aprire la strada allo sviluppo di nuovi dispositivi medici, anche per altre sedi corporee ed altre applicazioni chirurgiche, basati su sistemi compositi che combinano membrane biologiche, coating polimerici e solidi lamellari in un unico sistema multi-funzionale.

1.3 Potenziale innovativo del progetto

Nel presente lavoro di ricerca sperimentale si possono riscontrare direttrici di innovazione nei seguenti settori dell'area biomedicale:

1. Medicina di precisione e personalizzazione: la conformazione 3D delle MBD deve tenere conto dei requisiti unici del tessuto di destinazione, imitandone fedelmente l'architettura per avere integrazione in vivo e funzionalità ottimale.
2. Materiali intelligenti e reattivi: lo sviluppo di biomateriali intelligenti in grado di rispondere alle indicazioni ambientali o ai cambiamenti fisiologici è un'area di ricerca attiva. Questi materiali si adattano dinamicamente alle esigenze del tessuto ospite, rilasciando API o modulando le loro proprietà in risposta a segnali specifici. In questo lavoro di ricerca, il dispositivo che si vuole realizzare è caricato con antibiotici prima dell'impianto e la velocità di rilascio degli stessi sarà modulabile in base all'eventuale insorgenza di infezioni: in questo caso si hanno condizioni di temperatura e forza ionica che stimolano il rilascio degli API, rendendo così il dispositivo in grado di rispondere agli stimoli dell'ambiente circostante.
3. Miglioramento della biocompatibilità e dell'immuno-modulazione: la funzionalizzazione delle MBD volta a conferire una maggiore stabilità 3D della protesi ne migliora anche la biocompatibilità e quindi modula la risposta immunitaria del paziente, contribuendo al successo a lungo termine dell'impianto. Inoltre, un avanzamento successivo di questa ricerca potrebbe prevedere l'integrazione di API antinfiammatori a lento rilascio al sistema anti-biofilm.
4. Tecniche di vascolarizzazione: lo sviluppo di metodi efficaci per la vascolarizzazione all'interno delle protesi biologiche è essenziale per garantire la sopravvivenza e la funzionalità dei tessuti rigenerati. Approcci innovativi, come l'uso di fattori bioattivi per stimolare l'angiogenesi, possono avere un impatto significativo sul successo di questi impianti. Un progresso successivo di questo lavoro potrebbe prevedere l'integrazione di fattori di crescita e di angiogenesi i al sistema anti-biofilm.

5. Nanomedicina rigenerativa: le nanotecnologie promettono di fornire terapie rigenerative su scala nanometrica. Le nanoparticelle possono essere progettate per trasportare fattori di crescita, geni o farmaci direttamente ai tessuti bersaglio, migliorando la precisione e l'efficienza dei processi rigenerativi.
6. Per la prima volta un sistema ingegnerizzato costituito da solidi lamellari quali idrotalciti e fosfati di zirconio pro-attivi sarà ancorato a una membrana, ottenendo un sistema caricabile con antibiotici in uno step pre-impianto.

Il potenziale di innovazione di questo progetto di ricerca quindi è molto elevato, per gli obiettivi che si propone di raggiungere, sia per i futuri sbocchi che le conoscenze generate potrebbero contribuire a creare negli ambiti sopracitati.

1.4 Stato dell'arte dei dispositivi biomedicali a base di pericardio bovino

Le protesi a base di MBD di origine animale utilizzate in chirurgia mammaria per il rinforzo, la riparazione e la rigenerazione dei tessuti molli sono varie e di seguito descritte. Veritas Collagen Matrix® (di Baxter/Synovis) [117], il pericardio bovino Tutopatch® [118] e il pericardio bovino fenestrato Tutomesh® [119] di Tutogen, il derma fetale e neonatale bovino Surgimend™ di Integra [120], Bioripar® da pericardio bovino e Bioripar Derma® da derma porcino di Assut europe spa [121].

Tutti questi dispositivi impiantabili a base di pericardio bovino (ma anche derma bovino o porcino) sono DM impiantabili di Classe III. Hanno caratteristiche di: biocompatibilità, modellabilità, flessibilità, resistenza alla trazione e alla pressione, sono facili da suturare, semplici da gestire in sala operatoria. Data la loro natura derivante da tessuti biologici, una volta impiantati hanno la capacità di conformarsi facilmente alle strutture anatomiche, offrendo supporto per la rivascolarizzazione e il rimodellamento tissutale. Sono ottenuti dai tessuti biologici tramite processi di sterilizzazione e decellularizzazione, e quindi non sono immunogenici. Tipicamente esse sono disponibili in una varietà di dimensioni, fenestrati e non fenestrati con forme rettangolari e ovali.

Di tutti i prodotti presenti sul mercato nessuno di questi è però disponibile in conformazione 3D o con proprietà antibatteriche. Per questo, protesi biologiche innovative con un effetto antibatterico e anti-biofilm e/o in conformazione 3D sarebbero di sicuro interesse per il mercato, specialmente nell'ambito della ricostruzione mammaria.

1.5 Membrana biologica in pericardio bovino BioRipar®

Tra i dispositivi a base di pericardio bovino, Bioripar® è la membrana biologica usata per il presente lavoro di tesi (Figura 24). Essa è costituita fondamentalmente da collagene di tipo I ed elastina ed è prodotta da Assut Europa spa a partire da vero pericardio bovino tramite un processo multifasico di lavorazione di proprietà dell'azienda stessa. Da qui in avanti, in tutta la parte sperimentale della presente tesi ci si riferirà sempre a questo tipo di membrana, che verrà semplicemente indicata come MPB.

In questo processo di lavorazione, soggetto a segreto industriale perciò non esplicitato nel presente lavoro di tesi, la membrana biologica viene sterilizzata, decellularizzata e ritagliata.

Il processo permette di rimuovere l'antigenicità della membrana, inattivare ogni tipo di patogeno mantenendo inalterata la struttura 3D del collagene, conservandone le proprietà biomeccaniche e

garantendone la biocompatibilità. Si ottiene pertanto una matrice per la germinazione dei fibroblasti che promuove la formazione di nuovi tessuti e vasi sanguigni.

Le proprietà meccaniche sono state confermate da test di resistenza a trazione e prova di resistenza allo scoppio. Studi preclinici ne hanno verificato la biocompatibilità e i meccanismi che sono alla base del processo di integrazione con il tessuto ospite [122]. Dal processo è possibile ottenere membrane in varie forme e dimensioni, idratate o non idratate, forate o non forate. Per le attività sperimentali svolte nell'ambito della presente tesi, sono state utilizzate membrane BioRipar® rettangolari, di dimensioni 6x8 cm, non idratate, non forate.

Il materiale utilizzato per la produzione di BioRipar® deriva da bovini nati, allevati e macellati in Italia, di età inferiore ai 24 mesi e riconosciuti sani (in particolare che non abbiano contratto Encefalopatia Spongiforme Bovina - BSE) dopo il controllo ante e post mortem secondo le vigenti disposizioni comunitarie, al fine di escludere ogni "cross-contamination". I tessuti sono processati con il metodo "single-donor" e non vi è mai "pooling" dei tessuti. Gli animali selezionati da veterinari, secondo rigorosi criteri, sono tutti certificati e impiegati per il consumo alimentare.

Oltre che per la chirurgia mammaria, questo dispositivo medico è utilizzato per la riparazione dei tessuti molli, per il rinforzo dei lembi muscolari, per il rinforzo delle strutture tendinee, per il rinforzo e/o la sostituzione di tessuti connettivali, per prevenire la formazione delle aderenze e accelerare i tempi di riparazione tissutale nelle chirurgie: addominale, plastica ricostruttiva, urologia, ginecologia, andrologia, toracica, ortopedia, otorinolaringoiatria, traumatologia, implantologia e parodontologia.



Figura 24. Immagine di MBD in pericardio bovino BioRipar® a seguito del processo di lavorazione

1.6 Attività sperimentale

L'attività di ricerca sperimentale del presente lavoro di tesi ha consistito in cinque principali punti, di seguito esposti.

1. Caratterizzazione chimico-fisica e funzionale della MPB BioRipar®.
2. Ricerca e sviluppo di metodi per il conferimento alla MPB di struttura 3D permanente in ambiente fisiologico, tramite procedure di cross-linking e/o essiccamento; valutazione dei risultati.
3. Ricerca e sviluppo di metodi per l'adesione alla MPB di solidi lamellari idonei all'uptake e al rilascio di API antimicrobici e antibiofilm; valutazione dei risultati.
4. Studio della cinetica di uptake e rilascio degli API antimicrobici e antibiofilm.
5. Studio dell'attività antibiofilm complessiva del prototipo ottenuto.

È importante sottolineare che si è cercato di integrare le procedure di caricamento dei solidi lamellari sulle membrane e di conferimento alle stesse di forma 3D con i vari metodi, valutando procedure sequenziali o contestuali in modo da ottimizzare il processo di funzionalizzazione delle MPB.

1.6.1 Caratterizzazione chimico-fisica e funzionale della MPB

Per quanto riguarda la caratterizzazione chimico-fisica e funzionale della MPB sono state valutate proprietà quali spessore, peso specifico, umidità relativa, micro-morfologia tramite SEM, capacità di assorbimento di liquidi della membrana secca e di desorbimento di liquidi da parte della membrana umida.

1.6.2 Ricerca e sviluppo di metodi per il conferimento alla MPB di struttura 3D

Per quanto riguarda le attività di ricerca e sviluppo di metodi per il conferimento alla MPB di struttura 3D, sono state valutate varie procedure basate sulla reticolazione e su diverse tecniche di essiccamento delle MPB posizionate su apposite dime, per ottenere rispettivamente membrane in forma umida e in forma secca. I metodi valutati sono stati validati in riferimento al Regolamento (UE) 2017/745 per l'applicazione in ambito biomedico [123].

Le attività di questo punto hanno consistito nello sviluppo delle formulazioni di cross-linking a base di chitosano, delle procedure di essiccamento e nella valutazione dei prototipi ottenuti.

Per quanto riguarda le procedure di essiccamento, queste sono state ritenute funzionali alla buona riuscita dei protocolli di conferimento della forma 3D oltre che a quelli di adesione dei solidi lamellari. Sono state prese in considerazione le tecniche di freeze-drying (liofilizzazione), di essiccamento in condizioni ambientali, in condizioni di essiccamento spinto e mediante solvente organico volatile.

Per quanto riguarda le procedure di cross linking, è stata prima svolta un'ampia attività di ricerca bibliografica sui metodi di reticolazione delle membrane biologiche.

Sono stati presi in considerazione tra i reticolanti chimici:

- gli epossidi EGDE (etilene glicole diglicidil etere) [125] e pentaepossido [124], entrambi in grado di legare aminoacidi del collagene e con buoni risultati in termini di resistenza alla calcificazione dei tessuti cross-linkati e buona citocompatibilità;
- il sistema EDC (1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimide cloridrato (EDC), NHS (N-idrossisuccinimide) e MES (acido 2-morfolinoetano sulfonico) [112], dove EDC è un agente di cross-linking che reagisce con i gruppi carbossilici delle proteine, attivandoli per legarsi con i gruppi amminici e NHS funge da stabilizzante dell'intermedio reattivo, questi danno eccellenti risultati a livello delle proprietà meccaniche e di biocompatibilità;
- genipina (GEN) [126], che reagisce con i gruppi amminici liberi presenti nelle proteine e dà ottima biocompatibilità e un buon tasso di rigenerazione tissutale in base a modelli *in vivo* [127];
- glutaraldeide (GLU), che possiede un'ottima capacità reticolante ma è tossica e può provocare un eccessivo irrigidimento dei tessuti sottoposti al trattamento [127].

Tra i reticolanti fisici sono stati considerati invece tripolifosfato (TPP) [20,35] e riboflavina + destrano (cross linking tramite radiazione UVA) [128] in quanto biocompatibili, non tossici e con un grado di reticolazione che dà prodotti meno rigidi rispetto ai reticolanti chimici.

In base a queste premesse è stato selezionato TPP come agente cross-linker sperimentale e i test sono stati effettuati sia su membrane in PB tal quali che in seguito a trattamento con il CH, in modo da valutare l'effetto sul sistema di una reticolazione combinata del collagene di membrana e del polimero con lo stesso agente. GLU è stata usata come controllo positivo di avvenuta reticolazione. La valutazione del cross-linking si è basata su parametri quantitativi (% di assorbimento di acqua) ma anche su alcuni qualitativi, come la rigidità e l'aspetto rispetto alle MPB tal quali, in quanto un buon procedimento di reticolazione di membrane biologiche deve in primis assicurare la conservazione delle proprietà meccaniche ed elastiche del tessuto, fondamentale per il suo impiego chirurgico: un eccessivo irrigidimento causerebbe problemi a livello di maneggevolezza operatoria, di adattabilità ai piani anatomici e di integrazione biologica.

1.6.3 Ricerca e sviluppo di metodi per l'adesione alla MPB di solidi lamellari

Il fine ultimo dell'attività di ricerca e sviluppo di metodi per l'adesione alla MPB di solidi lamellari, è stato quello di ottenere un prototipo di membrana biologica ingegnerizzata in modo da legare in modo stabile solidi lamellari capaci di adsorbire in modo efficiente (e poi rilasciare in modo controllato e in un ambiente opportuno che mimino le condizioni *in vivo*) API antimicrobici.

La scelta di dotare il DM impiantabile non direttamente di farmaci antimicrobici, ma di un rivestimento di solidi lamellari, proattivi al caricamento, è stata fatta sulla base del brevetto europeo EP22195794 (pubblicato come EP 4154923 A1) di proprietà di Prolabin & Tefarm srl, relativo all'invenzione di uno scaffold proattivo per il caricamento di principi attivi [129]. L'obiettivo è quello infatti di caricare gli API antimicrobici sul dispositivo direttamente in sala operatoria prima dell'impianto in vivo, tramite semplici procedure di contatto con soluzioni delle specie di interesse, che saranno facilmente adsorbite e intercalate dai solidi lamellari. Le specie antimicrobiche saranno quindi rilasciate in modo graduale e controllato in vivo nel post-operatorio, garantendo protezione nell'arco di vari giorni contro le SSI.

Le attività di questa parte hanno consistito: nella selezione, sintesi e caratterizzazione dei solidi lamellari più idonei al caricamento degli API e biocompatibili; nello sviluppo delle soluzioni a base di biocolle più adatte all'adesione, considerando come parametri-chiave il mantenimento delle proprietà funzionali inalterate delle MPB e la stabilità chimica e funzionale dei solidi lamellari; nello sviluppo di un processo efficiente di adesione dei solidi lamellari alle MPB.

I solidi lamellari sono stati selezionati all'interno dei gruppi delle idrotalciti (CAS 12304-65-3) e dei fosfati di zirconio tipo α (CAS 13772-29-7), con caratteristiche di biocompatibilità, dimensioni, area superficiale e composizione secondo quanto indicato nel brevetto europeo EP22195794. La scelta è ricaduta su idrotalcite $MgAl-CO_3$ 3:1, in grado di intercalare API anionici, e su α -ZrP, capace di caricare specie cationiche. Accanto al classico fosfato di zirconio di tipo α , sono stati testati anche ZrP nanometrico e ZrP esfoliato con Tris, per studiare la capacità di veicolare API da parte di solidi con elevata area superficiale e struttura esfoliata. In questo modo si è pensato di creare un sistema ad ampio spettro, abile al caricamento con API di diversa natura e carica.

Come bioadesivo è stato preso in considerazione principalmente il chitosano, per le sue proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità, versatilità chimica e affinità per i tessuti biologici, ampiamente caratterizzate nell'introduzione della presente tesi. Sono stati analizzati chitosani di diverso MW (alto medio e basso), in quanto questo fattore impatta le sue proprietà di biocolle e di agente antimicrobico, come da letteratura a riguardo [11,13,37,38]. Sono state testate soluzioni con la concentrazione

massima di chitosano possibile (2%), ma con diversa concentrazione di acido acetico, per aumentare la solubilità del chitosano, e diverso pH, e quindi diverso comportamento elettrolitico del chitosano. Sono state valutate anche altre biocolle: collagene, gelatina e cellulosa rigenerata. È stata infine testata anche l'associazione di più biocolle nella stessa soluzione.

Tra i metodi di adesione sono stati testati la filtrazione, il bar-coating, l'immersione e il gocciolamento. I prototipi sono stati caratterizzati e valutati sulla base della omogeneità dei solidi sulla MPB, della stabilità dell'adesione dei solidi alle membrane a secco, a seguito di sollecitazione meccanica e a seguito di immersione in opportuno mezzo.

È stata anche valutata la quantità di solidi adesi, con l'obiettivo di caricare stabilmente le MPB con solidi lamellari in percentuale rispetto al peso della membrana anidra compreso tra lo 0.5% e il 10%.

1.6.4 Studio della cinetica di uptake e rilascio degli API antimicrobici e antibiofilm

Questa parte della sperimentazione ha previsto un'iniziale fase di studio dello stato dell'arte esistente riguardante gli API antibiofilm. Dopo aver selezionato gli API più idonei alla sperimentazione, sono state svolte delle prove preliminari di intercalazione di tali API nei solidi lamellari, e sono stati messi a punto i protocolli di uptake e di rilascio di tali specie antimicrobiche dal dispositivo a base di MPB-biocolla-solidi lamellari.

1.6.4.1 Valutazione delle specie microbiche più comuni nelle infezioni da biofilm su protesi

La letteratura riguardante le infezioni ai dispositivi protesici impiantabili causate da biofilm ha messo in evidenza come le specie microbiche maggiormente responsabili di tali infezioni siano, tra i batteri: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterococci spp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e streptomiceti; tra i funghi: *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* [115,130,131]. In particolar modo, ci si è concentrati tra tutti questi sulle specie più comuni: *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*.

1.6.4.2 Valutazione degli API più idonei con attività antibiofilm

Lo stato dell'arte ha anche fornito conoscenze per la valutazione di quali API fossero più idonei al trattamento delle infezioni da parte delle specie microbiche sopra elencate e sulla loro MIC. Per sua natura il biofilm è difficilmente debellabile, richiedendo una MIC dell'antibiotico circa 10 volte superiore a quella sufficiente in condizioni planctoniche del microrganismo [132]. Per questo motivo si è optato per una strategia basata sulla prevenzione della formazione di biofilm, piuttosto che sul tentativo di una sua eradicazione a innesto già avvenuto. Si è deciso di prendere in considerazione sia antibiotici che antisettici, in modo da fornire due livelli di protezione antimicrobica al dispositivo medico: uno, di prima linea, più immediato e più generico, quello degli antisettici; e uno, in seconda difesa, più specifico e più protratto nel tempo, a base di antibiotici.

Antibiotici

Tra i possibili antibiotici ed antifungini ad ampio spettro, il cui uso contro le infezioni su dispositivi medici impiantabili è raccomandato dalla letteratura, sono stati valutati (vedi Tabella 2): Amfotericina B, Amoxicillina, Bacitracina, Cefazolina, Ceftarolina, Ciprofloxacina, Clindamicina, Daptomicina, Fosfomicina, Gentamicina, Kanamicina, Meropenem, Metronidazolo, Neomicina, Oxazolidinoni (Linezolid e Tedizolid fosfato), Penicillina G, Streptomicina, Tobramicina, Vancomicina [133-140]. Nella valutazione degli antibiotici ottimali sono state considerate la possibilità di caricare i solidi lamellari con l'API (presenza di carica netta e MW), solubilità dell'API a pH fisiologico; metodo analitico per il rilevamento dell'API e sua sensibilità (spettroscopia UV-vis o HPLC-OES).

Tabella 2. Lista degli antibiotici ed antifungini valutati come potenziali API

Antibiotico o antifungino	Rilevabilità UV-vis (nm)	Spettro d'azione	MW (g/mol)	Solubilità in H ₂ O 20 °C (mg/ml)
Beta-lattamici				
Amoxicillina	230	Gram+	365	si
Cefazolina	272	Gram+	454	slightly
Ceftarolina	242	Gram+	685	no
Meropenem	298	Gram+ e Gram-	383	>50
Penicillina G	290	Gram+ e Gram-	334	210
Macrolidi				
Amfotericina B	347,365,384,408	Funghi	924	no
Chinoloni				
Ciprofloxacina	277	Gram+ e Gram-	331	30
Aminoglicosidi				
Gentamicina	no	Gram+ e Gram-	478	si
Kanamicina	no	Gram-	485	50
Neomicina	310	Gram-	614	250
Streptomicina	279, 326	Gram-	582	>20
Tobramicina	no	Gram+ e Gram-	467	si
Polipeptidici				
Bacitracina	278	Gram+	1422	50-100
Lincosamidi				
Clindamicina	202	Gram+ e Gram-	425	si
Lipopeptidi				
Daptomicina	223	Gram+	1620	100
Fosfonici				
Fosfomicina	no	Gram+ e Gram-	138	50
Ossazolidinoni				
Linezolid	251,360	Gram+	337	3
Tedizolid	290	Gram+	370	2-3
Nitroimidazoli				
Metronidazolo	319	Gram+ e Gram- e protozoi	171	10-12
Glicopeptidi				
Vancomicina	238,282	Gram+	1449	>100

Alcuni antibiotici, come Gentamicina, Tobramicina e Kanamicina sono stati esclusi dalla scelta in quanto non direttamente rilevabili tramite spettroscopia UV-visibile. Altri, come Clindamicina, Amoxicillina, Ciprofloxacina, Fosfomicina, Neomicina, Bacitracina, Oxazolidinoni, Meropenem e Metronidazolo sono stati esclusi perché venduti come formulazioni contenenti eccipienti. Altresì, tutti gli antibiotici poco o scarsamente solubili in acqua, quali Ceftarolina e Amfotericina B, sono stati esclusi per problemi a mettere in atto la procedura di uptake in sala operatoria. Infine, antibiotici con MW molto elevato, come Daptomicina, sono stati esclusi perché l'elevato peso molecolare non consente un efficiente intercalazione nei solidi lamellari.

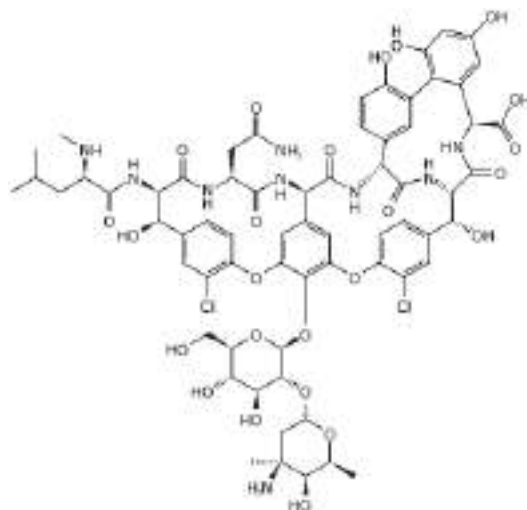


Figura 25. Struttura chimica della vancomicina

Tra i rimanenti, si è data la preferenza a antibiotici anfoteri, che si prestano sia all'intercalazione in idrotalciti che in zirconio fosfato, e ad alta solubilità in acqua, favorevole ad un caricamento con bassi tempi di contatto. Tra questi, è stato selezionato **Vancomicina** (Vanco), la cui struttura è riportata in Figura 25.

Antisettici

Tra gli antisettici raccomandati dalla letteratura sono stati presi in considerazione i seguenti [141-146]:

- clorexidina digluconato (0,05-4%), già ampiamente utilizzata per la disinfezione cutanea prechirurgica, per i lavaggi intraoperatori e come rivestimento di DM ed efficace contro batteri, funghi e virus con mantello;
- iodopovifone (0,1-10%) efficace contro batteri, virus, funghi e protozoi e utilizzato per la disinfezione cutanea, i lavaggi superficiali, chirurgia minore;
- acido ipocloroso (HOCl , 10-200 ppm), usato per la disinfezione di ferite, ulcere, lavaggi intraoperatori sperimentali contro batteri, virus e funghi;
- ipoclorito di sodio (NaOCl , 0,5-5%) e perossido di idrogeno (H_2O_2 , 3-6%), efficaci entrambi contro batteri, virus, funghi e spore e usati per disinfezione di strumenti, endodonzia, irrigazione di ferite necrotiche, il primo e per pulizia di ferite superficiali e disinfezione di strumenti, il secondo;
- alcool etilico/isopropilico (70-90%) usato per la disinfezione cutanea preoperatoria, l'igiene delle mani ed efficace contro batteri e virus enveloped;
- poliesanide (PHMB), usato nel trattamento di ferite croniche e lavaggi intraoperatori in ortopedia e argento e derivati (es. Ag^+ , nanoparticelle d'argento), usato come rivestimento di protesi, medicazioni avanzate per ferite infette, entrambi efficaci contro batteri, biofilm e funghi.

Nello specifico, è stata selezionata **clorexidina digluconato** CLO DG (struttura in Figura 26a), per l'ampio spettro d'azione e l'elevata efficacia, l'elevata solubilità in acqua ($>20\%$ p/v), la moderata citotossicità e perché già impiegata ampiamente nel rivestimento di dispositivi medici come cateteri e impianti. A seguito della consulenza con il Dott. Michele Riccio, specialista in chirurgia plastica, estetica e ricostruttiva presso l'Azienda ospedaliera universitaria delle Marche (Ancona) e dell'Accademia del Lipofilling, si è deciso di eseguire i test anche sul **poliesanide** PHMB (struttura in Figura 26b), nome commerciale Preventia®, in quanto antisettico di nuova generazione ampiamente utilizzato nella disinfezione delle ferite chirurgiche con ottimi risultati in termini di

efficacia e scarsa citotossicità [147]. Essi sono entrambi caricabili su zirconio fosfato lamellare e a pH idonei possono essere assorbiti anche dal chitosano durante la fase di uptake, permettendo un rilascio controllato dell'API nel tempo.

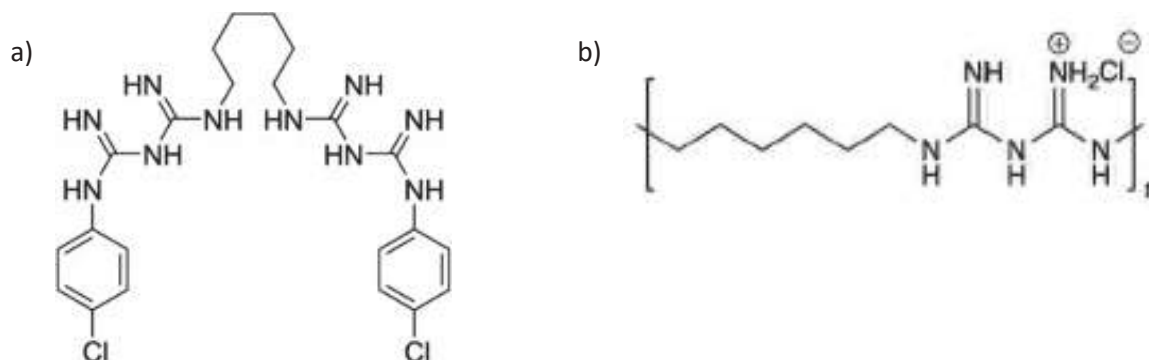


Figura 26. Struttura chimica della a) clorexidina e del b) PHMB

In Tabella 3 i valori di MIC (Minimum Inhibitory Concentration) espressi in $\mu\text{g/ml}$, relativi alle tre molecole selezionate verso *Staphylococcus epidermidis* e *Candida spp.* [141,147-150]:

Tabella 3. MIC verso *S. epidermidis* e *Candida spp.* per CLO DG, PHMB e Vanco

	CLO DG	PHMB	Vanco
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<145 $\mu\text{g/ml}$	0,25 - 2 $\mu\text{g/ml}$	Susceptible (VSSA): $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ Intermediate (VISA): 4 – 8 $\mu\text{g/ml}$ Resistant (VRSA): $\geq 16 \mu\text{g/ml}$
<i>Candida parapsilosis</i>	2 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	-

1.6.4.3 Prove preliminari di intercalazione

Una volta selezionati gli API di interesse, questi sono stati testati nella loro capacità di essere intercalabili nei solidi scelti in condizioni di contatto simili a quelle di sala operatoria. In particolare sono state studiate l'intercalazione della clorexidina digluconato (cationica) in α -ZrP e l'intercalazione di PHMB (cationico) nei vari tipi di zirconio fosfato, poiché essendo questa specie ad alto MW, si è voluta studiare la reattività dei tre tipi di zirconio fosfato, di cui due a maggiore capacità di intercalazione - in quanto ZrP nano ha elevata area superficiale e ZrP-tris ha lamelle pre-allargate - e selezionare quello più idoneo al caricamento su membrana. Non è stata sperimentata l'intercalazione di vancomicina (anfotera) nell'idrotalcite poiché già ampiamente descritta in letteratura [151].

1.6.4.4 Messa a punto del protocollo per l'uptake e il rilascio degli API

Sono state testate la capacità di up-take degli API selezionati da parte dei solidi lamellari adesi alle membrane, e la velocità di rilascio di tali API dai solidi in condizioni mimanti l'essudato di una ferita. È stata prevista una fase iniziale di ricerca nella letteratura scientifica di protocolli esistenti per studiare la cinetica di rilascio di principi attivi da dispositivi medici impiantabili, e in particolar modo è stata presa in considerazione la sperimentazione delle cinetiche di uptake e rilascio svolta per StimulanTM [116]. In base a tale ricerca bibliografica sono stati messi a punto i protocolli di uptake e rilascio. I test hanno consistito per l'uptake, nel contatto delle membrane funzionalizzate con una soluzione di API per un tempo opportuno, idoneo ai protocolli di sala operatoria, e nella quantificazione del titolo di API caricato sui prototipi; per il rilascio, nell'immersione delle membrane precedentemente caricate con gli API in una soluzione e in condizioni mimanti i fluidi

biologici a livello di una ferita chirurgica e nella quantificazione nel tempo del titolo di API rilasciato in tale fluido tramite spettroscopia UV-visibile o HPLC.

È stato tenuto conto delle seguenti considerazioni, fatte in via preliminare.

1. La necessità di minimizzare i tempi in cui la membrana è immersa nel liquido contenente gli API (15') e di utilizzare API in forme uguali a quelle in cui sono comunemente preparati per l'utilizzo in sala operatoria (CLO DG 20%, Preventia® e Vancomicina 6 mg/ml; in modo da non incidere significativamente sulle procedure di sala operatoria già previste, e da garantire un "facile uso medico" del dispositivo da produrre.
2. Per quanto riguarda la presenza di uno step o meno di risciacquo della membrana post imbibizione e pre rilascio è stato escluso in quanto non necessaria alle condizioni di sterilità e di sicurezza previste dal protocollo operatorio e in quanto potrebbe influire negativamente sull'uptake degli API da parte dei solidi adesi alla membrana.
3. La necessità di avere un protocollo sequenziale tra i test di uptake e quelli di rilascio, in modo da evitare l'errore nella quantificazione degli API e da mimare le condizioni di sala operatoria, in cui i dispositivi sono posti in situ nella ferita chirurgica subito dopo l'uptake, ha consentito di eseguire il protocollo di rilascio immediatamente dopo quello di uptake.
4. Per quanto riguarda la natura del mezzo di rilascio, sono state testate svariate soluzioni isotoniche, tra le quali: soluzione fisiologica, PBS (phosphate buffer saline), tampone acetato pH 4,5, soluzione sodio acetato pH 5,5 e pH 6,5. Dalle prove effettuate in via preliminare si è optato per la soluzione sodio acetato pH 6.5 per i test su CLO DG, tampone PBS pH 7.4 per quelli su PHMB e su Vancomicina, in quanto favorevoli al mantenimento in soluzione degli API e con un pH vicino alla neutralità.
5. Per quanto riguarda la metodologia di ottenimento dei campioni dal test di rilascio è stato selezionato il metodo via sostituzione del mezzo e non via prelievo, in modo da riprodurre delle condizioni in vivo in cui la quantità di API che viene rilasciato dal prototipo è portata lontano dalla sede di impianto dal sistema linfatico, e in cui quindi l'API viene continuamente rimpiazzato da quello liberato dalla membrana.
6. Per quanto riguarda le tempistiche del test di rilascio è stato selezionato un timesheet con sostituzioni del mezzo ogni 24 h per 7 giorni continuativi, tempo idoneo all'eventuale abbattimento sul nascere del biofilm.
7. Per quanto riguarda infine l'eventuale presenza simultanea di più antimicrobici e loro interazioni, queste non sono state valutate, ma saranno oggetto di studi più approfonditi a valle del presente progetto di tesi.

1.6.5 Studio dell'attività antibiofilm complessiva del prototipo ottenuto

Per quanto riguarda la valutazione dell'attività antibiofilm effettiva del dispositivo medico, i prototipi a base di MPB caricate con solidi lamellari, pre e post contatto con gli API d'interesse, sono stati sottoposti a test per valutarne l'effettiva capacità di decontaminazione microbica e anti-biofilm. Questa parte della sperimentazione ha previsto ha previsto un'iniziale attività di ricerca bibliografica riguardante i test in vitro eseguiti per testare l'attività antibiofilm di dispositivi impiantabili simili a quello oggetto del presente studio, e in particolare sul caso-studio StimulanTM [115].

Il protocollo messo a punto ha consistito in una iniziale valutazione della capacità anti-biofilm delle MPB funzionalizzate con la biocola, per verificare l'effettiva attività antimicrobica del chitosano nelle conduzioni di utilizzo. La seconda parte della sperimentazione ha consistito invece nella

valutazione dell'attività antibiofilm dei prototipi con chitosano e con i solidi lamellari caricati, in modo da verificare eventuali variazioni rispetto alla condizione con la sola biocolla. Di questi campioni è stato eseguito il confronto tra la condizione nativa (non caricati ancora con API) e post-uptake degli API, in modo da valutare l'effettiva attività dell'API una volta inserito nel sistema composito. Come API modello è stata scelta CLO DG.

L'attività antibiofilm è stata testata verso ceppi appartenenti a specie microbiche ad alta incidenza di infezione nelle SSI: il batterio *Staphylococcus epidermidis* e il fungo *Candida parapsilosis*, nello specifico verso *C. parapsilosis* T210U, un ceppo isolato da protesi mammarie infette. La valutazione dell'attività antibiofilm è avvenuta tramite SEM, microscopia ottica e OD. Come tempo di valutazione per la crescita microbica è stato scelto 24 h per *C. parapsilosis* e 48 h per *S. epidermidis*, tempo necessario alle specie selezionate per ottenere un biofilm maturo. Per il primo ceppo si è ottenuta un'analisi semi-quantitativa dell'attività anti-biofilm delle MPB funzionalizzate, mentre per il secondo un'analisi quantitativa.

2. Materiali e metodi

2.1 Materiali

Le MPB sono state fornite da AssutEurope spa nel prodotto Bioripar®, in forma umida o secca, non fenestrata, di dimensioni 6x8 cm. Anche le dime nei diversi materiali e forme sono state fornite da Assut Europe spa, così come Collagene in polvere, Lapi Gelatina e Cellulosa ossidata rigenerata Oxitamp.

α -ZrP è stato acquistato da Sunshine Factory Co. Ltd. (China).

Etanolo denaturato $\geq 99\%$ con 1% MEK è stato acquistato da PanReac AppliChem.

Acetone $\geq 99,5\%$; anidride fosforica $P_2O_5 \geq 98,0\%$; chitosano alto MW, 310-375 kDa, 800-2000 cP, DD $>75\%$; chitosano medio MW, 190-310 kDa, 200-800 cP, DD $>75\%$; alluminio nitrato nonaidrato $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O \geq 99,9\%$; magnesio nitrato esaidrato $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O \geq 99,9\%$; NaOH $\geq 98,0\%$; sodio tripolifosfato TPP grado tecnico $\geq 85,0\%$; glutaraldeide grado I, 25% in acqua; acido acetico glaciale 100%, anhydrous EMSURE® ACS; fosfato di sodio Na_2HPO_4 ACS $\geq 99,0\%$; fosfato di potassio KH_2PO_4 ACS $\geq 99,0\%$; sodio cloruro NaCl ACS $\geq 99,0\%$; soluzione di sodio idrossido NaOH 50% e 1 M; acido cloridrico 37%; acido ortofosforico H_3PO_4 85% Suprapur®; Tris base (2-ammino-2-(idrossimetil)-1,3-propanediolo) $\geq 99,8\%$ ACS; soluzione di clorexidina digluconato 20% in acqua; acetato di sodio anidro Emsure® ACS; bicarbonato di sodio anidro $\geq 99,0\%$; Vancomicina B $\geq 85\%$ e cristal violetto $\geq 99,0\%$ sono stati acquistati da Sigma-Aldrich.

Chitosano basso MW, 50-190 kDa, 20-300 cP, DD $>75\%$ da funghi è stato acquistato da Alidans.

Preventia® (soluzione 0,1% PHMB poli(esametilen biguanide) + polossamero) è stata fornita da Dott. Michele Riccio, UOSD di Chirurgia Ricostruttiva e della Mano presso gli Ospedali Riuniti di Ancona. Propionato di zirconile $C_{12}H_{20}O_8Zr \geq 95,0\%$ è stato acquistato da Mel Chemicals.

Tutte le materie prime sono state utilizzate senza ulteriore purificazione.

L'acqua deionizzata è stata prodotta internamente con un distillatore Decasei Forwater.

2.2 Tecniche analitiche e strumenti

Un microscopio elettronico a scansione ad emissione di campo FE-SEM Electron Microscope LEO 1525 con sonda per spettrometria EDX Bruker, risoluzione di 1.5nm a 20kV e 3.5nm a 1kV e una

distanza di lavoro di 8,5 mm, stub circolari in alluminio ricoperti di biadesivo conduttivo in grafite e metallizzati con sputtering ionico in oro è stata utilizzato per la caratterizzazione micro-strutturale ed elementare delle membrane biologiche in pericardio bovino in forma nativa, a seguito delle procedure di essiccamento e di reticolazione e a seguito del trattamento con le soluzioni di bioadesivi, per effettuare la valutazione dell'impatto di tali tecniche/materiali sulle proprietà strutturali (e di conseguenza funzionali) di membrana. La microscopia SEM+EDX è stata anche utilizzata per la caratterizzazione dei solidi lamellari utilizzati per l'adesione sulle MPB e per la caratterizzazione della distribuzione dei solidi depositi sulle membrane stesse. È stata infine la tecnica di base per la valutazione dell'attività antibiofilm del dispositivo composito a base di MPB, solidi lamellari e chitosano, pre e post uptake degli API antimicrobici.

Una bilancia analitica Sartorius è stata utilizzata per la caratterizzazione delle MPB: peso specifico, capacità di assorbire acqua da forma secca e di perdere acqua a seguito di disidratazione (peso acqua assorbita o desorbita / peso membrana). Un calibro elettronico di sensibilità 0,001 mm è stato utilizzato per determinare lo spessore delle MPB in forma nativa e a seguito dei test di essiccamento e reticolazione. Una stufa Binder e un essiccatore sono stati utilizzati per le procedure di essiccamento delle MPB. Un liofilizzatore 5PASCAL LIO-20 FP è stato utilizzato per le procedure di essiccamento delle MPB a seguito dei trattamenti con le soluzioni di reticolazione e di adesione dei solidi lamellari e per ottenere i provini per i test antibiofilm. Un viscosimetro rotazionale Fungilab Viscolead ADV è stato utilizzato per la caratterizzazione delle soluzioni di adesione. Un ultra turrax Ika T25 Digital e un bar-coater RK K-control coater sono stati utilizzati per la preparazione e l'applicazione delle biocolle alle MPB.

Uno spettrometro ad emissione ottica al plasma ICP/OES (inductively coupled plasma / optical emission spectroscopy) PerkinElmer Avio 200 è stato utilizzato per la caratterizzazione dei solidi lamellari a seguito del contatto con le soluzioni di adesione.

Un diffrattometro a raggi X (XRD) per analisi strutturale e di fase con raffinamento Rietveld (Bruker D2 Phaser 2nd generation) è stato utilizzato per la caratterizzazione dei solidi lamellari utilizzati per l'adesione sulle MPB, per la stabilità di tali solidi a seguito del contatto con le soluzioni di adesione, per la caratterizzazione delle MPB a seguito di tale deposizione e per la caratterizzazione delle prove preliminari di intercalazione degli API antimicrobici nei solidi lamellari.

L'analisi termica simultanea TGA/DTA/DSC (PerkinElmer STA 8000), con una rampa di temperatura da 25 a 1000 °C, una velocità di riscaldamento di 10 °C/min, in flusso di aria è stata utilizzata per la caratterizzazione delle MPB, per valutare l'UR % nelle prove di essiccamento e di reticolazione e per caratterizzare le intercalazioni degli API antimicrobici nei solidi lamellari nelle prove preliminari.

L'analisi granulometrica tramite Laser Diffraction (Malvern Panalytical Mastersizer 2000), l'analisi di Area Superficiale BET e Porosità (Micromeritics Gemini VIII) e l'analisi dimensioni particelle (Dynamic Light Scattering) e potenziale zeta (Anton Paar Litesizer 500) sono state utilizzate per la caratterizzazione dei solidi lamellari utilizzati per essere adesi sulle MPB.

Uno spettrofotometro UV-vis JascoV-750-ISU-922 con emissione di lunghezze d'onda nel range 190-800 nm è stato utilizzato per la determinazione delle cinetiche di uptake e rilascio degli API antimicrobici dal dispositivo prototipo.

Un microscopio ottico MIT 300\500 Series è stato utilizzato per la valutazione dell'attività antibiofilm dei prototipi, una spettroscopia Optech e una Tecan Infinite 200 sono state utilizzate per il controllo rispettivamente della crescita microbica post inoculo e post incubazione con i provini.

Una camera climatica Heraeus BBD 6220 è stata utilizzata per i test di rilascio.

