

Politecnico di Torino

Tesi magistrale di Ingegneria Biomedica



**Politecnico
di Torino**

**"Sviluppo di membrane polimeriche altamente porose e
con proprietà antiadesive come potenziale dispositivo
per la chirurgia mini-invasiva nel trattamento del
glaucoma"**

Relatrice

Prof.ssa Chiara Vitale Brovarone

Co-relatori

Prof.ssa Sonia Fiorilli

Prof. Antonio Fea

Dott.ssa Giorgia Montalbano

Candidato

Dario Davì

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

Lista delle figure	4
Lista delle tabelle	6
ABSTRACT	8
1 INTRODUZIONE	10
1.1 Il glaucoma: quadro socio-economico sanitario del glaucoma e stato dell'arte	10
1.1.1 Anatomia dell'occhio	12
1.1.2 Glaucoma	14
1.1.3 Terapie convenzionali	17
1.1.4 Terapie innovative: Chirurgia del glaucoma micro-invasiva (MIGS).....	18
1.2 Biomateriali per dispositivi di drenaggio per cura del glaucoma	21
1.2.1 Materiali polimerici.....	23
1.2.2 Materiali antiadesivi	24
1.2.3 Siliconi medici: Silpuran.....	28
1.2.4 Polivinildene-fluoruro (PVDF)	32
1.3 Tecniche di produzione dei dispositivi MIGS	35
1.3.1 Elettrospinning.....	39
1.3.1 Stampante 3D	44
2 MATERIALI E METODI	47
2.1 Preparazione delle soluzioni a base di silicone medico (Silpuran)	47
2.2 Preparazione della soluzione a base di Polivinildene-fluoruro (PVDF)	47
2.3 Preparazione nanoparticelle a base di acido poli(lattico-co-glicolico) (nPLGA).....	48
2.4 Formulazioni ibride a base di PVDF e nPLGA	48
2.5 Caratterizzazione reologica delle soluzioni di Silpuran	49
2.5.1 Caratterizzazione reologica delle soluzioni a base di Silpuran per processo di elettrospinning	51
2.5.2 Caratterizzazione reologica delle soluzioni a base di Silpuran per il processo di stampa 3D	52
2.6 Test di elettrospinning.....	53
2.6.1 Test di elettrospinning per le soluzioni a base di Silpuran	54
2.6.2 Test di elettrospinning per le soluzioni a base di PVDF.....	55
2.7 Processo di stampa 3D.....	57
2.8 Analisi morfologiche tramite microscopia a scansione elettronica (SEM).....	59
2.9 Spettroscopia infrarossa FTIR-ATR.....	61
3 RISULTATI E DISCUSSIONE	63
3.1 Sviluppo e caratterizzazione reologica delle soluzioni di Silpuran per il processo di elettrospinning	64

3.2 Sviluppo e caratterizzazione di membrane elettrofilate a base di Silpuran	69
3.3 Caratterizzazione reologica delle soluzioni a base di Silpuran per il processo di stampa 3D	72
3.4 Stampa 3D della formulazione a base di Silpuran	78
3.5 Sviluppo e caratterizzazione di membrane elettrofilate a base di PVDF	81
3.6 Sviluppo e caratterizzazione di formulazioni ibride	84
4 CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....	92
BIBLIOGRAFIA.....	96

Lista delle figure

Figura 1: costi medi annui diretti durante il primo anno di follow-up nei pazienti con glaucoma.[4]	11
.....	11
Figura 2: Sezione trasversale e sagittale dell'occhio all'interno dell'orbita.[6]	13
Figura 3 : fisiologia della circolazione dell'umor acqueo.[7]	14
Figura 4: confronto occhio fisiologico e patologico con glaucoma.[3]	15
Figura 5: evoluzione dei biomateriali.[18]	21
Figura 6: (a) Adesione proteica, cascata di coagulazione e attivazione del complemento con conseguente rilascio di PMN e macrofagi; (b) Il tessuto danneggiato rilascia ciò che porta a ulteriore risposta immunitaria; (c) La continua risposta infiammatoria porta al rilascio di enzimi proteolitici e specie reattive dell'ossigeno (ROS) che possono danneggiare la superficie del biomateriale.	25
Figura 7: Schema per l'ancoraggio di polimero MPC sulla superficie dell'elastomero di silicone.[29]	27
.....	27
Figura 8: struttura chimica silicone.[31]	28
Figura 9 : reticolazione di gomma siliconica per vulcanizzazione.[32]	29
Figura 10: Reazione di addizione del Silpuran.[32]	31
Figura 11: struttura chimica del PVDF.[37]	32
Figura 12 : Polimerizzazione vinilica a radicale libero del monomero di.....	33
Figura 13 : Rappresentazione schematica del processo di taglio laser. [46]	36
Figura 14 : Rappresentazione schematica del processo dell'elettroerosione a filo[48]	37
Figura 15: Rappresentazione schematica del processo dell'estrusione.[49]	38
Figura 16: Rappresentazione schematica del processo dello stamoaggio a compressione[50]	38
Figura 17: Rappresentazione schematica degli elementi costitutivi del sistema Electrospinning. [53]	40
.....	40
Figura 18: Rappresentazione schematica della configurazione dell'elettrospinning coassiale.[56]	41
.....	41
Figura 19: step sequenziali del processo di stampa 3D: (A) immagine CAD del modello da realizzare; (B) stereolitografia del modello; 3D printing software; (D) oggetto 3D stampato.[59]	44
Figura 20: geometrie disponibili per l'utilizzo del reometro.[5]	50
Figura 21: Reometro rotazionale DHR-2 utilizzato per le analisi.	51
Figura 22: Elettrospinning usato per la produzione delle membrane.	54
Figura 23: configurazione del processo di elettrospinning coassiale.	56
Figura 24: BIOX (Cellink) con montata la testina a temperatura controllata per l'estrusione del materiale.	57

<i>Figura 25: Strumento del SEM usato per la caratterizzazione delle membrane.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 26: Strumento FTIR modello Bruker Tensor 27 utilizzato per la caratterizzazione delle membrane di PVDF.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 27: Rampe di flusso a confronto delle quattro formulazioni di Silpuran a 23°C.</i>	<i>66</i>
<i>Figura 28: Analisi in regime oscillatorio delle quattro formulazioni di Silpuran a 23°C: (A) SILPURAN 1.1_82%, (B) SILPURAN 1.1_93%, (C) SILPURAN 10_74%, (D) SILPURAN 1_90%.</i>	<i>67</i>
<i>Figura 29: confronto rampe di flusso delle formulazioni “Silpuran 1.1_82%” e “Silpuran 1.1_93%” prima e dopo la loro permanenza in frigo a 4°C.</i>	<i>69</i>
<i>Figura 30: Immagini SEM delle 4 formulazioni di silicone: (A) Silpuran 1.1_ ; (B) Silpuran 1.1_ ; (C) Silpuran 10_ ; (D) Silpuran 1_</i>	<i>71</i>
<i>Figura 31: Analisi in regime oscillatorio delle tre formulazioni di Silpuran a 4°C: (A) SILPURAN 1.1_82%, (B) SILPURAN 1.1_93%, (C) SILPURAN 1_90%..</i>	<i>74</i>
<i>Figura 32: Test di mantenimento del picco del flusso delle formulazioni a base di Silpuran a 4°C.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 33: Analisi in regime oscillatorio delle tre formulazioni di Silpuran a 10°C: (A) SILPURAN 1.1_82%, (B) SILPURAN 1.1_93%, (C) SILPURAN 1_90%.</i>	<i>76</i>
<i>Figura 34: Analisi in regime oscillatorio delle tre formulazioni di Silpuran a 65°C: (A) SILPURAN 1.1_82%, (B) SILPURAN 1.1_93%, (C) SILPURAN 1_90%.</i>	<i>77</i>
<i>Figura 35: (1) modello CAD impostato nella stampante; (2) strutture ottenute a fine processo: (2A) struttura ottenuta con pressione di 150kPa e velocità di 2mm/s; (2B) struttura ottenuta con pressione di 180 e velocità di 3mm/s; (2C) struttura ottenuta con pressione di 200 e velocità di 4mm/s.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 36: (1) modello CAD impostato nella stampante; (2) struttura del perimetro ottenuta a fine processo.</i>	<i>81</i>
<i>Figura 37: immagini SEM della formulazione a base di PVDF: (A), (B) distanza ago-collettore di 10 cm; (C), (D) distanza ago-collettore di 12 cm; (E), (F) distanza ago-collettore di 15 cm; (G), (H) distanza ago-collettore di 18 cm;.....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 38: Immagini al FESEM delle nPLGA contenenti ibuprofene.</i>	<i>84</i>
<i>Figura 39: immagini al FESEM delle prove di stabilità delle nPLGA all'interno di acetone e DMSO a diversi step point: (A) 3h; (B) 6h; (C) 24h.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 40: : immagini al SEM delle membrane di PVDF con nPLGA all'interno: (A), (B), (C), (D) membrane con nPLGA all'1% con distanza ago collettore rispettivamente di 10,12,15,18 cm; (E), (F), (G), (H) membrane con nPLGA al 5% con distanza ago collettore rispettivamente di 10,12,15,18 cm.</i>	<i>86</i>