2.3 Metodi

2.3.1 Caratterizzazione chimico-fisica e funzionale della MPB

La caratterizzazione delle MPB ha previsto l'analisi del peso specifico, dello spessore, dell'umidità relativa, della capacità di idratazione della membrana in forma secca, della capacità di disidratazione della membrana in forma umida e la caratterizzazione della loro micro-struttura e morfologia. Il peso specifico è stato misurato con bilancia analitica su campioni di MPB secca, umida ed essiccata e riportato come mg/cm^2 . Lo spessore è stato misurato con un calibro elettronico e riportato in mm. L'umidità relativa (UR%) è stata misurata tramite analisi termogravimetrica. Per quanto riguarda la capacità di idratazione, la MPB secca è stata immersa in acqua per 24h e quindi sgocciolata per 30'', pesata e calcolata la percentuale $[(\text{peso umido} - \text{peso secco}) / \text{peso secco}]$. Per quanto riguarda la capacità di disidratazione, la MPB umida è stata essiccata in liofilizzatore per 24h, pesata e calcolata la percentuale $[(\text{peso umido} - \text{peso secco}) / \text{peso umido}]$. Tutti i risultati sono stati ottenuti dalla replica di 10 campioni e riportati come media $\pm$ deviazione standard.

La micro-struttura e la composizione elementare delle MPB è stata analizzata tramite SEM ed EDX, ricavando dei dischetti circolari di 1 cm di diametro dalle membrane secche.

2.3.2 Metodi per il conferimento alla MPB di struttura 3D

2.3.2.1 Metodi per l'essiccamento

Lo studio della modalità ottimale di essiccamento delle MPB, sono stati effettuati sulle MPB in forma umida, trattandole con 4 diverse tipologie di essiccamento (A-D), e testando 5 campioni per ogni metodologia:

- A) La MPB è stata immersa completamente in acetone in una piastra petri e lasciata in queste condizioni per 24 h.
- B) La MPB è stata posta in essiccatore sotto vuoto e in presenza di P_2O_5 per 24h.
- C) La MPB è stata congelata a -20°C per 2h e subito liofilizzata per 24 h.
- D) La MPB è stata lasciata essiccare all'aria a T e umidità ambientali per 24h.

La procedura migliore è stata valutata in base alle proprietà visive (plastificazione o meno del tessuto e spessore), che hanno trovato perfetta corrispondenza nell'analisi della microstruttura tramite SEM e dell'umidità relativa (UR%) tramite analisi termo gravimetrica TGA.

Una volta selezionato il processo ottimale, le MPB sono state essiccate su dima per testare se il processo di essiccamento permettesse a tali membrane di mantenere la forma 3D conferitagli. Le dime, realizzate da Assut Europe spa, sono: due in acciaio inox e a forma di cupola, di due dimensioni differenti (1), altezza $H \sim 30 \text{ mm}$ e diametro $d \sim 60 \text{ mm}$, (2) $H \sim 40 \text{ mm}$ e $d \sim 120 \text{ mm}$; la terza è in plastica PA12 e di forma cilindrica ad arco (3), lunghezza $L \sim 70 \text{ mm}$. In Figura 27 i disegni tecnici (a,b) e un'immagine (c) delle dime. La scelta delle caratteristiche delle dime è stata effettuata da Assut a seguito di una consulenza apposita con uno medico chirurgo specialista in ortopedia.

a)

b)

c)

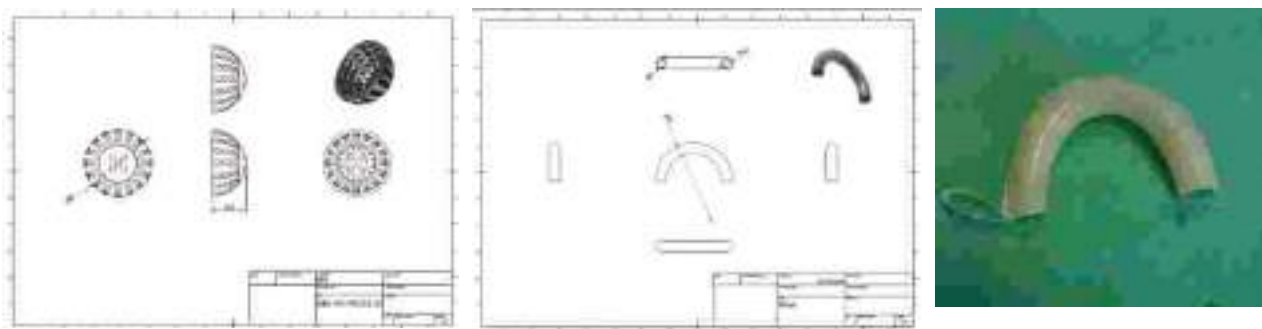


Figura 27. Disegni tecnici (a,b) e immagine (c) delle dime utilizzate

2.3.2.2 Metodi per il cross linking

La sperimentazione ha consistito nel trattamento delle MPB, tal quali o dopo coating con CH, con le soluzioni di cross-linking (TPP, GLU), nel successivo essiccamento su dima tramite liofilizzazione e nella valutazione dell'avvenuta reticolazione tramite immersione per 24 h in tampone PBS.

Sono state preparate: una soluzione chitosano alto/medio MW 2% w/v in soluzione acido acetico 1% v/v, agitata magneticamente a 60°C per 24 h e poi centrifugata 3500 rpm per 10'; una soluzione TPP 2% pH 9; una soluzione GLU $8 \cdot 10^{-6}$ %; una soluzione PBS pH 7,4 a partire da Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 e NaCl. Le membrane con coating con CH HMW/MMW sono state ottenute mediante la tecnica descritta nel paragrafo 1.6.3.3. La procedura di reticolazione ha previsto il contatto delle MPB, tal quali o con coating, poste su una dima cilindrica, nelle soluzioni a base TPP o GLU (controllo positivo) a RT, sotto costante agitazione per garantire un contatto uniforme tra le membrane e le soluzioni e rispettivamente per 8 h (TPP) e 30' (GLU). Dopo il trattamento, le MPB sono state rimosse dalle soluzioni e dalle dime, risciacquate in PBS per rimuovere l'eccesso di TPP/GLU non reagito e congelate -20 °C per 2h e liofilizzate per 24. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato e sono stati valutate anche 3 MPB non sottoposte a reticolazione (controlli negativi). I campioni così ottenuti sono stati pesati e immersi in tampone PBS 37 °C (mimante le condizioni fisiologiche) per 24 h, al termine delle quali sono stati valutati:

- aspetto visivo (se mantenuto quello tipo delle MPB non reticolate),
- rigidità (se uguale a quella delle MPB non reticolate (2), maggiore (3) o minore(1)),
- variazione della forma rispetto a quella conferitagli dalla dima,
- assorbimento di liquidi ($W\%$, dato da W_{24h}/W_0 , dove W_{24h} è il peso dopo 24 h in PBS e W_0 il peso secco iniziale). Per quest'ultimo parametro, non è stato possibile eseguire una vera e propria valutazione del grado di swelling, come è d'uso comune nel caso della sperimentazione sui metodi di cross-linking, poiché i campioni non sono scaffold porosi, ma membrane rivestite, ma si è potuto comunque procedere alla valutazione dell'assorbimento di acqua da parte dei campioni. Questo valore ($W\%$) è indicativo infatti della capacità dei gruppi amminici del collagene (e del CH) di interagire con le molecole di acqua, capacità che diminuisce nel caso in cui questi gruppi siano impegnati in legami di cross-linking.

2.3.3 Metodi per l'adesione alla MPB di solidi lamellari

2.3.3.1 Sintesi e caratterizzazione dei solidi lamellari

L'idrotalcite $\text{MgAl}(\text{OH})_6$ 3:1 è stata sintetizzata con il metodo della co-precipitazione. Ad una soluzione 1 M dei sali $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ in rapporto 3/1 (Mg/Al) è stata aggiunta NaOH 50% fino a pH 9, sotto agitazione magnetica e a temperatura ambiente. Al momento della precipitazione, sono stati aggiunti 400 ml di una soluzione Na_2CO_3 1,8 M, sotto agitazione meccanica e per 2 ore. Il prodotto è stato ottenuto tramite centrifugazione e lavaggio con acqua. Percentuale del

secco sul prodotto = 21,7% (w/w). Da una soluzione 0,2 M di propionato di zirconile in etanolo, aggiungendo velocemente acido fosforico 85% in rapporto P/Zr=6 e mantenendo in agitazione meccanica per 2h, si è ottenuto lo ZrP nanometrico, sottoforma di gel trasparente. Questo è stato centrifugato e lavato con etanolo. Percentuale del secco sul prodotto = 12,9% (w/w). ZrP-tris è stato ottenuto aggiungendo α -ZrP ad una soluzione acquosa 5% (w/v) Tris (2-ammino-2-(idrossimetil)-1,3-propanediolo) fino ad ottenere un gel di concentrazione 10% (w/v). Tutti i solidi lamellari utilizzati sono stati caratterizzati tramite le seguenti tecniche analitiche: XRD, particle size distribution tramite analisi granulometrica o DLS (a seconda delle dimensioni del solido, micro- o nanometriche), BET, SEM ed EDX. 5% w/v

2.3.3.2 Preparazione e caratterizzazione delle biocolle

Sono state preparate soluzioni acquose di biocolle a base di: chitosano cloridrato (CH) 2% (w/v), ad alto (HMW), medio (MMW) o basso (LMW) peso molecolare, in acido acetico 1 o 2%. La soluzione CH LMW è stata ottenuta per semplice agitazione magnetica a RT e poi portata a vari pH (4,5; 5,5; 6,5), tramite aggiunta di NaOH 1 M; mentre le soluzioni con CH MMW e HMW sono state agitate magneticamente a 60 °C per 24 h e poi centrifugate 3500 rpm per 10'. Sono state preparate soluzioni di CH 2% con diverse concentrazioni (0,5-1-2% (w/v)), di collagene (COL) idrolizzato con HCl 0,5 M, con gelatina (GEL) 0,5% (w/v) e cellulosa rigenerata (CEL) 0,5% (w/v). Sono state preparate soluzioni di soli COL, GEL e CEL 0,5-1-2% (w/v). Di tutte le soluzioni sono stati determinati pH e viscosità e ne è stata valutata la stabilità, lasciandole a temperatura ambiente per 48 h e osservando in seguito eventuale precipitazione di materiale. Le soluzioni sono sempre state conservate a 4 °C.

Le biocolle sono state valutate anche tramite il contatto tra le soluzioni di bioadesivi e:

- le MPB, per determinare il mantenimento dell'integrità strutturale e funzionale di membrana,
- i solidi lamellari, per verificarne la stabilità chimica.

Un campione di MPB è stato immerso in ogni soluzione di biocolle da testare per 30', quindi ogni provino è stato fatto sgocciolare per 1' e messo in una piastra petri, liofilizzato e ne è stata valutata l'integrità tramite SEM.

Sono state ottenute delle dispersioni al 5% (w/v) dei solidi $MgAlCO_3$ e α -ZrP (preso come modello per i fosfati di zirconio utilizzati) nelle soluzioni di adesione sotto agitazione magnetica per 72 h, quindi i solidi sono stati recuperati per centrifugazione e lavati con acqua deionizzata e i pellet finali seccati in stufa a 70 °C per 12 h. Dal peso secco ottenuto rispetto al peso iniziale del solido usato si è ricavata la perdita in peso percentuale (wt %). Si è deciso di utilizzare come limite inferiore per l'accettazione della stabilità del solido nelle soluzioni di adesione il valore di wt % = 90%.

Per confermare ulteriormente la stabilità dei solidi nelle soluzioni, i solidi recuperati sono stati analizzati tramite XRD e confrontati con lo spettro di partenza, per determinare eventuali processi di intercalazione o modifica superficiale a seguito del contatto con le soluzioni di adesione.

Come ulteriore prova della stabilità dei solidi nelle soluzioni di adesione, nel caso della $MgAlCO_3$ 3:1, è stata eseguita un'analisi ICP sulle acque di centrifugazione e di lavaggio delle dispersioni per quantificare il titolo di Al presente e da questo risalire al quantitativo di idrotalcite eventualmente disciolto. È stato prima effettuata un'analisi sulle acque come controllo negativo, e il titolo di Al è risultato essere al di sotto del limite di rilevabilità dello strumento.

Accanto ai test sulle soluzioni di adesione, sia le MPB che i solidi sono stati anche testati in acqua come controllo negativo.

2.3.3.3 Sviluppo del protocollo di adesione e relativa valutazione

Scelta del metodo di adesione

Lo sviluppo del protocollo di adesione dei solidi lamellari alle MPB tramite la biocolla selezionata come soluzione-modello al punto 1.6.3.2 (Soluzione 3: CH LMW 2%, acido acetico 1%, pH 6,5) ha previsto la valutazione di 4 metodi: filtrazione, bar-coating, immersione e gocciolamento.

In tutti i casi, le MPB sono state ritagliate in una forma opportuna, pesate (da secche) e identificate e, al termine della procedura, ripesate (da umide) e liofilizzate per favorire l'ancoraggio dei solidi alle membrane. I test sono stati effettuati solo sull'idrotalcite $MgAlCO_3$, usata come solido modello in questa fase, con un quantitativo in peso pari al massimo utilizzabile, pari cioè al 10% rispetto al peso della MPB, in modo da massimizzare il carico di API nella successiva fase della sperimentazione. Per ogni metodo, sono state preparate delle dispersioni al 5% di $MgAlCO_3$ nella Soluzione 3* tramite un ultra-turrax. Ogni metodo è stato testato in triplicato. Sono state effettuate anche delle prove con acqua al posto della biocolla e con sola soluzione di biocolla, come controlli.

- A) *Filtrazione*: un provino circolare di MPB è stato usato come membrana di filtrazione, tramite un buchner e una pompa a vuoto, di 20 ml di dispersione solido-biocolla.
- B) *Gocciolamento*: un provino rettangolare di MPB è stato posizionato su una piastra petri e 5 ml di dispersione solido-biocolla è stata gocciolata con una pasteur sullo stesso fino a completo assorbimento.
- C) *Immersione*: un provino circolare di MPB è stato immerso per 24h in 20 ml di dispersione solido-biocolla in una piastra petri opportunamente modificata con un'intercapedine per l'agitazione magnetica.
- D) *Bar-coating*: un provino rettangolare di MPB è stato sottoposto a stesura della dispersione solido-biocolla tramite bar-coater con barra da 80 μm , con una deposizione ripetuta per 3 volte di seguito. Le membrane sono state fissate con aghi a un supporto di polistirolo prima di essere liofilizzate.

I provini ottenuti sono stati tutti valutati per: 1) mantenimento della flessibilità della membrana, 2) adesione del film polimerico alla membrana, 3) omogeneità dei solidi adesivi, 4) stabilità dell'adesione dei solidi a secco e 5) dell'adesione dei solidi a seguito di sollecitazione meccanica. Ad ogni parametro è stato assegnato un punteggio da 1 (peggior risultato) a 3 (miglior risultato). Le MPB funzionalizzate ottenute sono state anche caratterizzate tramite XRD, confrontandole con gli spettri delle membrane native e dei solidi puri, SEM ed EDX per confermare la presenza dei solidi lamellari sulle stesse e determinarne l'omogeneità della distribuzione sulla superficie del provino.

Scelta della biocolla

Una volta individuato come metodo di deposizione il bar-coating, sono state effettuate ulteriori prove testando anche le altre soluzioni di biocolle (individuate al punto 1.6.3.2) e utilizzando come solido modello sempre l'idrotalcite $MgAlCO_3$ al massimo quantitativo possibile, pari cioè al 10% rispetto al peso della MPB. In questo modo sono state selezionate le migliori soluzioni di biocolle sempre in base ai parametri 1-5.

Scelta delle condizioni dei solidi lamellari

Una volta individuata la biocolla, sono state effettuate delle prove a diversa concentrazione e composizione di solidi; e sono state valutate questa volta secondo i parametri:

- Valutazione stesura: bontà della dispersione (1), facilità di stesura (2);

- Valutazione provini a secco: omogeneità del film depositato (3), stabilità dell'adesione dei solidi a secco (4), a seguito di sollecitazione meccanica (5), carico dei solidi (7) e di CH (8);
- Stabilità dell'adesione dei solidi in umido, ponendoli in soluzione fisiologica per 7 giorni a 37 °C e 90% UR e valutando il distacco dei solidi ogni 24 h (6).

È stata anche valutata la quantità di solidi adesi, tramite gravimetria per differenza tra il peso della membrana tal quale secca e di quella depositata e secca, noti la concentrazione di solidi e di biocolle nella dispersione e il quantitativo di dispersione depositato.

2.3.4 Metodi per lo studio della cinetica di uptake e rilascio degli API antimicrobici e antibiofilm

2.3.4.1 Prove preliminari di intercalazione

Ad una soluzione 20% CLO DG viene aggiunto α -ZrP in concentrazione 17% w/v e mantenuto in agitazione magnetica per 15' RT, il prodotto di intercalazione viene poi filtrato e seccato 70 °C per 6 h. L'esito dell'intercalazione è stato valutato tramite caratterizzazioni XRD e TGA/DSC.

L'intercalazione di PHMB nei vari tipi di ZrP ha previsto il contatto di a) 100 mg α -ZrP, b) 1 g ZrP nano e c) 1 g ZrP-tris con 35 ml di Preventia®, sotto agitazione magnetica RT per 15'. I prodotti sono stati quindi centrifugati 10' 11500 rpm e i solidi recuperati. L'esito dell'intercalazione è stato valutato tramite caratterizzazioni XRD e TGA/DSC.

La caratterizzazione XRD ha previsto la registrazione di spettri nel range compreso tra 0 e 20 °2 θ , mentre la TGA nel caso dei solidi lamellari in forma secca (α -ZrP) ha previsto un aumento di temperatura da RT a 1000 °C con una velocità di 10 °C/min, nel caso di solidi lamellari in forma di dispersione acquosa, ha previsto una prima rampa di temperatura da RT a 110 °C (per consentire l'evaporazione di tutta l'acqua di idratazione), un'isoterma di 30' a 110 °C e una seconda rampa di temperatura da 110 a 1000 °C con velocità di 10 °C/min.

2.3.4.2 Protocollo per l'uptake e il rilascio degli API

Protocollo di uptake

I prototipi di MPB funzionalizzate con i solidi lamellari, liofilizzati e di dimensioni 6x4 cm, sono stati pesati e immersi in una soluzione di API (CLO DG 20% (0,4 M) / Preventia® tal quale) in un volume opportuno (20 ml) a ricoprirli interamente, in condizioni di temperatura (20°C) e umidità (50%) mimanti le condizioni di sala operatoria, per 15' (tempo necessario all'uptake degli attivi nei solidi). I provini sono stati quindi prelevati, sgocciolati per 20'' e depositi su una nuova petri e pesati. Il carico di API è stato ottenuto per via gravimetrica, tramite la differenza di peso tra la membrana secca e la stessa post imbibizione e noti quindi il quantitativo di soluzione assorbita e la sua concentrazione, ed espresso come peso su area di membrana (mg/cm²). Tale carico è stato successivamente verificato tramite i dati di rilascio.

Sono stati testati alcuni dei prototipi ottenuti nel paragrafo 3.6.3.3, ovvero MPB caricate con diversi tipi e diverse concentrazioni di ZrP (essendo CLO e PHMB caricabili solo su zirconio fosfato), singolarmente o come mix, depositi su un solo lato della membrana con la soluzione di biocolla a base di CH MMW (vedi Tabella 4). Sono state testate anche una membrana con sola biocolla e una membrana nativa, come controlli. Ogni campione è stato analizzato in triplicato.

Tabella 4. Campioni analizzati nei test di uptake e rilascio per CLO DG e PHMB

Campione	Identificativo
MPB tal quale	m tq
MPB con CH 2%	m CH

MPB con CH + α -ZrP 2%	m ZrP
MPB con CH + ZrP nano 12%	m ZrP nano
MPB con CH + ZrP-tris 18%	m ZrP-tris
MPB con CH + mix solidi 39%	m mix

Nel caso della Vancomicina invece, al fine di incrementare la sensibilità del metodo sperimentale, la procedura di uptake ha previsto il contatto di frammenti di MPB in 5 ml di soluzione Vanco 50 mg/ml in tampone fosfato per 15' all'interno di matracci, a 20 °C e 50 % UR. Dopo questo tempo di contatto, i matracci sono stati capovolti e svuotati del liquido di uptake, lasciando i frammenti di membrana all'interno. Il carico di API è stato ottenuto sempre per via gravimetrica ed espresso come peso su area di membrana (mg/cm²). In questo caso, essendo Vanco una molecola anfotera e in quanto tale intarcalabile sia su LDH che su zirconio fosfato, è stata testata una MPB caricata con entrambi i solidi lamellari (MgAlCO₃ 1% e ZrP 2%) e con la soluzione di biocola a base di CH MMW (vedi Tabella 5). È stata testata anche una membrana nativa, come controllo. Ogni campione è stato analizzato in triplicato.

Tabella 5. Campioni analizzati nei test di uptake e rilascio per Vanco

Campione	Identificativo	Area totale campione (cm ²)	Peso totale campione (mg)
MPB tal quale	m tq	51,1	748
MPB con CH + MgAlCO ₃ 1% + α -ZrP 2%	m mix	42,5	723

Protocollo di rilascio

I campioni ottenuti dallo step di uptake degli API sono stati posti ognuno in una piastra petri e immersi in 20 ml di una soluzione sodio acetato pH 6,5 (per CLO DG) / tampone PBS pH 7,4 per PHMB), le piastre sono state sigillate e poste in camera climatica a 37 °C e 60% UR. Ad intervalli di tempo regolari (ogni 24 ore) il fluido di rilascio è stato prelevato e rimpiazzato con nuovo fluido, termostato alla stessa temperatura. La cinetica di rilascio degli API dalla membrana è stata valutata per un periodo totale di 7 giorni. Il liquido di rilascio è stato analizzato tramite spettrofotometro UV-vis, per determinare la concentrazione di antimicrobico rilasciato nel tempo, previo ottenimento di un'opportuna retta di taratura dello strumento. Dalle assorbanze (Abs) ottenute ai vari tempi, si è risalito alla concentrazione molare di API grazie alla retta di taratura ottenuta. Da tale concentrazione molare si è ottenuta la concentrazione di API e in mg/ml e in normalizzata rispetto all'uptake (%). Dal valore in mg/ml è stato ottenuto, noto il volume dei prelievi, il quantitativo effettivo di API rilasciato (mg), e da questo, nota l'area della membrana, la concentrazione di API su area di membrana (mg/cm²) e da questa la media giornaliera di rilascio (mg/die/cm²). La curva di rilascio di ogni API è stata ottenuta esprimendo la [API] in mg/cm² o in percentuale sull'uptake in funzione del tempo. Ogni valore è stato espresso come media con deviazione standard.

Nel caso della Vancomicina invece, i matracci contenenti i frammenti di MPB sono stati riempiti con tampone PBS pH 7,4 e posti in camera climatica a 37 °C e 60% UR. Ad intervalli di tempo regolari (ogni 60 ore) il fluido di rilascio è stato interamente prelevato e rimpiazzato con nuovo fluido, termostato alla stessa temperatura. La cinetica di rilascio degli API dalla membrana è stata valutata per un periodo totale di 20 giorni. Il liquido di rilascio è stato analizzato tramite spettrofotometro UV-vis, e, previo ottenimento di un'opportuna retta di taratura dello strumento, è stata ottenuta la concentrazione molare di Vanco nel tempo e da questa la [API] in mg/cm².

Ottenimento della retta di taratura per la rilevazione UV-vis degli API

La retta di calibrazione per CLO DG ($\lambda_{\max}=254$ nm) è stata ottenuta analizzando per via spettrofotometrica diverse concentrazioni di questo API a partire dalla soluzione madre 20% w/v (da $5 \cdot 10^{-5}$ M a $1 \cdot 10^{-6}$ M) in tampone acetato pH 6,5. Le Abs₂₅₄ sono state espresse in funzione della [CLO DG] e dai punti è stata ottenuta una retta di fitting.

La retta di calibrazione per PHMB ($\lambda_{\max}=236$ nm) è stata ottenuta analizzando per via spettrofotometrica diverse concentrazioni di questo API a partire dalla soluzione madre 0,1% w/v (da 0,00005% a 0,00004%) in tampone PBS pH 7,4. Le Abs₂₃₆ sono state espresse in funzione della [PHMB] e dai punti è stata ottenuta una retta di fitting.

La retta di calibrazione per Vancomicina ($\lambda_{\max}=280$ nm) è stata ottenuta analizzando per via spettrofotometrica diverse concentrazioni di questo API a partire dalla soluzione madre 6 mg/ml (da 0,01 mg/ml a 0,7 mg/ml) in tampone PBS pH 7,4. Le Abs₂₈₀ sono state espresse in funzione della [Vanco] e dai punti è stata ottenuta una retta di fitting.

2.3.5 Metodi per lo studio dell'attività antibiofilm complessiva del prototipo ottenuto

2.3.5.1 Test antibiofilm verso *Candida parapsilosis*

L'analisi è stata eseguita sui campioni di MPB funzionalizzate con diversi tipi di chitosano, ad alto, medio o basso peso molecolare e con chitosano più solidi lamellari, singoli o in mix, pre e post-uptake di clorexidina digluconato. È stata valutata anche la membrana nativa come controllo negativo (vedi Tabella 6). Ogni campione è stato analizzato in triplicato.

*Tabella 6. Campioni analizzati nei test anti-biofilm verso *C. parapsilosis**

Campione	Identificativo
MPB tal quale	A 1-3
MPB con CH HMW 2%	B 1-3
MPB con CH MMW 2%	C 1-3
MPB con CH LMW 2%	D 1-3
MPB con CH 2% + MgAlCO ₃	E 1-3
MPB con CH 2% + MgAlCO ₃ + CLO DG	EC 1-3
MPB con CH 2% + α -ZrP	F 1-3
MPB con CH 2% + α -ZrP + CLO DG	FC 1-3
MPB con CH 2% + ZrP nano	G 1-3
MPB con CH 2% + ZrP nano + CLO DG	GC 1-3
MPB con CH 2% + ZrP-tris	H 1-3
MPB con CH 2% + ZrP-tris + CLO DG	HC 1-3
MPB con CH 2% + mix solidi	I 1-3
MPB con CH 2% + mix solidi + CLO DG	IC 1-3
MPB con CH 2%	L 1-3
MPB con CH 2% + CLO DG	LC 1-3

I campioni di MPB con solo CH (B,C,D) sono stati ottenuti per immersione dei provini nelle soluzioni di adesione per 1' e poi liofilizzati. Quelli con CH + solidi lamellari (E,F,G,H,I) e solo CH per confronto (L) sono stati ottenuti con la procedura di bar-coating descritta al punto 1.6.3.3. Quelli con CH + solidi lamellari + CLO DG (EC,FC,GC,HC,IC,LC) sono stati ottenuti con una procedura identica a quella descritta al punto 1.6.4.2 (Uptake), ma invece di essere sottoposti a test di rilascio, sono stati direttamente liofilizzati dopo l'uptake. Una volta secco, di ogni campione è stato ottenuto

un dischetto di 1 cm di diametro tramite una fustellatrice. I provini sono stati chiusi ermeticamente in busta in alluminio e sottoposti a sterilizzazione via irradiazione con raggi γ .

Il ceppo di *Candida parapsilosis* T210U è stato inizialmente pre-inoculato in brodo YPD supplementato con cloramfenicolo (0,5 g/L) e incubato a 37 °C con agitazione per 22–24 ore. Al termine dell'incubazione, la crescita cellulare è stata valutata mediante misurazione della densità ottica a 600 nm (OD_{600}) e le cellule sono state successivamente diluite in terreno RPMI-1640 tamponato con MOPS (pH 7,0 $\pm$ 0,2) fino a raggiungere un' OD_{600} pari a 0,1.

La capacità dei ceppi di formare biofilm è stata valutata analizzando ogni provino in triplicato. Un volume noto della sospensione cellulare standardizzata è stato quindi trasferito in piastre multiwell da 12 pozzetti (2 mL per pozzetto). In ciascun pozzetto è stato inserito un provino sterile, posizionato con il lato rivestito (coating) rivolto verso l'alto e quello non rivestito verso il fondo. Le piastre sono state incubate a 37 °C per 24 ore per consentire l'adesione iniziale delle cellule e la maturazione del biofilm.

Al termine dell'incubazione, i provini sono stati prelevati mediante pinzette sterili e lavati due volte con acqua sterile per rimuovere le cellule non aderenti. I campioni sono stati quindi trasferiti su una nuova piastra multiwell sterile, sottoposti a liofilizzazione, fissati su stub per microscopia elettronica a scansione (SEM) mediante adesivo al carbonio, soffiati con aria compressa per rimuovere particolato non aderente e successivamente metallizzati. L'analisi SEM è stata quindi eseguita per osservare la formazione del biofilm.

Parallelamente, i terreni residui nei pozzetti sono stati sottoposti a lettura della densità ottica per verificare la crescita microbica. Dopo la rimozione del terreno, il fondo dei pozzetti è stato colorato con una soluzione di cristal violetto allo 0,1% per 15 minuti a temperatura ambiente. I pozzetti sono stati quindi lavati con acqua deionizzata per rimuovere il colorante in eccesso e osservati al microscopio ottico, al fine di valutare la presenza di biofilm sul fondo come controllo della crescita sulle superfici dei provini.

È stata tentata la colorazione dei provini di MPB con lo stesso colorante ma si è osservato che questo si lega in modo aspecifico al collagene della MPB, non permettendo di discriminare le cellule fungine.

2.3.5.2 Test antibiofilm verso *Staphylococcus epidermidis*

L'analisi è stata eseguita sui campioni di MPB funzionalizzata con biocolle e solidi lamellari e sulla membrana tal quale come riferimento (vedi Tabella 7). Ogni campione è stato analizzato in triplicato.

Tabella 7. Campioni analizzati nei test anti-biofilm verso *S. epidermidis*

Campione	Identificativo
MPB tal quale	RIF
MPB con CH 2% - COL 0,5% + mix solidi	M
MPB tal quale controllo senza ceppo	RIF ₀
MPB con CH 2% - COL 0,5% + mix solidi controllo senza ceppo	M ₀

I campioni di MPB con CH-COL e solidi lamellari sono stati ottenuti con la procedura descritta al punto 1.6.3.3. Di ogni campione è stato ottenuto un dischetto di 1 cm di diametro tramite una fustellatrice. I provini sono stati chiusi ermeticamente in busta in alluminio e sottoposti a sterilizzazione via irradiazione con raggi γ .

L'analisi microbiologica è stata eseguita ispirandosi alla norma tecnica ISO 4768 [152] che descrive un metodo per la determinazione di attività anti-biofilm su plastiche e superfici non porose, opportunamente adattata alla tipologia dei campioni oggetto di test.

Il ceppo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 6538 è stato preparato con le condizioni descritte dalla norma UNI EN 12353:2021 [153], messo in coltura liquida overnight a 37°C in agitazione in terreno TSB (Tryptic Soy Broth) e il giorno successivo, dopo misurazione dell'assorbanza (OD₆₀₀) è stata preparata una sospensione del ceppo compresa tra $1,0 \cdot 10^4$ - $1,0 \cdot 10^5$ UFC/ml in terreno TSB. Questa sospensione è stata piastrata in piastra multiwell da 96 pozzetti insieme alle MPB trattate (M) e non trattate (RIF), la piastra è stata incubata a 37°C per 48 ore. Sono stati inseriti nel test anche dei controlli sempre in triplicato consistenti nelle membrane incubate con solo terreno TSB senza aggiunta del ceppo (M₀ e RIF₀). Dopo 24 ore di incubazione è stato rimosso da tutti i pozzetti una parte di terreno esausto e sostituito con terreno TSB fresco, e la piastra reincubata per le altre 24 ore. Terminato il tempo di incubazione, le membrane sono state rimosse dai pozzetti con pinzette sterili e lavate in acqua sterile per rimuovere l'eccesso di terreno e le cellule non adese. L'eventuale biofilm adeso sulle membrane è stato recuperato tramite scraping, colorato con cristal violetto 0,1% per 30 minuti a temperatura ambiente, risospeso in un piccolo volume di acqua e centrifugato a 6000 rpm per 10 minuti. I lavaggi con acqua e i passaggi in centrifuga sono stati ripetuti fino a quando il surnatante è diventato limpido ed è comparso un pellet sul fondo della provetta. Tutto il surnatante è stato rimosso e il pellet è stato lasciato asciugare sotto cappa a flusso laminare, risospeso in SDS 1%, vortexato e lasciato a temperatura ambiente per 10 minuti. Sono state eseguite misurazioni allo spettrofotometro (OD₆₀₀) sia dei controlli sia dei campioni. Di ogni campione e controllo sono state eseguite tre misurazioni e i dati riportati sono la media delle tre. Come bianco è stata usata la OD₆₀₀ dell'SDS 1%.

La condizione di validità del test è che il titolo del ceppo microbico dopo 48 ore di incubazione a 37°C non risulti inferiore a $1,0 \times 10^6$ UFC/ml. L'attività anti-biofilm è stata determinata comparando i valori medi di assorbanza misurati nel trattato rispetto al controllo, e nello specifico sottraendo alla misurazione dell'assorbanza media ottenuta dal campione inoculato con il ceppo la misurazione dell'assorbanza del campione inoculato con terreno di crescita TSB.

$$\% \text{ di inibizione del biofilm} = (1 - (A/B)) * 100$$

Dove A = valore medio di assorbanza calcolato sui 3 replicati del campione trattato (M) dopo sottrazione del bianco (M₀) e B = valore medio di assorbanza calcolato sui 3 replicati del controllo negativo (RIF) dopo sottrazione del bianco (RIF₀).

3. Risultati e discussione

3.1 Caratterizzazione chimico-fisica e funzionale della MPB

Aspetto di una membrana in pericardio bovino (MPB) in forma umida e in forma secca (Figura 28).



Figura 28. Immagine di MPB in forma umida e in forma secca

Nella Figura 29 l’analisi termogravimetrica di uno dei campioni di MPB in forma umida, con riportati in blu la perdita di peso (%) e in rosso il flusso di calore (mW).

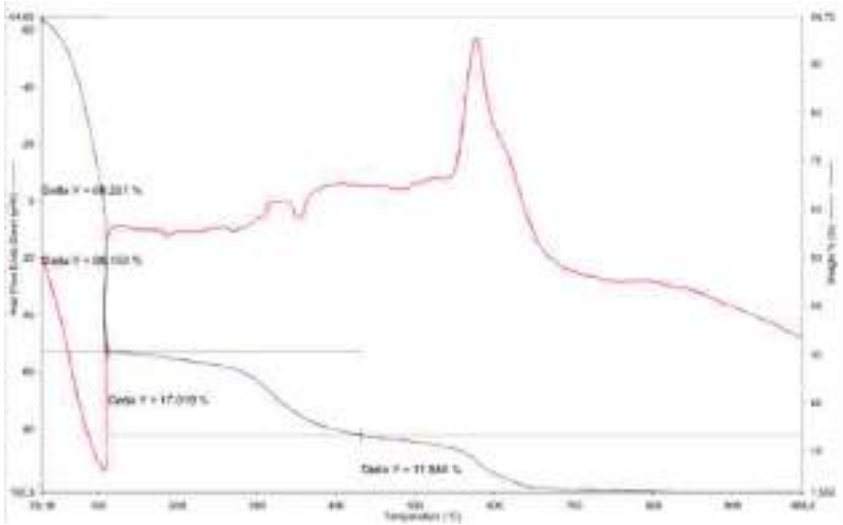


Figura 29. Analisi termogravimetrica di una MPB umida

La Tabella 8 di seguito riportata presenta i risultati della caratterizzazione delle MPB.

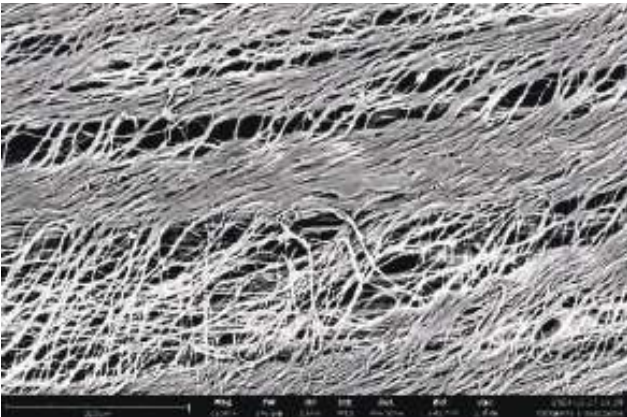
Tabella 8. Caratterizzazione chimico-fisica delle MPB

	MPB secca	MPB umida
Peso specifico (mg/cm²)	12,7±4,2	66,3±7,2
Spessore (mm)	0,250±0,100	0,220±0,100
Capacità di idratazione (%)	340±70	-
Capacità di disidratazione (%)	-	77±10
Umidità relativa (UR%)	70,2±5	Vedi paragrafo 3.6.2

Dalla capacità di idratazione si ottengono risultati notevoli, in quanto come di evince la MPB è in grado di assorbire acqua fino a più di 3 volte il suo peso secco, comportandosi come una “spugna” e con importanti prospettive per l’assorbimento delle soluzioni di API d’interesse.

La micro-struttura e la composizione elementare delle MPB ottenute tramite SEM ed EDX sono riportate in Figura 29 e 30 rispettivamente.

1500x



1000x

1000x



1000x

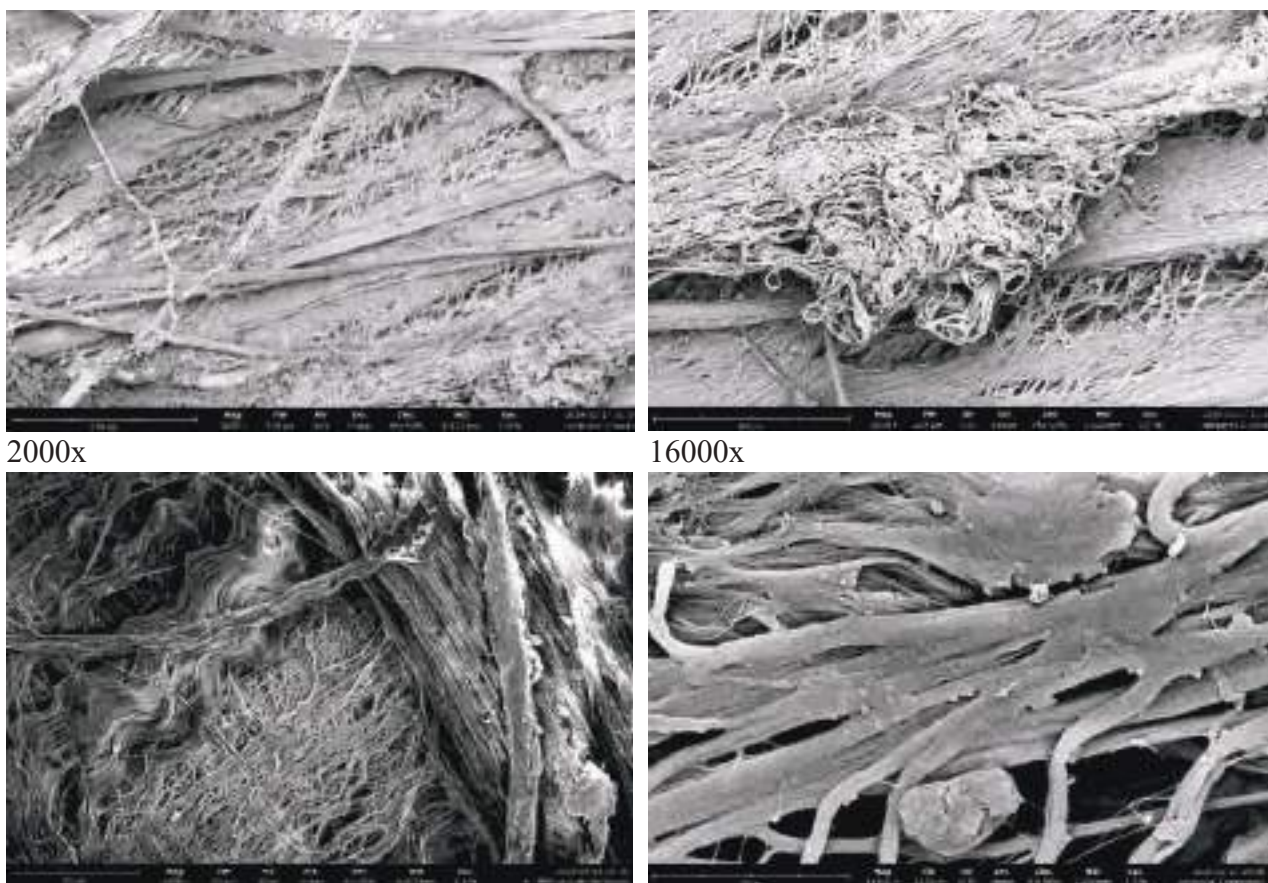


Figura 30. Immagini SEM a vari ingrandimenti delle MPB

Dalle immagini riportate in Figura 30 si può osservare come la MPB sia costituita da una struttura filamentosa con lunghe fibre di collagene di tipo I, quelle più spesse (circa 1-10 μm), lunghe e lineari, ed elastina, più rappresentate, arricciate e sottili (spessore fino a 1 μm).

L'analisi EDX (Figura 31) permette di evidenziare come i campioni siano costituiti essenzialmente dai classici elementi costitutivi delle macromolecole biologiche: C, N ed O.