<i>Figura 41: Immagini al FESEM della membrana di PVDF con nPLGA al 5%: (A) distanza ago collettore di 12 cm (B) distanza ago collettore di 15cm.</i>	<i>87</i>
<i>Figura 42: spettri FTIR a confronto: solo PVDF (blu) e PVDF + nPLGA(5%) in un'unica soluzione (arancione).</i>	<i>87</i>
<i>Figura 43: immagini al FESEM delle prove di stabilità delle nPLGA all'interno di acqua (75%), acido acetico (20%) e DMSO (5%) a diversi step point: (A) 3h; (B) 6h; (C) 24h.</i>	<i>88</i>
<i>Figura 44: immagini SEM delle membrane con configurazione coassiale, in cui il flusso del core è maggiore di quello dello shell: (A), (B), distanza ago collettore 12 cm; (C), (D), distanza ago collettore 15 cm.</i>	<i>89</i>
<i>Figura 45: immagini SEM delle membrane con configurazione coassiale, in cui il flusso del core è minore di quello dello shell: (A), (B), distanza ago collettore 12 cm; (C), (D), distanza ago collettore 15 cm.</i>	<i>89</i>
<i>Figura 46: immagini FESEM delle membrane con configurazione coassiale, in cui il flusso del core è minore di quello dello shell: (A) distanza ago collettore di 12cm; (B) distanza ago collettore di 15cm.</i>	<i>90</i>
<i>Figura 47: spettri FTIR a confronto: solo PVDF (blu) e PVDF + nPLGA(1%) con configurazione coassiale.</i>	<i>91</i>

Lista delle tabelle

<i>Tabella 1: categorie di farmaci e rispettivi meccanismi di azione del trattamento medico.[11]</i>	<i>17</i>
<i>Tabella 2: parametri e caratteristiche delle tecniche parachirurgiche.[8]</i>	<i>18</i>
<i>Tabella 3: Tecniche di lavorazione del PVDF per ottenere differenti morfologie. [44]</i>	<i>35</i>
<i>Tabella 4: analisi reologiche effettuate sulle formulazioni a base di Silpuran per ottimizzazione dei parametri per l'elettrospinning.</i>	<i>52</i>
<i>Tabella 5: analisi reologiche effettuate sulle formulazioni a base di Silpuran per ottimizzazione dei parametri per la stampa 3D.</i>	<i>52</i>
<i>Tabella 6: Parametri di processo per l'elettrofilatura delle formulazioni a base di Silpuran.</i>	<i>55</i>
<i>Tabella 7: Parametri di processo per l'elettrofilatura della soluzione a base di PVDF.</i>	<i>55</i>
<i>Tabella 8: Parametri di processo per l'elettrofilatura della soluzione a base di PVDF con nPLGA.</i>	<i>56</i>

<i>Tabella 9: parametri di processo per elettrofilatura coassiale delle soluzioni a base di nPLGA (core) e di PVDF (shell) nelle due diverse condizioni: 1) flusso core maggiore di quello dello shell; 2)flusso core minore di quello dello shell.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabella 10: parametri di stampa ottimizzati.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabella 11: parametri di processo impostati per l'analisi FTIR-ATR.</i>	<i>62</i>
<i>Tabella 12: valori massimi e minimi di viscosità delle quattro formulazioni a 23°C.</i>	<i>66</i>
<i>Tabella 13 : tempistiche di transizione sol/gel e relativi moduli G' e G'' delle quattro formulazioni di silpuran a 23°C.....</i>	<i>68</i>
<i>Tabella 14: valori di viscosità a confronto delle due formulazioni di Silpuran a temperature ambiente e a temperatura di 4°C.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabella 15: tabella riassuntiva delle tempistiche di transizione sol/gel e relativi moduli G' e G'' delle 3 formulazioni di Silpuran a 4, 10 e 65 °C.</i>	<i>78</i>
<i>Tabella 16: Parametri ambientali e di processo impostati per l'elettrofilatura su collettore piano delle soluzioni a base di PVDF.....</i>	<i>82</i>
<i>Tabella 17: range diametro fibre di PVDF al variare della distanza ago/collettore.....</i>	<i>84</i>

ABSTRACT

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, si stima che oltre 2 miliardi di individui nel mondo soffrano di disabilità visive, tra le quali il glaucoma si distingue come la principale causa di cecità irreversibile. Tale patologia è caratterizzata dalla compresenza di un aumento della pressione intraoculare, di un danno al nervo ottico e di un'alterazione del campo visivo.

Negli ultimi decenni, la chirurgia mini-invasiva per il glaucoma (MIGS) ha suscitato grande interesse come possibile alternativa alle terapie convenzionali, poiché queste ultime sono spesso causa di complicanze post-operatorie. Il fine ultimo di questi impianti è quello di creare una via artificiale per il corretto deflusso dell'umore acqueo, diminuendo così la pressione intraoculare. Attualmente, però, i dispositivi MIGS in commercio presentano una problematica comune relativa alla formazione di una capsula fibrotica post impianto, rendendo pertanto ancora necessaria oggi la ricerca e l'ottimizzazione di nuovi dispositivi in grado di superare tali limitazioni.

Sulla base di queste considerazioni, questo lavoro di tesi si è concentrato sulla realizzazione di una membrana fibrosa e altamente porosa potenzialmente in grado di garantire il deflusso dell'umore acqueo, e con proprietà antiadesive in modo da impedire l'adesione dei fibroblasti e quindi la conseguente formazione di una capsula fibrotica sulla superficie del dispositivo. Tenendo in considerazione questi aspetti, si sono selezionati diversi polimeri dalle proprietà antiadesive e si è studiata la loro potenziale processabilità con tecniche di elettrospinning e stampa 3D, tecniche in grado di garantire un buon controllo della porosità e struttura finale del dispositivo. In una prima fase dello studio si è investigato nello specifico l'uso del Silpuran, un silicone medico già utilizzato in prodotti commerciali per impianti ortopedici. Pertanto, le proprietà reologiche di quattro formulazioni differenti sono state studiate e successivamente processate tramite elettrospinning e stampa 3D per ottenere rispettivamente delle membrane nanofibrose o strutture con porosità controllata.

A causa delle difficoltà riscontrate nella processabilità del silicone e di alcuni limiti tecnologici, una seconda fase dello studio si è concentrata sullo studio di un secondo polimero dalle proprietà antiadesive, il polivinilidenefluoruro (PVDF), per la finale realizzazione di membrane elettrofilate. Il polimero è stato inizialmente processato da solo per valutare la morfologia della membrana ottenuta. Successivamente, per investigare la potenziale realizzazione di un sistema a rilascio di farmaco, è stata studiata una formulazione ibrida combinando la soluzione di PVDF con delle nanoparticelle a base di acido Poli(lattico-co-glicolico) (nPLGA) contenenti ibuprofene. Nello specifico sono state testate due condizioni differenti: 1) elettrospinning di un'unica formulazione di PVDF contenente

nPLGA; 2) elettrospinning coassiale per la realizzazione di fibre “core-shell” mantenendo separate soluzione di PVDF e sospensione di nPLGA. Le membrane ottenute sono state in seguito caratterizzate tramite analisi fisico-chimica e morfologica.