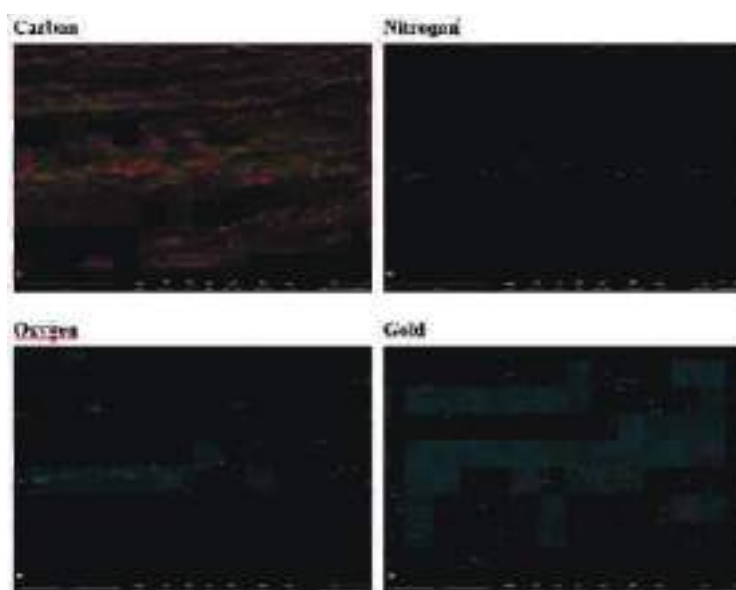


Figura 31. Caratterizzazione EDX delle MPB

3.2 Ricerca e sviluppo di metodi per il conferimento alla MPB di struttura 3D

3.2.1 Metodi per l'essiccamento

Per quanto riguarda lo studio delle modalità ottimali di essiccamento delle MPB, come si può osservare dalle Figure 32 e 33, relative all'aspetto visivo e alla microstruttura dei campioni a seguito delle procedure A-D, il trattamento migliore, che mantiene le proprietà strutturali della membrana inalterate, è la liofilizzazione (C). In tutti gli altri casi (trattamento con acetone A, essiccatore con P_2O_5 B, condizioni ambientali D), l'eccessiva disidratazione delle fibre porta a una completa perdita della loro integrità strutturale, spiegando anche l'aspetto macroscopico "plastificato" dei campioni.

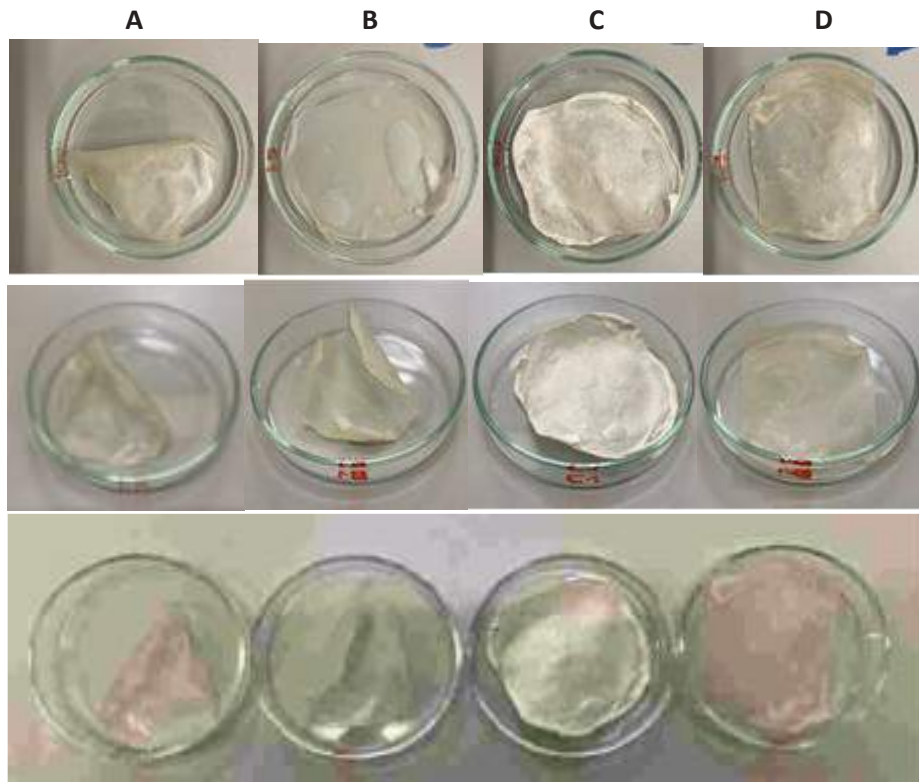
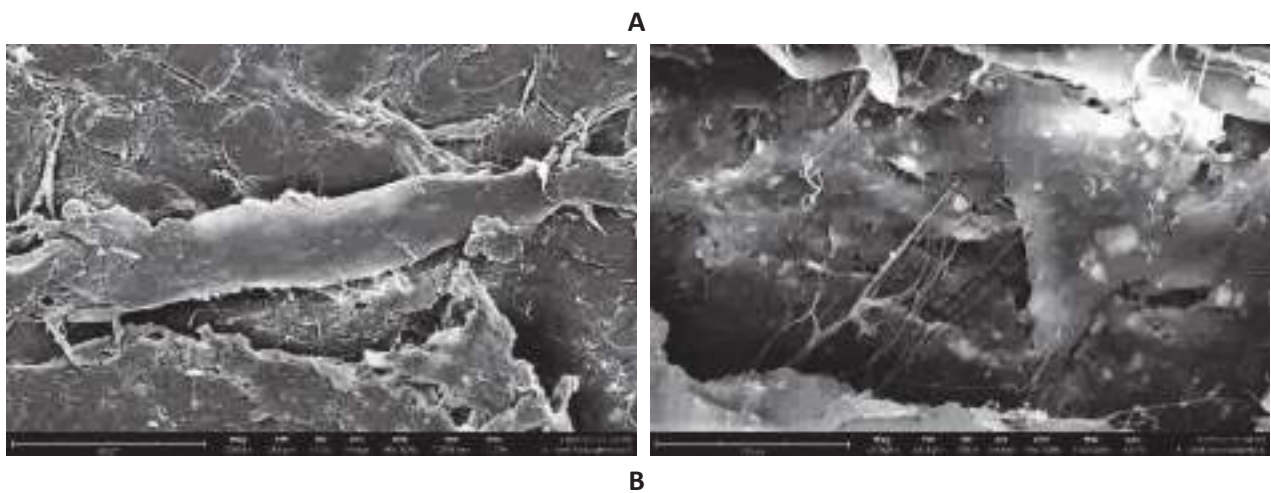


Figura 32. Aspetto visivo dei campioni di MPB a seguito delle procedure di essiccamento tramite acetone (A), essiccatore (B), liofilizzazione (C) e in condizioni ambientali (D)



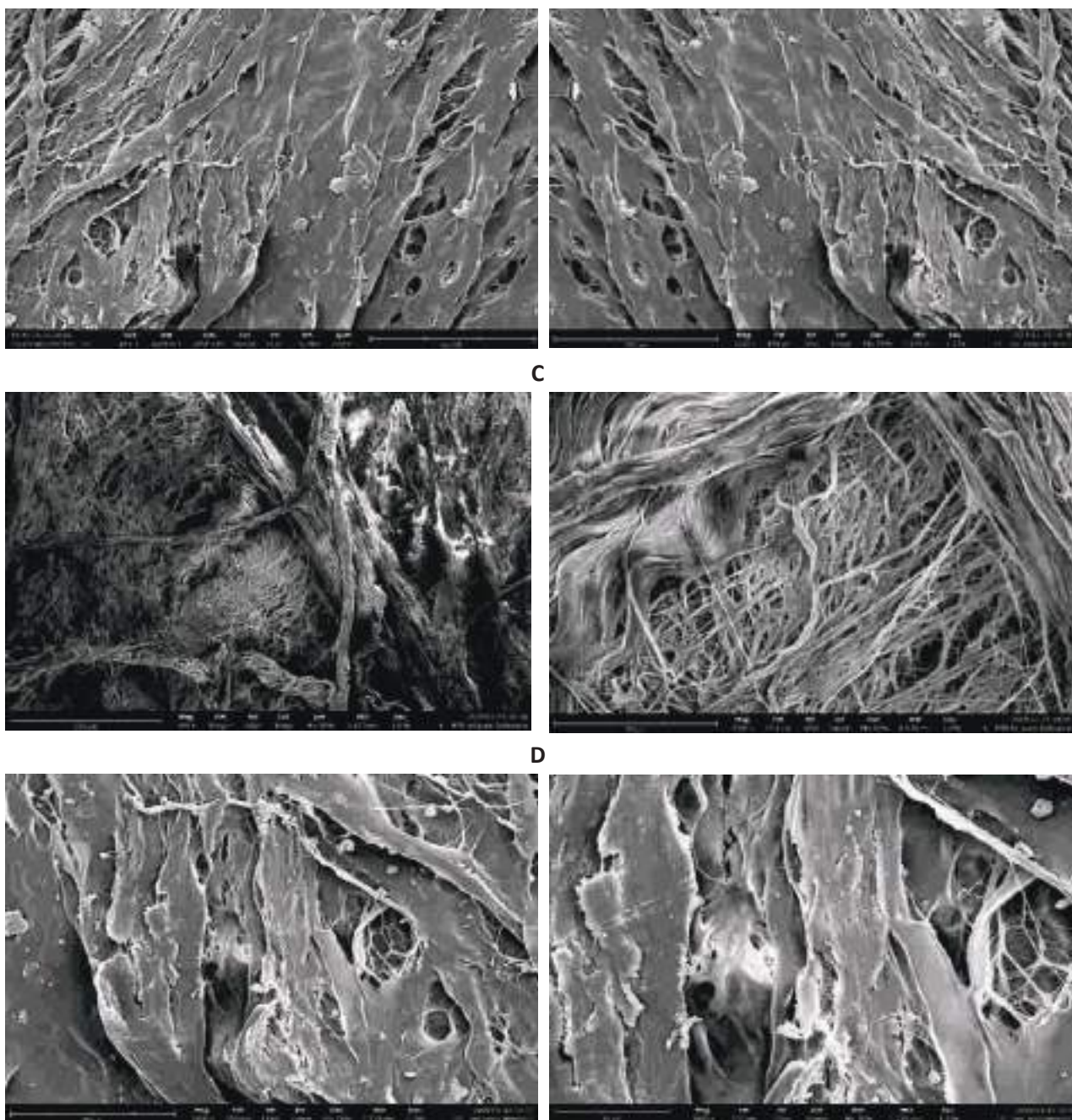
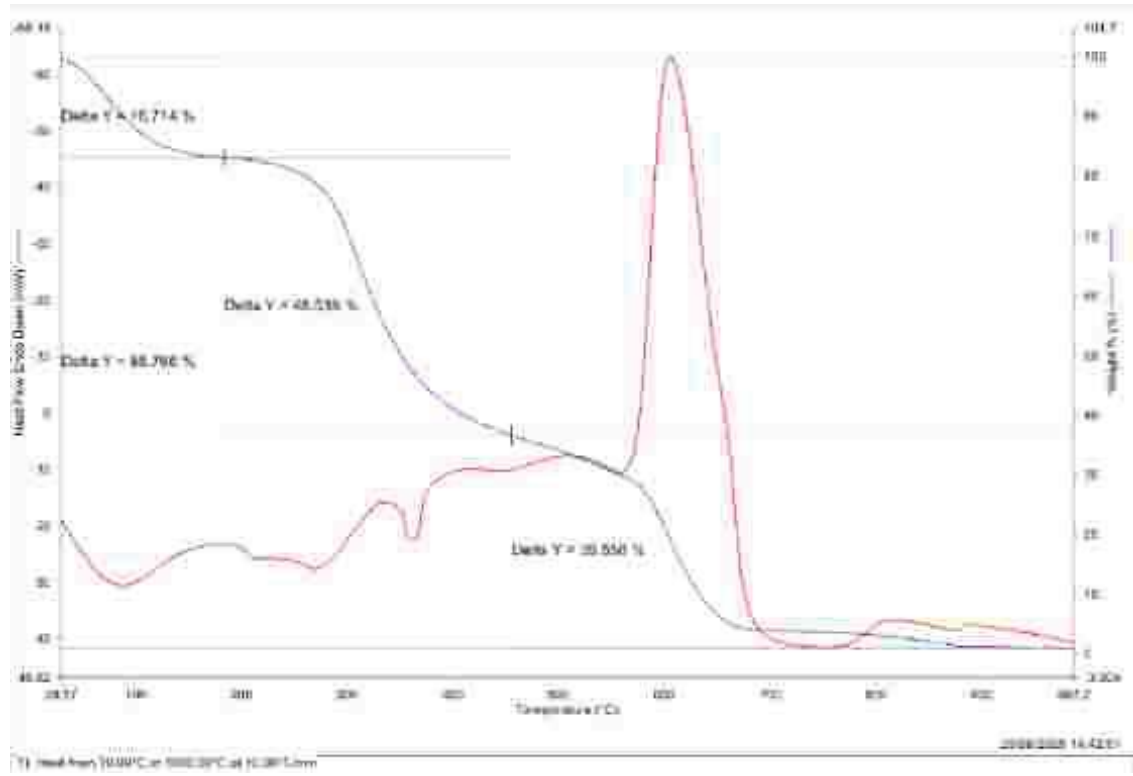


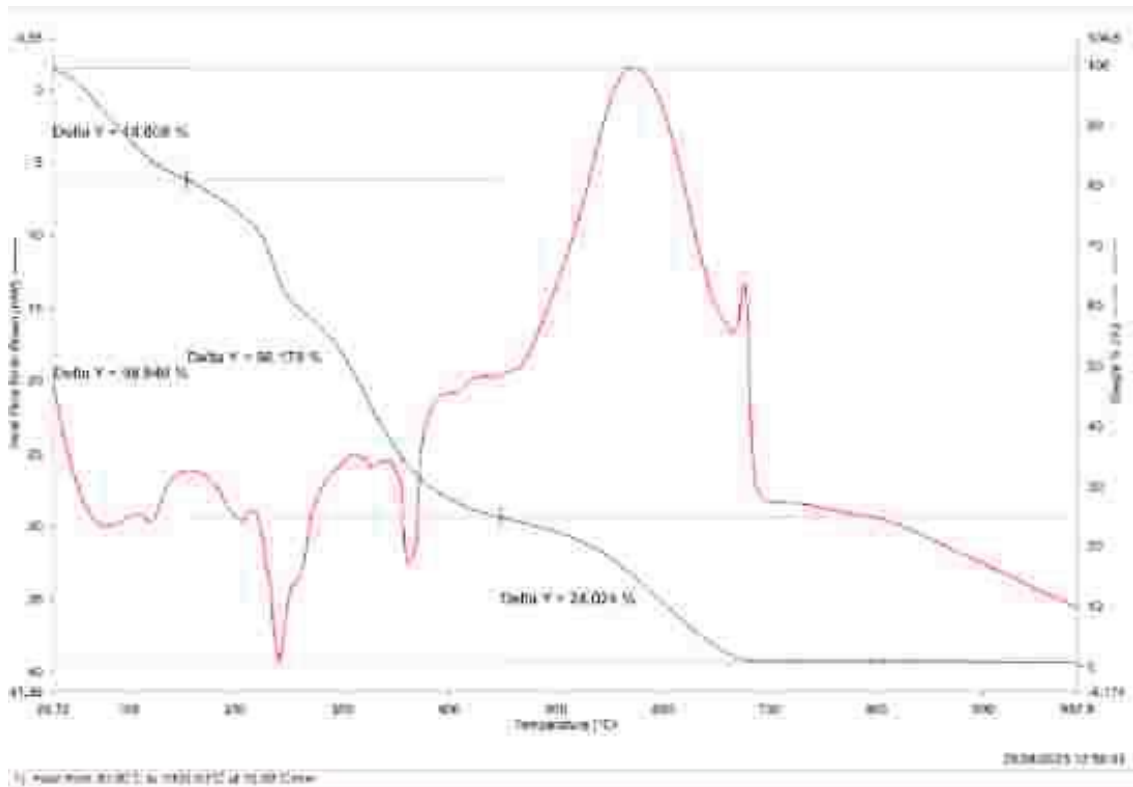
Figura 33. immagini SEM dei campioni di MPB a seguito delle procedure di essiccamento tramite acetone (A), essiccatore (B), liofilizzazione (C) e in condizioni ambientali (D)

L'analisi termogravimetrica TGA (Figura 34) ha confermato i dati ottenuti fornendo dei valori di umidità relativa (UR%), riportati in Tabella 9, che sono maggiori per i campioni sottoposti alle procedure A, B, D ($UR\% > 16\%$), e che infatti risultano eccessivamente disidratati visivamente e da analisi SEM rispetto alla procedura C ($UR\% = 12\%$). Anche i valori dello spessore mostrano un trend in concordanza con i dati ottenuti, essendo questo maggiore per i campioni A, B, D rispetto allo C.

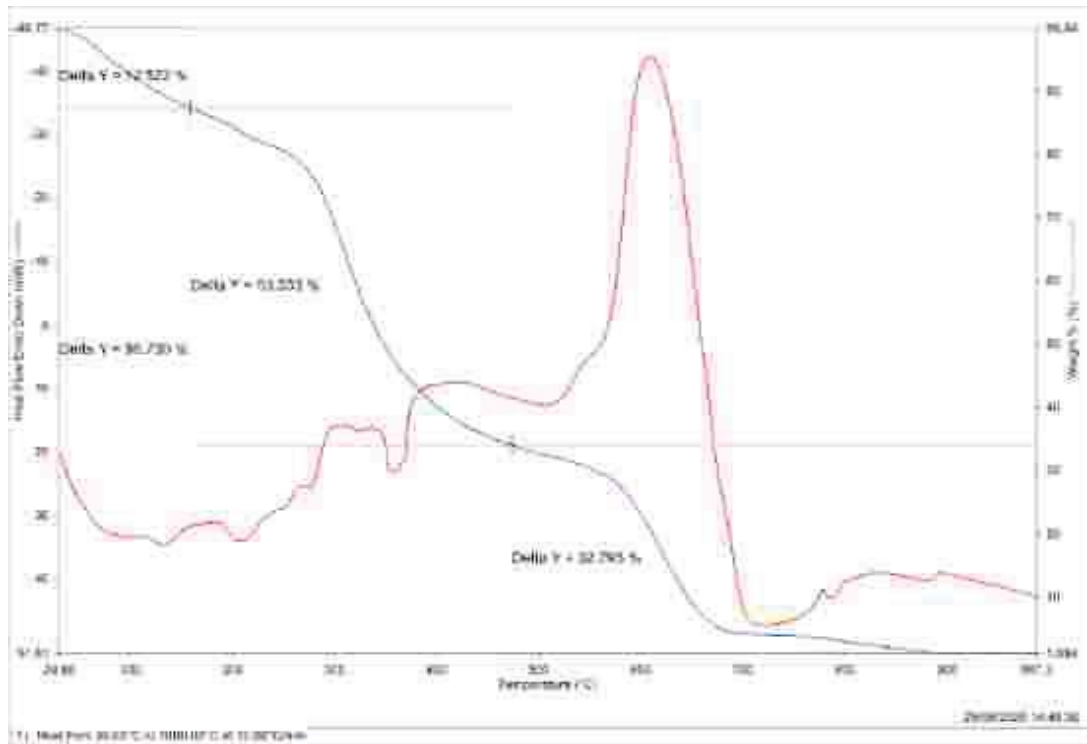
A



B



C



D

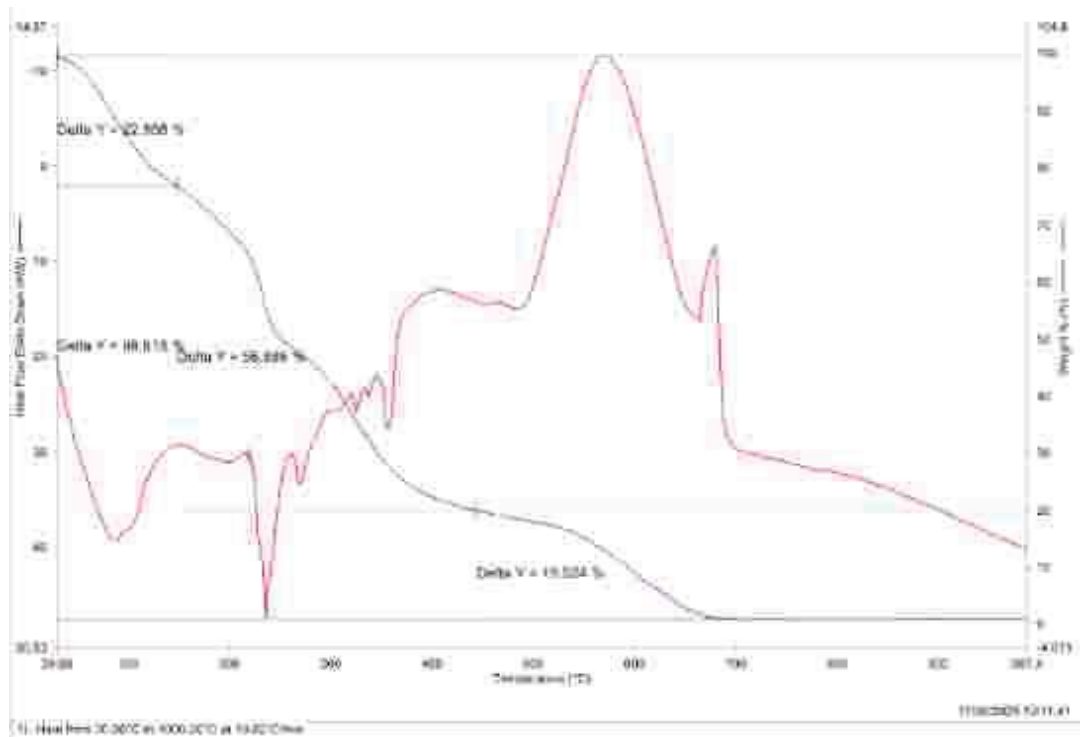


Figura 34. Analisi termogravimetrica delle MPB sottoposte alle prove di essiccamento A-D

Tabella 9. Umidità relativa (UR %) e spessore (mm) dei campioni sottoposti ad essiccamento (A-D)

Prova essiccamento	UR (%)	Spessore (mm)
A	16,5±2	0,390±0,100
B	18,0±2	0,430±0,100
C	12,7±2	0,250±0,100
D	22,6±3	0,420±0,100

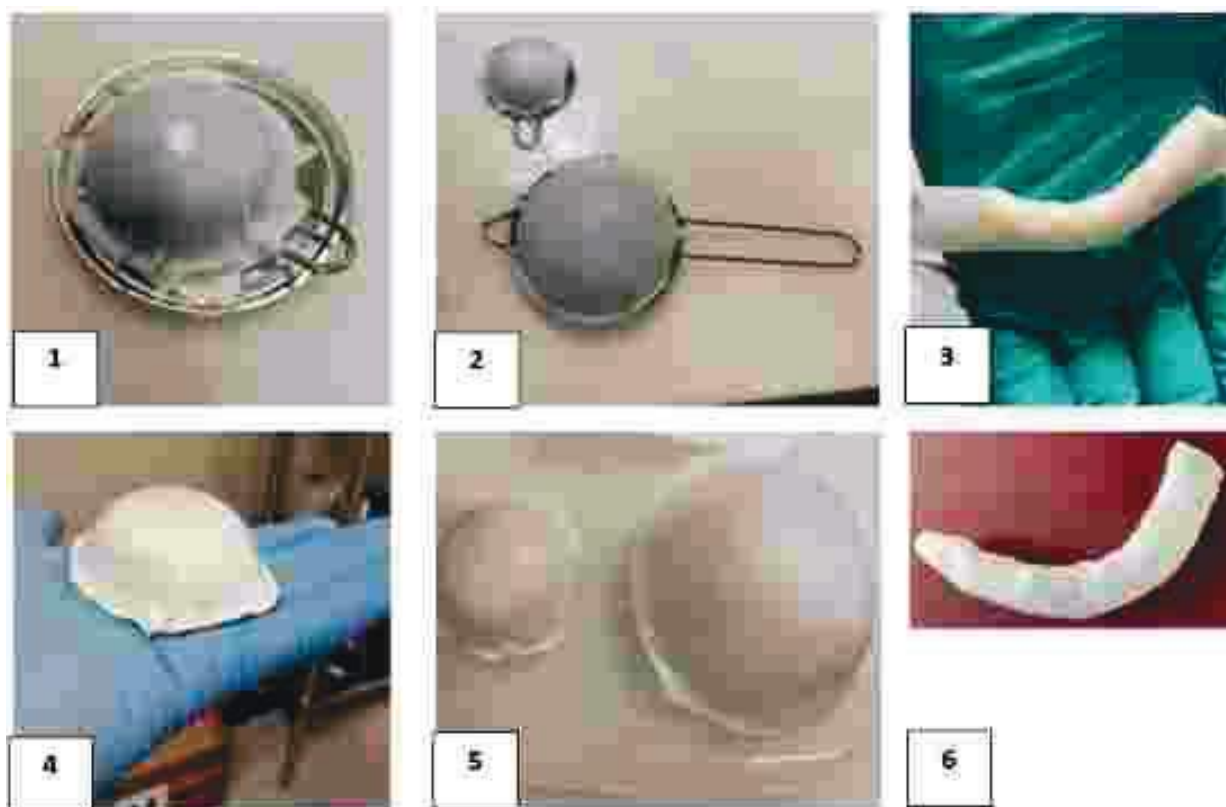


Figura 35. Immagini delle MPB su dime 1) a cupola piccola, 2) a cupola grande e 3) ad arco, dopo liofilizzazione: la conformazione 3D conferita dalla dima è mantenuta dalla MPB secca

La liofilizzazione è stata quindi selezionata come metodo di elezione per l'essiccamento delle MPB e in quanto tale è stata sempre utilizzata a seguito dei test di reticolazione e di adesione dei solidi analizzati in dettaglio nei paragrafi successivi.

Dal processo di liofilizzazione delle membrane direttamente su dima si è osservato che le stesse mantengono, da secche, la struttura 3D conferitagli (vedi Figura 35). È inoltre confermata l'idoneità dei materiali usati per le dime (acciaio inox e plastica PA12), nel mantenimento delle proprietà strutturali del PB. Chiaramente, il mantenimento della forma 3D non permane però in ambiente umido e perciò sono necessari trattamenti reticolanti.

3.2.2 Metodi per il cross linking

In Tabella 10 sono riportati i risultati della reticolazione effettuata sulle MPB tal quali (campioni A-B-C) e su quelle rivestite con CH HMW (campioni HA-HB-HC) e con CH MMW (campioni MA-MB-MC) con TPP, con GLU (controllo positivo) e non reticolate (controllo negativo).

Per quanto riguarda l'aspetto visivo e la rigidità, si può osservare dalla Tabella 10, che solo nel caso della GLU si ha una colorazione gialla e un irrigidimento delle membrane rispetto a quelle non trattate. Per quanto riguarda l'aumento di peso dovuto all'assorbimento di acqua dopo 24h, si può osservare che, come rappresentato nel grafico in Figura 37, all'interno di ogni serie di campioni (CH HMW, CH MMW e MPB tal quali), nel caso del trattamento con TPP si ha un aumento di peso superiore a quello che si ha nel caso del trattamento con GLU, ma minore rispetto ai campioni non trattati, indicando una reticolazione più blanda di quella con GLU ma che permette di avere risultati in termini di assorbimento di acqua migliori rispetto ai campioni non trattati. Confrontando invece i risultati ottenuti per MPB rivestite con CH o tal quali, si hanno risultati migliori in termini di assorbimento di acqua (minore aumento di peso %) per le membrane trattate con CH rispetto a quelle

non rivestite, ad indicare un effetto sinergico della reticolazione del collagene di membrana e del chitosano del coating.

Tabella 10. Valori di W_0 , W_{24h} , $W\%$, rigidità e aspetto dei campioni di membrane con CH HWM, MMW e tal quali trattati con TPP, GLU e bianchi.

Nome campione	Trattamento	W_0 (g)	W_{24h} (g)	$W\%$	Media $W\%$	SD $W\%$	Rigidità	Aspetto
HA1	bianco	0,317	1,1109	351	356	4	2	bianco
HA2	bianco	0,281	1,1005	358			2	bianco
HA3	bianco	0,210	0,7543	359			2	bianco
HB1	TPP	0,352	1,1786	335	329	7	2	bianco
HB2	TPP	0,221	0,7271	330			2	bianco
HB3	TPP	0,251	0,806	321			2	bianco
HC1	GLU	0,340	1,0363	305%	305	4	3	giallo
HC2	GLU	0,265	0,8192	309			3	giallo
HC3	GLU	0,454	1,3721	302			3	giallo
MA1	bianco	0,248	0,9069	366	361	4	2	bianco
MA2	bianco	0,303	1,09	360			2	bianco
MA3	bianco	0,306	1,0955	358			2	bianco
MB1	TPP	0,306	1,0404	340%	344	5	2	bianco
MB2	TPP	0,298	1,0192	342			2	bianco
MB3	TPP	0,287	1,0045	350			2	bianco
MC1	GLU	0,302	0,9422	312	314	5	3	giallo
MC2	GLU	0,299	0,9568	320			3	giallo
MC3	GLU	0,257	0,7992	311			3	giallo
A1	bianco	0,171	0,6296	368%	362	8	2	bianco
A2	bianco	0,203	0,7409	365			2	bianco
A3	bianco	0,199	0,7025	353			2	bianco
B1	TPP	0,202	0,7373	365	357	10	2	bianco
B2	TPP	0,220	0,792	360			2	bianco
B3	TPP	0,189	0,652	345			2	bianco
C1	GLU	0,178	0,5874	330%	325	5	3	giallo
C2	GLU	0,189	0,6142	325			3	giallo
C3	GLU	0,201	0,6452	321			3	giallo

Per quanto riguarda il mantenimento della forma a seguito di reticolazione, dalla Figura 36 si può osservare come a seguito del processo le membrane mantengano la forma 3D impostagli dalla dima. Dopo 24h in ambiente in umido invece, a differenza dell'atteso (cioè che i campioni reticolati mantengano la forma per più tempo), si osserva in tutti i casi una perdita della forma conferita dalla dima, rendendo questo metodo non particolarmente informativo del grado di cross linking (Figura 38).

In conclusione, si è ottenuto che il TPP ha un effetto sull'assorbimento di acqua da parte dei campioni di membrane migliorativo rispetto alle membrane non trattate, anche se più blando di GLU, e non da criticità a livello di variazione delle proprietà meccaniche ed elastiche del tessuto, a differenza della GLU. Tuttavia dato il mancato riscontro a livello di mantenimento della forma 3D in ambiente umido, sono necessari ulteriori studi sulle condizioni d'uso del TPP e sulla sua valutazione, anche tramite tecniche quali FTIR, TGA e SEM.

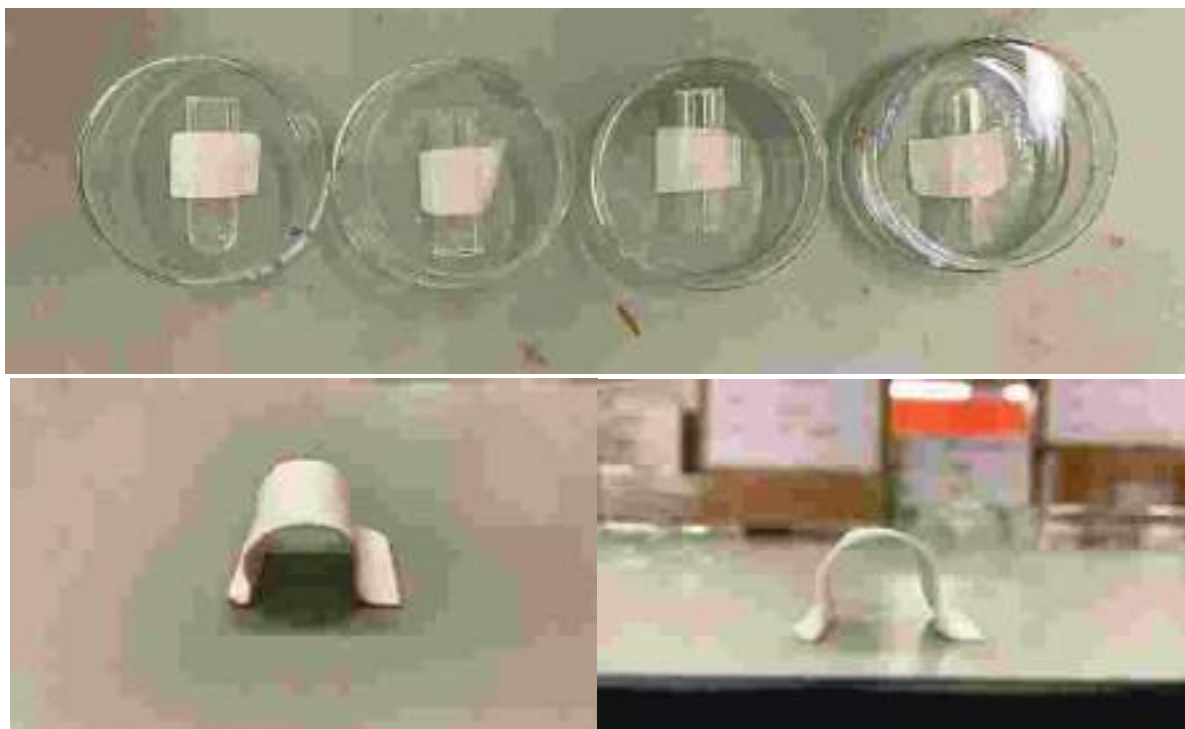


Figura 36. Alcune MPB durante il trattamento con le soluzioni di cross-linking e dopo liofilizzazione

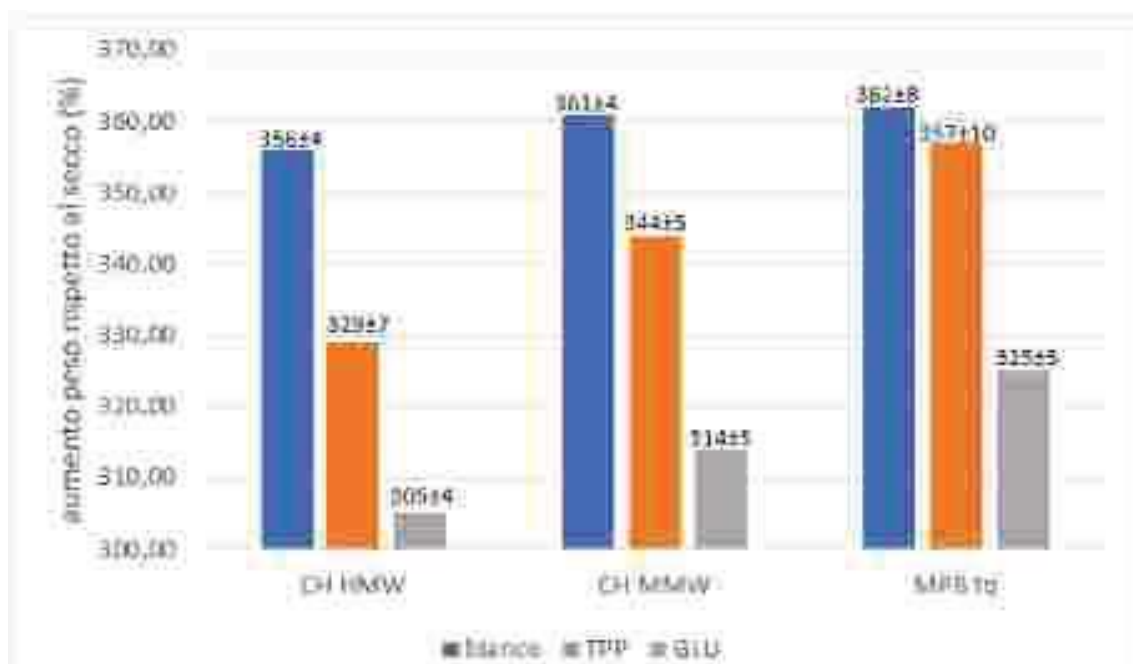


Figura 37. Aumento di peso delle MPB dopo 24 h in tampone PBS: in blu i bianchi, in arancione le membrane reticolate con TPP e in grigio le membrane reticolate con GLU

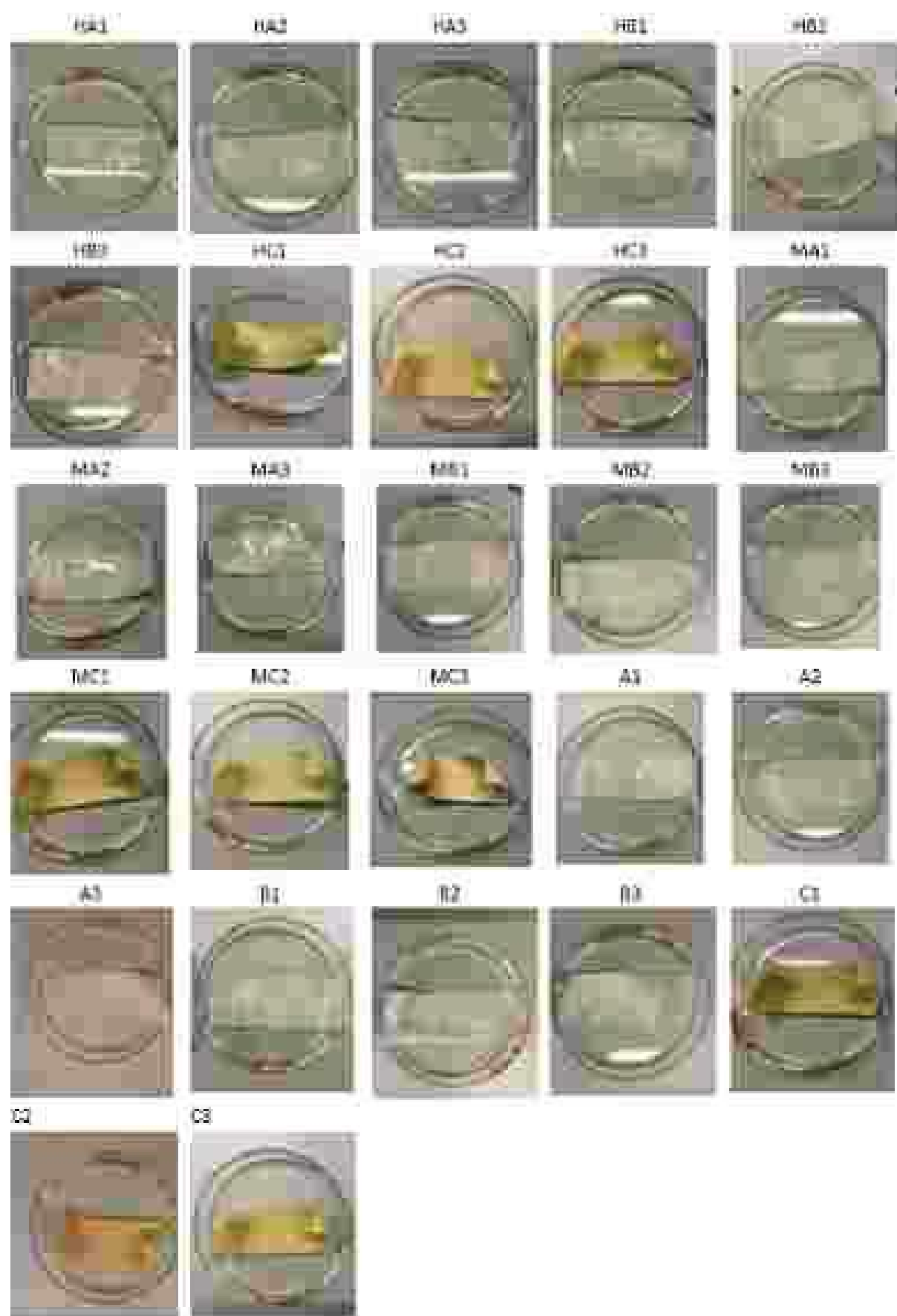


Figura 38. MPB con CH HWM, MMW e tal quali trattate con TPP, GLU e bianchi dopo 24 h in tampone PBS

3.3.1 Sintesi e caratterizzazione dei solidi lamellari

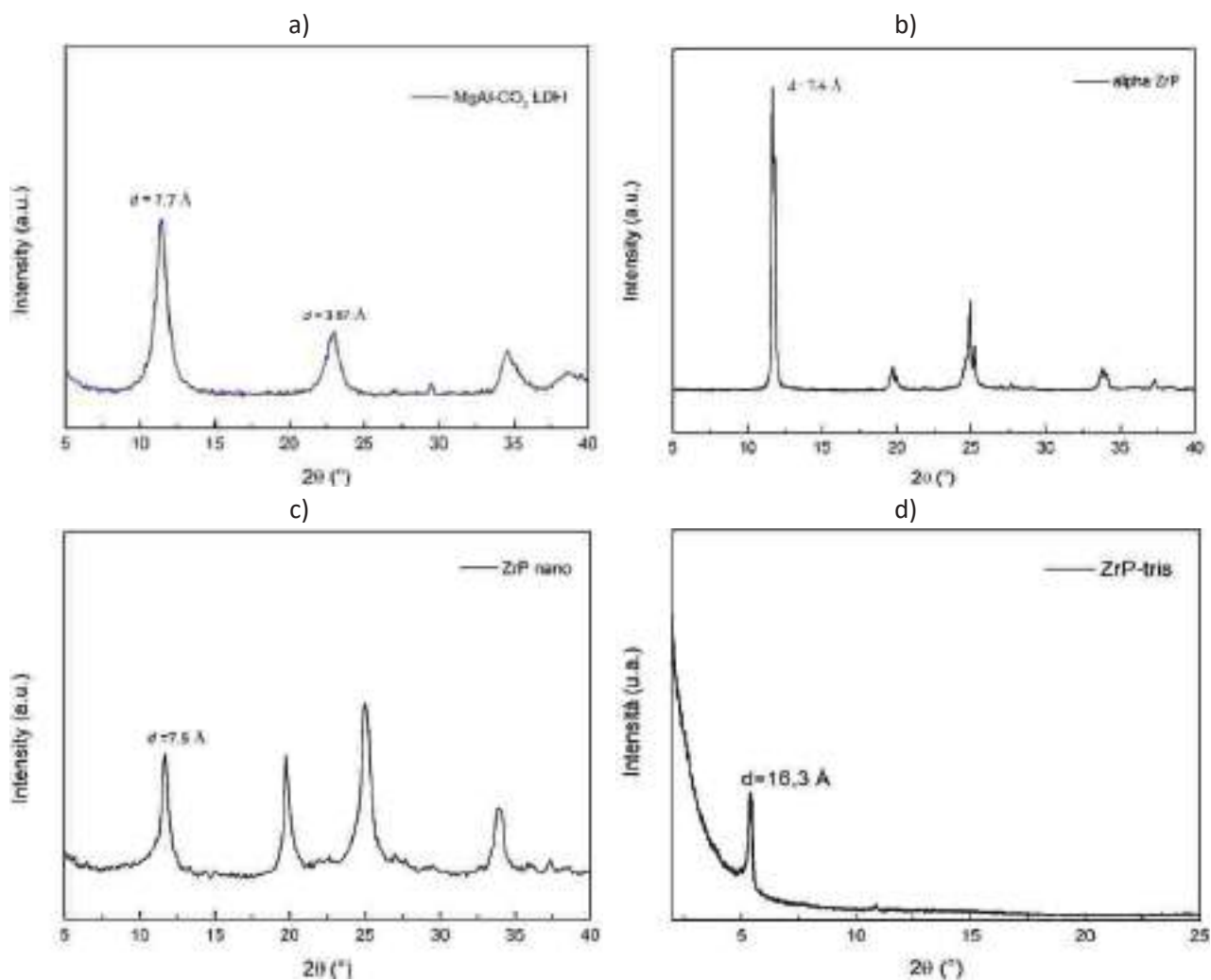


Figura 39. Spettri XRD dei solidi lamellari utilizzati a) MgAlCO_3 , b) α -ZrP, c) ZrP nano e d) ZrP-tris

Dall'analisi XRD in Figura 39 è resa evidente la struttura cristallina tipica dei solidi lamellari, con spettri con segnali di diffrazione che indicano distanze interstrato di a) 7,7 Å per l'idrotalcite MgAlCO_3 3:1, b) 7,6 Å per α -ZrP, c) 7,5 Å per ZrP nanometrico e d) 16,3 Å per ZrP-tris.