1 INTRODUZIONE

In questo capitolo si propone di introdurre il glaucoma. In particolare, nella prima sezione verrà spiegato come questa malattia influenzi lo scenario socio-economico e sanitario italiano, quindi come il ritardo nella diagnosi del glaucoma possa incidere sul costo sanitario italiano e come tale patologia possa influenzare la vita dei pazienti. Successivamente, per comprendere meglio il glaucoma, viene introdotta l'anatomia e la fisiologia dell'occhio, con un particolare focus sulle vie di deflusso naturali dell'umore acqueo. Nel sottoparagrafo successivo, invece, verrà presentata la natura del glaucoma, quindi come questo si manifesti, i fattori che influenzano l'insorgere della malattia e le tipologie di glaucoma maggiormente più diffuse. Infine, nella sezione finale, si fornisce una panoramica concisa delle terapie convenzionali attualmente in uso, con rispettive limitazioni, con un particolare focus su una terapia innovativa, ovvero la chirurgia del glaucoma micro invasiva (MIGS).

1.1 Il glaucoma: quadro socio-economico sanitario del glaucoma e stato dell'arte

La disabilità visiva e la cecità hanno conseguenze significative sia a livello individuale, poiché la vista è il senso prevalente utilizzato dagli esseri umani in tutte le fasi della vita, sia sulla società nel suo complesso. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), si stima che oltre 2 miliardi di individui nel mondo soffrano di disabilità visiva e che almeno 1 miliardo di questi casi potrebbe essere prevenuto, dove la maggior parte dei casi si manifesta in età superiore ai 50 anni.[1]

Lo studio "Global Burden of Disease" condotto dall'OMS (2017) ha identificato la disabilità visiva come la terza causa principale di disabilità a lungo termine sperimentata dagli individui. Le ripercussioni sociali della disabilità visiva comprendono impatto sul lavoro, sulla qualità della vita e sulle esigenze di cura dei disabili. Molte persone non agiscono in modo proattivo per la salute degli occhi e rimangono inconsapevoli di avere il glaucoma finché non sperimentano una perdita estesa del campo visivo [2]. Il glaucoma si distingue come la principale causa di cecità e disabilità visiva irreversibile. Studi hanno stimato che entro il 2030 circa 95,4 milioni di individui potrebbero avere il glaucoma. In particolare l'angolo aperto primario (POAG) e chiuso (CAG) sono i tipi più frequenti di glaucoma.

La prevalenza e i tassi di incidenza del glaucoma aumentano con l'età e sono fortemente influenzati dall'etnia degli individui. Lo studio di Schoff ha mostrato l'influenza dell'invecchiamento sull'incidenza del glaucoma. Individui di quarant'anni rappresentano circa 1,6 nuovi casi di glaucoma su 100.000 abitanti all'anno, mentre individui di ottant'anni rappresentano 94,3 casi su 100.000 abitanti. [3]

Si prevede un aumento della prevalenza del glaucoma nei prossimi anni all'aumentare della crescita della popolazione e dell'aspettativa di vita. Di conseguenza, si prevede che gli impatti economici e sociali di tale prevalenza aumentino significativamente.

Il carico economico del glaucoma è significativo e aumenta all'aumentare del peggioramento della malattia. Gli analisti hanno utilizzato una varietà di approcci per quantificare il carico economico del glaucoma, rendendo difficile il confronto diretto tra gli studi e tra le popolazioni. Sono stati recentemente pubblicati dati che dimostrano il crescente costo globale e i pesi sociali del glaucoma. Nel caso in particolare dell'Italia, Valentina Perrone ha condotto dei studi analizzando dati provenienti dalle Unità Sanitarie locali, coprendo circa 2,7 milioni di soggetti affetti di glaucoma. Le analisi sul consumo di risorse sanitarie e sui costi sono state effettuate nel primo anno di follow-up su pazienti ancora in vita. Il consumo di risorse sanitarie è stato riportato come media annuale (e deviazione standard, SD) del numero di tutte le prescrizioni farmaceutiche, delle ospedalizzazioni per tutte le cause e dei servizi ambulatoriali per ciascun paziente. Il risultato emerso stima un costo annuo totale medio diretto per paziente di circa 1725 euro, principalmente legato alla spesa farmaceutica (€800), seguito dalle ospedalizzazioni (€567) e dai servizi ambulatoriali (€359).[4]

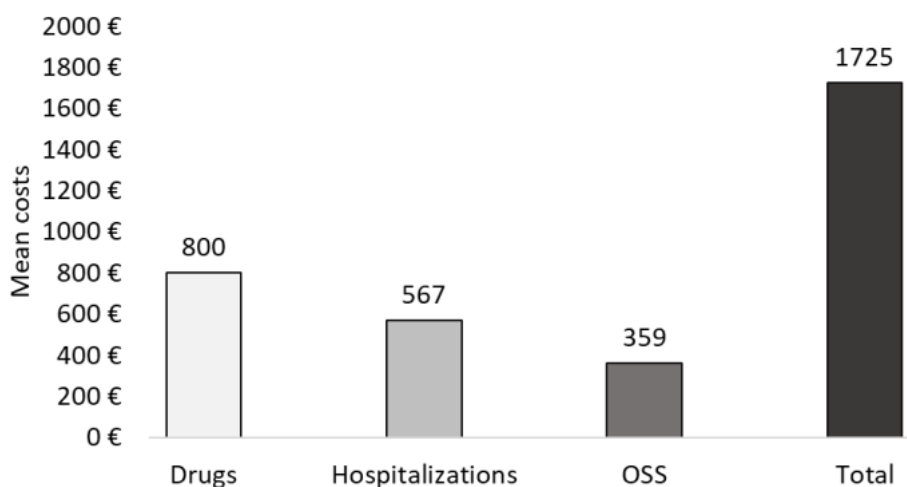


Figura 1: costi medi annui diretti durante il primo anno di follow-up nei pazienti con glaucoma.[4]

I costi economici e individuali aumentano con la gravità della malattia; tuttavia, una gestione proattiva del glaucoma potrebbe ridurre il carico complessivo della malattia. L'identificazione e il trattamento precoci dei pazienti con glaucoma e di quelli con ipertensione oculare possono ridurre i costi economici personali e sociali.

Il Protocollo Clinico e le Linee Guida Terapeutiche dovrebbero essere aggiornate includendo linee guida per la trabeculoplastica con laser e le chirurgie anti-glaucoma (micro-invasive e tradizionali). I

dati disponibili in letteratura hanno dimostrato che i pazienti con glaucoma trattati precocemente con tecniche terapeutiche in grado di rimuovere il ruolo principale dei colliri nel trattamento presentano un miglior controllo della malattia e un tasso di progressione ridotto, nonché minori risorse spese. Le chirurgie con laser hanno attirato grande attenzione come terapia primaria conveniente per il POAG. Le chirurgie micro-invasive, come gli impianti trabecolari, si sono dimostrate convenienti nel trattamento a lungo termine del glaucoma lieve-moderato, mentre la chirurgia di filtrazione è l'opzione più conveniente nei casi di glaucoma avanzato.

1.1.1 Anatomia dell'occhio

L'occhio umano è un organo bilaterale, situato all'interno delle orbite ossee nella parte anteriore del cranio. Ha una forma sferica, con un diametro di circa 2,5 centimetri. La sua anatomia è composta da diverse strutture che collaborano per consentire la visione. L'orbita è una struttura ossea a forma di piramide quadrangolare con apice rivolto posteriormente e base anteriormente, che alloca all'interno il bulbo oculare.

L'occhio, in particolare, è un bulbo costituito da 3 membrane sovrapposte: la sclera è la parte più esterna, l'uvea quella intermedia, mentre la retina è quella più interna che ricopre solamente la parte posteriore del bulbo oculare [5]. **La sclera** è molto fibrosa ed è vascolarizzata solamente nella parte posteriore, mentre in quella anteriore è trasparente e costituisce la cornea, un tessuto non vascolarizzato, a sua volta divisa in epitelio, stroma e endotelio. **L'uvea**, invece, è molto vascolarizzata e pigmentata e nella parte anteriore dell'occhio diventa complessa in quanto si separa in varie strutture, tra cui il corpo ciliare, la coroide e l'iride. Per quanto riguarda **la retina** essa è costituita da 10 strati, ma di questi 10 strati l'unità funzionale importante è costituita essenzialmente da tre componenti cellulari dove avviene la trasduzione del segnale luminoso in segnale elettrico.

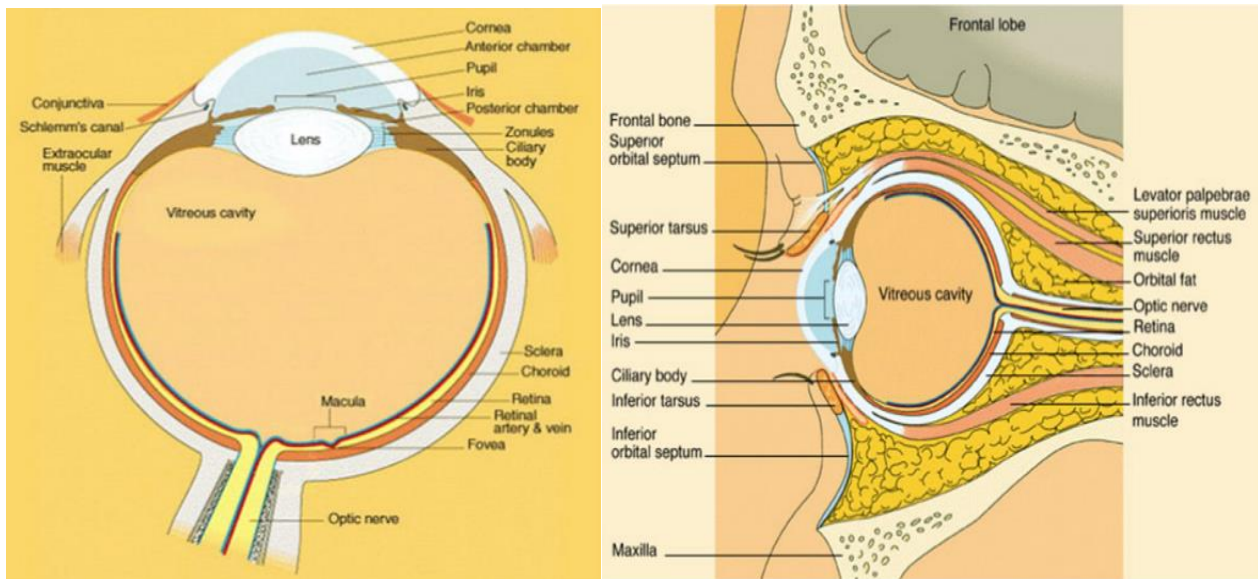


Figura 2: Sezione trasversale e sagittale dell'occhio all'interno dell'orbita. [6]

Come già espresso in precedenza, la tonaca intermedia, ovvero la tonaca uveale presenta tre parti: iride, corpo ciliare e coroide. Il corpo ciliare, a sua volta, presenta una pars plana e una pars plicata. Quest'ultima è la più vicina all'iride ed è composta da piccole pliche aventi ghiandole che producono umor acqueo. Questo viene riversato nella camera posteriore, si fa strada verso la camera anteriore e viene eliminato dall'occhio tramite le vie di deflusso. Nell'85% della sua produzione, l'umore acqueo viene eliminato tramite la via trabecolare, in particolare mediante il canale di schlemm; nella restante percentuale viene eliminato tramite il deflusso uveo-sclerale (assorbimento passivo da parte del tessuto uveale del corpo ciliare) per il 14%, e un 1% per via trans-iridea. Quando aumenta la pressione intraoculare (intraocular pressure (IOP)), causato da un blocco delle vie di deflusso dell'umor acqueo, vi è una traslazione lungo l'asse posteriore del diaframma irido-lenticolare che comprime la testa del nervo ottico (punto di minor resistenza) creando un danno.

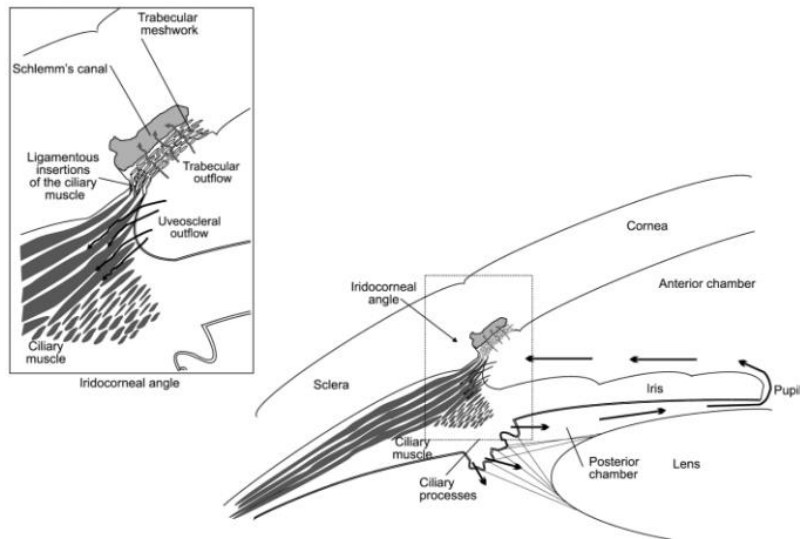


Figura 3 : fisiologia della circolazione dell'umor acqueo.[7]

1.1.2 Glaucoma

Con glaucoma si intende un insieme di malattie in cui la pressione intraoculare è abbastanza elevata tale da comportare un danno della vista. E' opportuno notare che non vi è una "pressione minima" considerevole patologica, poiché non esiste un target pressorio definibile "normale", ma questo va valutato su ogni singola persona ed è soggettivo poiché dipende dalla condizione sistemica ed oculare del soggetto. Esiste, in ogni caso, un cut-off entro il quale la pressione viene considerata nella norma. Infatti, per pressioni superiori ai 20 mmHg si può già sospettare un innalzamento della pressione intraoculare, ma questo dato da solo non è sufficiente per definire il glaucoma poiché tale definizione necessita della coesistenza di altri elementi. Infatti con il termine glaucoma si intende un gruppo di malattie oculari in cui coesistono[8]:

- L'aumento della pressione intraoculare;
- Danno e modifiche anatomiche a carico della testa del nervo ottico (inserzione del nervo ottico a livello del bulbo oculare), dovuto a questa ipertensione, che determina escavazione della papilla ottica;
- Alterazioni del campo visivo (o alterata funzionalità del nervo ottico), come conseguenza del danno anatomico del nervo ottico.

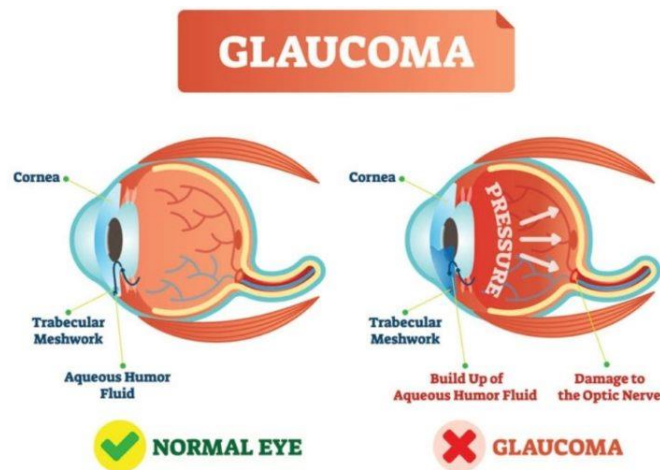


Figura 4: confronto occhio fisiologico e patologico con glaucoma.[3]

E' importante comprendere le caratteristiche alla base della definizione di glaucoma perché esistono altre 2 particolari condizioni in cui alcune di queste possono mancare. Queste sono: **l'ipertensione endoculare**, in cui vi è un aumento di pressione rilevante (anche 24/25 mmHg), ma con un campo visivo e un nervo ottico sani. L'ipertensione oculare può essere causata da un aumento nella produzione di umor acqueo o da una ridotta capacità del sistema di drenaggio a rimuovere il liquido in eccesso. Questo paziente potenzialmente potrebbe diventare glaucomatoso, così come può rimanere così per tutta la vita (motivo per cui il solo aumento di pressione non è sufficiente per definire il glaucoma); il **glaucoma sine pressione**, invece, rappresenta essere una variante del glaucoma in cui il danno al nervo ottico si verifica nonostante la pressione intraoculare sia nella norma o anche leggermente al di sotto dei valori di riferimento. Fare diagnosi di glaucoma sine pressione non è semplice perché il danno anatomico al nervo ottico e il conseguente danno funzionale del campo visivo non è specifico di glaucoma (può essere dovuto a malattie di carattere neurologico). Pertanto, la diagnosi di glaucoma è una diagnosi di esclusione. Si eseguono una TAC encefalica e/o una risonanza magnetica per escludere le altre cause di natura neurologica e, laddove TAC e risonanza siano negative, possiamo parlare di glaucoma sine pressione.[9]

Le forme di glaucoma più frequenti e studiate risultano essere il **glaucoma ad angolo aperto**, dove si vedono tutte le strutture angolari e quello ad **angolo chiuso**, in cui, al contrario, non è possibile osservare nessuna struttura. Esistono comunque altre forme di glaucoma come quello congenito, ad angolo stretto e quello secondario.