Immagini dei prodotti delle sintesi sono riportati in Figura 40.

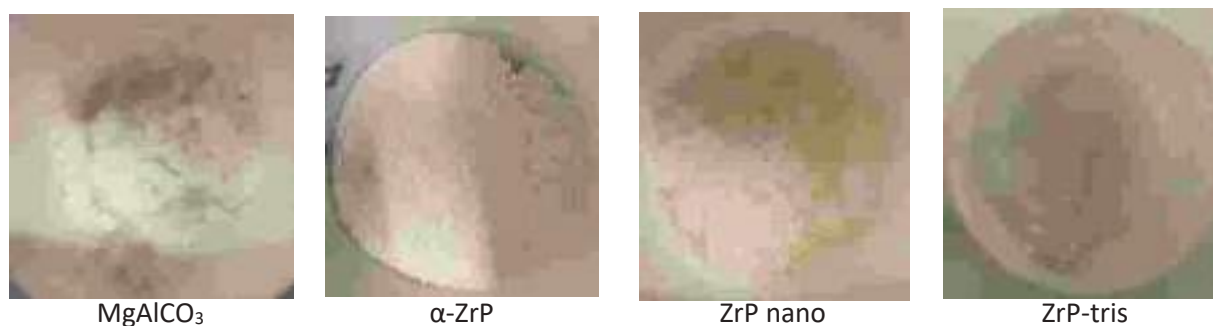


Figura 40. Aspetto macroscopico dei solidi lamellari sintetizzati

Dalle analisi dimensionali combinate (granulometria tramite diffrazione laser, DLS e BET), indicate in Tabella 11, si può osservare come idrotalcite MgAlCO_3 3:1 e α -ZrP abbiano una D_{90} di pochi micron e un'area superficiale di qualche decina di m^2/g . ZrP-tris ha D_{90} sotto al micron, mentre non

è stato possibile eseguire la BET. Per quanto riguarda ZrP nano, non è stato possibile seguire alcuna misura perché la dimensione nanometrica si mantiene solo in dispersione e per questo ci si avvale solamente dei dati SEM.

Tabella 11. Analisi dimensionali dei solidi lamellari utilizzati

solido	Dimensioni	BET (m ² /g)
MgAl-CO ₃ 3:1	D ₁₀ =3,9 μm; D ₅₀ =4,8 μm; D ₉₀ =6,1 μm	42,23
α-ZrP	D ₁₀ =1,6 μm; D ₅₀ =2,1 μm; D ₉₀ =4,8 μm	10,47
ZrP nano	-	-
ZrP-tris	D ₁₀ =0,4 μm; D ₅₀ =0,6 μm; D ₉₀ =0,8 μm	-

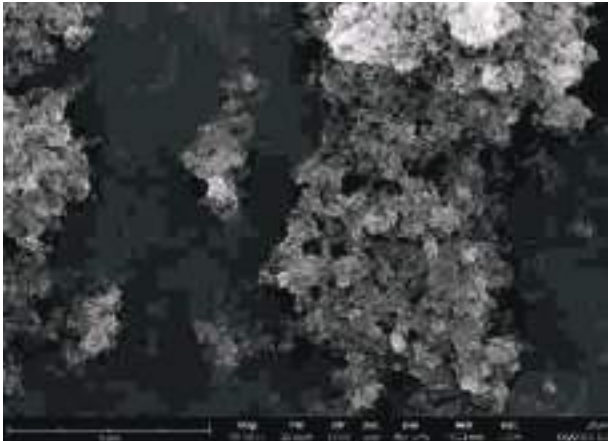
Dalle foto SEM (in Figura 41) è stato possibile confermare le caratteristiche dimensionali dei solidi lamellari utilizzati. L'idrotalcite MgAlCO₃ 3:1 presenta particelle di dimensioni intorno a qualche unità di micron, così come il α-ZrP, con particelle pseudo-esagonali. Il ZrP nano è costituito da aggregati di particelle di dimensioni inferiori a 1 μm. Non è stato possibile eseguire l'analisi per ZrP-tris. Per quanto riguarda l'analisi EDX (in Figura 42) è confermata la composizione negli elementi tipici dei solidi (Mg, Al, O per l'idrotalcite; Zr, P, O per il fosfato di zirconio).

MgAlCO₃ 3:1

10000x

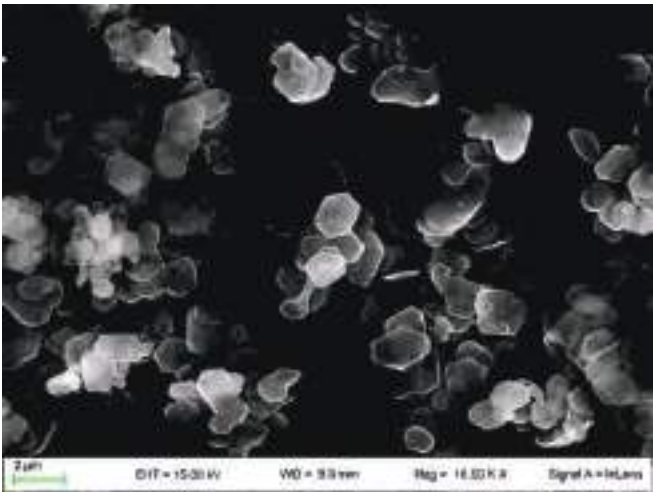


20000x

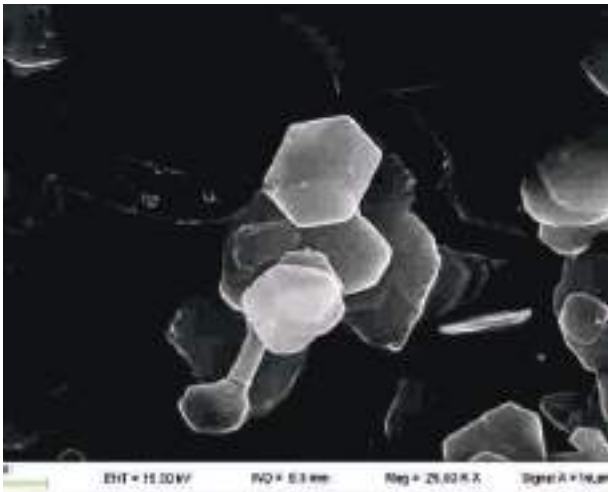


α-ZrP

10000x

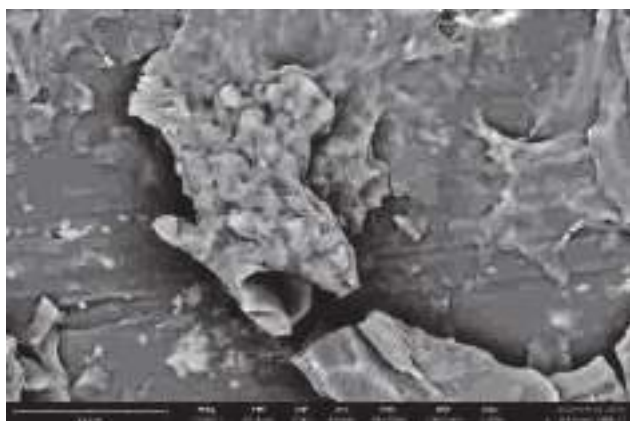


25000x



ZrP nano

10000x



13000x

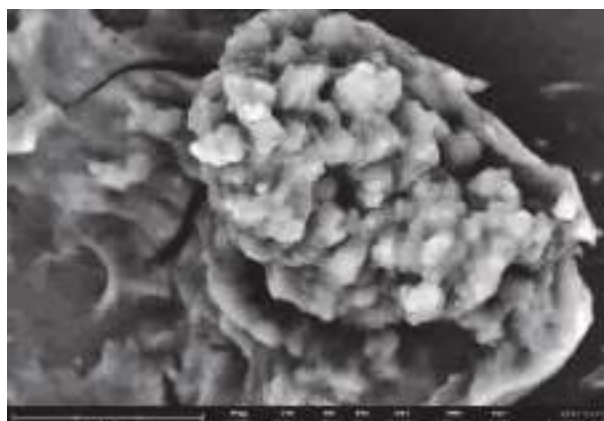


Figura 41. Immagini SEM dei solidi lamellari utilizzati

MgAlCO₃ 3:1



α -ZrP

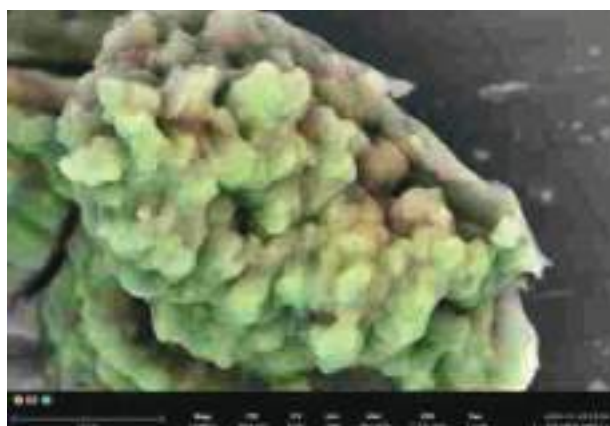


Figura 42. Analisi EDX dei solidi lamellari utilizzati

3.3.2 Preparazione e caratterizzazione delle biocolle

Nella Tabella 12 e Figura 43, le soluzioni di biocolle preparate. I dati mancanti di pH e viscosità sono riscontrati nei casi di mancata solubilizzazione della biocolle (30-32) o di impossibilità a misurare la viscosità (24-29) perché al di sotto del limite strumentale.

Di tutte le soluzioni di adesione preparate, quelle con concentrazione di acido acetico al 2% sono state escluse poiché il pH risultante era troppo basso per il range di stabilità delle idrotalciti (il cui limite inferiore è pH=4). Tra le rimanenti, sono state selezionate quelle di CH e COL 0,5%, CH e GEL 0,5%, COL 0,5% e GEL 0,5% (w/v), perché nelle altre sono stati riscontrati problemi di solubilizzazione della biocolle o di stabilità. Le soluzioni selezionate (indicate in Tabella 7 con un *) sono state valutate verso i solidi lamellari e le MPB.



Figura 43. Immagini di alcune delle soluzioni di adesione testate

Tabella 12. Tabella riassuntiva delle soluzioni di adesione testate

Soluzione di bioadesivo	Tipo CH	[acido acetico]	Altre biocolle	pH	Viscosità (cP)
1*	LMW	1%	-	4,5	41,96
2*	LMW	1%	-	5,5	30,00
3*	LMW	1%	-	6,5	35,71
4	LMW	2%	-	3,8	40,86
5*	MMW	1%	-	4,3	216,53
6	MMW	2%	-	4,3	220,65
7*	HMW	1%	-	4,2	253,12
8	HMW	2%	-	3,7	255,04
9*	LMW	1%	COL 0,5%	4,5	50,71
10	LMW	1%	COL 1%	4,6	48,20
11	LMW	1%	COL 2%	4,6	47,85
12*	MMW	1%	COL 0,5%	4,3	220,45
13	MMW	1%	COL 1%	4,3	223,03
14	MMW	1%	COL 2%	4,4	218,98
15*	HMW	1%	COL 0,5%	4,5	250,01
16	HMW	1%	COL 1%	4,2	249,34
17	HMW	1%	COL 2%	4,2	250,56
18*	LMW	1%	GEL 0,5%	4,3	40,66
19*	MMW	1%	GEL 0,5%	4,5	218,55
20*	HMW	1%	GEL 0,5%	4,1	249,54
21	LMW	1%	CEL 0,5%	4,5	40,13
22	MMW	1%	CEL 0,5%	4,3	220,65
23	HMW	1%	CEL 0,5%	4,6	254,70
24*	-	-	COL 0,5%	3,9	-
25	-	-	COL 1%	3,6	-
26	-	-	COL 2%	3,1	-
27*	-	-	GEL 0,5%	5,4	-
28	-	-	GEL 1%	5,3	-
29	-	-	GEL 2%	5,4	-
30	-	-	CEL 0,5%	-	-
31	-	-	CEL 1%	-	-
32	-	-	CEL 2%	-	-

Per quanto riguarda l'effetto delle soluzioni di adesione sulle MPB, è stato osservato per tutte che, a seguito del trattamento, mantengono inalterate le loro proprietà visive (no plastificazione), e l'integrità strutturale è confermata dalle immagini SEM (Figura 44). Si può osservare perdita di tridimensionalità rispetto alle membrane native, per via della presenza del film polimerico che copre le fibre, ma si nota anche che al di sotto di tale film l'integrità della rete delle fibre permane, a differenza di quanto visto precedentemente per la plastificazione e ad indicare come le soluzioni di adesione non compromettano l'integrità delle membrane. Essendo l'esito identico per tutte, in Figura 44 sono riportate le immagini sono dei test relativi alla Soluzione 3*.

Per quanto riguarda l'effetto delle soluzioni di adesione sui solidi, dalla Tabella 14 si può osservare come in tutti i campioni il peso residuo sia superiore al 90% rispetto al peso iniziale e quindi come in tutte le soluzioni testate i solidi rimangano stabili.

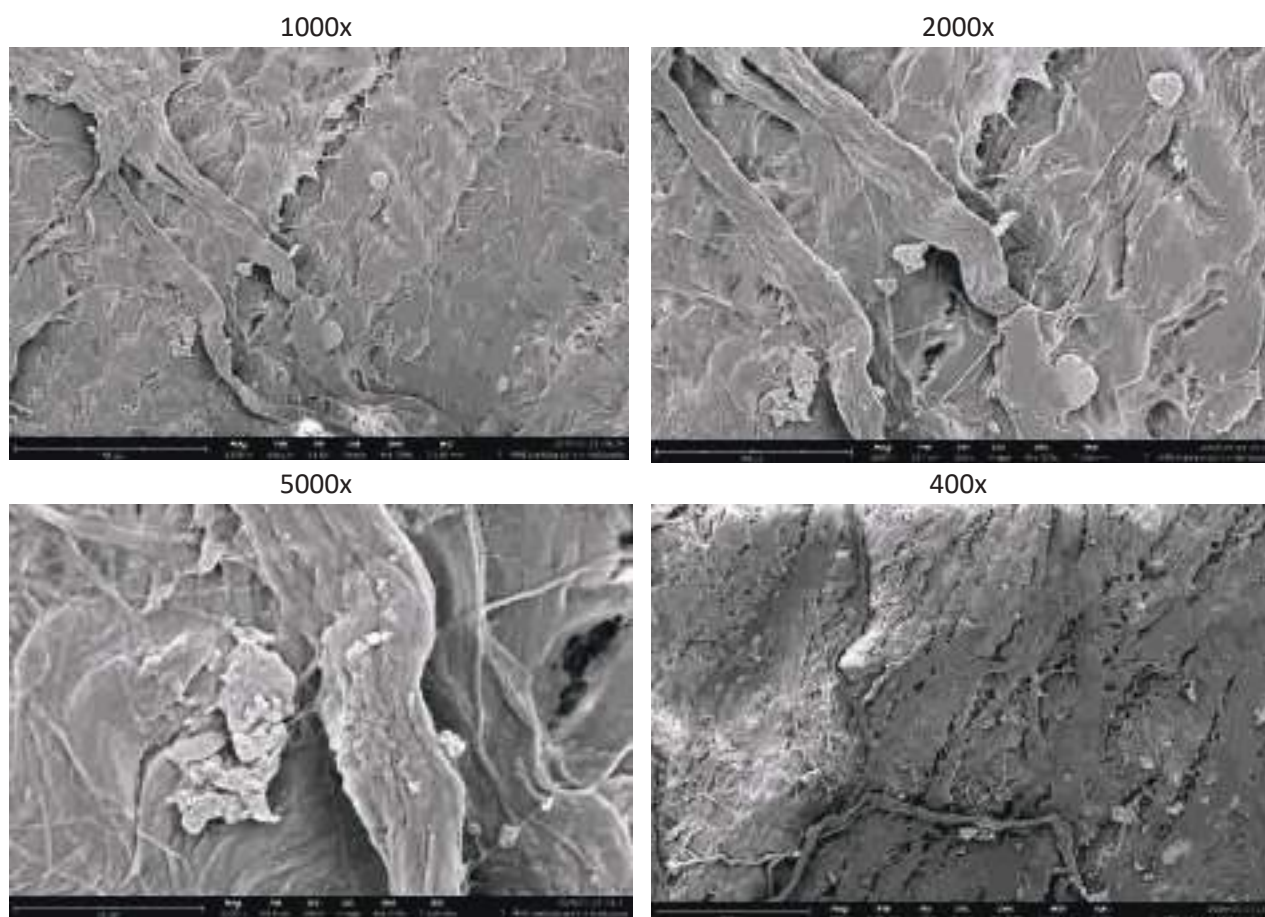


Figura 39. Immagini SEM delle MPB dopo trattamento con la soluzione di adesione 3*

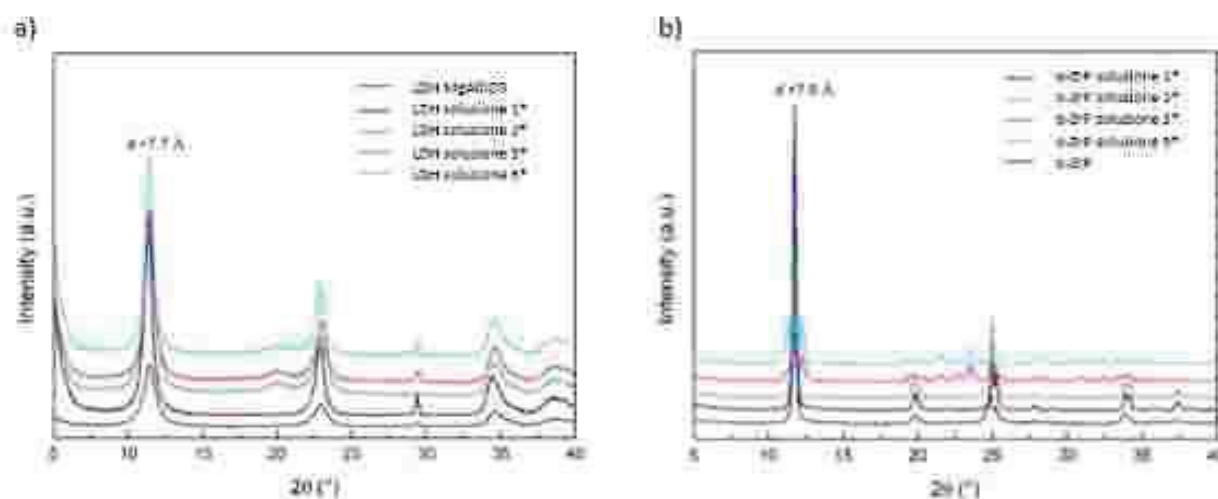


Figura 45. Spettri XRD di a) $MgAlCO_3$ e b) α -ZrP dei solidi prima e dopo contatto con le soluzioni di adesione 1*, 2*, 3* e 5*

Dagli spettri XRD dei solidi dopo la dispersione nelle soluzioni di biocolle (in Figura 45, sono riportati gli spettri solo per i test nelle soluzioni 1*, 2*, 3*, 5*) si può osservare che la distanza interstrato tipica dei solidi $MgAlCO_3$ (7,7 Å) e α -ZrP (7,5 Å) rimane invariata rispetto agli spettri dei solidi iniziali, a confermare che i solidi non hanno subito processi di intercalazione dovuti al contatto con le soluzioni di adesione e rimangono proattivi al caricamento con API.

Dall'analisi ICP della $MgAlCO_3$ 3:1 (Tabella 13, riportati i risultati solo per le soluzioni 1*, 2*, 3* e 5*) si osserva che la perdita in peso dell'Al a seguito del trattamento con le soluzioni di biocolle è in ogni caso inferiore allo 0,01%, perciò la porzione di idrotalcite disciolta in soluzione è trascurabile.

Tabella 13. Effetto delle soluzioni di adesione 1*,2*,3* e 5* su $MgAlCO_3$ (% Al disciolto)

prova	g teorici Al in $MgAlCO_3$ 3:1	ppm Al rilevati nelle acque	mg Al disciolto nelle acque	Perdita in peso dell'Al (%)
1*	0,0981	0,089	0,0103	0,010%
2*	0,1115	0,055	0,0064	0,006%
3*	0,1289	0,046	0,0056	0,004%
5*	0,1466	0,039	0,0049	0,003%

Tabella 14. Effetto delle soluzioni di adesione sulle MPB e sui solidi $MgAlCO_3$ e α -ZrP (peso residuo wt % e XRD)

Soluzione di bioadesivo	Effetto sulle MPB	wt %		XRD solidi	
		$MgAlCO_3$	α -ZrP	$MgAlCO_3$	α -ZrP
1*	Ok	92	97	Ok	Ok
2*	Ok	91	94	Ok	Ok
3*	Ok	97	98	Ok	Ok
5*	Ok	97	99	Ok	Ok
7*	Ok	93	96	Ok	Ok
9*	Ok	92	94	Ok	Ok
12*	Ok	96	92	Ok	Ok
15*	Ok	96	95	Ok	Ok
18*	Ok	98	98	Ok	Ok
19*	Ok	92	92	Ok	Ok
20*	Ok	94	97	Ok	Ok
24*	Ok	96	98	Ok	Ok
27*	Ok	95	92	Ok	Ok

Dal momento che tutte le soluzioni selezionate si sono dimostrate compatibili verso la stabilità dei solidi lamellari e dell'integrità strutturale di membrana, tutte sono state considerate idonee per i test di adesione dei solidi sulle MPB. Si è deciso di scegliere come soluzione modello da testare quella a pH più vicino alla neutralità (soluzione 3*) in modo da essere il più compatibile possibile con il sito di impianto, il più tollerabile possibile per la stabilità dei solidi lamellari, pur mantenendo una leggera acidità in grado di conferire carattere policationico al chitosano.

3.3.3 Sviluppo del protocollo di adesione e relativa valutazione

3.3.3.1 Scelta del metodo di adesione

Di seguito alcune immagini (Figura 46) delle procedure utilizzate per l'adesione dei solidi alle MPB: a) filtrazione, b) ultra-turrax, c e d) piastre petri modificate per l'immersione, e) dispersioni solido-biocolla, f) provino post gocciolamento, g e h) fissaggio dei provini dopo bar-coating e i) bar-coater.

In Tabella 15 sono riportate le prove effettuate per lo studio dei metodi di adesione dei solidi lamellari alle MPB tramite biocolla. Per ogni metodo (A-D) sono riportati 3 test (ad esempio metodo A: A1, A2, A3), il controllo con acqua e solidi (A4) e il controllo con sola biocolla (A5). I parametri oggetto di valutazione sono individuati con un numero da 1 a 5; ad ogni parametro è stato assegnato un punteggio da 1 (peggior risultato) a 3 (miglior risultato).

Il metodo di filtrazione è stato immediatamente scartato in quanto le MPB non risultano permeabili alla soluzione di biocolla (anche se diluita con acqua fino a un rapporto 1:20, come verificato da test non riportati in Tabella), ma solo all'acqua, ma quest'ultima non è sufficiente per garantire l'adesione dei solidi alla MPB. Nel metodo di gocciolamento, si è osservata una scarsa adesione del film sulla membrana e una scarsissima omogeneità della dispersione sui campioni ottenuti e quindi una scarsa riproducibilità del metodo stesso.

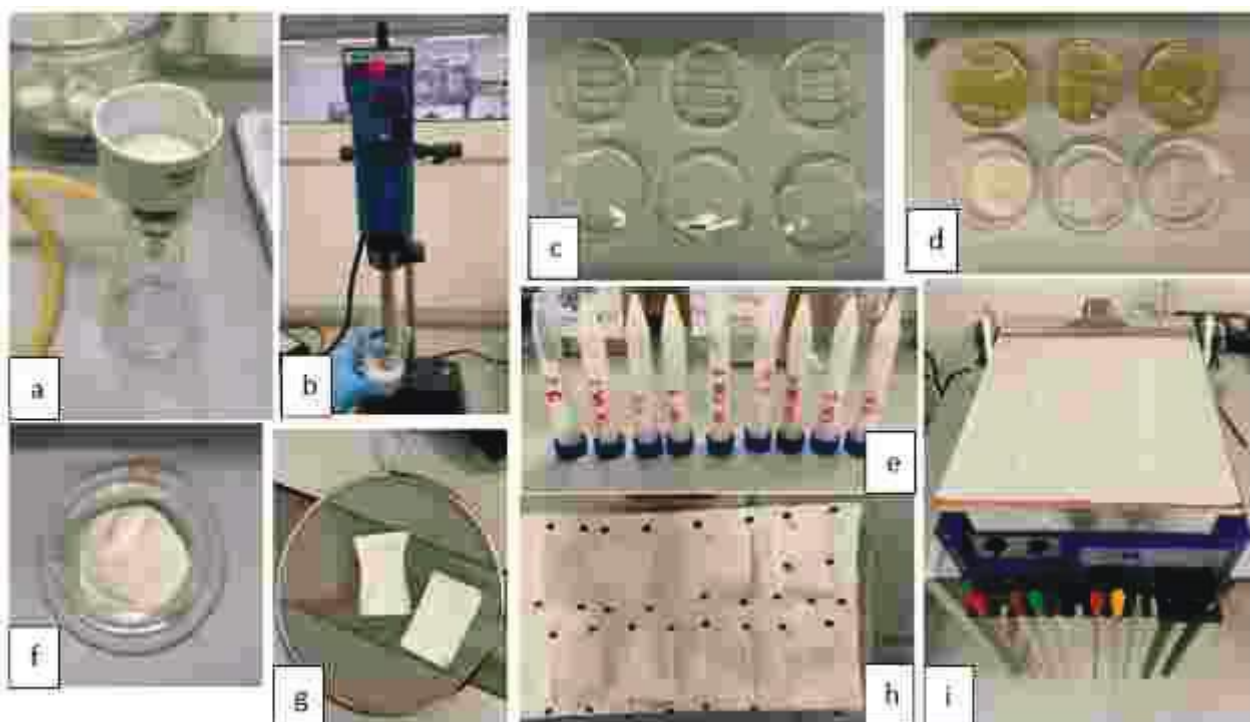


Figura 40. Differenti metodi di adesione dei solidi sulle MPB: a) filtrazione, c,d) immersione, f) gocciolamento e g,h,i) bar-coating; b)ultra-turrax ed e) dispersioni testate

Tabella 15. Prove effettuate sui metodi di adesione dei solidi alle MPB tramite biocolle, parametri valutati e relativo punteggio

Parametro	1	2	3	4	5
Prova	flessibilità MPB	adesione film polimerico a MPB	omogeneità solidi adesi	stabilità adesione a secco	adesione solidi sollecitazione meccanica
Filtrazione					
A1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
A2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
A3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
A4 (ctrl acqua-solido)	3	n.a.	3	1	1
A5 (ctrl biocolle)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Gocciolamento					
B1	3	1	1	1	1
B2	3	2	2	1	1
B3	3	1	1	1	1
B4 (ctrl acqua-solido)	3	n.a.	1	1	1
B5 (ctrl biocolle)	3	1	n.a.	n.a.	n.a.
Immersione					
C1	3	3	1	3	2
C2	3	3	1	3	2
C3	3	3	1	3	2
C4 (ctrl acqua-solido)	3	n.a.	1	1	1
C5 (ctrl biocolle)	3	3	n.a.	n.a.	n.a.
Bar-coating					
D1	3	3	3	3	3
D2	3	3	3	3	3
D3	3	3	3	3	2
D4 (ctrl acqua-solido)	3	n.a.	1	1	1
D5 (ctrl biocoll)	3	3	n.a.	n.a.	n.a.

Per quanto riguarda l'immersione, anche in questo caso, nonostante il sistema sia soggetto ad agitazione magnetica continua, non si ha buona omogeneità della deposizione dei solidi sulla membrana, anche se l'adesione sia del solo film che dei solidi sulla stessa migliora rispetto agli altri metodi. La strategia del bar-coating infine, ha dato i risultati migliori in termini di omogeneità della distribuzione dei solidi e di stabilità dell'adesione, non solo a secco, buoni anche per il metodo di immersione, ma anche a seguito di sollecitazione meccanica. Il metodo del bar-coating è stato quindi selezionato come la tecnica per la deposizione dei solidi sulle membrane per le sue caratteristiche di riproducibilità e semplicità di esecuzione.

Come si può osservare infine, in ogni caso l'utilizzo della soluzione con la biocolla migliora l'adesione rispetto al risultato utilizzando sola acqua, mentre l'utilizzo di sola biocolla è indicativo del mantenimento della proprietà di flessibilità della MPB e dell'adesione del film polimerico allo stesso.

Dalle immagini SEM (Figura 48) si può osservare come nei campioni ottenuti da gocciolamento, immersione e bar-coating (la filtrazione è stata esclusa in partenza), il tipo di metodo influenza il tipo di copertura della MPB con il film polimerico, dando una copertura più omogenea nel caso del bar-coating, rispetto a gocciolamento ed immersione. In tutti i casi però, la struttura della MPB viene completamente ricoperta dal film, non permettendo l'individuazione dei solidi lamellari depositati sulla superficie. L'analisi SEM è stata quindi effettuata anche sui campioni ottenuti con sola acqua (nello specifico prova A4), e in questo caso è possibile osservare la co-presenza di filamenti di collagene e dell'idrotalcite, depositata in modo uniforme su di essi. La conferma della natura di queste componenti è stata ottenuta tramite analisi EDX. In Figura 49 si può osservare la presenza di due distinte porzioni del campione in base alla composizione elementare: una a base di C e N (fibre del PB) e una a base di Mg e Al (idrotalcite). Essendo questi elementi presenti in modo esclusivo in una o nell'altra componente del provino, è stato possibile identificare con certezza quali fossero le fibre di PB e quali i granuli di idrotalcite ed è stato possibile osservare una distribuzione omogenea del solido lamellare sulla superficie della MPB.

L'analisi XRD dei provini mostra sulla membrana del campione D1 (in blu in Figura 47) la presenza dei segnali riconducibili all'idrotalcite $\text{MgAl}(\text{OH})_6$ (in nero) e in particolare del picco a $11,4^\circ 2\theta$ (corrispondente alla $d = 7,7 \text{ \AA}$), a differenza della membrana tal quale (in rosso), che non presenta tale segnale, confermando l'adesione dei solidi lamellari alla MPB.

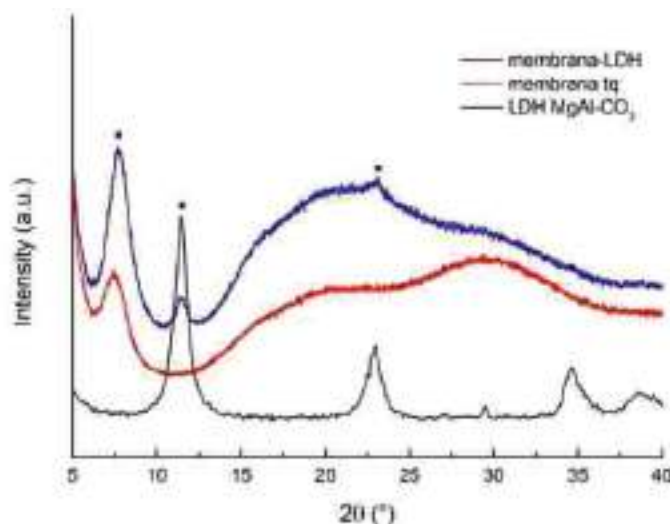
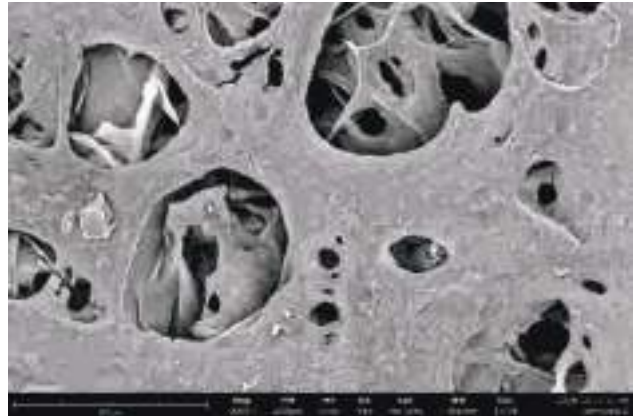
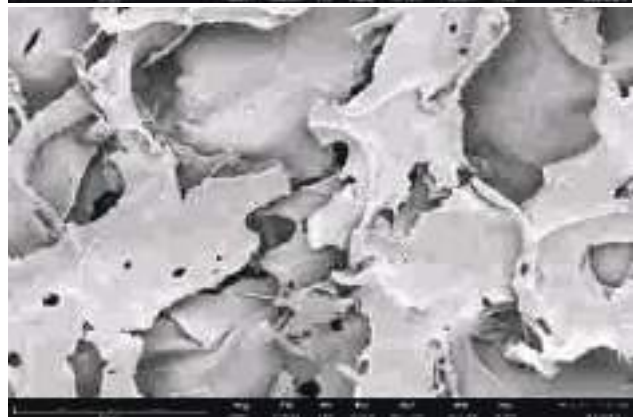
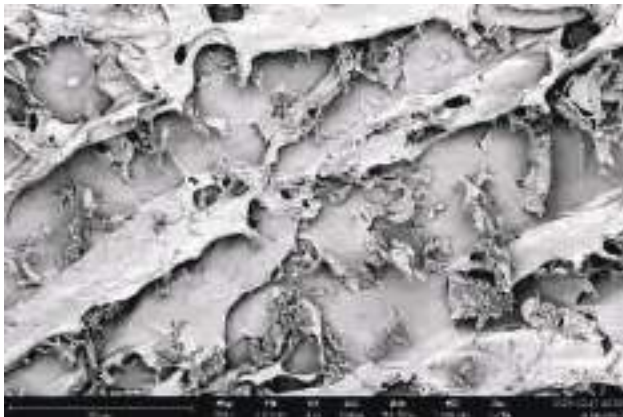


Figura 47. Spettri XRD del campione D1 (blu), dell'idrotalcite $\text{MgAl}(\text{OH})_6$ (nero) e della membrana tal quale (rosso) a confronto

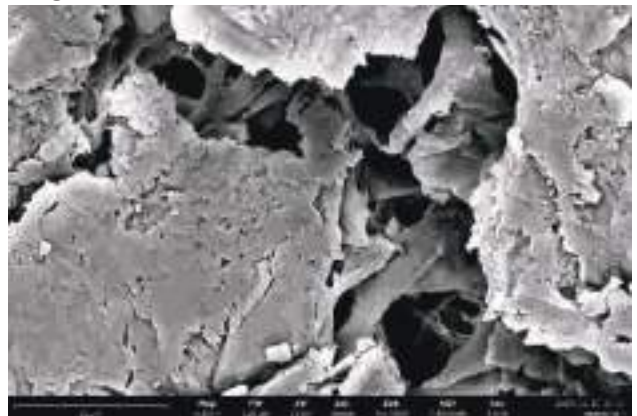
Gocciolamento

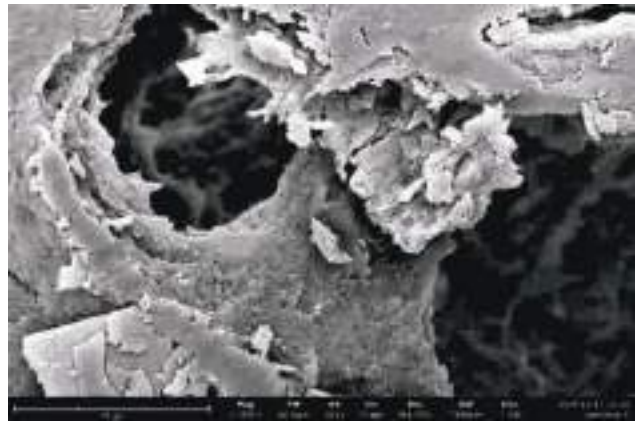
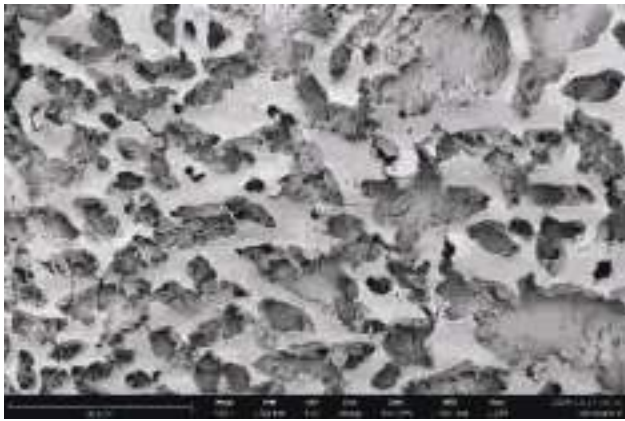


Immersione



Bar-coating





Filtrazione con sola acqua (A4)

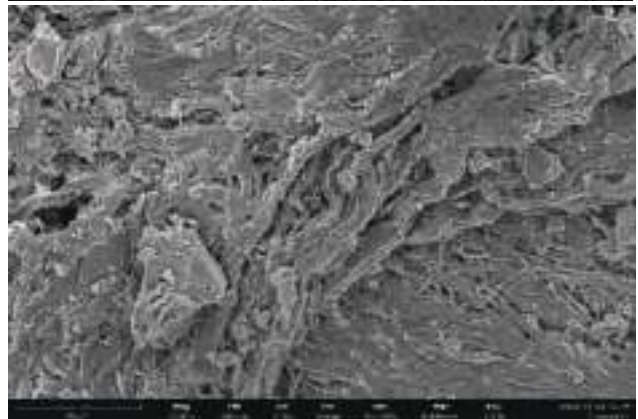
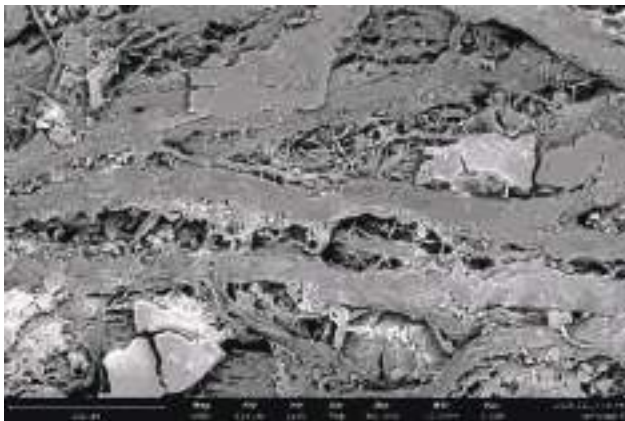




Figura 41. Immagini SEM dei campioni ottenuti dai test di adesione tramite gocciolamento, immersione, bar-coating e filtrazione con sola acqua

Filtrazione con sola acqua (A4)

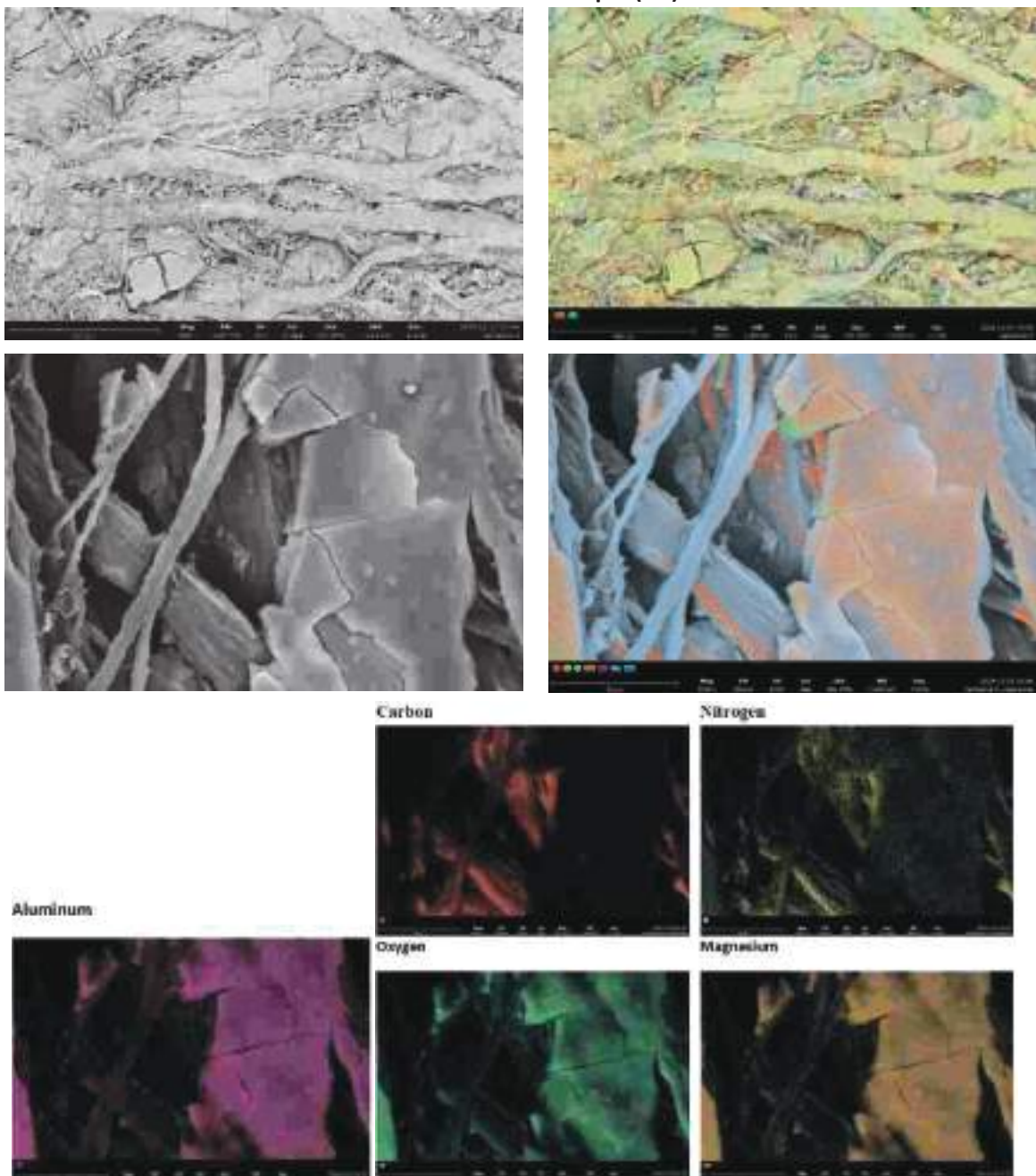


Figura 49. Analisi EDX dei campioni ottenuti dai test di adesione tramite filtrazione con sola acqua (A4)

3.3.3.2 Scelta della biocolle

In Tabella 16 sono riportati i risultati dei test di deposizione con le biocolle. Sono state valutate tutte quelle risultate positive ai test al paragrafo 3.6.3.2 (e già riportate in Tabella 14). In tutti i casi la concentrazione di chitosano è sempre 2% con acido acetico 1%. Dai risultati ottenuti valutando i parametri 1-5, sono state selezionate come migliori biocolle dal punto di vista del mantenimento della flessibilità delle MPB, dell'adesione del film polimerico e dell'omogeneità e della stabilità di adesione dei solidi a secco, il CH MMW e HMW, da solo o con 0,5% COL, a vari MW (evidenziati in arancione in Tabella 16).