In particolare il **glaucoma primario ad angolo aperto** è il glaucoma con maggiore incidenza in Italia, conosciuto anche come glaucoma cronico semplice, caratterizzato da IOP alta, angolo aperto e danno al nervo ottico dovuto dall'aumento del tono. E' causato da un ridotto drenaggio dell'umore acqueo dovuto ad un cattivo funzionamento del trabecolato. La patogenesi è sconosciuta, ma ha un'incidenza

familiare notevole. E' una malattia dell'occhio prevenibile se si effettua una buona prevenzione dopo i 40 anni misurando la pressione intraoculare per evitare perdite eccessive e non reversibili del campo visivo che possono giungere, nei casi più gravi, a completa cecità. [8]

Il fattori di rischio che possono influenzare l'insorgenza del glaucoma o meno sono [9]:

- **Familiarità:** sono stati individuati infatti 9 loci genici associati al glaucoma, per cui all'anamnesi diventa fondamentale chiedere se ci siano parenti affetti da glaucoma;
- **Fumo;**
- **Diabete;**
- **Ipertensione;**
- **Razza:** l'incidenza aumenta notevolmente nella popolazione africana e afroamericana;
- **Età:** quest'ultimo fattore riguarda il glaucoma acquisito, mentre le forme congenite sono già presenti in età neonatale.

Ad oggi, per riuscire a svolgere una diagnosi completa e accurata, è necessario, in prima istanza, accertarsi della variazione della pressione intraoculare mediante **tonometria**. I tonometri a contatto (o ad appianazione) sono i gold standard e sono così chiamati perché la misurazione prevede il contatto del tonometro con la superficie anteriore della cornea. Lo strumento che dà la misurazione più precisa della pressione dell'occhio è il tonometro ad appianazione di Goldmann. Quest'ultimo sfrutta il principio di Imbert-Fick, secondo il quale viene valutata la forza che il cono (lo strumento) deve fare per appiattire la cornea che in condizioni normali è una superficie convessa. Dopo aver misurato la pressione si deve poi guardare l'angolo irido-corneale tramite la **gonioscopia**. L'angolo può essere aperto, stretto o chiuso in relazione al tipo di glaucoma. L'analisi viene effettuata mediante l'apposizione di una "lente a tre specchi di Goldmann", dotata di tre specchi ad angolatura diversa in grado di studiare nervo, retina e strutture angolari. A seguire, bisogna vedere se il paziente presenta delle modifiche a carico della testa del nervo ottico (o papilla ottica), visitando il polo posteriore del paziente tramite **oftalmoscopia**. Infine, si studia la funzione del nervo ottico, tramite **esame del campo visivo** o potenziale evocato visivo (se vista troppo compromessa), che dimostra come il danno anatomico corrisponde a un danno funzionale. L'esame del campo visivo valuta la sensibilità della retina punto a punto, e oggi si esegue computerizzato e dinamico così da testare, in maniera casuale, la soglia di percezione luminosa che si ha in ogni singolo punto retinico.[10]

1.1.3 Terapie convenzionali

Il tipo di terapia scelta per il trattamento del glaucoma dipende principalmente dallo stadio di avanzamento della malattia. In letteratura si sono trovate tre differenti terapie convenzionali che vengono utilizzate oggi:

- **Terapia medica:** vengono usati principalmente 4 categorie di farmaci che sono gli analoghi delle prostaglandine, betabloccanti, inibitori delle anidrasi carboniche, alfa₂ adrenergici. Essi agiscono o riducendo la produzione di umore acqueo o potenziando il deflusso uveo-sclerale. La terapia è cronica, in quanto non si guarisce da glaucoma, e tutti i farmaci usati hanno come effetto collaterale quello di alterare la produzione di film lacrimale, comportando secchezza e rossore dell'occhio, dovuto a un conservante tossico presente al loro interno. Inoltre, le prostaglandine causano ipertricosi, ovvero ciglia aumentate. Il farmaco può anche causare dolore e lacrimazione, ma è necessario sensibilizzare il paziente sull'importanza di non abbandonare la terapia per non rischiare la cecità, nonostante gli effetti collaterali. Il paziente può assuefarsi alla terapia poiché esiste un meccanismo di tachifilassi, dunque, si preferisce iniziare con una monoterapia per poi coadiuvarla nel tempo con tutte e quattro le classi farmacologiche.[11]

Drug Class	Representative Medication	IOP-lowering Mechanism
Beta-adrenergic antagonists	Timolol	↓ inflow
Carbonic anhydrase inhibitors	Dorzolamide	↓ inflow
Alpha ₂ -adrenergic antagonists	Brimonidine	↓ inflow (acutely) and ↑ pressure-insensitive outflow (chronically)
Adrenergic agonists	Epinephrine	↑ inflow (acutely) and ↑ "C"
Prostaglandin prodrugs	Latanoprost	↑ "C" and ↑ pressure-insensitive outflow
Prostamides	Bimatoprost	↑ "C" and ↑ pressure-insensitive outflow
Cholinergics	Pilocarpine	↑ "C"

Tabella 1: categorie di farmaci e rispettivi meccanismi di azione del trattamento medico.[11]

- **Terapia parachirurgica:** il laser (laser trabeculoplastica, in disuso, e SLT) viene utilizzato quando il paziente in monoterapia non riesce a compensare IOP. La trabeculoplastica va a creare dei piccoli fori con effetto termico sulle maglie del trabecolato, facilitando il drenaggio dell'umore acqueo. Tuttavia, in questo modo, il trabecolato veniva gradualmente distrutto e ciò non consentiva di ripetere l'intervento nel tempo. Pertanto, oggi è preferita la SLT (laser terapia selettiva), terapia nuova che agisce sul trabecolato, tramite effetto fotostimolante, allargando le maglie già esistenti, senza creare nuovi fori. [12]

Parametri del laser	ALT	SLT
Dimensione dello spot	50 µm	400 µm
Tempo di esposizione	0.1 sec	3 nsec (fixed)
Potenza	500-1200 mW in relazione alla reazione visibile sul trabecolato; sufficiente una bassa potenza se trabecolato intensamente pigmentato	0.4 - 1.2 mJ in relazione alla reazione desiderata; se trabecolato intensamente pigmentato partire con potenza bassa (esempio 0.4 mJ)
Reazione ottimale	Sbiancamento transitorio o formazione di piccole bolle	La potenza viene regolata in modo da ottenere minuscole bolle d'aria "bolle di champagne" nel punto di applicazione e quindi ridotta con decrementi di 0.1 mJ finchè non si apprezzano più bolle*
Numero di spot	50 - 100 spot uniformemente distribuiti su 180 -360°	50 - 100 spot non sovrapposti distribuiti su 180 -360°

Tabella 2: parametri e caratteristiche delle tecniche parachirurgiche. [8]

- Terapia chirurgica:** lo scopo è creare una via di drenaggio “artificiale” alternativa per l’umor acqueo. Si può creare con diverse tecniche chirurgiche ma ancora oggi si utilizza la trabeculectomia (tecnica più vecchia) con la quale si crea una nuova via di deflusso dell’umore acqueo verso lo spazio sottocongiuntivale. Viene eseguita tagliando un pezzettino di sclera in corrispondenza dell’angolo irido corneale, così da accedere nella camera anteriore, e con un ulteriore taglietto si realizza un foro in corrispondenza del trabecolato. Successivamente si richiude la sclera e dal foro realizzato nel trabecolato, l’umor acqueo passa direttamente nello spazio sottocongiuntivale ma al di sopra della sclera. Vengono utilizzati anche impianti valvolari che sostituiscono la trabeculectomia, con la valvola che viene allocata nella sclera e, attraverso un tubicino che viene fatto passare nello spessore sclerale e che penetra nella camera anteriore, l’umor acqueo viene raccolto in una camera messa in comunicazione con i vasi sanguigni. In questo modo l’umore acqueo viene riversato nel torrente ematico. [13]

In prima istanza si esegue la terapia medica, prima in monoterapia, poi con due farmaci. Se questa dovesse fallire si passa alla parachirurgica. Qualora anche quest’ultima dovesse fallire, si esegue in ultimo quella chirurgica. La terapia non fa regredire il danno esistente ma rallenta o blocca l’evoluzione della malattia glaucomatosa. Per capire se il campo visivo peggiora nonostante una IOP riportata a valori fisiologici con la terapia, si eseguono almeno tre valutazioni del campo visivo annuali e si aggiungono in terapia farmaci neuroprotettivi così da cercare di rendere il nervo ottico meno suscettibile al danno.