Tabella 16. Prove effettuate sulle biocolle, parametri valutati e relativo punteggio

Parametro		1	2	3	4	5
Soluzioni di bioadesivo	Biocolle	flessibilità MPB	adesione film polimerico a MPB	omogeneità solidi adesi	stabilità a secco	adesione solidi sollecitazione meccanica
1*	CH LMW pH 4,5	3	3	2	2	2
2*	CH LMW pH 5,5	3	3	2	2	2
3*	CH LMW pH 6,5	3	3	2	2	2
5*	CH MMW	3	3	3	3	3
7*	CH HMW	3	3	3	3	3
9*	CH LMW - COL 0,5%	3	3	2	2	2
12*	CH MMW - COL 0,5%	3	3	2	3	3
15*	CH HMW - COL 0,5%	3	3	3	3	3
18*	CH LMW- GEL 0,25%	2	1	2	1	1
19*	CH MMW- GEL 0,25%	1	1	2	2	1
20*	CH HMW- GEL 0,25%	1	1	2	2	1
24*	COL 0,5%	2	1	1	1	1
27*	GEL 0,5%	2	1	1	1	1

3.3.3.3 Scelta delle condizioni dei solidi lamellari

In Tabella 17 sono riportati i risultati dei test di deposizione con i solidi lamellari a diversa concentrazione e composizione. Di tutte le biocolle selezionate al punto precedente sono state testate solo CH MMW e CH MMW – COL 0,5% perché nei test antibiofilm (vedi paragrafo 3.6.5.1) è stata riscontrata maggiore attività del chitosano a medio MW rispetto ad alto e basso.

Tabella 17. Prove effettuate sui solidi lamellari a diversa concentrazione e composizione, parametri valutati e relativo punteggio

Tipo solidi	[solidi] nella soluzione (% w/v)	1 bontà dispersione	2 facilità stesura	3 omogeneità film depositato	4 Stabilità a secco	5 adesione sollecitazione meccanica	6 solidi in umido 24h	7 carico solidi (%)
CH MMW (Soluzione 5*)								
MgAlCO₃	1	3	3	3	3	3	3	3
	9	3	2	2	2	2	1	15
	13	2	1	1	1	1	1	20
α-ZrP	1	3	3	3	3	3	3	2
	5	3	3	3	3	3	2	4
	9	3	3	3	3	3	1	11
	13	3	3	3	3	3	1	21
	23	3	3	3	2	3	1	32
	33	3	2	3	2	3	1	39
	37	2	2	2	1	2	1	45

ZrP nano	3	2	2	3	3	3	3	6
	5	2	2	3	3	3	3	12
	8	2	1	2	2	2	1	18
ZrP-tris	6	3	3	3	3	3	3	10
	9	3	3	3	3	3	3	18
	12	3	2	2	2	2	1	24
mix	15	3	3	3	3	3	3	28
	18	3	3	3	3	3	3	39
	23	2	2	2	2	2	1	54
CH MMW – COL 0,5% (Soluzione 12*)								
MgAlCO ₃	1	3	3	3	3	3	3	2
	9	2	2	3	2	2	1	8
	13	2	1	2	1	1	1	13
α-ZrP	1	3	3	3	3	3	3	1
	5	3	3	3	3	3	3	2
	9	3	3	3	3	3	3	8
	13	3	3	3	3	3	1	11
	23	2	2	3	3	2	1	16
	33	2	2	3	2	2	1	18
	37	2	2	2	2	2	1	20
ZrP nano	3	2	2	3	3	3	3	6
	5	2	2	3	3	3	3	12
	8	2	2	1	1	1	1	18
ZrP-tris	6	3	3	3	3	3	3	10
	9	3	3	3	3	3	3	18
	12	3	2	1	2	1	1	24
mix	15	3	3	3	3	3	3	28
	18	3	3	3	3	3	3	39
	23	2	2	1	1	1	1	54

Dalla Tabella 17 si può evincere che, all'aumentare del carico di solidi nella dispersione (e di conseguenza sulla membrana) si ha generalmente maggiore difficoltà di stesura tramite bar-coating, a causa dell'aumento della viscosità della dispersione biocolla-solido. Si ha anche minore stabilità di adesione, sia a secco che in umido, perché il carico di solidi sulla membrana è così elevato che l'azione della biocolla non è più sufficiente a tenerli adesi. Nel caso della biocolla a base di CH, i massimi carichi di solidi lamellari ottenuti – stabili a 24 h - sono: 3% MgAlCO₃, 2% α-ZrP, 12% ZrP nano, 18% ZrP-tris, 39% del mix dei solidi (vedi Figura 50). Gli stessi risultati si ottengono per la biocolla CH – COL 0,5%, tranne che nel caso dello α-ZrP il cui massimo carico stabile su membrana è dell'8%.

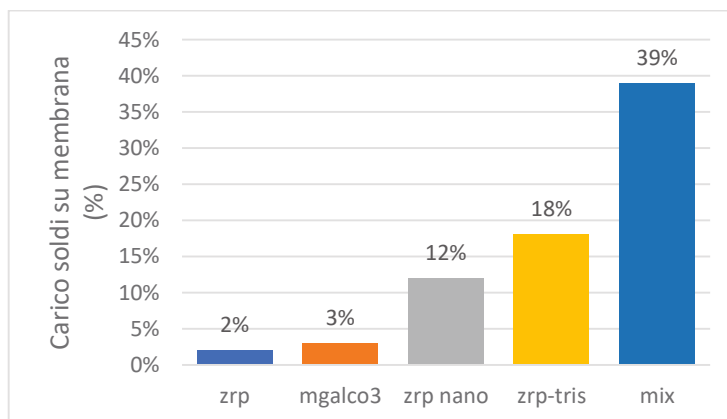


Figura 50. Massimi carichi dei solidi ottenuti con la biocolla CH 2%

Le immagini della valutazione di alcune membrane a secco e in soluzione fisiologica sono riportate in Figura 51.

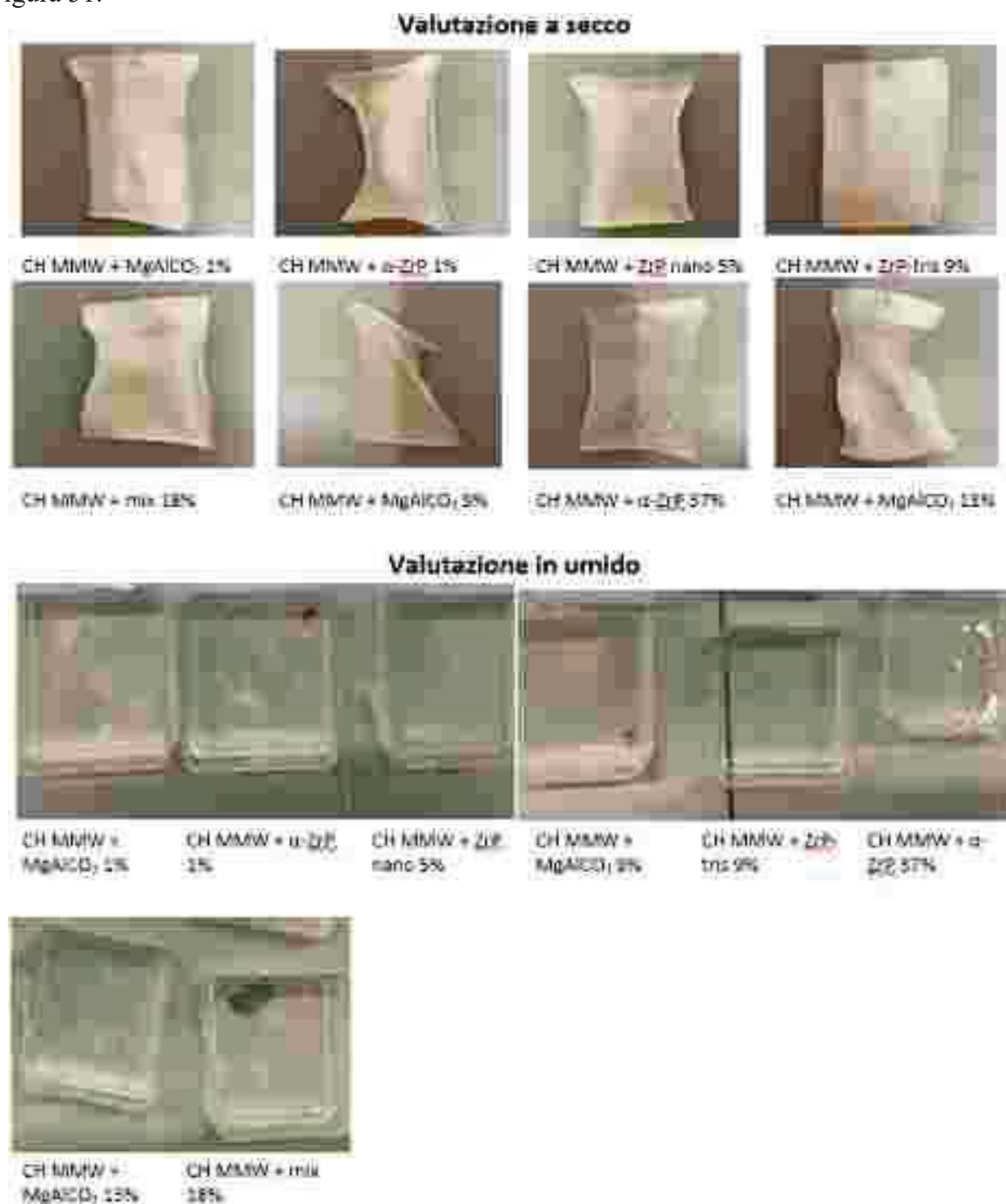


Figura 5142. Valutazione a secco e in umido di MPB con diverse concentrazioni e combinazioni di solidi dispersi in CH MMW

3.4 Studio della cinetica di uptake e rilascio degli API antimicrobici e antibiofilm

3.4.1 Prove preliminari di intercalazione

Come si può osservare dalla Figura 52a, lo spettro XRD del prodotto ZrP-CLO (in nero) mostra una variazione della d da $7,7 \text{ \AA}$ ($12^\circ 2\theta$), tipica dello $\alpha\text{-ZrP}$ acido (in blu), a $21,8 \text{ \AA}$ ($4^\circ 2\theta$), ad indicare l'avvenuta formazione del composto di intercalazione tra ZrP e CLO DG. Nel prodotto di intercalazione è presente anche il segnale relativo a $d/2$ ($10,7 \text{ \AA}$), mentre quello relativo a $d/3$ ($7,6 \text{ \AA}$) è coperto dal segnale dello ZrP acido. L'analisi termo gravimetrica (Figura 52b) mostra una perdita di peso del composto ZrP-CLO (in nero) pari al 33,6%, indicando quindi la presenza di molecole

organiche nel composto rispetto allo α -ZrP (in blu, perdita del 10,7%). La DSC (Figura 52c) mostra in corrispondenza della perdita di peso per ZrP-CLO (in nero) una transizione di stato endotermica intorno a 400 °C, riconducibile con ogni probabilità ad un passaggio di stato della clorexidina. Tale transizione non si osserva invece in α -ZrP (in blu).

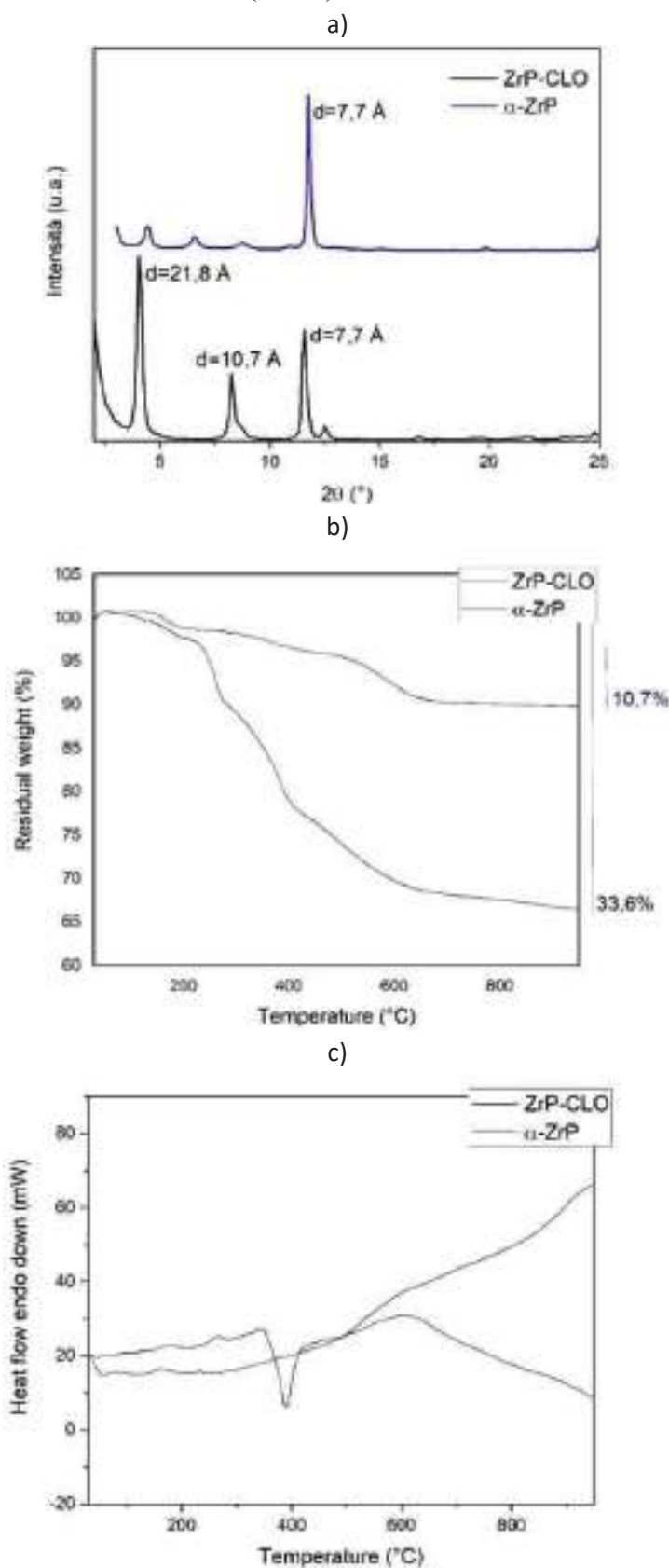
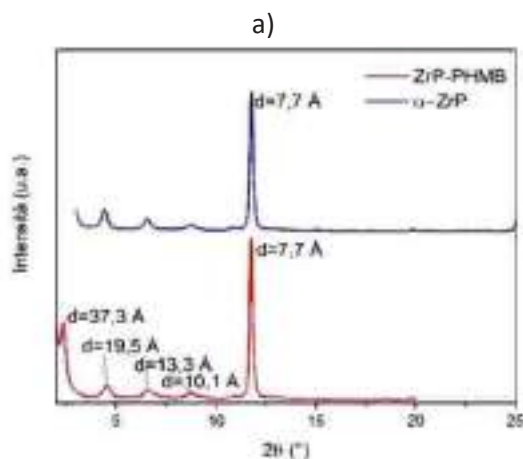


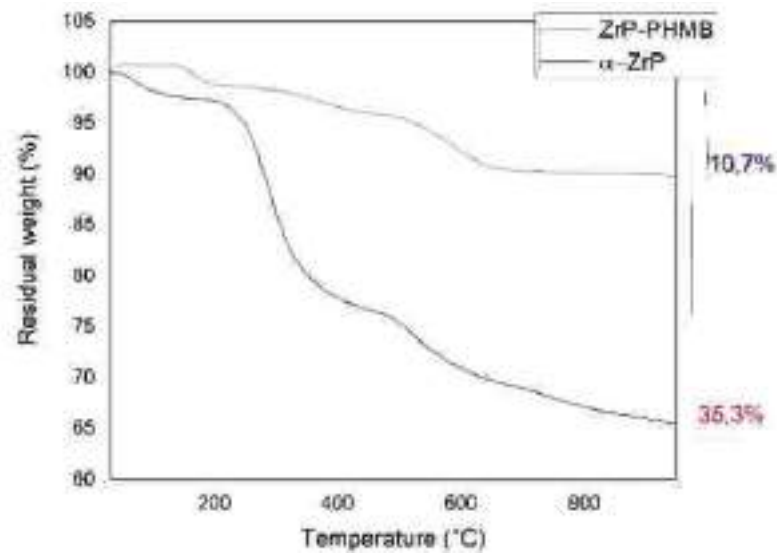
Figura 52. a) XRD, b) TGA e c) DSC dei prodotti di intercalazione tra α -ZrP e CLO DG

Dalla Figura 53a, si può osservare come lo spettro XRD di ZrP-PHMB (in rosso) mostri un pattern di segnali riconducibile all'intercalazione del principio attivo PHMB: sono visibili il primo riflesso a 37,3 Å (d), il secondo a 19,5 Å (d/2), il terzo a 13,3 Å (d/3) e il quarto a 10,1 Å (d/4). È visibile anche il riflesso dello α -ZrP di partenza (in blu, d=7,7 Å), ad indicare un'intercalazione parziale. ZrP nano (in verde, in Figura 53d) mostra un segnale intorno a 7,5 Å, ma è molto amorfo, così come il prodotto di intercalazione (in rosso) e in quanto tale non è possibile trarre ulteriori informazioni dallo spettro XRD. ZrP-tris (Figura 53g) mostra un pattern di segnali diverso tra la fase gel esfoliata con Tris (in azzurro, picchi a 16,3 Å, 8,1 Å e 5,4 Å) e la fase dopo contatto con PHMB (in rosso, picchi a 20,4 Å, 6,5 Å e 3,2 Å), ad indicazione di una modifica della distanza interlamellare dovuta all'intercalazione del PHMB; la bassa cristallinità del materiale è dovuta all'uso di un esfoliato. In conclusione, le analisi XRD mostrano α -ZrP come candidato più idoneo per l'intercalazione della specie PHMB. L'analisi termo gravimetrica (Figura 53b) mostra una perdita di peso del composto ZrP-PHMB (in rosso) pari al 35,3%, indicando quindi la presenza di molecole organiche nel composto rispetto allo α -ZrP (in blu, perdita del 10,7%). La DSC (Figura 53c) conferma i dati della TGA mostrando una transizione endotermica tra i 300 e i 600 °C per ZrP-PHMB (in rosso), assente invece per il solo α -ZrP (in blu) e dovuta quindi al PHMB intercalato.

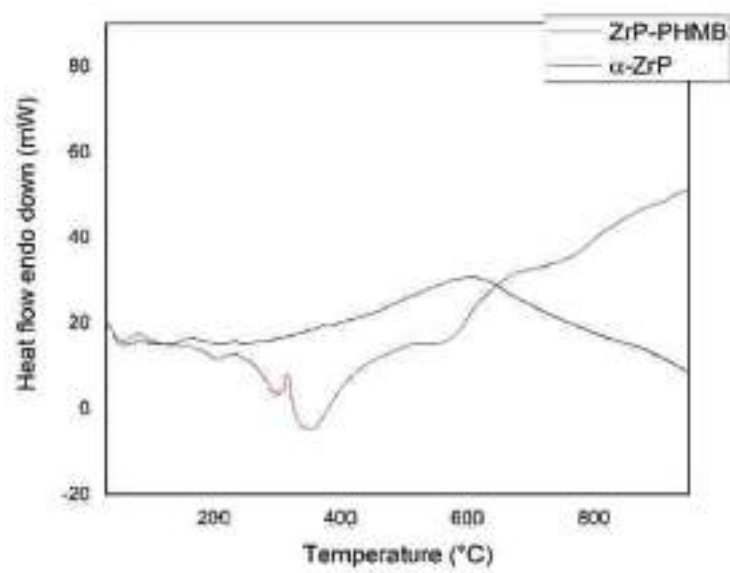
Dalla TGA in Figura 53e si può osservare per ZrP nano e ZrP nano-PHMB, una perdita totale di peso rispettivamente di 82,1% (in verde) e 40,1% (in rosso). Tali valori sono spiegabili con il fatto che ZrP nano è utilizzato in dispersione acquosa e non da secco. A seguito dell'isoterma a 110 °C per 30' e ricalcolando le perdite di peso percentuali in base al peso ottenuto dopo la completa evaporazione dell'acqua, si ottiene una perdita di 15,1% per ZrP nano e di 61,3% per ZrP nano-PHMB, ad indicare la presenza di organico intercalato nel secondo composto. La DSC in Figura 53f conferma tali dati mostrando una transizione esotermica nel caso di ZrP nano-PHMB (in rosso), assente nel solido puro (in verde). Allo stesso modo, dalla TGA in Figura 53h si può osservare per ZrP-tris e ZrP-tris-PHMB, una perdita totale di peso rispettivamente di 88,1% (in azzurro) e 57,4% (in rosso). Anche ZrP-tris è usato in dispersione acquosa e ricalcolando le perdite di peso percentuali in base al peso ottenuto dopo l'isoterma a 110 °C, ottiene una perdita di 48,8% per ZrP-tris e di 44,0% per ZrP-tris-PHMB. In questo caso non possono essere fatte deduzioni dalla TGA in quanto anche ZrP-tris contiene molecole organiche e perciò non si può discriminare il contributo nel prodotto d'intercalazione dovuto al tris da quello dovuto al PHMB. La DSC in Figura 53i mostra due diverse transizioni: una endotermica nel caso dello ZrP-tris-PHMB (in rosso) e una esotermica nel caso di ZrP-tris (in azzurro).



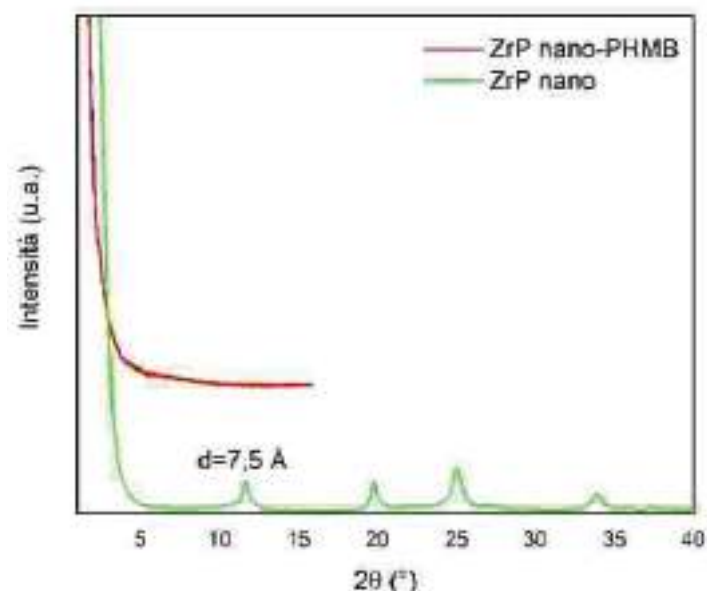
b)



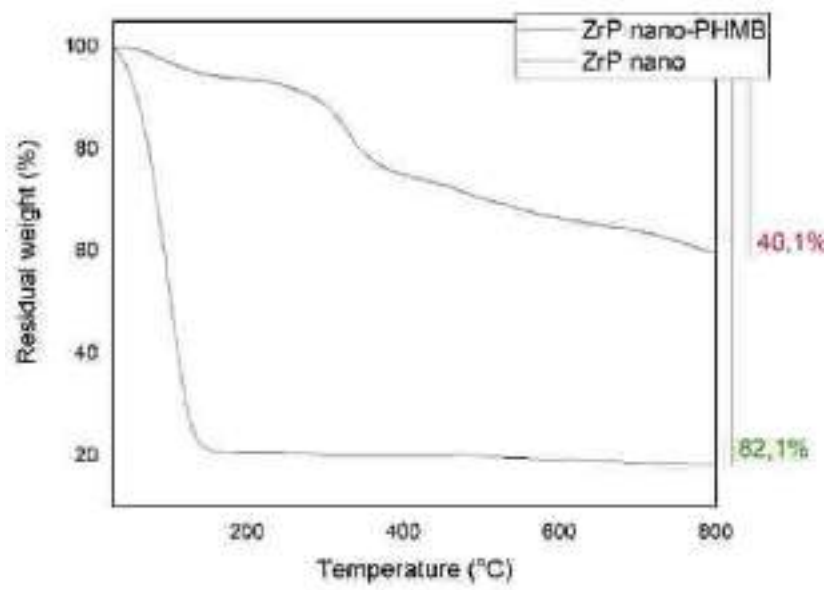
c)



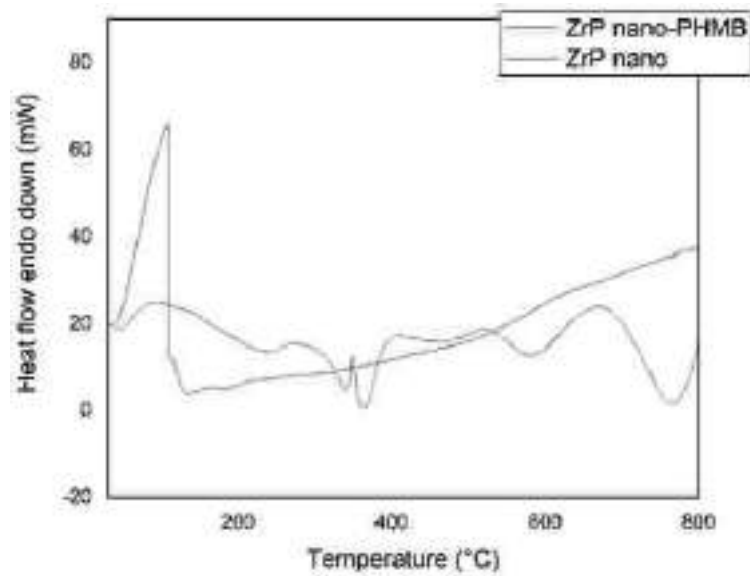
d)



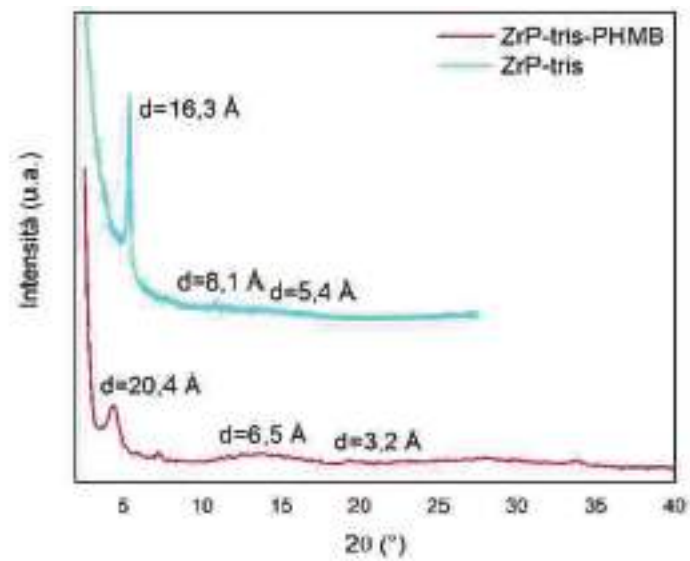
e)



f)



g)



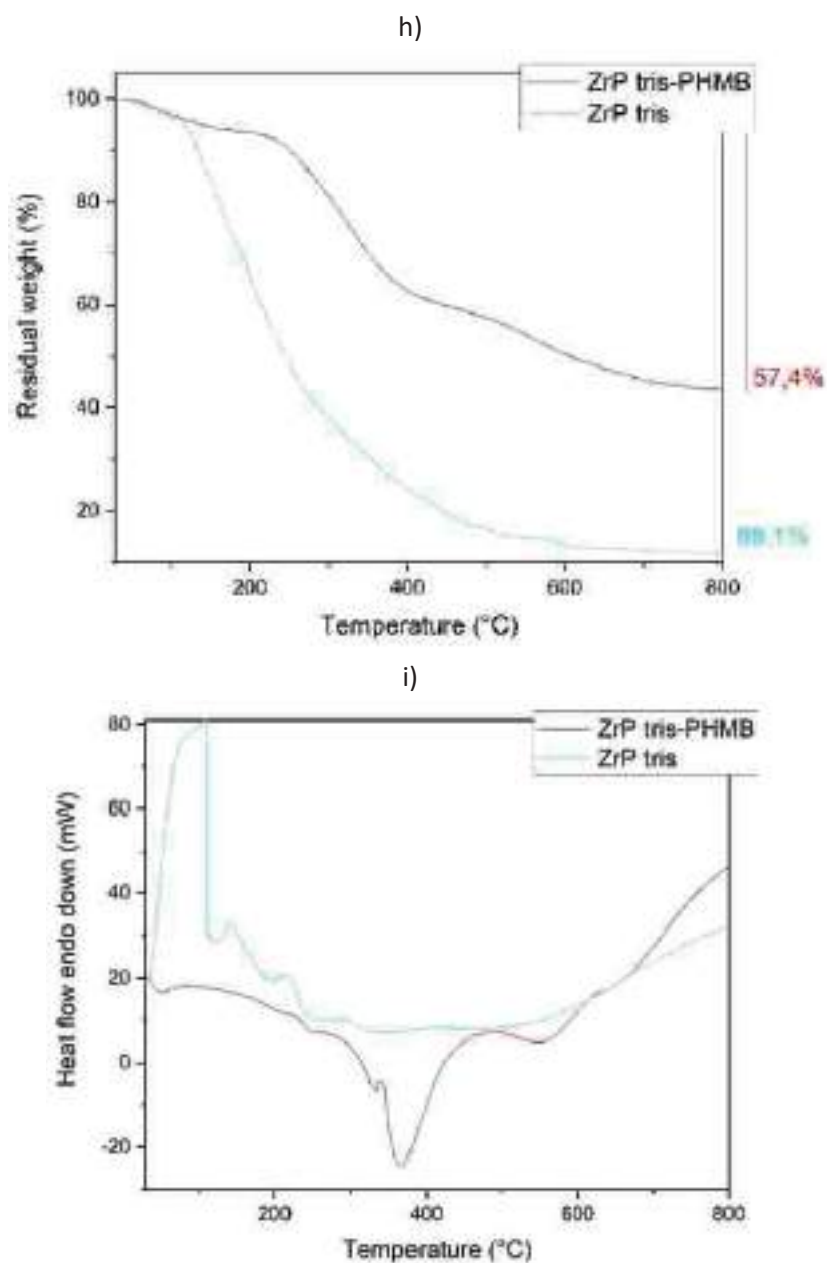


Figura 53. a) XRD, b) TGA e c) DSC dei prodotti di intercalazione tra α -ZrP e Preventia®; d) XRD, e) TGA e f) DSC dei prodotti di intercalazione tra ZrP nano e Preventia®; g) XRD, h) TGA e i) DSC dei prodotti di intercalazione tra ZrP-tris e Preventia®.

3.4.2 Uptake e il rilascio degli API

3.4.2.1 Uptake

In Figura 54 e 55 alcune immagini della procedura di uptake di CLO DG e Vanco da parte dei campioni analizzati.



Figura 54. Campioni pre, durante e post procedura di uptake di CLO DG

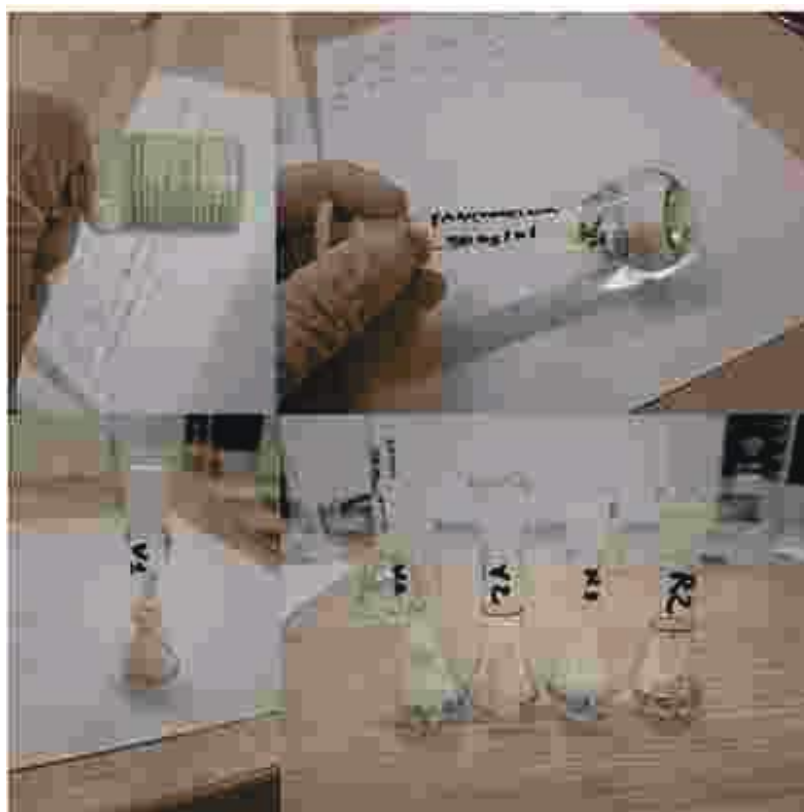


Figura 55. Procedura di uptake di Vanco

I carichi di API ottenuti nei test di uptake per i vari campioni sono riportati in Tabella 18, espressi come quantitativo di API assorbito per unità di area di membrana.

Tabella 18. Risultati in termini di uptake (mg di API assorbiti per cm² di membrana)

Campione	CLO DG (mg/cm ²)	PHMB (mg/cm ²)	Vanco (mg/cm ²)
m tq	17,87±1,6	18,02±1,5	18,50±0,5
m CH	7,15±0,7	8,01±0,6	-
m ZrP	7,17±0,8	8,39±0,7	-
m ZrP nano	6,85±0,6	7,65±0,6	-
m ZrP-tris	5,97±0,5	6,58±0,7	-
m mix	7,37±0,6	6,43±0,6	24,01±0,6

I risultati ottenuti per CLO DG mostrano che ognuno dei prototipi analizzati (MPB con CH e con CH e solidi lamellari) è efficace nel caricare un quantitativo di specie antimicrobica superiore a 1,0 mg/cm². Il quantitativo di CLO DG caricato dalle membrane funzionalizzate con i solidi lamellari, singoli o mix, o con la sola biocolla è inferiore rispetto a quello caricato dalla membrana tal quale, fenomeno spiegabile con il fatto che le membrane con deposta la biocolla e i solidi possono risultare in parte “saturate” nella loro capacità di assorbire liquidi.

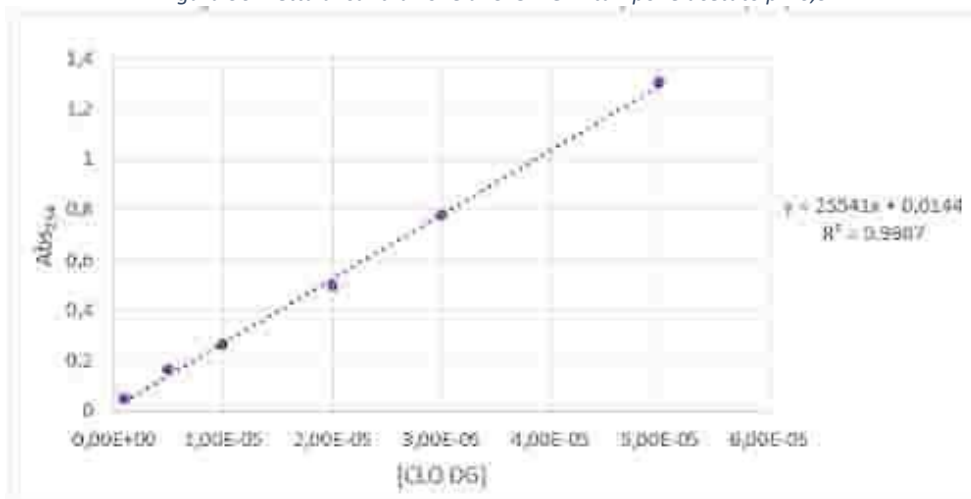
Anche nel caso del PHMB l’uptake ha prodotto risultati simili a quelli ottenuti per CLO DG, con maggiore carico da parte della membrana tal quale rispetto a quelle funzionalizzate.

Per quanto riguarda la vancomicina, in questo caso il prototipo di MPB con CH e solidi lamellari è efficace nel caricare un quantitativo di specie antibiotica pari a 24 mg/cm², maggiore rispetto a quello caricato dal controllo (MPB tal quale), cioè 18,50 mg/cm².

3.4.2.2 Ottenimento della retta di taratura per la rilevazione UV-vis degli API

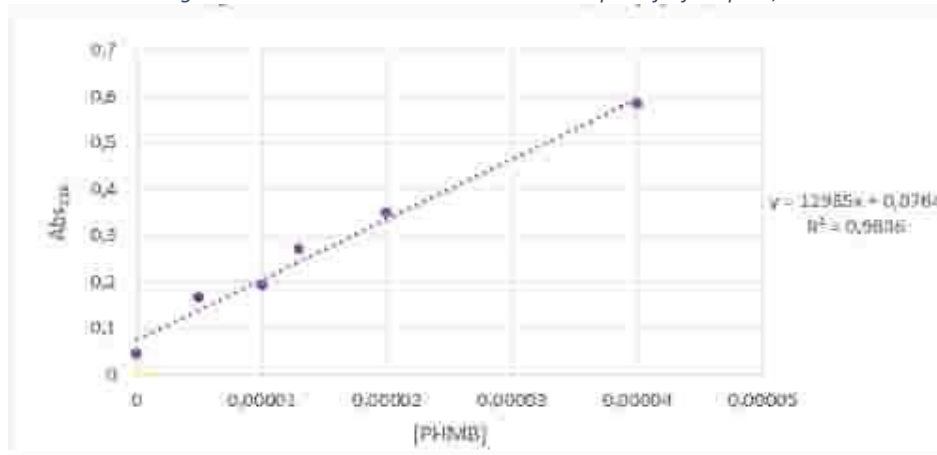
Di seguito sono riportate le rette di fitting, le relative equazioni e gli indici di correlazione R^2 ottenuti per CLO DG (Figura 56), PHMB (Figura 57) e Vanco (Figura 58). Come si può osservare dalle rette, la sensibilità analitica è per CLO DG $=1 \cdot 10^{-6}$ M, per PHMB 0,0005% e per Vanco 0,01 mg/ml.

Figura 56. Retta di calibrazione di CLO DG in tampone acetato pH 6,5



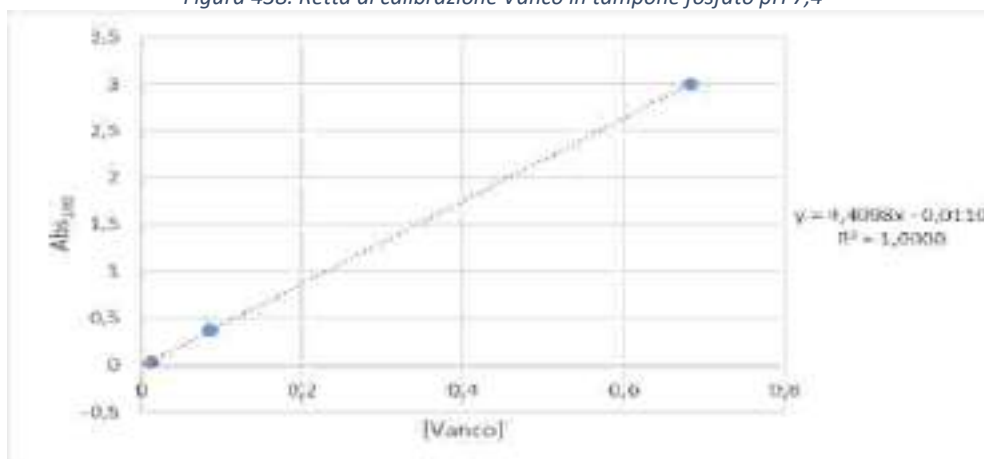
$$Abs_{254} = 25541 \cdot [CLO DG] + 0,0144$$

Figura 57. Retta di calibrazione PHMB in tampone fosfato pH 7,4



$$Abs_{236} = 12985 \cdot [PHMB] + 0,0764$$

Figura 438. Retta di calibrazione Vanco in tampone fosfato pH 7,4



$$Abs = 4,4098 \cdot [Vanco] - 0,011$$

3.4.2.3 Rilascio

I risultati dei test di rilascio di CLO sono riportati in Tabella 19, espressi come quantitativo di API rilasciato per unità di volume di rilascio (mg/ml), area di membrana (mg/cm²), quantitativo totale (mg), quantitativo normalizzato rispetto all'uptake (%) e rilascio teorico giornaliero (mg/die/cm²).

Tabella 19. Risultati del test di rilascio per CLO espressi come mg/ml, % sull'uptake, mg effettivi rilasciati, mg/cm² di membrana e mg/die/cm² per m tq, m CH, m ZP, m ZrP nano, m ZrP-tris e m mix

Campione	m tq	m CH	m ZrP	m ZrP nano	m ZrP-tris	m mix
Concentrazione (mg/ml)						
giorno 1	19,25±1,62	7,06±0,78	6,93±0,66	6,62±0,40	5,82±1,07	6,71±0,93
giorno 2	1,88±0,32	1,10±0,11	1,13±0,08	1,17±0,20	1,00±0,13	1,36±0,28
giorno 3	0,26±0,08	0,28±0,10	0,34±0,07	0,26±0,06	0,22±0,02	0,46±0,21
giorno 4	0,06±0,04	0,08±0,02	0,10±0,02	0,09±0,02	0,07±0,002	0,16±0,05
giorno 5	0,01±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01	0,04±0,01	0,03±0,001	0,07±0,02
giorno 6	0,004±0,004	0,02±0,005	0,03±0,005	0,02±0,01	0,01±0,001	0,04±0,01
giorno 7	0,001±0,002	0,01±0,004	0,03±0,002	0,02±0,01	0,01±0,002	0,04±0,01
tot	21,45±2,06	8,58±1,04	8,60±0,84	8,22±0,70	7,16±1,23	8,84±1,50
Percentuale dell'uptake (%)						
giorno 1	89,75±7,53%	82,31±9,13%	80,56±7,63%	80,51±4,85%	81,27±14,90%	75,92±10,55%
giorno 2	8,75±1,48%	12,82±1,29%	13,12±0,96%	14,25±2,39%	14,01±1,87%	15,34±3,14%
giorno 3	1,19±0,38%	3,25±1,20%	3,96±0,77%	3,19±0,71%	3,05±0,30%	5,19±2,33%
giorno 4	0,26±0,17%	0,92±0,28%	1,19±0,18%	1,04±0,22%	0,92±0,03%	1,80±0,58%
giorno 5	0,03±0,04%	0,39±0,12%	0,51±0,11%	0,50±0,10%	0,37±0,02%	0,81±0,23%
giorno 6	0,02±0,02%	0,18±0,05%	0,33±0,05%	0,28±0,11%	0,19±0,02%	0,50±0,09%
giorno 7	0,01±0,01%	0,12±0,04%	0,32±0,03%	0,22±0,08%	0,18±0,03%	0,44±0,08%
tot	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Quantitativo totale (mg)						
giorno 1	384,98±32,31	141,30±15,68	138,59±13,13	132,44±7,98	116,39±21,33	134,21±18,65
giorno 2	37,53±6,36	22,01±2,21	22,58±1,65	23,43±3,94	20,07±2,68	27,12±5,55
giorno 3	5,11±1,63	5,58±2,06	6,81±1,33	5,25±1,17	4,36±0,43	9,18±4,12
giorno 4	1,11±0,73	1,58±0,47	2,05±0,30	1,71±0,36	1,32±0,05	3,18±1,02
giorno 5	0,13±0,15	0,67±0,20	0,88±0,19	0,83±0,17	0,53±0,03	1,43±0,41
giorno 6	0,07±0,08	0,31±0,09	0,58±0,09	0,47±0,18	0,28±0,03	0,88±0,16
giorno 7	0,03±0,03	0,21±0,07	0,55±0,05	0,37±0,13	0,26±0,04	0,77±0,14
tot	428,96±41,31	171,66±20,79	172,04±16,74	164,49±13,92	143,21±24,58	176,78±30,04
Quantitativo su area di membrana (mg/cm²)						
giorno 1	16,04±1,35	5,89±0,65	5,77±0,55	5,52±0,33	4,85±0,9	5,59±0,78
giorno 2	1,56±0,26	0,92±0,09	0,94±0,07	0,98±0,16	0,84±0,11	1,13±0,23
giorno 3	0,21±0,07	0,23±0,08	0,28±0,05	0,22±0,05	0,18±0,02	0,38±0,17
giorno 4	0,05±0,003	0,07±0,02	0,09±0,01	0,07±0,01	0,05±0,002	0,13±0,04
giorno 5	0,01±0,006	0,03±0,01	0,04±0,008	0,03±0,007	0,02±0,001	0,06±0,02
giorno 6	0,03±0,003	0,01±0,003	0,02±0,004	0,02±0,008	0,01±0,001	0,04±0,01
giorno 7	0,01±0,003	0,01±0,003	0,02±0,002	0,02±0,005	0,01±0,002	0,03±0,01
tot	17,87±0,24	7,15±0,12	7,17±0,99	6,85±0,08	5,97±0,15	7,37±0,18
Quantitativo giornaliero su area di m (mg/die/cm²)						
tot	2,55±0,03	1,02±0,02	1,02±0,14	0,98±0,01	0,85±0,02	1,05±0,02

I risultati dei rilasci espressi in mg/cm², in % sull'uptake e in mg/ml sono riportati per maggiore comprensione nei grafici in Figura 59. Come si può osservare, il quantitativo di CLO rilasciato nel tempo è più alto nelle prime 24h per la membrana tal quale rispetto a quelle caricate con i solidi o con il solo CH, dato in linea con i risultati del test di uptake, che vedeva la m tq quella a maggiore

loading. Nei punti successivi però, cioè da 48h a 7 giorni, i quantitativi di CLO rilasciati dai vari campioni hanno un livello assolutamente paragonabile.

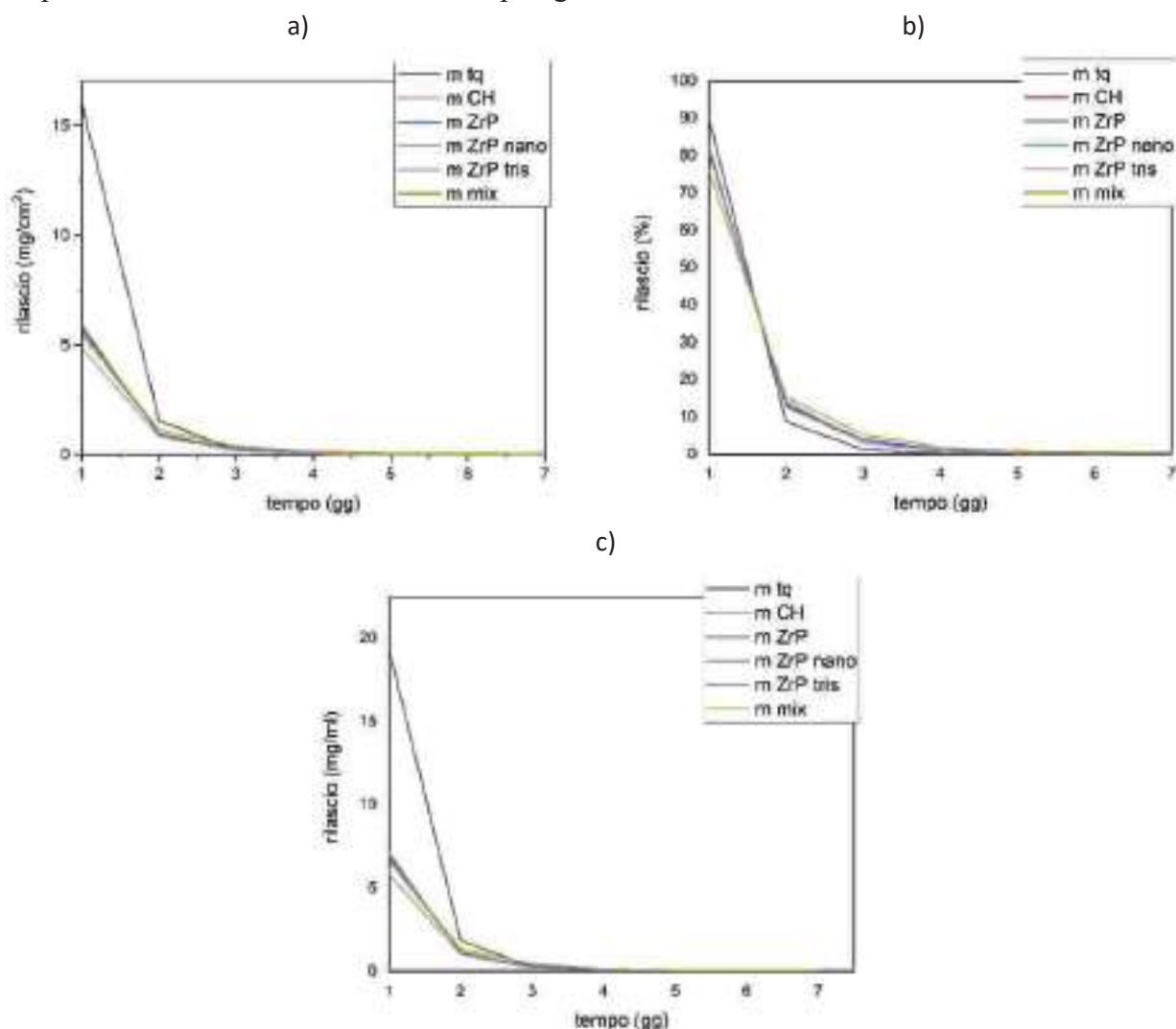


Figura 59. Cinetiche di rilascio osservate per CLO espresse come a) mg/cm² di membrana e come b) % di rilascio e c) mg/ml in funzione del tempo da parte di: m tq (in nero), m CH (in blu), m ZrP (in arancio), m ZrP nano (in rosa), m ZrP-tris (in verde) e m mix (in ocra)

La cinetica di rilascio tra i vari prototipi mostra quindi una certa somiglianza nell'andamento, con un maggiore rilascio a 24 h e poi una diminuzione del quantitativo rilasciato di un fattore 10 ad ogni successivo punto. Si può osservare come fino al giorno 7 il livello di CLO rilasciato sia superiore a 0,01 mg/cm², rendendo quindi i prototipi efficaci del rilasciare un quantitativo di questa specie antimicrobica ampiamente superiore alla sua MIC (145 µg/ml verso *S. epidermidis* e < 145 µg/ml verso *C. albicans*) [141]. Quindi, sebbene la membrana tal quale rilasci inizialmente un quantitativo di CLO maggiore rispetto a quelle caricate con CH/solidi nelle condizioni sperimentali studiate, i prototipi rilasciano un quantitativo di API perfettamente efficace in termini di attività antibiofilm verso le specie considerate.

Il quantitativo effettivo (in mg) di CLO rilasciata è riportato nel grafico in Figura 60. Da questi valori emerge che la m CH, m ZrP, m ZrP nano, m ZrP-tris e m mix rilasciano complessivamente 171,66±20,79, 172,04±16,74, 164,49±13,92, 143,21±24,58 e 176,78±30,04 mg di CLO, a fronte dei 428,96±41,31 mg rilasciati dalla m tq, e quindi con valori inferiori del 33-41% rispetto al controllo.

Dal grafico in Figura 60 si osserva che per tutti i campioni il rilascio è massiccio nelle prime 24 h, per diminuire di un fattore 10 nei giorni successivi.

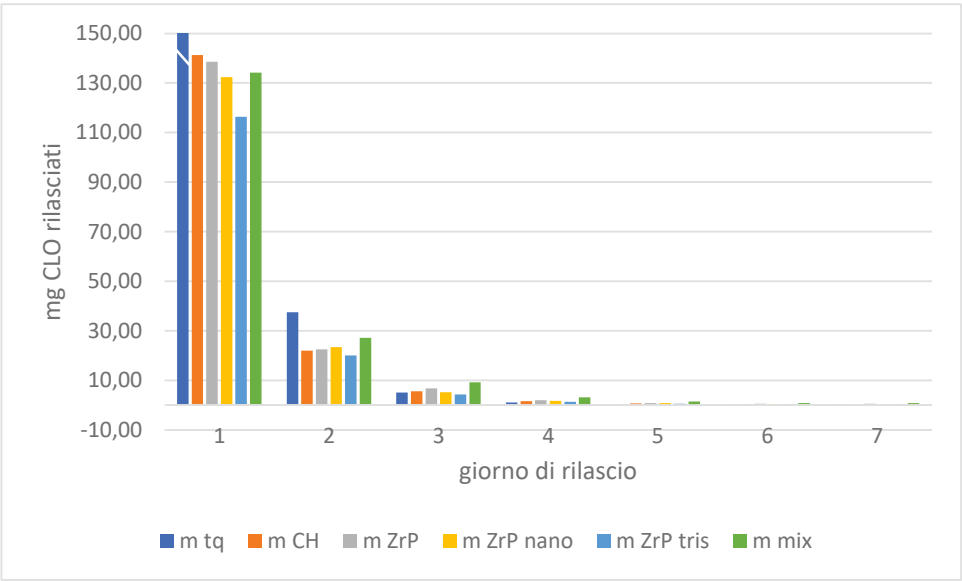


Figura 6044. Quantitativo effettivo di CLO (mg) rilasciato nel tempo da parte di: m tq (in nero), m CH (in blu), m ZrP (in arancio), m ZrP nano (in rosa), m ZrP-tris (in verde) e m mix (in ocra)

Per quanto riguarda il rilascio teorico giornaliero, si evidenziano valori di 1,02 mg/die/cm² per m CH e m ZrP, 0,98 per ZrP nano, 0,85 per m ZrP-tris, 1,05 per m mix e 2,55 per m tq. È interessante infine notare infine come dalla somma dei rilasci (mg/cm²) nell’arco dei 7 giorni (vedi Tabella 19) per ogni campione si ottiene un valore che è identico – e va a confermare - il dato di uptake ottenuto precedentemente.

Per quanto riguarda i risultati dei rilasci con PHMB, purtroppo non è stato possibile sviluppare un metodo analitico idoneo alla determinazione del polimero nei campioni di rilascio. L’assorbanza del principio attivo si è infatti rivelata troppo bassa per consentirne il monitoraggio. Sono stati esplorati diversi approcci, tra cui metodi di complessazione con metalli (nichel, ferro, rame, cobalto) finalizzati a generare cromofori e incrementare la sensibilità di rilevazione, ma tali tentativi non hanno fornito risultati soddisfacenti. Anche la determinazione del PHMB mediante HPLC non ha portato a esiti positivi. Alla luce di queste difficoltà, lo studio del rilascio di PHMB dalle membrane viene rimandato a una fase di sviluppo successiva, in cui sarà necessario implementare e validare metodiche analitiche più adeguate tra cui quella più promettente è LC-MS.

I risultati dei test di rilascio di Vanco sono riportati in Tabella 20, espressi come quantitativo di API rilasciato per unità di volume di rilascio (mg/ml), area di membrana (mg/cm²), quantitativo totale (mg), quantitativo normalizzato rispetto all’uptake (%) e rilascio teorico giornaliero (mg/die/cm²).

Tabella 20. Risultati del test di rilascio per Vanco espressi come mg/ml, % sull’uptake, mg effettivi rilasciati, mg/cm² di membrana e mg/die/cm² per m tq e m mix

Campione	m mix	m tq	m mix	m tq	m mix	m tq
	Concentrazione		Percentuale dell’uptake		Quantitativo totale	
	(mg/ml)		(%)		(mg)	
punto 1	3,60±0,40	3,20±0,48	14,71%	17%	10,6±1,2	8,1±0,8
punto 2	5,19±1,66	3,32±0,26	21,21%	18%	13,3±1,1	9,5±0,8
punto 3	3,99±1,25	2,92±0,19	16,31%	16%	12,2±1,2	9,0±1,0
punto 4	3,81±0,68	3,25±0,40	15,57%	18%	11,8±1,0	10,7±1,0
punto 5	4,04±0,65	3,00±0,70	16,51%	16%	12,3±1,3	10,4±1,1

punto 6	2,27±0,24	1,59±0,09	9,28%	9%	7,9±0,8	5,7±0,7
punto 7	1,17±0,23	0,79±0,09	4,78%	4%	4,1±0,4	2,9±0,3
punto 8	0,40±0,19	0,38±0,09	1,63%	2%	1,2±0,2	1,5±0,1
tot	24,47±0,66	18,45±0,29	100%	100%	73,4±5,1	57,8±4,5
	Quantitativo su area di membrana (mg/cm²)		Quantitativo giornaliero su area di m (mg/die/cm²)			
punto 1	0,25±0,1	0,16±0,1				
punto 2	0,31±0,1	0,19±0,1				
punto 3	0,29±0,1	0,18±0,1				
punto 4	0,28±0,2	0,21±0,1				
punto 5	0,29±0,1	0,20±0,1				
punto 6	0,19±0,1	0,11±0,1				
punto 7	0,10±0,1	0,06±0,002				
punto 8	0,03±0,002	0,03±0,001				
tot	1,13±0,1	1,73±0,1	0,057±0,001	0,086±0,001		

I risultati dei rilasci espressi in mg/cm², in % sull'uptake e in mg/ml sono riportati per maggiore comprensione nei grafici in Figura 61. Come si può osservare, sia per la membrana caricata con i solidi lamellari e il CH (m mix) che per quella di controllo (m tq), il quantitativo di Vanco rilasciato nel tempo è abbastanza costante nei primi 5 punti (fino al giorno 12), per poi diminuire negli ultimi 3 (giorni 15-20). La cinetica di rilascio tra i due campioni mostra anche in questo caso una certa somiglianza nell'andamento. In tutti i punti sperimentali analizzati si osserva un quantitativo di farmaco rilasciato maggiore da parte della membrana funzionalizzata rispetto alla tal quale. I dati ottenuti indicano che la m mix ha rilasciato complessivamente 1,73 mg/cm² di vancomicina, rispetto agli 1,13 mg/cm² della m tq, con un incremento pari al 53%. Nel caso della membrana prototipo, fino al punto 6 (giorno 15) il livello di Vanco rilasciata è superiore alla MIC (2 µg/ml) [135], rendendola effettivamente in grado di rilasciare un quantitativo di API perfettamente efficace in termini di attività antibiofilm verso le specie considerate.

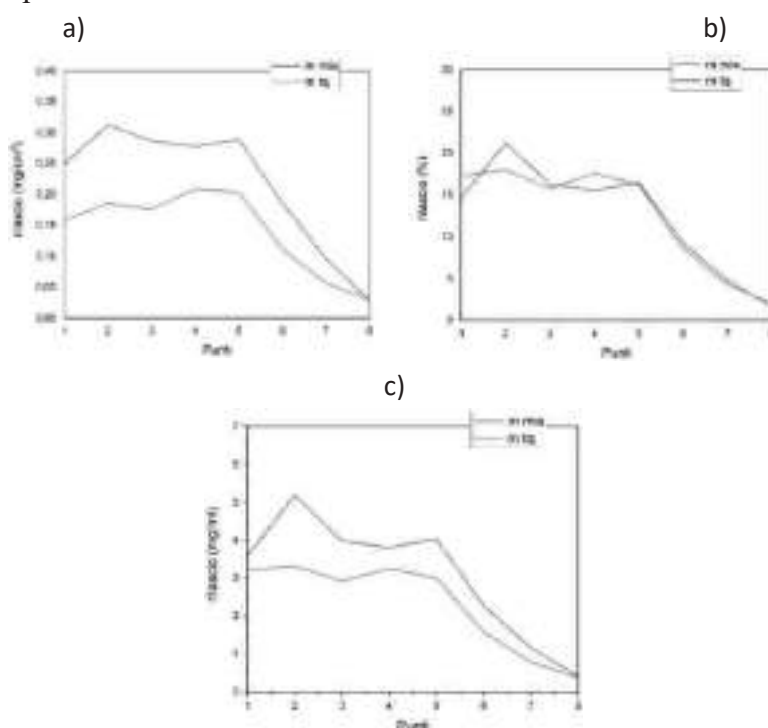


Figura 61. Cinetiche di rilascio osservate per Vanco espresse come a) mg/cm² di membrana e come b) % di rilascio e c) mg/ml in funzione del tempo da parte di: m tq (in arancio) e m mix (in blu)

Il quantitativo effettivo (in mg) di Vanco rilasciata è riportato nel grafico in Figura 62. Da questi valori emerge che la m mix rilascia complessivamente $73,4 \pm 5,1$ mg di vancomicina, a fronte dei $57,8 \pm 4,5$ mg rilasciati dalla m tq. Nel complesso, la membrana prototipo garantisce quindi un rilascio superiore del 27% rispetto al controllo.

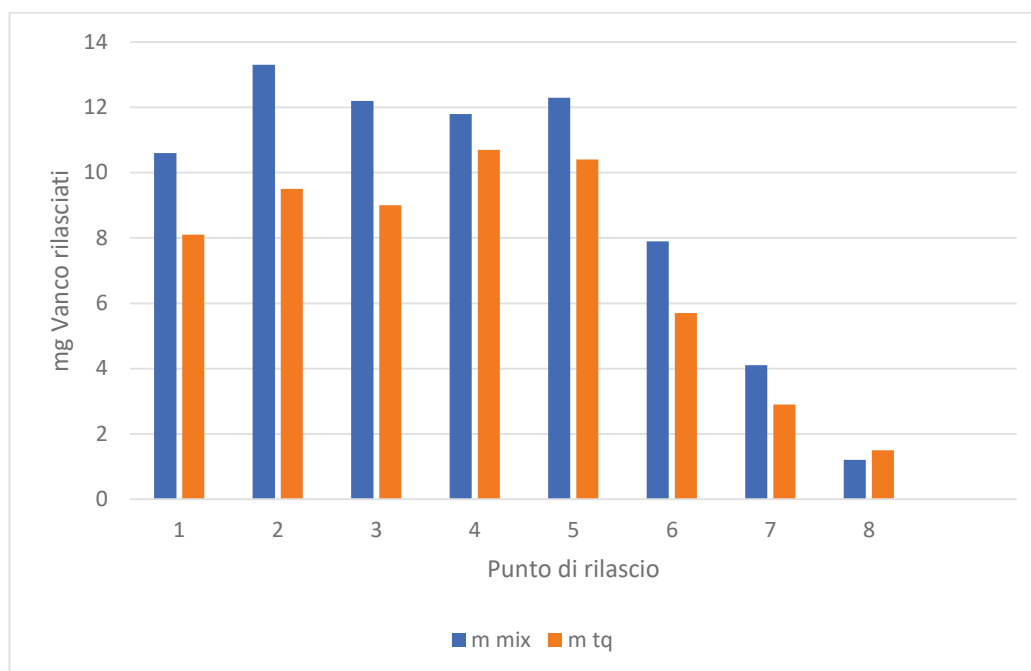


Figura 62. Quantitativo effettivo di Vanco (mg) rilasciato nel tempo da parte di: m tq (in arancio) e da m mix (in blu)

Per quanto riguarda il rilascio teorico giornaliero, si evidenziano valori di $0,057 \text{ mg/die/cm}^2$ per la membrana di riferimento e di $0,086 \text{ mg/die/cm}^2$ per la membrana prototipo. Anche in questo caso dalla somma dei rilasci (mg/cm^2) nell'arco degli 8 punti (vedi Tabella 20) per ogni campione si ottiene un valore che è identico – e va a confermare – il dato di uptake ottenuto precedentemente.

3.5 Studio dell'attività antibiofilm complessiva del prototipo ottenuto

3.5.1 Test antibiofilm verso *Candida parapsilosis*

Di seguito i risultati ottenuti per i test antibiofilm verso *C. parapsilosis* sui campioni in Tabella 6. In Figura 63 sono riportate le immagini delle piastre multiwell con a) i provini immersi dopo 24 h di incubazione, b) i provini post lavaggio e c) i fondi dei pozzetti colorati con cristal violetto; dove la serie A rappresenta la MPB tal quale, la serie B la MPB con CH HMW 2%, la serie C la MPB con CH MMW 2% e la serie D la MPB con CH LMW 2%.

Come si può osservare dalla Figura 63a, il terreno dopo 24 h di incubazione con il provino assume sfumature di colore leggermente diverse rispetto alla membrana tal quale (campione A) e ai controlli (ctrl), ad indicare una parziale solubilizzazione del CH (B-C-D), ma non si osserva dispersione dei solidi depositati. Le caratteristiche ottiche dei provini post incubazione rimangono uguali a quelle pre trattamento (Figura 63b). Dalla colorazione con cristal violetto (Figura 63c), si può osservare che i pozzetti più intensamente colorati, cioè quelli in cui si ha avuta la massima crescita microbica rispetto ai controlli sono quelli relativi ai campioni A, ovvero le MPB tal quali. A seguire, la crescita microbica (e la colorazione) diminuisce passando dalle membrane con CH HMW (B), per diventare praticamente incolore per i campioni con CH MMW (C) LMW (D), e indicando così una potenziale attività antimicrobica del chitosano a medio e basso MW, rispetto a quello ad alto.

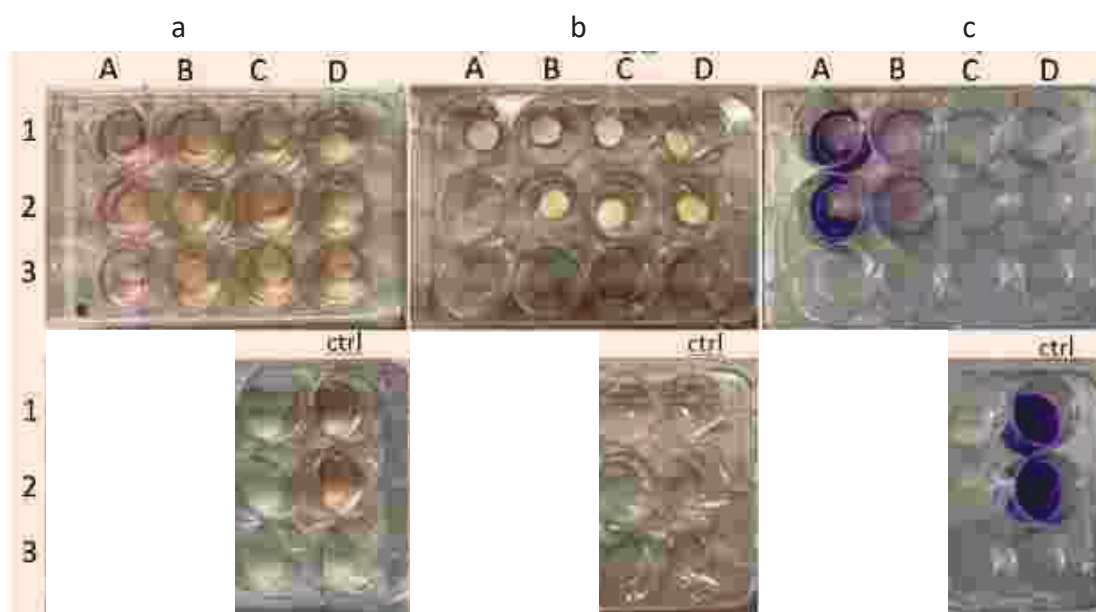


Figura 63. Pozzetti dei campioni A-D e ctrl a) con provini dopo 24 h di inoculo, b) con provini dopo lavaggio e c) dopo colorazione

Il trend di crescita sui dischetti sopra espresso è rilevabile in modo analogo anche sul fondo dei pozzetti corrispondenti, come si può evincere in Figura 64 (foto al microscopio ottico): si osserva la maggiore crescita microbica rispetto ai controlli (ctrl) sul pozzetto corrispondente alla membrana tal quale (A), minore su quello corrispondente alla membrana con CH HMW (B) e ancora più bassa su quello della membrana con CH MMW (C) e LMW (D).

L'attività filmogena di *C. parapsilosis* potrebbe essere anche inibita dalla semplice presenza fisica del dischetto di campione sul fondo del pozzetto, e per questo la crescita potrebbe risultare più blanda nei campioni A-D rispetto ai controlli. Tuttavia, la variabilità osservata all'interno del gruppo campioni indica che la crescita microbica è contrastata non solo dalla presenza fisica del campione sul fondo del pozzetto ma anche dal tipo di campione, e quindi dovuta in qualche modo alla presenza di CH di vari MW e/o dei solidi.

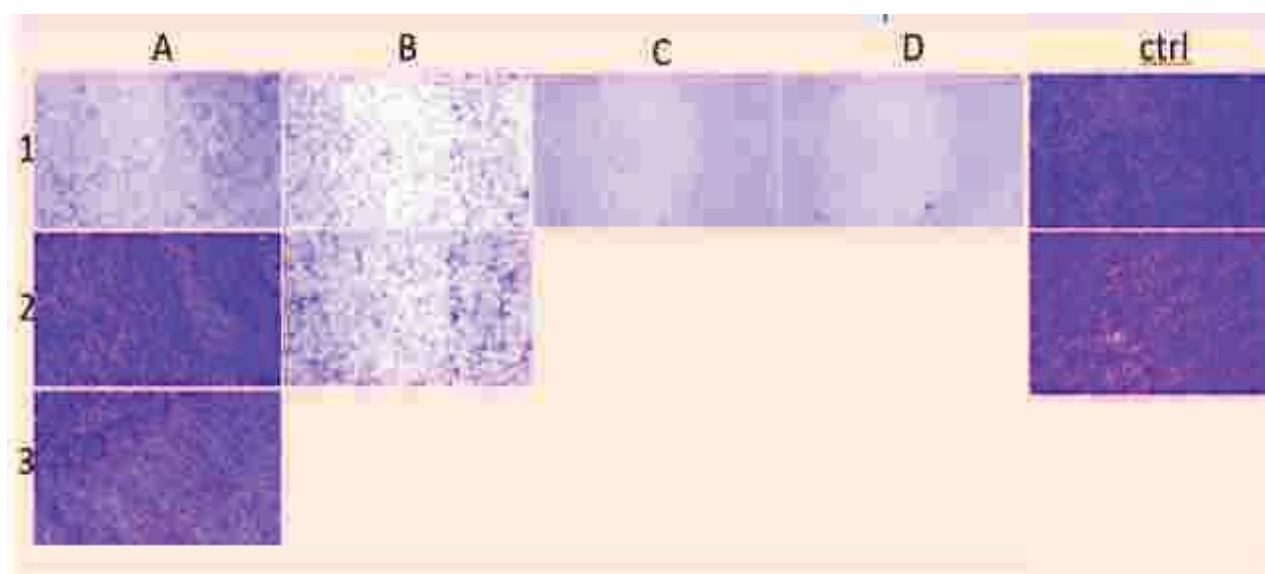


Figura 64. Foto al MO dei fondi dei pozzetti per i campioni A-D e ctrl

Per confermare questa ipotesi, è stata verificata la crescita microbica in sospensione nel terreno tramite lettura della OD. Dai dati spettrofotometrici dei vari pozzetti, riportati in Tabella 21, e colorati

a seconda del valore (OD<0,06 verde chiaro, OD<0,1 verde, OD<0,14 verde oliva, OD<0,22 giallo, OD<0,24 ocra, OD<0,28 arancio, OD<0,6 rosso, OD>0,6 rosso scuro) è emerso che la crescita microbica in sospensione è maggiore nei controlli e poi progressivamente minore nei pozzetti con: MPB tal quali, CH HMW, CH MMW e CH LMW, indicando una concordanza con i dati ottenuti al MO e confermando l’effetto del MW del CH sulla crescita microbica, in sospensione o forma biofilm adeso ai provini.

Tabella 21. Lettura della OD sui terreni dei vari pozzetti a seguito di 24 h di incubazione con i provini

	A	B	C	D	ctrl	plastica
1	0,1514	0,1654	0,0775	0,1182	0,6383	0,04
2	0,1011	0,2525	0,0812	0,0556	0,5464	
3	0,2225	0,1536	0,0733	0,0785		

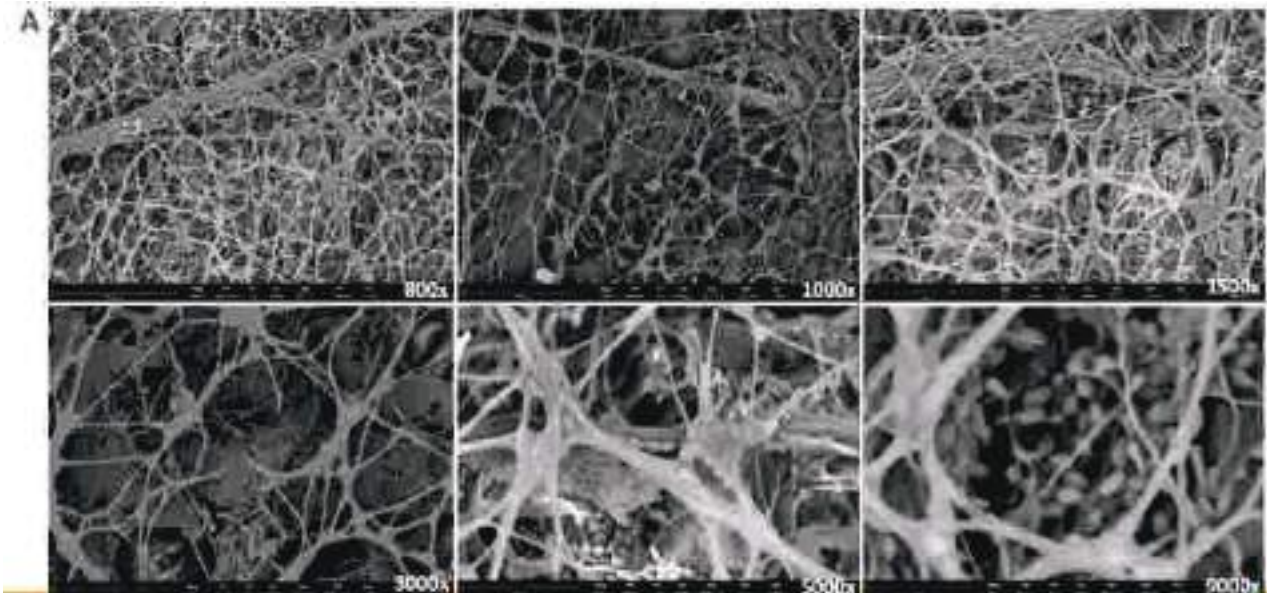


Figura 65. Immagini SEM del campione A (MPB tal quale) a vari ingrandimenti

Di seguito le immagini SEM delle MPB tal quali (Figura 65), con CH HMW (Figura 66), MMW (Figura 67) e LMW (Figura 68).

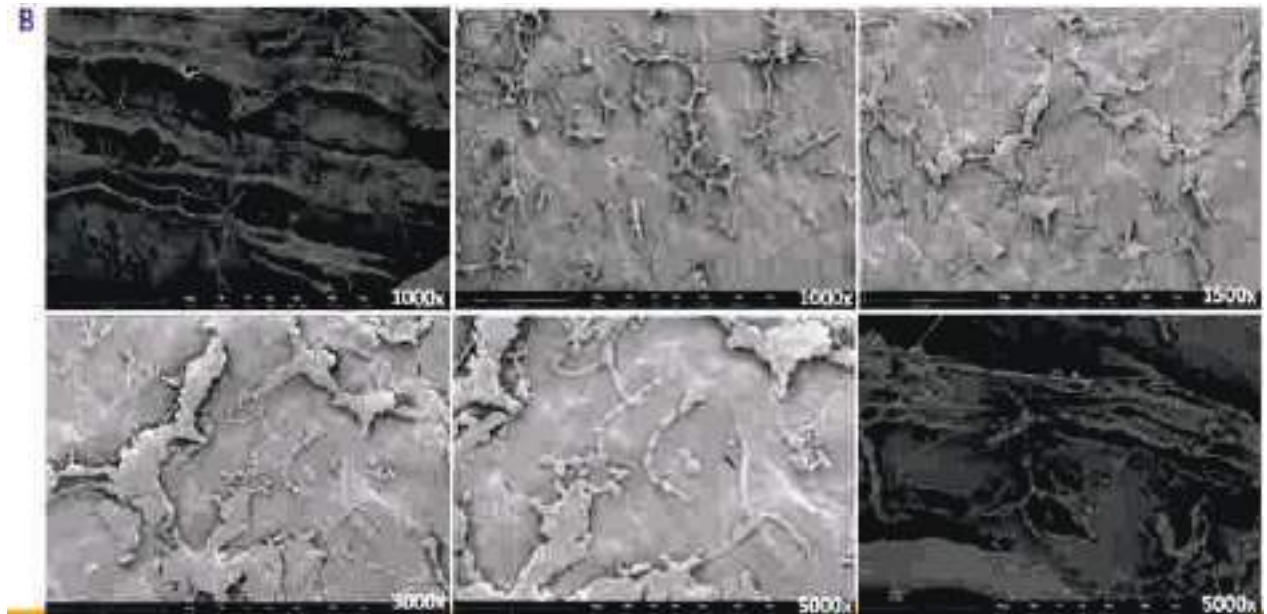


Figura 66. Immagini SEM del campione B (MPB + CH 2% HMW) a vari ingrandimenti

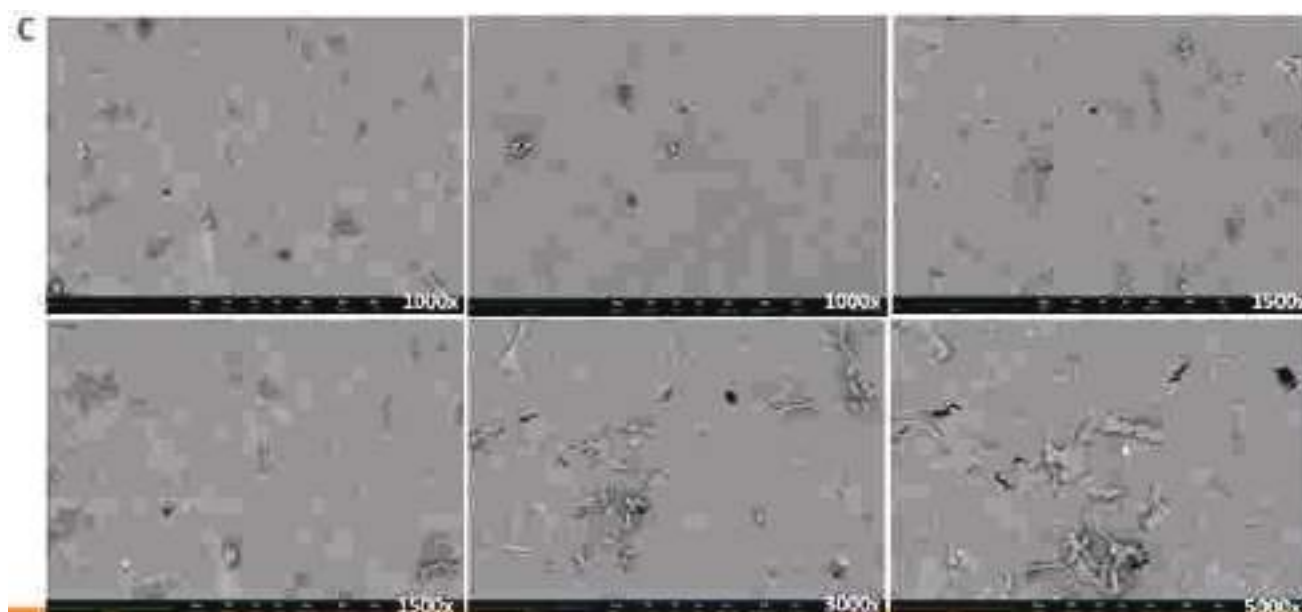


Figura 67. Immagini SEM del campione C (MPB + CH 2% MMW) a vari ingrandimenti

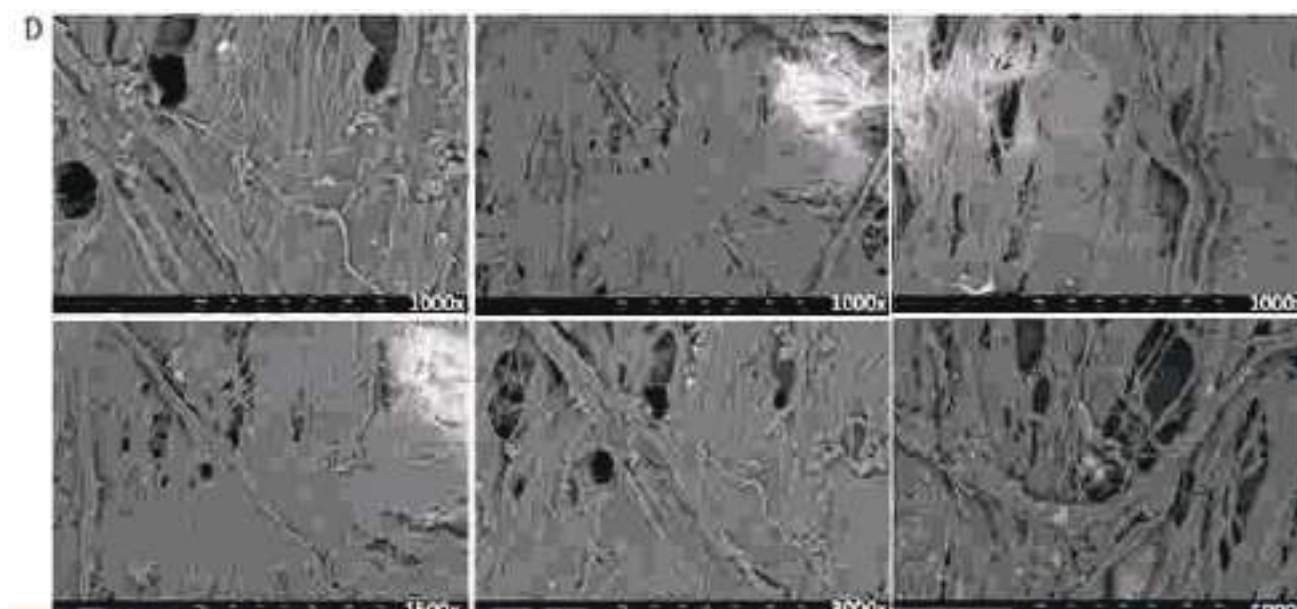


Figura 6845. Immagini SEM del campione D (MPB + CH 2% LMW) a vari ingrandimenti

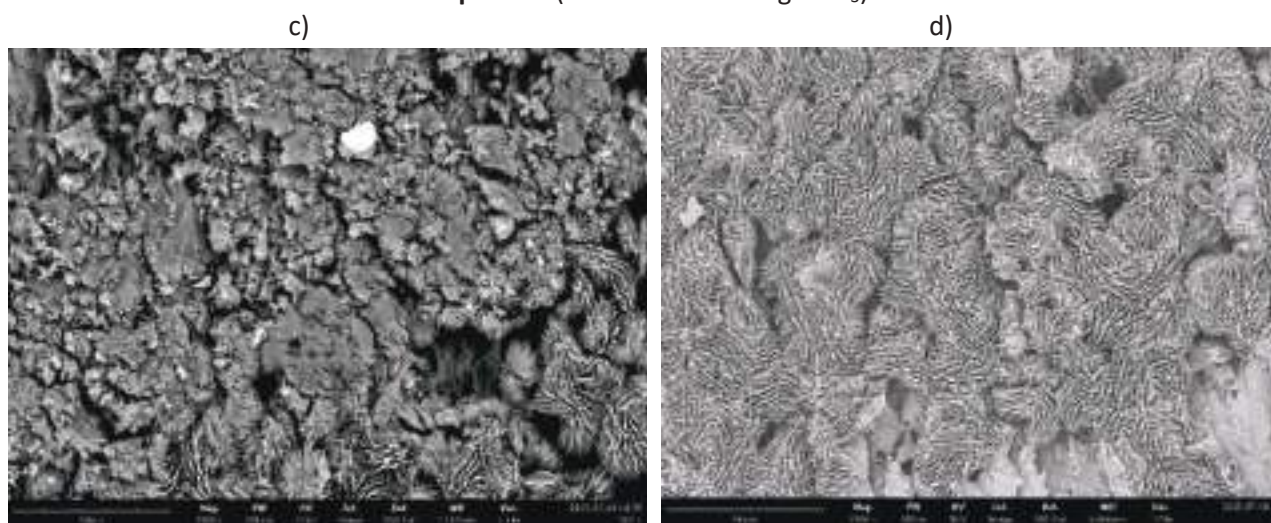
Dalle immagini SEM è possibile osservare come, in linea con l'ipotesi precedentemente espressa, la crescita microbica sia massima nelle membrane tal quali, con le cellule che vanno ad occupare ogni anfratto tra le fibre della membrana stessa. Tale crescita è decisamente inferiore nel caso delle membrane con CH HMW, dove si possono osservare ampi gruppi cellulari adesi alle sporgenze delle fibre e nelle cavità, ma non la copertura riscontrata nel caso precedente; mentre è del tutto trascurabile nel caso del CH MMW, che praticamente forma un film impenetrabile in superficie con pochissime rappresentanze di *C. parapsilosis*. La membrana con CH LMW presenta una situazione di scarsa crescita cellulare, ma maggior rispetto a quella del campione con MMW.