1.1.4 Terapie innovative: Chirurgia del glaucoma micro-invasiva (MIGS)

Tutte le procedure chirurgiche si basano sullo stesso principio: evitare le vie naturali di deflusso dell’occhio per fornire un percorso alternativo affinché l’umor acqueo possa uscire efficacemente dalla camera anteriore, riducendo così la IOP. Le tecniche convenzionali sono associate a possibili gravi complicanze post-operatorie e richiedono una gestione post-operatoria sostanziale. Pertanto, al fine

di fornire un metodo più sicuro e meno invasivo, è emersa di recente una nuova classe di dispositivi e procedure di drenaggio, chiamata chirurgia del glaucoma minimamente o micro invasiva (MIGS). Indipendentemente dalla procedura o dal dispositivo utilizzato, l'obiettivo generale del trattamento chirurgico è ridurre la IOP a un livello che prevenga ulteriori danni al nervo ottico, tipicamente intorno ad un valore di 10 mmHg.

I criteri per soddisfare la definizione di un dispositivo MIGS sono controversi. Da un lato, la FDA definisce un dispositivo MIGS come "un tipo di dispositivo utilizzato per ridurre la IOP tramite un meccanismo di deflusso con un approccio ab interno o ab esterno, associato a scarsa o nessuna dissezione sclerale e manipolazione congiuntivale minima o nulla". D'altra parte, le linee guida della Società Europea del Glaucoma affermano che "solo le procedure ab interno che non formano bolle d'aria possono essere definite MIGS". Più nel dettaglio la **procedura ab interna** viene eseguita attraverso piccole incisioni nell'occhio senza dover aprire completamente la congiuntiva. In genere, vengono utilizzati strumenti specializzati come endoscopi o laser per eseguire l'intervento chirurgico. Alcuni esempi di procedure mini-invasive ab interno includono la trabeculoplastica selettiva laser (SLT) e la Chirurgia del glaucoma canalicolare; la **procedura ab esterno**, invece, prevede un'incisione sulla parete dell'occhio, solitamente attraverso la congiuntiva. Alcuni esempi di procedure mini-invasive ab esterno includono Trabeculectomia e Shunt.[13]

I dispositivi MIGS possono essere classificati in tre categorie principali in base al sito di innesto del dispositivo:

- **Dispositivi MIGS del canale di Schlemm**, dove il deflusso trabecolare viene incrementato evitando la trabecolatura e indirizzando l'umor acqueo nel canale di Schlemm. Attualmente, sono disponibili tre dispositivi MIGS del canale di Schlemm: l' "iSten"t, un dispositivo fatto in titanio e ricoperto in eparina. L'impianto non risulta essere estremamente sicuro, poiché si sono verificati ipema transitorio, ma anche dislocazioni e occlusioni del dispositivo; l' "iStent inject", che rappresenta essere la seconda generazione del primo dispositivo. La differenza principale sta nel tecnica di somministrazione, in quanto questo impianto viene inserito mediante auto-iniezione, comportando minore tempo chirurgico e minori rischi; infine l' "Hydrus Microstent", un'impalcatura in nitinol che viene inserita mediante operazione ab interno. Grazie alla sua natura chimica, tale dispositivo è in grado di far dilatare il canale di Sclemn fino a quattro/cinque volte la sua sezione trasversale, garantendo un rapido deflusso dell'umor acqueo. L'impianto richiede però maggiori studi di sicurezza.[14]
- **Dispositivi MIGS sopracoroidei**, dove il deflusso uveosclerale viene incrementato mediante l'impianto di shunt sopracoroidei; tra i principali oggi in commercio si trovano: "Micro-Stent

CyPass®” è un dispositivo fatto in polimide che viene inserito, a livello dello spazio supraciliare. Il deflusso dell’umor acqueo è garantito grazie alla presenza di una struttura porosa per il passaggio del fluido oculare. Studi preclinici hanno dimostrato che l’impianto garantisce solo una piccola diminuzione dell’IOP; **Il dispositivo “STARflo”** è composto da una testa simile a un incudine per evitare l’estrazione della camera anteriore e da un corpo posizionato nello spazio supracoroideo. L’impianto è costituito da una rete altamente organizzata di sfere cave realizzata utilizzando un particolare silicone flessibile chiamato “STAR” derivato dal NuSil med-6215. Ancora oggi però esistono pochi studi sull’efficacia del dispositivo;[15]

- **Dispositivi MIGS sottocapsulari**, in cui viene creato un percorso di drenaggio nello spazio sottotenoniano. Rispetto ai dispositivi descritti in precedenza, questa classe risulta essere una strategia poco fisiologica, poiché appunto l’umor acqueo non fluisce naturalmente nello spazio sotto congiuntivale. Attualmente esistono due dispositivi: Il “XEN gel stent” che si presenta come un tubo idrofilico realizzato in gelatina di maiale reticolata con glutaraldeide. Grazie alla sua natura idrofilica, in loco il dispositivo rigonfia, diventando un canale di drenaggio morbido e fisso che si uniforma ai tessuti; Il “PRESERFLO MicroShunt” è un tubo flessibile realizzato in poli(stirene-blocco-isobutilene-blocco-stirene), o SIBS. Il dispositivo presenta una sorta di apertura alare che si posiziona all’interno di una tasca superficiale nella sclera, garantendo così una buona immobilizzazione del device. In alcuni pazienti però è stata riscontrata una elevata infiammazione a causa della natura chimica del dispositivo.[16]

In generale, i dispositivi visti fino ad ora, nonostante presentino un buon profilo di sicurezza, sono accomunati dalla stessa problematica, ovvero formazione della capsula fibrotica. In particolare la parte di drenaggio termina nello spazio sottocongiuntivale. In questa area, alcuni fibroblasti episclerali, come quelli del tenone umano e quelli della sclera possono dare origine a fibrosi, incapsulando il dispositivo e compromettendone il normale funzionamento. Quindi oggi la ricerca si sta focalizzando sulle realizzazioni di dispositivi che evitino l’adesione di sostanze sulla superficie dell’impianto, investigando particolari materiali con caratteristiche di anti incrostazione (materiali anti-biofouling), oppure dei particolari sistemi di rilascio controllato di farmaco di natura anti fibrotica. [17]

1.2 Biomateriali per dispositivi di drenaggio per cura del glaucoma

Nella realizzazione di un dispositivo impiantabile, la scelta del biomateriale adoperato svolge un ruolo essenziale. Nel corso degli anni sono state fornite differenti definizioni di biomateriale, ma ad oggi si è concordi nel definire un biomateriale come “un materiale destinato ad interfacciarsi con i sistemi biologici per valutare, trattare, aumentare o sostituire qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo”. Sulla base dello sviluppo della tecnologia e della scienza medica, si sono osservate varie generazioni di biomateriali [18]:

- Nei materiali di **prima generazione** (materiali inerti), l’obiettivo è di avere la minima risposta possibile da parte dell’organismo ospite;
- Nei materiali di **seconda generazione** (materiali bioattivi), si cerca una reattività positiva in termini di riassorbimento o interazione controllata con l’ambiente fisiologico;
- Nei materiali di **terza generazione** (materiali biomimetici), l’obiettivo è di rigenerare le funzionalità del tessuto stimolandone l’attività, cercando di stimolare la risposta delle cellule fino a livello molecolare.