I risultati del test antibiofilm effettuato sui campioni A-D hanno mostrato che mentre la MPB tal quale è un buon substrato per la crescita del biofilm, le membrane trattate con chitosano a medio e basso peso molecolare sono molto meno propense dalla colonizzazione da parte delle cellule microbiche di *C. parapsilosis*.

Risultati diversi sono stati ottenuti nel caso dei campioni prodotti con il metodo del bar-coating (E,F,G,H,I,L) anziché immersione (B,C,D), come si può osservare dalle immagini SEM in Figura 69. Le membrane deposte con chitosano e solidi via bar-coating presentano – a differenza di quelle prodotte per immersione (Figure 65-68) vari gradi di crescita microbica. In particolare, nei campioni con $MgAlCO_3$ (Figura 69 a,b) e α -ZrP (e,f), si possono osservare numerose cellule microbiche tra le lamelle di solido lamellare. Nei campioni con ZrP nano (i,j) il gel non è ben visibile sulla superficie della MPB, mentre nel caso dello ZrP-tris (m,n) sono presenti agglomerati e non sono visibili le singole particelle di solidi lamellari, ma anche in questi due casi si osserva un'intensa colonizzazione microbica, come nel caso della membrana con solo chitosano (u,v). Nel caso invece del campione con il mix dei solidi (q,r) la grande copertura della membrana da parte dei solidi lamellari sembra non aver permesso colonizzazione microbica probabilmente per un effetto di impedimento fisico, ma non essendo le cellule ben distinguibili dai solidi, non è possibile trarre conclusioni definitive. In tutti i campioni a seguito di uptake di clorexidina invece si osserva una crescita microbica praticamente trascurabile e la presenza dei cristalli di clorexidina (formazioni sferiche) sulla superficie dei provini (Figura 69 c,d,g,h,l,o,p,s,t). Le scarsissime cellule, singole e non formanti strutture pseudo-biofilm sono in particolar modo visibili in Figura 69 k,w e x, dove si può notare una totale assenza di proliferazione cellulare anche nelle zone cave o con morfologia di fatto più soggetta a colonizzazione.



Campione E (MPB + CH 2% + $MgAlCO_3$)



Campione EC (MPB + CH 2% + $MgAlCO_3$ + CLO DG)

e)

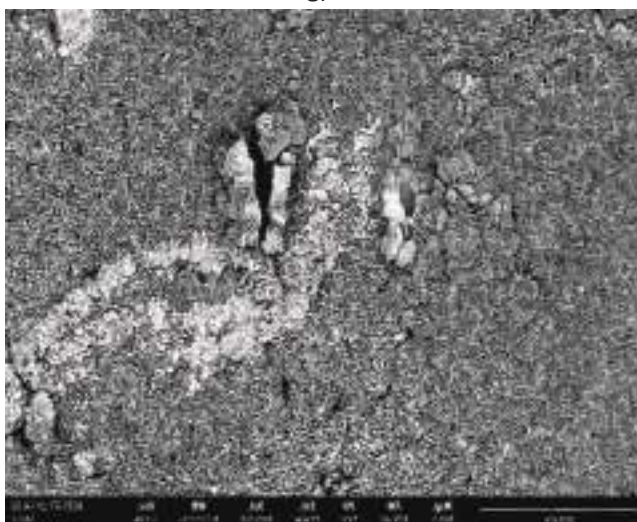


f)

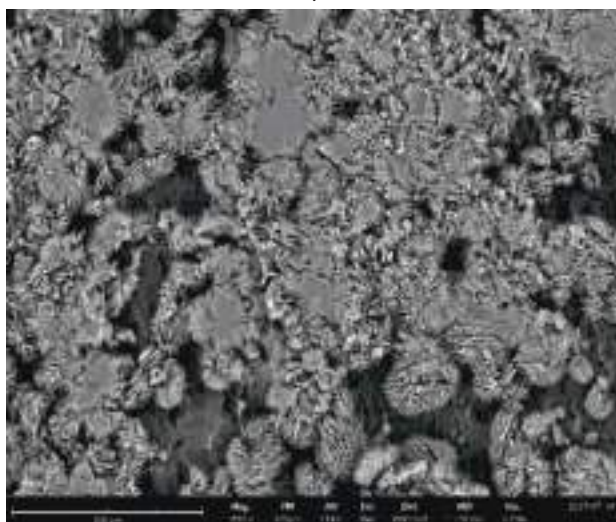


Campione F (MPB + CH 2% + α -ZrP)

g)

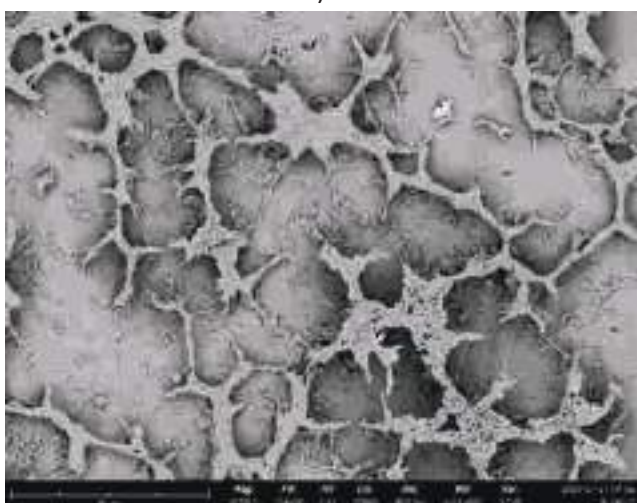


h)



Campione FC (MPB + CH 2% + α -ZrP + CLO DG)

i)

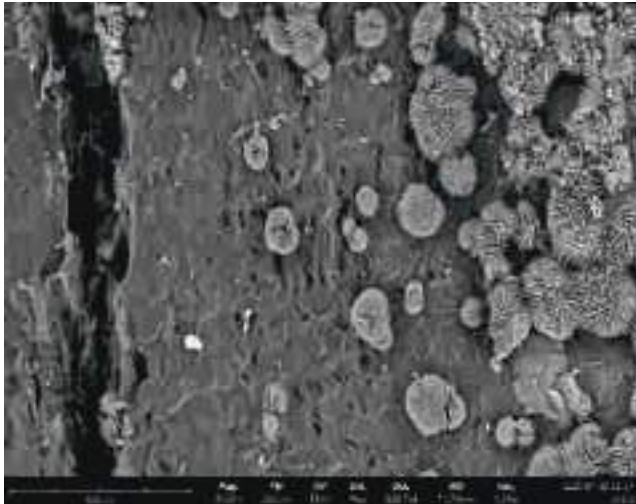


j)

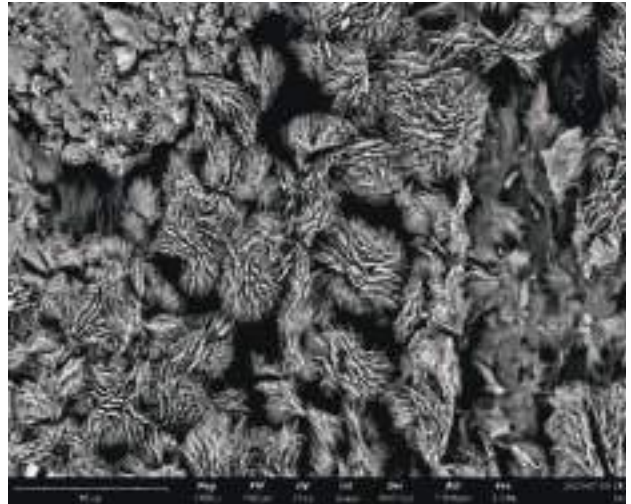


Campione G (MPB con CH 2% + ZrP nano)

k)

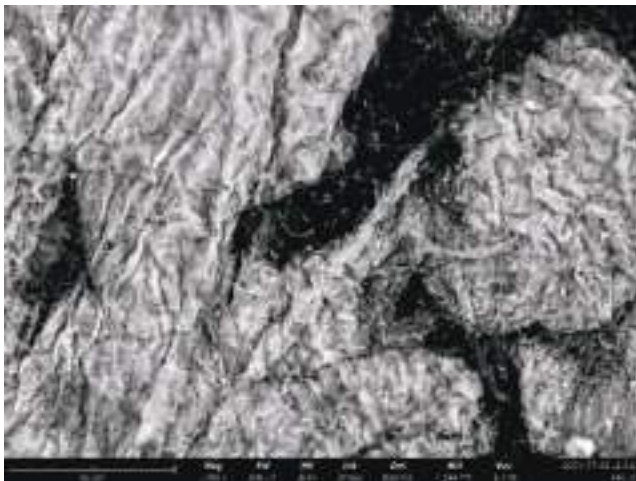


l)



Campione GC (MPB con CH 2% + ZrP nano + CLO DG)

m)

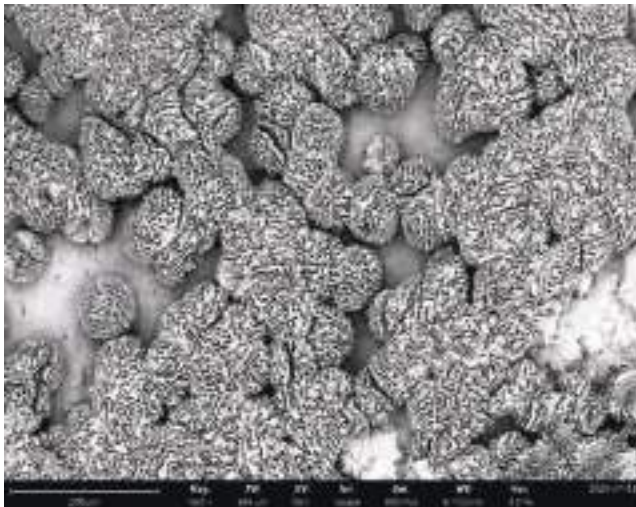


n)



Campione H (MPB con CH 2% + ZrP-tris)

o)



p)



Campione HC (MPB con CH 2% + ZrP-tris + CLO DG)

q)

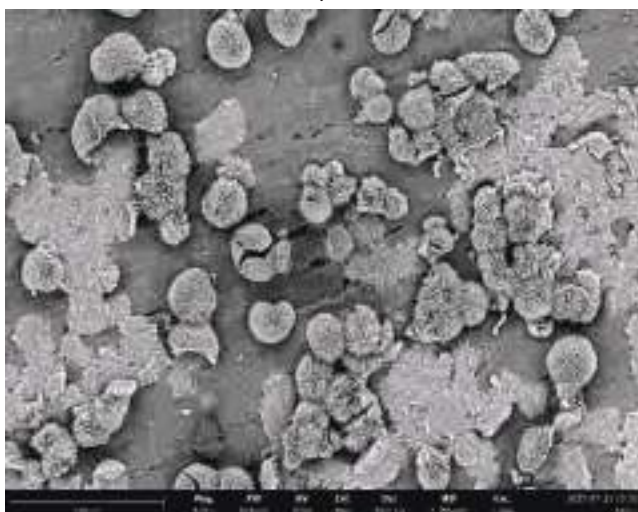


r)

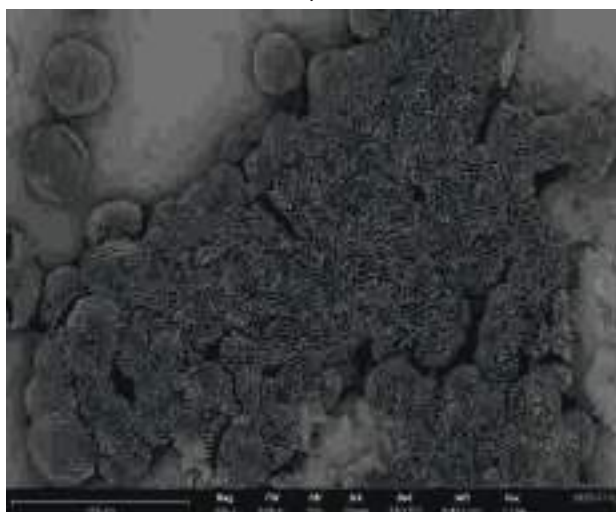


Campione I (MPB con CH 2% + mix solidi)

s)

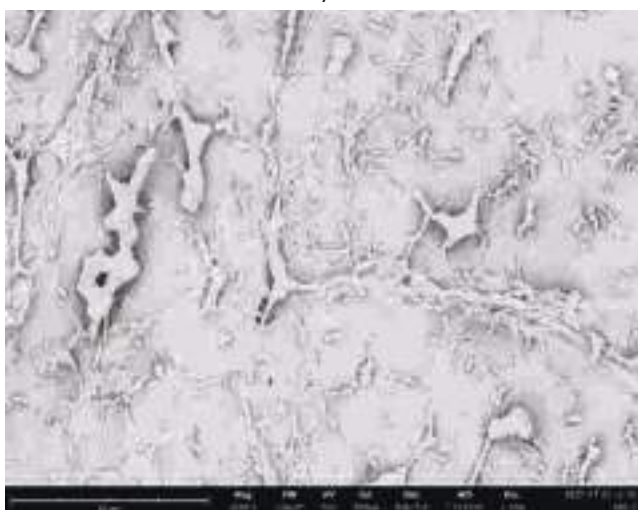


t)



Campione IC (MPB con CH 2% + mix solidi + CLO DG)

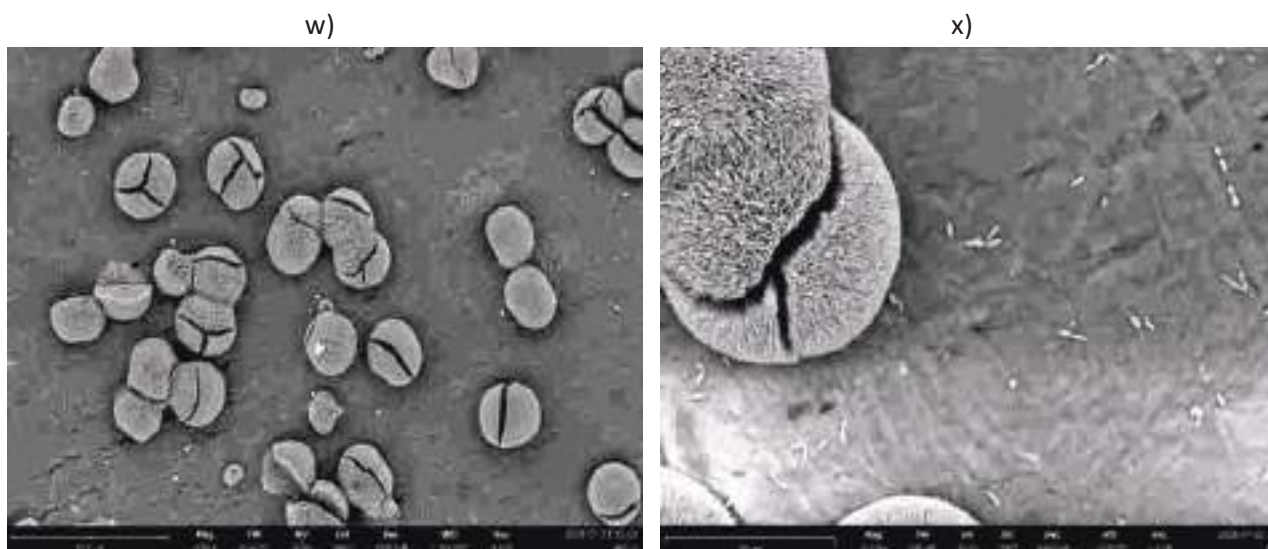
u)



v)



Campione L (MPB con CH 2%)

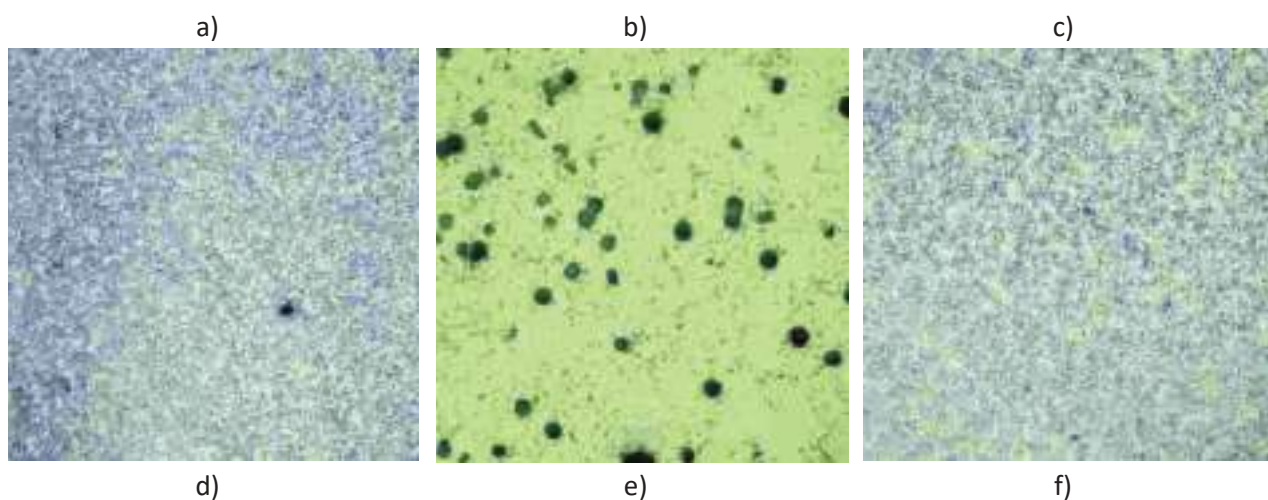


Campione LC (MPB con CH 2% + CLO DG)

Figura 69. Immagini SEM dei campioni a e b) E, c e d) EC, e e f) F, g e h) FC, i e j) G, k e l) GC, m e n) H, o e p) HC, q e r) I, s e t) IC, u e v) L, w e x) LC a vari ingrandimenti

In conclusione, tutti i campioni dove è stato realizzato l'uptake di clorexidina non mostrano presenza di biofilm di *C. parapsilosis*, confermando che la membrana ingegnerizzata con i solidi lamellari e le biocolle una volta imbibita con l'antisettico mostra inibizione dell'adesione del biofilm. I prototipi non imbibiti con l'antisettico invece, nel caso in cui il chitosano è depositato per immersione presentano attività anti-biofilm (nel caso di chitosano a medio e basso MW), mentre quelli ottenuti via bar-coating non presentano tale attività intrinseca, di fatto facendo ipotizzare che il metodo di deposizione delle soluzioni a base di CH sia fondamentale nella attività antibiofilm del prototipo, probabilmente per via della natura di schermatura fisica del CH verso la crescita microbica.

Risultati sul trend di crescita microbica in accordo con le immagini SEM sono stati ottenuti dalla analisi in microscopia ottica dei fondi dei pozzetti, riportate in Figura 70, dove è possibile osservare anche i cristalli di CLO (formazioni sferiche scure). Come previsto, in tutti i campioni con CLO (b,d,f,h,j) la crescita microbica è nettamente inferiore rispetto a quelli senza antisettico (a,c,e,g,i), i quali presentano invece crescita del tutto simile al controllo, cioè alla MPB tal quale (k).



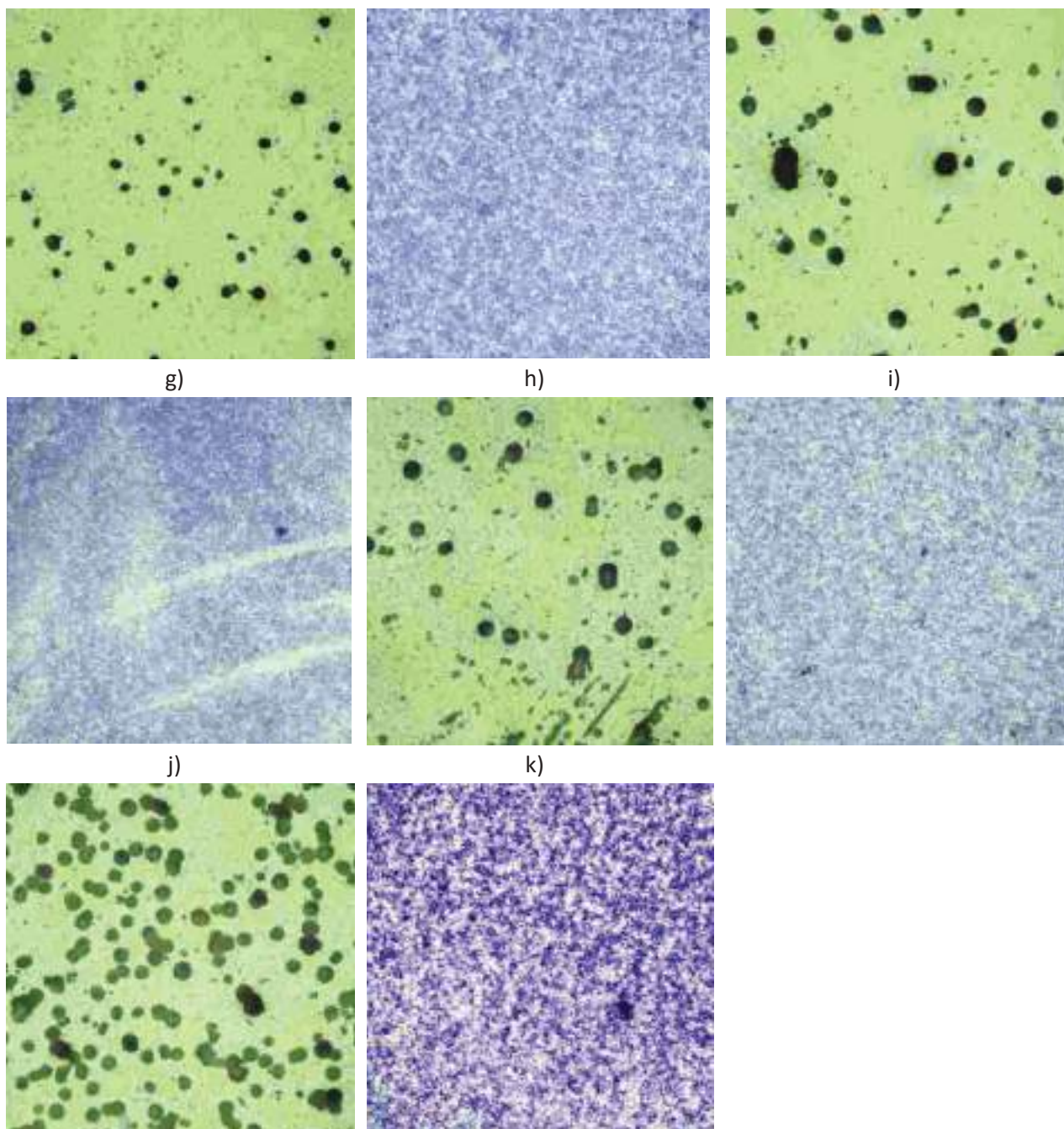


Figura 70. Immagini al MO dei campioni a) F, b) FC, c) G, d) GC, e) H, f) HC, g) I, h) IC, i) L, j) LC, k) ctrl.

3.5.2 Test antibiofilm verso *Staphylococcus epidermidis*

I dati indicati in Tabella 21 mostrano il titolo del ceppo al momento dell'inoculo nei pozzetti e il titolo dell'inoculo ottenuto dopo le 48 ore di incubazione a 37°C. La condizione di validità del test indicata dalla norma ISO 4768:2023 è soddisfatta quindi il test eseguito è ritenuto valido.

Tabella 21. Titolo del ceppo microbico in CFU/ml

	CFU/ml
Inoculo iniziale	$6,6 \times 10^4$
Titolo dopo 48 h incubazione	$7,9 \times 10^7$

In Tabella 22 sono riportati i valori delle misurazioni allo spettrofotometro (OD_{600}) dei campioni trattati con il ceppo (M e RIF) o con il solo terreno di coltura (M_0 e RIF_0), ognuno come media di tre misurazioni. Vengono riportati anche i dati del bianco.

Tabella 22. Misurazioni allo spettrofotometro della OD600 dei campioni testati

Campione M ₀				Campione RIF ₀			bianco
Media ± Dev st	Pozzetto 1	Pozzetto 2	Pozzetto 3	Pozzetto 1	Pozzetto 2	Pozzetto 3	-
	0,4810	0,5220	0,4550	0,2990	0,3570	0,4260	0,0450
	0,5450	0,4800	0,5240	0,3220	0,3790	0,4430	0,0470
	0,5130	0,5010	0,4895	0,3105	0,3680	0,4345	0,0460
	0,5012 ± 0,0277			0,3710 ± 0,0545			-
Campione M				Campione RIF			bianco
Media ± Dev st	Pozzetto 1	Pozzetto 2	Pozzetto 3	Pozzetto 1	Pozzetto 2	Pozzetto 3	-
	0,7520	1,0330	1,0810	0,4010	0,6980	0,5570	0,5570
	0,8940	1,1700	1,2050	0,3610	0,7480	0,5790	0,5790
	0,8230	1,1015	1,1430	0,3810	0,7230	0,5680	0,5680
	1,0225 ± 0,1616			0,5573 ± 0,1493			-

In Tabella 23 è possibile osservare come il valore di inibizione percentuale del biofilm ottenuto per il campione M indichi che non c'è per questo campione attività anti-biofilm nei confronti del ceppo *Staphylococcus epidermidis* nelle condizioni di test.

Tabella 23. Valori di OD₆₀₀ del campione trattato e non trattato dopo sottrazione dei bianchi e percentuale di inibizione del biofilm

A (M-M ₀)	B (RIF-RIF ₀)	Inibizione %
0,4753	0,1403	-240%

Anche in questo caso quindi, come già visto nei test antibiofilm verso *C. parapsilosis*, i campioni prodotti via bar-coating non mostrano attività antibiofilm intrinseca, confermando l'importanza della modalità di deposizione del coating a base di chitosano per ottenere questa funzionalità nei prototipi.

Conclusioni

Il progetto della presente tesi ha avuto come obiettivo la messa a punto di materiali e protocolli innovativi per il conferimento di struttura 3D stabile in ambiente umido e per la riduzione della contaminazione microbica e la prevenzione della formazione di biofilm su membrane in pericardio bovino utilizzate come dispositivi biomedicali. I risultati ottenuti hanno permesso di validare approcci originali e di aprire nuove prospettive di sviluppo, confermando la rilevanza applicativa e industriale delle soluzioni proposte.

Per quanto riguarda la messa a punto di metodi per il conferimento della struttura 3D alla MPB, la ricerca di modalità di essiccamento adeguate ha portato alla selezione della liofilizzazione come metodo di elezione, in quanto è l'unico che permette alle membrane di mantenere inalterata la loro integrità strutturale: in tutti gli altri casi analizzati invece (essiccamento con acetone, P_2O_5 , condizioni ambientali), si osserva un'eccessiva disidratazione delle fibre, con collasso della microstruttura, come mostrato dalle immagini SEM e confermato dalla percentuale di umidità relativa ottenuta tramite analisi termo gravimetrica (UR = 12% nel caso della liofilizzazione, UR > 16% negli altri casi). Inoltre, il processo di liofilizzazione delle membrane direttamente su dima ha permesso di osservare come esse, da secche, mantengano la struttura 3D conferitagli. È stata inoltre confermata l'idoneità dei materiali usati per le dime (acciaio inox e plastica PA12) nel mantenimento delle proprietà strutturali del PB.

Per quanto riguarda invece la messa a punto di metodi per la reticolazione delle membrane, utili per mantenerne la forma 3D in ambiente umido come quello biologico, il trattamento delle MPB con TPP ha dato dei risultati intermedi (357%), in termini di assorbimento di acqua, tra la GLU (325%) e i controlli (362%), indicando una reticolazione più blanda di quella con GLU, ma che permette di avere risultati migliori in termini di assorbimento di acqua rispetto ai campioni non trattati. Considerando invece i dati ottenuti per le MPB rivestite con coating polimerico a base di chitosano, si hanno risultati migliori in termini di assorbimento di acqua (minore aumento di peso %) per le membrane trattate con CH (HMW, 329% e MMW, 344% nel caso del TPP) rispetto a quelle non rivestite (357%), ad indicare un effetto sinergico della reticolazione del collagene di membrana e del chitosano del coating.

In conclusione, si è ottenuto che il TPP ha un effetto sull'assorbimento di acqua da parte dei campioni migliorativo rispetto ai controlli, anche se più blando rispetto alla GLU, e non dà criticità a livello di variazione delle proprietà meccaniche ed elastiche del tessuto e della citotossicità, a differenza della GLU. Se si accoppia il trattamento con TPP con l'utilizzo della biocolle chitosano, i risultati in termini di assorbimento di acqua sono anche migliori. Tuttavia, il mancato riscontro a livello di mantenimento della forma 3D in ambiente umido per 24h, poiché nessuno dei campioni mantiene la forma conferitagli dalla dima in queste condizioni, rende questo metodo non particolarmente informativo del grado di cross-linking e rende necessari ulteriori studi sulle condizioni d'uso del TPP e sulla sua valutazione, anche tramite tecniche quali FTIR, TGA e SEM.

La sperimentazione riguardante l'adesione dei solidi lamellari alle membrane per renderle dei substrati proattivi al caricamento con API anti-biofilm, ha portato alla selezione delle specie $MgAlCO_3$ 3:1, α -ZrP, ZrP-tris, ZrP nano come solidi lamellari di elezione, per le loro caratteristiche di biocompatibilità e di elevata capacità di caricamento con specie farmaceutiche, quest'ultima dovuta

anche alla loro elevata area superficiale e al pre-allargamento delle lamelle. Tali solidi sono stati sintetizzati e caratterizzati dal punto di vista dimensionale, morfologico e di composizione.

La sperimentazione relativa alle biocolle ha portato al testing di varie soluzioni di adesione a base di CH, COL, GEL e CEL, o di combinazioni di queste biocolle, e sono state selezionate quelle a base di chitosano a medio peso molecolare e della combinazione chitosano - collagene come soluzioni più idonee. Le loro caratteristiche intrinseche, tra cui pH e viscosità, rendono infatti queste soluzioni conciliabili con la stabilità dei solidi lamellari, come risultato dalle analisi XRD e ICP; compatibili con il mantenimento delle proprietà di membrana inalterate, come ottenuto dalle analisi SEM; e correlate ai migliori risultati in termini di flessibilità delle membrane, stabilità di adesione del film polimerico sulle membrane, omogeneità e stabilità dei solidi adesi a secco e in seguito a sollecitazione meccanica (strofinio). Inoltre, il trattamento con le soluzioni scelte non solo non modifica sostanzialmente le proprietà strutturali e funzionali delle membrane e dei solidi lamellari, ma ben si combina con il processo di liofilizzazione, fornendo anzi un supporto al mantenimento della loro forma 3D, se conferitagli prima della liofilizzazione.

A seguito delle prove sui protocolli di deposizione e della valutazione e caratterizzazione dei provini ottenuti, è stata selezionata come tecnica di elezione il bar-coating, per via delle sue caratteristiche di riproducibilità, semplicità di esecuzione ed efficienza, e poiché ha permesso di ottenere i risultati migliori in termini di omogeneità della distribuzione dei solidi in superficie, come ottenuto dalle analisi XRD, SEM ed EDX, e di tenacità dell'adesione del film e dei solidi sulla superficie dei provini. Sono state determinate le condizioni ottimali (diversa concentrazione di solido, diversa composizione di solidi, diverso numero di stesure, uno o due lati di stesura) per il protocollo di bar-coating. È stato ottenuto un prototipo di MPB con biocolle a base di CH e solidi lamellari, stabile in ambiente umido a 24 h, con carichi massimi di solidi pari alle seguenti percentuali (in peso rispetto al peso della membrana anidra): 3% per MgAlCO_3 , 2% per $\alpha\text{-ZrP}$, 12% per ZrP nano, 18% per ZrP-tris, 39% per il mix dei solidi (w/w). Gli stessi risultati sono stati ottenuti con la biocolle CH – COL 0,5%, tranne che nel caso dello $\alpha\text{-ZrP}$, il cui massimo carico stabile su membrana è risultato essere dell'8% (w/w). Poiché l'intervallo previsto inizialmente per il carico dei solidi su membrana era compreso tra lo 0,5 e il 10%, le attività sperimentali hanno portato in alcuni casi a risultati superiori all'atteso, e in particolare hanno dimostrato che le strategie di deposizione dei solidi lamellari influenzano in modo critico sia l'adesione che l'omogeneità del carico e hanno confermato il ruolo chiave e l'ambivalenza funzionale del chitosano, in quanto esso può sia agire da biocolle favorendo l'adesione dei solidi lamellari alla membrana, sia può aumentare la rigidità della membrana tramite reticolazione.

Le prove di intercalazione degli API di interesse nei solidi lamellari selezionati, svolte in via preliminare, hanno mostrato come $\alpha\text{-ZrP}$ sia un candidato idoneo per l'intercalazione (nei tempi desiderati e compatibili con le procedure di sala operatoria) sia di clorexidina che di PHMB, come si può dedurre dalle analisi XRD, TGA e DSC dei prodotti di intercalazione. Le analisi XRD infatti mostrano una modifica della distanza inter-lamellare tra la fase iniziale del solido e quella a seguito di contatto con l'API, dovuta all'intercalazione della specie attiva; mentre le analisi TGA e DSC mostrano rispettivamente un incremento nella perdita di peso percentuale e una variazione nelle transizioni termiche tra la fase iniziale del solido e il composto di intercalazione, ad indicare la presenza di molecole organiche in quest'ultimo. Per ZrP-tris non è stato possibile trarre risultati dall'analisi TGA, a causa della presenza dell'esfoliante organico tris nella fase iniziale, mentre per ZrP nano, essendo amorfo, non è stato possibile ottenere informazioni dallo spettro XRD. Tuttavia,

sia XRD per ZrP-tris che TGA per ZrP nano, hanno permesso di rilevare la presenza dell'API nel composto finale, confermando come questi due solidi lamellari siano anch'essi idonei per l'intercalazione di PHMB. Non è stata sperimentata l'intercalazione di vancomicina nell'idrotalcite poiché già ampiamente descritta in letteratura [151].

Dall'attività sperimentale portata avanti per l'uptake degli API da parte dei prototipi è stato ottenuto un protocollo semplice, funzionale e facilmente adattabile alle condizioni di sala operatoria, grazie ai tempi di contatto ridotti e all'utilizzo di concentrazioni clinicamente rilevanti, in linea con la pratica chirurgica. L'obiettivo della sperimentazione era il caricamento su membrana di un quantitativo di API maggiore di 1,0 mg/cm². La sperimentazione ha mostrato che, nel caso della clorexidina, i prototipi analizzati (a diversa composizione e concentrazione di solidi lamellari) sono tutti efficaci nel caricare un quantitativo di antisettico per unità di membrana maggiore di tale valore, e che tale quantitativo è, nel caso della membrana tal quale, circa 2 volte e mezzo superiore rispetto ai prototipi analizzati, fatto dovuto con ogni probabilità alla "saturazione" dei siti disponibili delle membrane trattate con la biocolla e i solidi rispetto alle tal quali, che di fatto si traduce in una minore imbibizione con la soluzione di API. La differenza osservata tra i vari prototipi suggerisce invece che il meccanismo di uptake nelle membrane funzionalizzate non sia puramente fisico, ma mediato anche dalle interazioni chimiche tra API e solidi lamellari. Tali interazioni, pur limitando la capacità di imbibizione, sono funzionali a un rilascio controllato e prolungato. Anche nel caso del PHMB l'uptake ha prodotto risultati simili a quelli ottenuti per clorexidina, con maggiore carico da parte della membrana tal quale rispetto a quelle funzionalizzate, mentre per quanto riguarda la vancomicina, in questo caso il prototipo di MPB con CH e solidi lamellari è efficace nel caricare un quantitativo di specie antibiotica maggiore rispetto a quello caricato dal controllo, che è paragonabile ai quantitativi osservati per le altre due specie antimicrobiche per le membrane tal quali.

Per quanto riguarda i test di rilascio, per tutti gli API oggetto di sperimentazione (tranne PHMB) è stato messo a punto un protocollo riproducibile e in grado di simulare condizioni simili a quelle *in vivo*. L'obiettivo della sperimentazione era ottenere un quantitativo di rilascio di API superiore alla MIC per il periodo più lungo possibile, in modo da garantire una quantità locale rilasciata di API sufficiente ad esercitare l'azione antimicrobica e a prevenire l'insorgenza di biofilm. Obiettivo del test di rilascio era anche ottenere un rilascio pari ad almeno 10 mg/die di specie antimicrobica e un rilascio medio giornaliero superiore a 0,05 mg/cm²,

Per quanto riguarda la clorexidina, la cinetica di rilascio mostra un titolo più elevato nelle prime 24 ore per la membrana tal quale, in linea con l'uptake inizialmente maggiore, tuttavia, nei giorni successivi (48 h – 7 giorni) i quantitativi rilasciati dai diversi prototipi (compresa la membrana tal quale) risultano paragonabili, dimostrando la capacità degli stessi di garantire un rilascio sostenuto e controllato. La concentrazione (mg/ml) di clorexidina rilasciata è superiore alla MIC verso *Staphylococcus epidermidis* (2 µg/ml) [148] per tutti e 7 i giorni di analisi e per tutti i campioni tranne la membrana tal quale; tale concentrazione è invece superiore alla MIC verso *Candida spp.* (< 145 µg/ml) [141] solo fino al giorno 3, nel caso della membrana con CH e mix di solidi fino al giorno 4. Si può quindi concludere che almeno fino al giorno 4 del test i prototipi sono efficaci nel rilasciare un quantitativo di antisettico sufficiente a garantire attività antimicrobica verso *S. epidermidis* e *Candida spp.* Il quantitativo complessivo di antisettico rilasciato dai prototipi nell'arco di 7 giorni varia nel range 143-177 mg, contro i 429 mg rilasciati dalla membrana di riferimento, con un decremento nella quantità del 33-41%. Da questi dati si può ottenere che i mg/die rilasciati sono circa

20-25 per tutti i prototipi analizzati (e 61 per la membrana tal quale), rientrando pienamente negli obiettivi prefissati. Il rilascio medio giornaliero per unità di area di membrana è risultato essere pari a 2,55 mg/die/cm² per la membrana tal quale e da 0,85 a 1,05 mg/die/cm² per le membrane prototipo, risultati in linea con gli obiettivi prefissati (valori superiori a 0,05 mg/cm²).

Nel caso della Vancomicina, la cinetica di rilascio è simile nell'andamento tra la membrana prototipo e il controllo, mostrano un valore abbastanza costante fino al giorno 12, per poi diminuire nei giorni 15-20. In ogni caso si osserva un quantitativo di farmaco rilasciato maggiore da parte della membrana funzionalizzata rispetto alla tal quale. La concentrazione (mg/ml) di vancomicina rilasciata è superiore alla MIC verso *Staphylococcus epidermidis* (2 µg/ml) [150] per tutta la durata del test (20 giorni) sia per il prototipo che per la membrana tal quale, rendendo il prototipo efficace nel rilasciare un quantitativo di antibiotico sufficiente ad inibire la crescita di *S. epidermidis*. Il quantitativo complessivo di antibiotico rilasciato dai prototipi nell'arco di 20 giorni è pari a 73,4 mg, contro i 57,8 mg della membrana di riferimento, con un incremento nella quantità del 27%. Da questi dati si può ottenere che i mg/die rilasciati sono circa 3,63 per il prototipo analizzato e 2,89 per la membrana tal quale, risultando più bassi di quelli prefissati inizialmente ma comunque promettenti per efficacia. Normalizzando i dati per superficie, la membrana trattata ha rilasciato 1,70 mg/cm² rispetto a 1,13 mg/cm² della membrana di riferimento (+53%). Il rilascio medio giornaliero per unità di area di membrana è risultato essere pari a 0,086 mg/die/cm² per la membrana prototipo e 0,057 mg/die/cm² per la membrana tal quale, risultati in linea con gli obiettivi prefissati (valori superiori a 0,05 mg/cm²).

Per il PHMB non è stato possibile ottenere risultati quantitativi di rilascio per l'assenza di un metodo analitico idoneo; i tentativi effettuati (complessazione con metalli per aumentare la sensibilità e HPLC) non hanno dato esito positivo. Vista la grande versatilità in ambito chirurgico di questo composto, sviluppi futuri della presente sperimentazione prevedranno sicuramente lo sviluppo di metodiche alternative, con particolare interesse verso la LC-MS, considerata la più promettente.

In sintesi, i risultati conseguiti dimostrano che i prototipi di membrane funzionalizzate con chitosano e solidi lamellari sono in grado di assorbire e rilasciare API in quantità clinicamente rilevanti e teoricamente efficaci in termini di attività antibiofilm verso le specie considerate. Si è osservato che il rilascio di tali specie antimicrobiche dai prototipi è più graduale e costante nel tempo rispetto alle membrane tal quali, aspetto funzionale per garantire un effetto terapeutico prolungato e un migliore controllo antibiofilm.

La valutazione dei prototipi non si è basata solo sulla cinetica di rilascio ma ha consistito nell'integrazione dei dati relative all'attività antimicrobica e antibiofilm. Sono stati messi a punto protocolli di valutazione dell'attività antibiofilm, strutturati su due specie microbiche modello: il fungo *Candida parapsilosis* e il batterio *Staphylococcus aureus epidermidis*. Le prove si sono basate sul contatto diretto delle specie con i supporti analizzati e sulla successiva quantificazione della crescita. Questo ha consentito di disporre sia di un'analisi semi-quantitativa (nel caso di *C. parapsilosis*) sia di un'analisi quantitativa (*S. epidermidis*).

Dall'integrazione dei dati ottenuti (SEM, MO, OD) è emerso che le MPB caricate con chitosano mostrano attività antibiofilm nei confronti di *C. parapsilosis*, in particolare quando si utilizzano chitosani a medio e basso peso molecolare, probabilmente per le loro proprietà filmogene, mentre l'effetto risulta meno marcato con il chitosano ad alto peso molecolare. È stato inoltre evidenziato che l'efficacia dipende fortemente dalle modalità di deposizione: l'immersione consente

probabilmente la formazione di uno strato di maggiore spessore e risulta più performante rispetto al metodo del bar-coating. Ciò rende necessario un approfondimento delle condizioni e dei metodi di stesura, al fine di massimizzare l'effetto antibiofilm e di conferire ai prototipi attività biofilm intrinseca oltre a quella fornita dall'antisettico/antibiotico, fornendo così un doppio livello di protezione contro le SSI.

Le immagini SEM dei campioni sottoposti ad up-take di clorexidina hanno confermato l'assenza di proliferazione di *C. parapsilosis* in tutti i campioni, confermando l'efficacia dei prototipi con chitosano e solidi lamellari nell'essere sistemi proattivi al caricamento con antimicrobici. Resta tuttavia da chiarire la durata dell'effetto antimicrobico una volta che la MPB funzionalizzata e imbibita con antisettico venga inserita in un sistema biologico.

In conclusione, l'attività di ricerca ha dimostrato la capacità del sistema di inibire la formazione e la crescita di alcune specie di biofilm patogeni su substrati chirurgici, evidenziandone il potenziale di applicazione nel campo della rigenerazione tissutale e della prevenzione delle infezioni nosocomiali ed ha portato alla definizione di nuove piattaforme ibride lamellari e biopolimeriche per la veicolazione di attivi farmaceutici, con potenziali applicazioni nei settori nutraceutico, cosmetico, farmaceutico e dei dispositivi medici.

Dalla sperimentazione è confermato il ruolo chiave del chitosano e la sua multivalenza funzionale che gli permette di agire sia da biocollo, favorendo l'adesione dei solidi lamellari alla membrana, sia da agente favorente la reticolazione, aumentando l'effetto dei cross-linker, sia di contribuire all'attività antibiofilm del dispositivo medico.

Riferimenti

- [1] *Chitin and chitosan: Properties and applications*. Rinaudo M. **Progress in Polymer Science**, 2006, Vol. 31 (7), 603-632.
- [2] *Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications*. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. **Progress in Polymer Science**, 2011, Vol. 36 (8), 981-1014.
- [3] *A review of chitin and chitosan applications*. Kumar MNVR. **Reactive and Functional Polymers**, 2000, Vol. 46 (1), 1-27.
- [4] *Chitosan and its antimicrobial potential*. Raafat D, Sahl HG. **Microbial Biotechnology**, 2009, Vol. 2, 186–201.
- [5] *Chitosan based bioadhesives for biomedical applications: A review*. Hamed H, Moradi S, Hudson SM, Tonelli AE, Kin MW. **Carbohydrate Polymers**, 2022, Vol. 282.
- [6] *Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship*. Sahariah P, Másson M. **Biomacromolecules**, 2017.
- [7] *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review*. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. **International Journal of Food Microbiology**, 2010, Vol. 144, 51-63.
- [8] *Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action*. Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. **Biomacromolecules**, 2003, Vol. 4 (6).
- [9] *A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan*. Goy RC, De Britto D, Assis OBG. **Polimeros: Ciencia y Tecnologia**, 2009, Vol. 19 (3), 241-247.
- [10] *Antimicrobial Degrees Activity of Acetylation of Chitosan and with Molecular Different Weights*. Omura Y, Shigemoto M, Akiyama T, Saimoto H, Shigemasa Y, Nakamura I, Tsuchido T. **Biocontrol Science**, 2003, Vol. 8 (1), 25-30.
- [11] *Chitosan-based membranes with different ionic crosslinking density for pharmaceutical and industrial applications*. Gierszewska-Drużyńska M, Ostrowska-Czubenko J. **Carbohydrate Polymers**, 2016, Vol. 153, 501-511.
- [12] *Studies on Effect of pH on Cross-linking of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note*. Bhumkar DR, Pokharkar VB. **AAPS PharmSciTech**, 2006, Vol. 7 (2).
- [13] *Antibacterial and Antibiofilm Effect of Low Viscosity Chitosan against Staphylococcus epidermidis*. Dragland IS, Rukke HV, Stenhagen ISR, Lonn-Stensrud J, Kopperud HM. **International Journal of Microbiology**, 2016.
- [14] *Antibacterial, Antibiofilm, and Antiadhesive Properties of Different Quaternized Chitosan Derivatives*. Piras AM, Esin S, Fabiano A, Zambito Y, Benedetti A, Maisetta G, Batoni G. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019, Vol. 20, 6297.
- [15] *Polymeric Bioadhesive Patch Based on Ketoprofen-Hydrotalcite Hybrid for Local Treatments*. Pagano C, Latterini L, Puglia D, Ricci M, Di Michele A, Luzi F, Viseras Iborra CA, Perioli L. **Pharmaceutics**, 2020, Vol. 12, 733.
- [16] *Ionically Crosslinked Chitosan Membranes Used as Drug Carriers for Cancer Therapy Application*. Alecsandra Ferreira Tomaz A, Sobral de Carvalho SM, Cardoso Barbosa R, Silva SML, Gutierrez MAS, De Lima AGB, Fook MVL. **Materials**, 2018, Vol. 11, 2051.

- [17] *Development and Characterization of Xanthan Gum and Alginate Based Bioadhesive Film for Pycnogenol Topical Use in Wound Treatment*. Pagano C, Puglia D, Primavilla S, Luzi F, Ceccarini MR, Di Michele A, Beccari T, Scuota S, Viseras Iborra CA, Ramella D, Ricci M, Perioli L. **Pharmaceutics**, 2021, Vol. 13, 324.
- [18] *Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Chitosan Nanoparticles Against Staphylococcus aureus Strains Isolated from Bovine Mastitis Milk*. Godoy CA, Balic I, Moreno AA, Larenas TB, Gamboa A, Diaz O, Colarte CA, Carofuentes N. **Pharmaceutics**, 2025, Vol. 17, 186.
- [19] *Chitosan and Hydroxyapatite Based Biomaterials to Circumvent Periprosthetic Joint Infections*. Costa-Pinto AR, Lemos AL, Kekhasharú Tavaría F, Pintado M. **Materials**, 2021, Vol. 14, 804.
- [20] *Preparation and Characterization of TPP-Chitosan Crosslinked Scaffolds for Tissue Engineering*. Silvestro I, Francolini I, Di Lisio V, Martinelli A, Scotto d'Abusco A, Scoppio A, Piozzi A. **Materials**, 2020, Vol. 13, 3577.
- [21] *Chitosan and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria*. Khan F, Nguyen Phamb DT, Folarin Oloketuyic S, Manivasagana P, Ohd J, Kim YM. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2020, Vol. 185.
- [22] *A Sponge-Like Double-Layer Wound Dressing with Chitosan and Decellularized Bovine Amniotic Membrane for Promoting Diabetic Wound Healing*. Yang Y, Zhang Y, Yan Y, Ji Q, Dai Y, Jin S, Liu Y, Chen J, Teng L. **Polymers**, 2020, Vol. 12, 535.
- [23] *Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan*. Ke CL, Deng FS, Chuang CY, Lin CH. **Polymers**, 2021, Vol. 13, 904.
- [24] *Optimization of Chitosan Glutaraldehyde-Crosslinked Beads for Reactive Blue 4 Anionic Dye Removal Using a Surface Response Methodology*. Galan J, Trilleras J, Zapata PA, Grande-Tovar CD. **Life**, 2021, Vol. 11, 85.
- [25] *An In Vitro Study of Chitosan-Coated Bovine Pericardium as a Dural Substitute Candidate*. Al Fauzi A, Fauza J, Widiyanti P, Suroto H, Parenrengi MA, Suryaningtyas W, Suroto NS, Utomo B, Firda Y. **Journal of Functional Biomaterials**, 2023, Vol. 14, 488.
- [26] *Chitosan-Based Antibacterial Films for Biomedical and Food Applications*. Khubiev OM, Egorov AR, Kirichuck AA, Khrustalev VN, Tskhovrebov AG, Kritchenkov AS. **International Journal of Molecular Sciences**, 2023, Vol. 24, 10738.
- [27] *Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co crosslinked chitosan gel beads*. Mi FW, Sung HW, Shyu SS, Su CC, Peng CK. **Polymer**, 2003, Vol. 44, 6521–6530.
- [28] *Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan*. Kean T, Thanou M. **Advanced Drugs Delivery**, 2010, Vol. 62 (1), 3–11.
- [29] *Photocrosslinkable chitosan: an effective adhesive with surgical applications*. Ishiharaa M, Onob K, Saitoc Y, Yurac H, Hattoria H, Matsua T, Kuritaa A. **International Congress Series**, 2001, Vol. 1223, 251–257.
- [30] *Experimental evaluation of photocrosslinkable chitosan as a biologic adhesive with surgical applications*. Ono K, Ishihara M, Ozeki Y, Deguchi H, Sato M, Saito Y, Yura H, Sato M, Kikuchi M, Kurita A, Maehara T. **Surgery**, 2001, Vol.130 (5), 844-850.
- [31] *Chitosan as an adhesive*. Mati-Baouchea N, Elchinger PH, De Baynast H, Pierre G, Delattre C, Michaud P. **European Polymer Journal**, 2014, Vol. 60, 198-212.

- [32] *Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive*. Ono K, Saito Y, Yura H, Ishikawa K, Kurita A, Akaike T, Ishihara M. **Journal of Biomedical Materials Research**, 2000.
- [33] *Analysis of clinical trials on biomaterial and therapeutic applications of chitosan: A review*. Kantak MN, Bharate SS. **Carbohydrate Polymers**, 2022, Vol. 268.
- [34] *Mechanical, Bioadhesive Strength and Biological Evaluations of Chitosan films for Wound Dressing* Khan TA, Peh KK, Ch'ng HS. **Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences**, 2000. Vol. 3 (3), 303-311.
- [35] *Effect of Selected Crosslinking and Stabilization Methods on the Properties of Porous Chitosan Composites Dedicated for Medical Applications*. Biernat et al. **Polymers**, 2023, Vol. 15, 2507.
- [36] *Bovine Pericardium-Chitosan As A Biomaterial Prospect For Substitute and Accelerate Tissue Healing of Dural Defect: A Review*. Al Fauzi A, Suroto H, Widiyanti P, Suroto NS, Fauza J, Thamrin AMH, Bella FR. **Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences**, 2021, Vol. 17(SUPP6): 102-109.
- [37] *Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Chitosan on the Oral Pathogen Candida albicans*. Costa, E, Sara S, Tavaría F, Pintado E. **Pathogens**, 2014, Vol. 3, 908-919.
- [38] *Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications*. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2004, Vol. 57 (1), 35-52.
- [39] *Anti-biofilm properties of chitosan coated surfaces*. Carlson RP, Taffs R, Davison WM, Stewart PS. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, 2008, Vol. 19 (8), 1035-1046.
- [40] *Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives*. Li J, Zhuang S. **European Polymer Journal**, 2020, Vol. 138.
- [41] *The extracellular matrix as a biologic scaffold material*. Badylak SF. **Biomaterials**, 2007, Vol. 28 (25), 3587-93.
- [42] *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Crapo PM; Gilbert TW, Badylak SF. **Biomaterials**, 2011, Vol. 32 (12) 3233-3243.
- [43] *Tripolyphosphate-Crosslinked Chitosan/Gelatin Biocomposite Ink for 3D Printing of Uniaxial Scaffolds*. Fischetti T, Celikkin N, Contessi Negrini N, Farè S, Swieszkowski W. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2020, Vol. 8.
- [44] *Chitosan Adsorption on the Collagen Tissue of the Bovine Pericardium from Solutions in Carbonic Acid: Role of Pressure*. Chaschin IS, Badun GA, Chernysheva MG, Bakuleva NP. **Physical Chemistry**, 2016, Vol. 472, 32-35.
- [45] *Significantly Accelerated Wound Healing of Full-Thickness Skin Using a Novel Composite Gel of Porcine Acellular Dermal Matrix and Human Peripheral Blood Cells*. Kuna VK, Padma AM, Hakansson J, Nygren J, Sjöback R, Petronis S, Sumitran-Holgersson S. **Cell Transplantation**, 2017, Vol. 26, 293-307.
- [46] *Bovine pericardium: effect of lyophilization*. **ASAIO Bioengineering Abstracts**.
- [47] *Lyophilized (freeze-dried) bovine pericardium*. **ASAIO Bioengineering/Tissue Engineering Abstracts**.
- [48] *Thermo-Mechanical and Adhesive Properties of Polymeric Films Based on ZnAl-Hydrotalcite Composites for Active Wound Dressings*. Perioli L, Dorigato A, Pagano C, Leoni M, Pegoretti A. **Polymer engineering and science**, 2018.

- [49] *Plasma-deposited membranes for controlled release of antibiotic to prevent bacterial adhesion and biofilm formation*. Hendricks SK, Kwok C, Shen M, Horbett TA, Carlson BD, Bryers JD. **Journal of Biomedical Materials Research**, 2000, Vol. 50 (2):160-70.
- [50] *Electrophoretic Deposition of Gentamicin-Loaded Silk Fibroin Coatings on 3D-Printed Porous Cobalt–Chromium–Molybdenum Bone Substitutes to Prevent Orthopedic Implant Infections*. Han C, Yao Y, Cheng X, Luo J, Luo P, Wang Q, Yang F, Wei Q, Zhang Z. **Biomacromolecules**, 2017.
- [51] *Copolymer/Clay Nanocomposites for Biomedical Applications*. Murugesan S, Scheibel T. *Advanced Functional Materials*, 2020, Vol. 30.
- [52] *Solid-State Supramolecular Chemistry: Two and Three dimensional Inorganic Networks*. Alberti G, Bein T et Al. Pergamon, Elsevier Science Ltd Press, 1996, Chap. 1, Vol. 7.
- [53] *Formation region and structural model of γ -zirconium phosphate*. Yamanaka S, Tanaka M. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, 1979, Vol. 41 (1), 45-48.
- [54] *Inorganic ion-exchange pellicles obtained by delamination of α -zirconium phosphate crystals*. Alberti G, Casciola M, Costantino U. **Journal of Colloid and Interface Science**, 1985, Vol. 107 (1), 256-263.
- [55] *Ac conductivity of anhydrous pellicular zirconium phosphate in hydrogen form*. Alberti G, Casciola M, Costantino U, Leonardi M. **Solid State Ionics**, 1984, Vol. 14 (4), 289-295.
- [56] *Preparation, proton transport properties and use in gas sensors of thin films of zirconium phosphate with γ -layered structure*. Alberti G, Cherubini F, Palombari R. **Sensors and Actuators**, 1995, B24-25, 270.
- [57] Manasse E, **Atti Società Toscana Scienze Naturali**, Proc. Verb., 1915, 24, 92.
- [58] *Solid-State Supramolecular Chemistry: Two and Three dimensional Inorganic Networks*. Alberti G, Bein T et Al. Pergamon, Elsevier Science Ltd Press, 1996, Chap. 8, Vol. 7.
- [59] *Zur Kenntnis der Doppelhydroxyde und basischen Doppelsalze III. Über Magnesium-Aluminiumdoppelhydroxyd*. Feitknecht W, Gerber M. **Helvetica Chimica Acta**, 1942, Vol. 25, 131.
- [60] *Zum Mechanismus der Fällung und Alterung schwerlöslicher Niederschläge. Fällung und Alterung basischer Zinkverbindungen*. Feitknecht W, Weidmann H. **Helvetica Chimica Acta**, 1942, Vol. 25, 555.
- [61] *Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications*. Cavani F, Trifirò F, Vaccari A. **Catalysis Today**, 1991, Vol. 11 (2), 173-301.
- [62] *Structural Aspects of Layered Double Hydroxides*. Evans DG, Slade RCT. 2006, Vol. 119, 1–87.
- [63] *Layered Double Hydroxides*, Duan X, Evans DG. Springer, 2006.
- [64] *Layered double hydroxide as novel antibacterial drug delivery system*. Ryu SJ, Jung H, Oh JM, Lee JK, Choy JH. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, 2010, Vol. 71, 685-688.
- [65] *The crystal structure of pyroaurite*. Allmann R. **Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry**, 1968, B24, 972.
- [66] *Segregation and cation-ordering in sjögrenite and pyroaurite*. H.F.W. Taylor, **Mineralogical Magazine**, 1969, Vol. 37, 338.
- [67] *Doppelschichtstrukturen mit brucitähnlichen Schichtionen $[Me(II)_{1-x}Me(III)_x(OH)_2]^{x+}$* . Allmann R, **Chimia**, 1970, Vol. 24, 99.

- [68] *A crystal-chemical study of Mg,Al and Ni,N hydroxy-perchlorates and hydroxycarbonates*. Brindley GW, Kikkawa S. **American Mineralogist**, 1979, Vol. 64, 836-843.
- [69] *A New Route to Obtain Well Crystallized Layered Double Hydroxides*. Delmas C, Borthomieu Y. **Journal of Solid State Chemistry**, 1993, Vol. 104(2), 345-352.
- [70] *Thermal decomposition of hydrotalcites. An infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopic study*. Rey F, Fornés V, Rojo JM. **Journal of Chemical Society**, 1992, Vol. 88, 2233-2238.
- [71] *New route to layered double hydroxides intercalated by organic anions: precursors to polyoxometalate-pillared derivatives*. Dimotakis ED, Pinnavaia TJ. *Inorganic Chemistry*, 1990, Vol. 29 (13), 2393.
- [72] *Progress in Layered Double Hydroxides - from Synthesis to New Applications*. Costantino U, Nocchetti M. 2022, Edizioni World Scientific, Vol.8.
- [73] *Polyvinyl Alcohol Coatings Containing Lamellar Solids with Antimicrobial Activity*. Bastianini M, Sisani M, Pietrella D, Escudero García R, Di Guida I, Russo C, Narducci R. **Physchem**, 2024, Vol. 4, 272–284.
- [74] *Effect of layered double hydroxide, expanded graphite and ammonium polyphosphate additives on thermal stability and fire performance of polyisocyanurate insulation foam*. Asimakopoulou E, Zhang J, Mckee M, Wieczorek K, Krawczyk A, Andolfo M, Kozlecki T, Scatto M, Sisani M, Bastianini M, Karakassides A, Papakonstantinou P. **Thermochimica Acta**, 2020, Vol. 693.
- [75] *Composite membranes based on polyvinyl alcohol and lamellar solids for water decontamination*. Bastianini M, Sisani M, Naryyev E, Petracci A, Di Guida I, Narducci R. **New Journal of Chemistry**, 2024, Vol. 48, 2128–2139.
- [76] *Layered Double Hydroxide-Based Catalysts: Recent Advances in Preparation, Structure, and Applications*. Xu M, Wei M. **Advanced Functional Materials**, 2018, Vol. 28 (47).
- [77] *Intercalation of Perylenediimide Dye into LDH Clays: Enhancement of Photostability*. Chancal C, Kausik D, Sudip M. **The Journal of Physical Chemistry**, 2010, Vol. 115 (5).
- [78] *Hybrid Materials Based on Magnetic Layered Double Hydroxides: A Molecular Perspective*. Abellan G, Martí-Gastaldo C, Ribera A, Coronado E. **Accounts of Chemical Research**, 2015, Vol. 48 (6).
- [79] *Cellular Uptake Mechanism of an Inorganic Nanovehicle and Its Drug Conjugates: Enhanced Efficacy Due To Clathrin-Mediated Endocytosis*. Oh JM, Choi SJ, Kim ST, Choy JH. **Bioconjugate Chemistry**, 2006, Vol. 17 (6).
- [80] *Assessing the biocompatibility of layered double hydroxide by intramuscular implantation: histological and microcirculation evaluation*. Rodrigues Cunha VR, Barbosa de Souza R, Rebello Pinto da Fonseca Martins AMC, Hong Jun Koh I, Leopoldo Constantino VR. **Scientific Reports**, 2016, Vol. 6.
- [81] *Preformulation studies on host–guest composites for oral administration of BCS class IV drugs: HTlc and furosemide*. Perioli L, Ambroggi V, Nocchetti M, Sisani M, Pagano C. **Applied Clay Science**, 2011, Vol. 53, 696-703.
- [82] *LDH Nanocontainers as Bio-Reservoirs and Drug Delivery Carriers*. Oh JM, Park DH, Choi SJ, Choy JH. By Jae-Min Oh, Dae-Hwan Park, Soo-Jin Choi and Jin-Ho Choy. **Recent Patents on Nanotechnology**, 2012, Vol. 6 (3), 200-217.
- [83] *Layered double hydroxide nanoparticles in gene and drug delivery*. Ladewig K, Xu ZP, Lu GQ. **Expert Opinion on Drug Delivery**, 2009, Vol. 6 (9), 907-922.

- [84] *Layered Double Hydroxide-Based Nanocarriers for Drug Delivery*. Bi X, Zhang H, Dou L. **Pharmaceutics**, 2014, 6(2), 298-332.
- [85] *Caffeic Acid-layered Double Hydroxide Hybrid: A New Raw Material for Cosmetic Applications*. Bastianini M, Faffa C, Sisani M, Petracci A. **Cosmetics**, 2018, Vol.5 (51).
- [86] *Caffeine vehiculation into alpha-zirconium phosphate: a multifunctional intercalation product and its application for modified topical release*. Bastianini M, Sisani M, Petracci A, Di Guida I, Faffa C, Cardellini F. **Materials Advances**, 2021, 4.
- [87] *Optimisation of phenol extraction from wine using layered double hydroxides and technological evaluation of the bioactive-rich powder*. Pagano C, Perioli L, Blasi F, Bastianini M, Chiesi C, Cossignani L. **International Journal of Food Science and Technology**, 2017.
- [88] *Hydrotalcite: a smart technology for innovative active ingredients*. Sisani M, Bastianini M, Petracci A. **H&PC Today - Household and Personal Care**, 2018, Vol. 13(3), 55-58.
- [89] *Use of hydrotalcites and clay materials in cosmetics: an overview*. Sisani M, Bastianini M, Petracci A. **H&PC Today - Household and Personal Care**, 2018, Vol. 13(6), 46-50.
- [90] *Ascorbyl Tetraisopalmitate Inclusion into γ -Cyclodextrin and Mesoporous SBA-15: Preparation, Characterization and In Vitro Release Study*. Sisani M, Bastianini M, Petracci A. **Cosmetics**, 2017, Vol. 4 (21).
- [91] *Screening of different lamellar solids for the adsorption of phenolic compounds from grape pomace*. Mangiapelo L, Cossignani L, Ianni F, Blasi F, Bastianini M, Spogli R. **Food Chemistry**, 2025, Vol. 471.
- [92] *Solid-Phase Adsorption of Curcumin from Turmeric Extracts by Lamellar Solids and Magnesium Oxide and Hydroxide*. Fiorito S, Epifano F, Preziuso F, Palumbo L, Marchetti L, Bastianini M, Cardellini F, Spogli R, Genovese S. **Food Analytical Methods**, 2021, Vol. 14, 1133–1139.
- [93] *3D additive manufactured composite scaffolds with antibiotic-loaded lamellar fillers for bone infection prevention and tissue regeneration*. Camara-Torres M, Duarte S, Sinha R, Egizabal A, Alvarez N, Bastianini M, Sisani M, Scopece P, Scatto M, Bonetto A, Marcomini A, Sanchez A, Patelli A, Mota C, Moroni L. **Bioactive Materials**, 2021, Vol. 6, 1073-1082.
- [94] *Gallic acid released by a layered double hydroxide-coated scaffold of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate inhibits the osteoclast formation In Vitro*. Suvieri C, Bastianini M, Leonardi L, Pagano S, Conte C, Marinucci L, Pallotta MT, Ambrogio V, Fioretti B, Traina G, Sisani M, Belladonna ML. **Biomaterials and Biosystems**, 2025, Vol. 19.
- [95] *Additive Manufactured Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Physical Characterization of Thermoplastic Composites with Functional Fillers*. Sinha R, Sanchez A, Camara-Torres M, Uriszar-Aldaca IN, Calore AR, Harings J, Gambardella A, Ciccarelli L, Vanzanella V, Sisani M, Scatto M, Wendelbo R, Perez S, Villanueva S, Matanza A, Patelli A, Grizzuti N, Mota C, Moroni L. **Applied Polymer Materials**, 2021, Vol. 3, 3788-3799.
- [96] *Innovative Composites Based on Organic Modified Zirconium Phosphate and PEOT/PBT Copolymer*. Bastianini M, Scatto M, Sisani M, Scopece P, Patelli A, Petracci A. **Journal of Composites Science**, 2018, Vol. 2 (31).
- [97] *Crystalline insoluble salts of polybasic metals - II. Synthesis of crystalline zirconium or titanium phosphate by direct precipitation*. Alberti G, Torracca E. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, 1968, Vol.30 (1), 317-318.

- [98] Clearfield A, Stynes JA. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, 1969, Vol. 26, 117.
- [99] Clearfield A, Troup JM. **Inorganic Chemistry**, 1977, Vol. 16, 3311.
- [100] Clearfield A, Blessing RH, Stynes JA. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, 1969, Vol. 30, 2249.
- [101] Christensen A, Krogh Andersen E, Krogh Andersen IG, Alberti G, Nielsen N, Lehmann M. **Acta Chemica Scandinavica**, 1990, Vol. 44, 865.
- [102] Clearfield A, Ion Exchange Materials, C.R.C. Press, Boca Ranton, Fl. 1982, Chap. 1, Chap. 2.
- [103] Alberti G, Casciola M, Costantino U. Solid State Proton Conductors III, J.B. Goodenough, J. Jensen, A. Potier Eds., (Odense University Press, 1985), p. 215.
- [104] Adams DM, Inorganic Solids, J. Wiley, New York, 1981, p. 41.
- [105] Kijima J, Sekikawa T, Veno ES. **Journal of Chemical Society Dalton Transactions**, 1982, 2499.
- [106] Costantino U, Massucci MA, La Ginestra A, Tarola AM, Zampa AL. **Journal of Inclusion Phenomena**, 1986, Vol. 4, 147.
- [107] Kijima J, Matsui Y. **Nature**, 1980, Vol. 322, 6070, 533.
- [108] *Breast cancer statistics 2024*. Angela N Giaquinto AN, Sung H, Newman LA, Freedman RL, Smith RA, Star J, Jemal A, Siegel RL. **A Cancer Journal for Clinicians**, 2024, Vol. 74 (6), 477-495.
- [109] *European cancer mortality predictions for the year 2025 with focus on breast cancer*. Santucci C, Mignozzi S, Levi F, Malvezzi M, Boffetta P, Negri E, La Vecchia C. **ESMO Annals of Oncology**, 2025, Vol. 36 (4), 460-468.
- [110] *Advanced breast conservation and partial breast reconstruction – a review of current available options for oncoplastic breast surgery*. Alder L, Zaidi M, Zeidan B, Mazari FAK. **The Annals of The Royal College of Surgeons of England**, 2022, Vol. 104 (5).
- [111] *Conservative mastectomy: extending the idea of breast conservation*. Veronesi U, Stafyla V, Petit JY, Veronesi P. **The Lancet: Oncology**, 2012, Vol. 13 (7), 311-317.
- [112] *Optimized method of bovine pericardium decellularization for tissue engineering*. Shchotkina NV, Sokol AA, Galkin OY, Yemets GI, Dolinchuk LV, Rudenko NM, Yemets IM. **Wiad Lek**, 2021, Vol. 74.
- [113] *Bovine pericardium membrane, gingival stem cells and ascorbic acid: a novel team in regenerative medicine*. Pizzicannella J, Marconi GD, Pierdiomenico SD, Cavalcanti MFXB, Diomedede F, Trubiani O. **Eur J Histochem**, 2019, Vol. 63.
- [114] *3D Human Periodontal Stem Cells and Endothelial Cells Promote Bone Development in Bovine Pericardium-based Tissue Biomaterial*. Pizzicannella J, Pierdomenico SD, Piattelli A, Varvara G, Fonticoli L, Trubiani O, Diomedede F. **Materials**, 2019, Vol. 12.
- [115] *A narrative review of microbial biofilm in postoperative surgical site infections: clinical presentation and treatment*. Edmiston CE, McBain AJ, Kiernan M, Leaper DJ, **Journal of Wound Care**, 2016, Vol. 25 (12).
- [116] *Antibiotic-Loaded Synthetic Calcium Sulfate Beads for Prevention of Bacterial Colonization and Biofilm Formation in Periprosthetic Infections*. Howlin RP, Brayford MJ, Webb JS, Cooper JJ, Aiken SS, Stoodley P. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2015, 59(1), 111-120.

- [117] Veritas® bovine pericardium for immediate breast reconstruction: a xenograft alternative to acellular dermal matrix products. Mofid MM, Meininger MS, Lacey MS. **European Journal of Plastic Surgery**, 2012, Vol. 35, 717–722.
- [118] Use of bovine pericardium (Tutopatch®) graft for surgical repair of deep melting corneal ulcers in dogs and corneal sequestra in cats. Dulaurent T, Azoulay T, Goulle F, Dulaurent A, Mentek M, Peiffer RL, Isard PF. **Veterinary Ophthalmology**, 2013.
- [119] A Head to Head Comparison Between SurgiMend® – Fetal Bovine Acellular Dermal Matrix and Tutomesh® – A Bovine Pericardium Collagen Membrane in Breast Reconstruction in 45 Cases. Eichler C, Efremova J, Brunner K, Kurbacher CM, Gluz O, Puppe J, Warm M. In vivo, 2017, Vol. 31, 677-682.
- [120] Clinical outcome and patient satisfaction with the use of bovine-derived acellular dermal matrix (SurgiMend™) in implant based immediate reconstruction following skin sparing mastectomy: A prospective observational study in a single centre. Headon H, kasem A, Manson A, Choy C, Carmichael AR, Mokbel K. **Surgical Oncology**, 2016, Vol. 25 (2), 104-110.
- [121] Characterization of a new decellularized bovine pericardial biological mesh: Structural and mechanical properties. Bielli A, Bernardini R, Varvaras D, Rossi P, Di Blasi G, Petrella G, Buonomo OC, Mattei M, Orlandi A. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2018, Vol. 78, 420-426.
- [122] **Gulf Journal of Oncology – Supplement**. Abstracts of the 3rd EUASSO Congress: “Innovations and New technologies in Surgical Oncology” - January 2017.
- [123] Regolamento (UE) 2017/745 del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 5 aprile 2017, relativo ai dispositivi medici, che modifica la direttiva 2001/83/CE, il regolamento (CE) n. 178/2002 e il regolamento (CE) n. 1223/2009 e che abroga le direttive 90/385/CEE e 93/42/CEE del Consiglio.
- [124] Cytotoxicity of Xenogeneic Pericardium Preserved by Epoxy Cross-Linking Agents. Bondarenko NA, Surovtseva MA, Lykov AP, Kim II, Zhuravleva IY, Poveschenko OV. **Sovrem Tekhnologii Med**, 2021, Vol. 13.
- [125] Cross-linking method using pentaepoxide for improving bovine and porcine bioprosthetic pericardia: A multiparametric assessment study. Zhuravleva, Yu I. *Materials Science and Engineering: C* 118 (2021): 111473.
- [126] Cell-free xenogenic vascular grafts fixed with glutaraldehyde or genipin: in vitro and in vivo studies. Yen C. **Journal of biotechnology**, 2005, Vol. 120 (2), 207-219.
- [127] Chitosan Hydrogels and their Glutaraldehyde-Crosslinked Counterparts as Potential Drug Release and Tissue Engineering Systems - Synthesis, Characterization, Swelling Kinetics and Mechanism. Akakuru OU, Isiuku BO. **Journal of Physical Chemistry & Biophysics**, 2017, VOL. 7 (3).
- [128] Riboflavin mediated UV crosslinking of chitosan-gelatin cryogels for loading of hydrophobic bioactive compounds. Mihai B, Dumitriu RP, Pamfil D, Butnaru E, Stoleru E. **Carbohydrate Polymers**, 2024, Vol. 324.
- [129] <https://register.epo.org/application?number=EP22195794>
- [130] Breast Implant Infections: An Update. Lalani T. **Infectious Disease Clinics of North America**, 2018, Vol. 32 (4), 877-884.
- [131] Postoperative Staphylococcus aureus Infections in Patients With and Without Preoperative Colonization. Troeman DPR, Hazard D, Timbermont L, Malhotra-Kumar S, van Werkhoven CH, Wolkewitz M, Ruzin A, Goossens H, Bonten MJM, Harbarth S, Sifakis F, Kluytmans JAJW. **JAMA Network Open**, 2023, Vol. 6 (10).

- [132] *Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics*. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. **Canadian Journal of Veterinary Research**, 2002, Vol. 66 (2), 86–92.
- [133] *Staphylococcus epidermidis biofilm in inflammatory breast cancer and its treatment strategies*. Allen-Taylor D, Boro G, Cabato PM, Mai C, Nguyen K, Rijal G. **Biofilm**, 2024, Vol. 8.
- [134] *Impact of duration of antibiotic prophylaxis on rates of surgical site infection (SSI) in patients undergoing mastectomy without immediate reconstruction, comparing a single prophylactic dose versus continued antibiotic prophylaxis postoperatively: a multicentre, double- blinded randomised control trial protocol*. Sattar AK, Zahid N, Shahzad H, Soomro R, Saleem O, Mahmood SF. **BMJ Open**, 2021, Vol. 11.
- [135] *The Duration of Postoperative Antibiotics in Autologous Breast Reconstruction: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Aldarragi A, Farah N, Warner C M, et al. **Cureus**, 2023, Vol. 15 (6).
- [136] *Use of Local Antibiotic Delivery Systems in Tissue Expander and Implant-Based Breast Reconstruction: A Systematic Review of the Literature*. Makarewicz N, Lipman K, Johnstone T, Shaheen M, Krupa Shah J, Nazerali R. **Eplasty**, 2023.
- [137] *Evidence for the use of peri- and post- operative antibiotic prophylaxis in autologous breast reconstruction: A systematic review*. Rijkx MEP, Klein DO, van Mens SP, Hommes JE, van Kuijk SMJ, van der Hulst RVJ, Heuts EM, Piatkowski AA. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, 2023, Vol. 83, 404–414.
- [138] *Extended Prophylactic Antibiotics for Mastectomy with Immediate Breast Reconstruction: A Meta-analysis*. Hai Y, Chong W, Lazar MA. **PRS Global Open**, 2020.
- [139] *Pharmacokinetics of Locally Applied Antibiotic Prophylaxis for Implant-Based Breast Reconstruction*. Hemmingsen MN, Bennedsen AK, Bismark Kullab R, Barksov Norlin C et Al. **JAMA Network Open**, 2023.
- [140] *Surveillance and Prevention of Surgical Site Infections in Breast Oncologic Surgery with Immediate Reconstruction*. Olsen MA, Nickel KB, Fox IK. **Curr Treat Options Infect Dis**, 2017, Vol. 9, 155–172.
- [141] *Chlorhexidine activity against bacterial biofilms*. Cordenonsi Bonez P, Filippi dos Santos Alves C, Vendruscolo Dalmolin T, Agertt VA, Rigon Mizdal C, da Costa Flores V, Baggiotto Marques J, Vianna Santos RC, Anraku de Campos MM. **American Journal of Infection Control**, 2013, Vol. 41, 119-122.
- [142] *Anti-biofilm Activity of Povidone-Iodine and Polyhexamethylene Biguanide: Evidence from In Vitro Tests*. Gryson L, Meaume S, Feldkaemper I, Favalli F. **Current Microbiology**, 2023, Vol. 80.
- [143] *Comparison of antibiofilm activity of low-concentrated hypochlorites vs polyhexanide-containing antiseptic*. Paleczny J, Junka AF, Czajkowska PKJ, Kramer A, Benkhail H, Żyfka-Zagrodzińska E, Bartoszewicz M. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, 2023 Vol. 13.
- [144] *In vitro microbicidal, anti-biofilm and cytotoxic effects of different commercial antiseptics*. Ortega-Peña R, Hidalgo-González R, Robson MC, Krötzsch E. **International Wound Journal**, 2016, 470-479.
- [145] *Update on the role of antiseptics in the management of chronic wounds with critical colonisation and/or biofilm*. Alves PJ, Barreto RT, Barrois BM, Gryson LG, Meaume S, Monsrey SJ. **International Wound Journal**, 2021, Vol. 18, 342–358.
- [146] *The Assessment of Activity of Antiseptic Agents against Biofilm of Staphylococcus aureus Measured with the Use of Processed Microscopic Images*. Grzegorz Krasowski G, Migdał P, Woroszyło M, Fijałkowski K, Chodaczek G, Czajkowska J, Dudek B, Nowicka J, Oleksy-Wawrzyniak M, Junka A. **International Journal of Molecular Sciences**, 2022, Vol. 23 (21).

- [147] *Comparison of antimicrobial efficacy and therapeutic index properties for common wound cleansing solutions, focusing on solutions containing PHMB*. Watson F, Chen R, Saint Bezar J, Percival S. **GMS Hygiene and Infection Control**, 2024, Vol. 19.
- [148] *Susceptibility to chlorhexidine amongst multidrug-resistant clinical isolates of Staphylococcus epidermidis from bloodstream infections*. Hijazi K, Mukhopadhyay I, Abbott F, Milne K, Al-Jabri ZJ, Oggioni MR, Gould IM. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2016, Vol. 48, 86-90.
- [149] *The Activity of PHMB and Other Guanidino Containing Compounds against Acanthamoeba and Other Ocular Pathogens*. Ratnayake D, Ansah M, Al Ani E, Heaselgrave W. **Microorganisms**, 2022, Vol. 10(7), 1375.
- [150] *Decreased susceptibility to vancomycin and other mechanisms of resistance to antibiotics in Staphylococcus epidermidis as a therapeutic problem in hospital treatment*. Szemraj M, Glajzner P, Sienkiewicz M. **Scientific Reports**, 2023, Vol. 13, 1362.
- [151] *Uptake/release of vancomycin on/from Mg–Al layered double hydroxides*. Lopez NA, Luengo CV, Avena MJ. **Adsorption**, 2019, Vol. 25, 1349–1360.
- [152] ISO 4768:2023 Measurement method of anti-biofilm activity on plastic and other non-porous surfaces.
- [153] UNI EN 12353:2021 Disinfettanti chimici e antisettici - Conservazione degli organismi per i test al fine della determinazione dell'attività: battericida (*Legionella* inclusa), micobattericida, sporicida, fungicida e virucida (inclusi i batteriofagi).