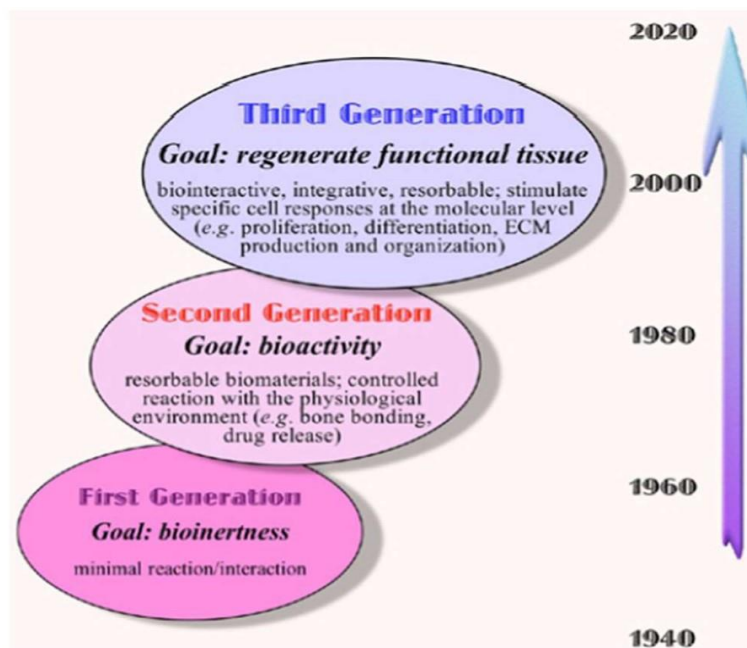


Figura 5: evoluzione dei biomateriali.[18]

La classificazione dei biomateriali può avvenire secondo differenti criteri:

- **Natura chimica**, ovvero si distinguono polimeri, metalli, compositi, ceramici e di derivazione biologica;
- **Interazione con l'ambiente fisiologico**, distinguendo materiali inerti (biostabili) o materiali reattivi (biodegradabili);
- **Effetto sull'ambiente fisiologico**, classificati come biotossici, bioinerti, bioattivi, biorisorbibili e biomimetici.

La ricerca di biomateriali idonei per impianti oculari è iniziata più di un secolo fa, con il primo dispositivo costituito da peli di cavallo impiantato da Rollet nel 1906 e successivamente nel 1949 con una lente intraoculare realizzata da Ridley [19]. Oggi, la ricerca ha portato allo sviluppo e alla scelta di una vasta gamma di biomateriali sintetici, semisintetici e naturali ottimali in campo oftalmico. Il fine ultimo, nel nostro caso, risulta essere il ripristino delle vie di deflusso dell'umor acqueo, garantendo così il ritorno della IOP ad un valore fisiologico. Tuttavia, c'è da specificare che, nonostante gli ottimi risultati ottenuti dai dispositivi oggi in commercio, vi sono numerose limitazioni ancora da superare. In particolare i biomateriali utilizzati e il design degli impianti hanno comportato numerosi casi di fallimento, dovuti a scarse proprietà meccaniche, reazioni infiammatorie, elevata biodegradabilità ma soprattutto scarsa durabilità nel tempo a causa della formazione di capsula fibrotica.[20]

Prima della crescita nell'interesse dei polimeri, i primi materiali utilizzati nella realizzazione di dispositivi per il trattamento del glaucoma risultavano essere i metalli e le loro leghe. Tali materiali presentano delle caratteristiche che li differenziano dai polimeri come elevate proprietà fisico meccaniche, ottima conducibilità termica ed elettrica e stabilità chimica, ovvero non reagiscono facilmente con fluidi corporei, il che li rende adatti per dispositivi medici che devono mantenere la loro integrità nel tempo. In particolare i principali materiali utilizzati nella realizzazione degli impianti in campo dell'oftalmologia sono il titanio, l'oro e il nitinol [21]. Per esempio l' "istent" e l' "istent inject" sono dispositivi MIGS realizzati in lega di titanio. Essi presentano ottime proprietà di biocompatibilità, ottima resistenza meccanica, elevata resistenza alla corrosione, peso leggero ed elevata stabilità chimica. Dall'altro lato però questi impianti non vengono più utilizzati oggi perché in molti pazienti sono state riscontrate numerose problematiche quali sanguinamento nella camera anteriore (ipema) ed edema corneale. Nel caso invece dello shunt in oro "SOLX", la food and drug administration (FDA) non ha neanche reso possibile la messa in commercio del dispositivo. Lo shunt era costituito da due piastre, di forma rettangolare, saldate tra di loro, sulle quali erano presenti 19 microcanali. I fori presenti alle due estremità del dispositivo consentivano all'umor acqueo di fluire attraverso i canali dalla camera anteriore allo spazio sopra-coroideo. Sono stati però riscontrati alti

tassi di fallimento dovuto a una eccessiva formazione di capsula fibrotica, e nel peggiore dei casi anche distacco della retina ed emorragia sopra-coroidea.

Sulla base di queste considerazioni, nonostante i metalli presentino tali ottimali caratteristiche, oggi non vengono più utilizzati per la realizzazione di questi dispositivi, in quanto si è compreso la necessità di materiali che fossero più leggeri, facili da lavorare, meno costosi ma soprattutto che eventuali prodotti di degradazione, come ioni metallici, non fossero nocivi per il nostro organismo. Per questo motivo le ricerche future si sono concentrate sulla realizzazione di dispositivi a base di polimeri. Tali materiali sono oggi utilizzati per le loro ottime proprietà di biomimetività, leggerezza, flessibilità, processabilità, versatilità, proprietà fisiche regolabili e possibilità di funzionalizzare le superfici per conferire o migliorare proprietà specifiche del materiale [21].

Nei paragrafi che seguono si andrà a focalizzare l'attenzione sui biomateriali polimerici, con un approfondimento su quelli selezionati nell'ambito di questo progetto di tesi.

1.2.1 Materiali polimerici

Per superare tutte le limitazioni dei materiali metallici, i dispositivi più moderni oggi sono realizzati in materiale polimerico. I polimeri sono macromolecole costituite monomeri, ovvero singole unità uguali che si ripetono, formando tra di loro legami chimici, per determinare strutture lineari, ramificate o reticolate ad alto peso molecolare. I polimeri si differenziano dalle altre classi di materiali, come i ceramici e i metalli, per la loro elevata biocompatibilità, facile processabilità e capacità di modulare le proprietà superficiali mediante tecniche di funzionalizzazione. Uno dei parametri con elevata rilevanza in questa ricerca risulta essere la degradabilità del polimero. In base a questo, si possono distinguere polimeri **biodegradabili e biorisorbibili** che rappresentano essere una struttura temporanea che poi viene sostituita dal nuovo tessuto appena formato, senza necessità di espanto, oppure polimeri **biostabili e bioinerti** che non subiscono sostanziali trasformazioni chimico-fisiche nel tempo ed interagiscono limitatamente con l'ambiente circostante. In particolare, in questa ricerca, si è interessati a quest'ultima classe di polimeri, in quanto si punta ad ottenere un dispositivo che interagisca il meno possibile con l'organismo e che soprattutto garantisca un filtraggio dell'umore acqueo nel lungo termine. È possibile distinguere due categorie di polimeri, quelli **sintetici**, e quelli **naturali** [22]. Quest'ultimi sono una famiglia di materiali, di origine animale e vegetale, largamente utilizzata in ambito biomedico grazie all'elevata biocompatibilità e biodegradabilità. Tali polimeri possono essere divisi in due classi: le proteine (es. gelatina, elastina, fibronectina, collagene, etc) e i polisaccaridi (chitosano, cellulosa, alginato, etc). In applicazioni biomediche i polimeri naturali vengono lavorati mediante numerose tecniche con il fine di ottenere scaffold alla micro e nano scala, film o idrogeli. Per esempio lo "XEN® Gel Stent" è un dispositivo a

forma tubolare a base di gelatina porcina reticolata con glutaraldeide. Il modello presentava dei vantaggi rispetto all'utilizzo di metalli o polimeri sintetici, quali minore risposta infiammatoria e maggiore biocompatibilità. Studi su animali hanno però mostrato eritema ed edema gravi delle palpebre e della congiuntiva bulbare, oltre insufficiente resistenza alla degradazione e piccola formazione di capsula fibrotica. [16]

Tenendo in considerazione lo scopo di questa ricerca, è necessaria una membrana non solo che sia resistente alla degradazione ma che sia anche in grado di evitare l'adesione cellulare in superficie, con conseguente formazione di capsula fibrotica, in quanto ne comprometterebbe il funzionamento.[23]

Per cercare di ovviare a tutte queste limitazioni dei polimeri di origine naturale, le successive ricerche, negli anni, si sono focalizzate sull'utilizzo di polimeri di origine sintetica. Essi rappresentano materiali polimerici prodotti industrialmente e vengono ampiamente adottati nel campo dell'ingegneria biomedica per via delle numerose virtù che li contraddistinguono, quali la facilità di sintesi e la capacità di conferire proprietà riproducibili e coerenti. I polimeri appartenenti a questa classe risultano essere ottimali da un punto vista di resistenza alla degradazione e di stabilità chimica, che si rispecchia conseguentemente su una maggiore durabilità del dispositivo.[24]

I polimeri sintetici maggiormente utilizzati nell'ambito di realizzazione di dispositivi per il trattamento del glaucoma risultano essere le poliammidi, il polietere sulfone, il silicone e il poli(stirene-blocco-isobutilene-blocco-stirene)[25]. Nonostante tali materiali hanno dimostrato una maggiore stabilità chimica nel tempo e una buona resistenza alla degradazione, la formazione della capsula fibrotica risultava essere la causa principale di fallimento degli impianti. Pertanto nasce l'esigenza di sviluppare dei dispositivi con materiali con caratteristiche di anti incrostazione, ovvero resistenti all'adesione proteica e cellulare, necessario per garantire un'ottimale performance del dispositivo.[21]

1.2.2 Materiali antiadesivi

Oggi la ricerca di superfici che evitino l'adesione e l'accumulo di biomolecole indesiderate, batteri, cellule e organismi, risulta essere un problema ubiquitario in diverse applicazioni pratiche in ambito medico, come biosensori, superfici di device medici, sistemi di rilascio per la somministrazione di farmaci, ma anche in campo alimentare e per l'industria marina.

In generale, le superfici antiadesive presentano delle forze intermolecolari di interazione tra biomolecole extracellulari e superficie sintetica che risultano essere minime, in modo che una cellula che aderisca alla superficie, venga poi rilasciata facilmente sotto basse sollecitazioni di taglio. In

ambito biomedico, tali superfici vengono anche definite “superfici Stealth”, ovvero che non vengono rilevate dalle cellule in ambiente biologico e quindi di conseguenza viene evitata qualsiasi interazione biologica.[25]

Per capire fino in fondo le proprietà antiadesive, è necessario prima spiegare cosa avviene quando un dispositivo viene inserito all'interno del corpo. La risposta dell'organismo a un dispositivo impiantato comprende generalmente due fasi: la prima fase è una **fase infiammatoria**, acuta e cronica, che mira a riparare la ferita chirurgica dall'inserimento dell'impianto; la seconda fase, invece, è una **risposta immunitaria** che mira ad eliminare l'impianto. Ogni fase è preceduta dall'adsorbimento di proteine presenti nei fluidi biologici, che tendono a circondare e isolare l'impianto. Secondo l'effetto di Vroman, anche se i tipi di proteine adsorbite possono variare nel tempo, la quantità rimane stabile a causa dell'incapacità delle proteine di assorbire in modo non specifico il monostato. Le proprietà del dispositivo, come la carica superficiale, la rigidità della matrice, la rugosità, le caratteristiche fisico-chimiche e la topografia, svolgono un ruolo significativo nella determinazione della quantità e della composizione del biofilm proteico durante l'incrostazione.[21]

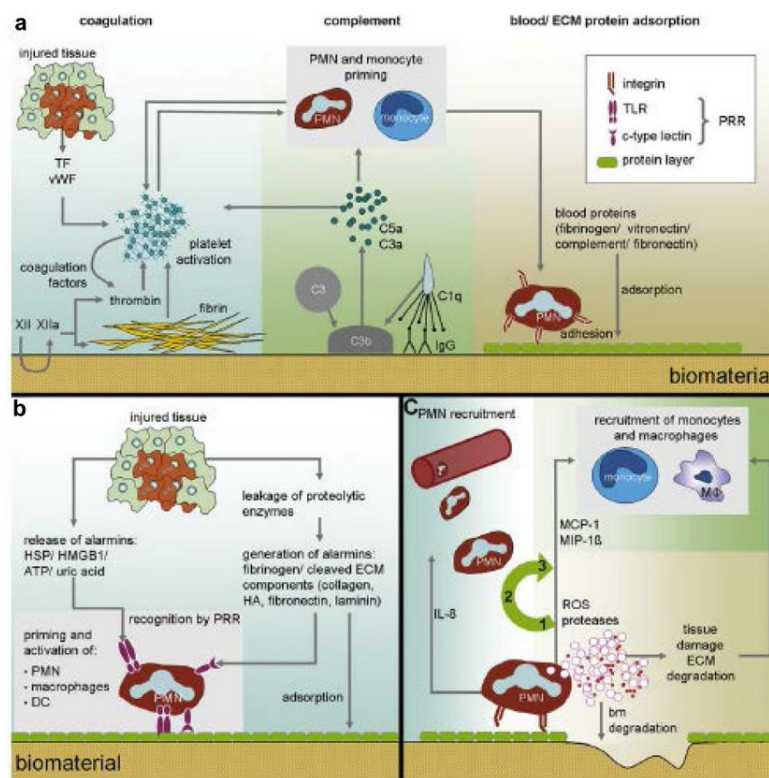


Figura 6:

(a) Adesione proteica, cascata di coagulazione e attivazione del complemento con conseguente rilascio di PMN e macrofagi; (b) Il tessuto danneggiato rilascia ciò che porta a ulteriore risposta immunitaria; (c) La continua risposta infiammatoria porta al rilascio di enzimi proteolitici e specie reattive dell'ossigeno (ROS) che possono danneggiare la superficie del biomateriale.

Durante tali fasi la parte fondamentale risulta essere la formazione di legami iniziali tra gli organismi e le superfici dei materiali, che avviene sempre mediato dalla presenza di fluidi biologici. Pertanto, il passaggio del contatto è strettamente associato alla bagnabilità delle superfici dei materiali, indicando che regolare la bagnabilità della superficie potrebbe essere un modo promettente per controllare l'incrostazione. Sulla base di queste considerazioni si possono ottenere **superfici idrofobiche**, come quelle del poli-dimetilsilossano (PDMS), che presentano un angolo di contatto maggiore di 90 gradi, impedendo assorbimento di fluidi da parte della superficie; oppure **superfici idrofile**, quindi con angolo di contatto minore di 90 gradi, di polimeri come il polietilene glicole (PEG), il polietilene ossido (PEO) e il poli(metacrilato di 2-idrossietile) (PHEMA), che hanno dimostrato una grande capacità di resistere all'adsorbimento non specifico di proteine, persino dal plasma sanguigno non diluito, e di ridurre l'adesione batterica e la formazione di biofilm. Questi polimeri presentano bassi valori di energia interfacciale polimero-acqua. In generale l'energia interfacciale tra una superficie e l'acqua rappresenta essere un parametro fondamentale per il controllo delle proprietà antiadesive. Le superfici idrofobiche non polari mostrano un'alta energia interfacciale con l'acqua. Ad esempio, l'energia interfacciale del PDMS con l'acqua è di circa 52 mJ/m^2 . In confronto, l'energia interfacciale dell'acqua dei polimeri polari come il PEG è inferiore a 5 mJ/m^2 . Di conseguenza, quando una superficie idrofobica entra in contatto con un'interfaccia biologica, biomolecole anfifiliche come le proteine mostrano un significativo adsorbimento sulla superficie per minimizzare l'energia interfacciale. [26]

È stato dimostrato, mediante tecniche di funzionalizzazione superficiale, la possibilità di modulare le proprietà antiadesive di un materiale polimerico. In particolare è possibile partire da una superficie che presenti già proprietà antiadesive e amplificarne l'effetto, ottenendo così risultati stabili nel tempo. Oppure, qualora sia necessaria la scelta di un materiale polimerico per le sue particolari proprietà chimico-fisiche in una determinata applicazione, che però non presenta proprietà di anti-incrostazione, è possibile, mediante opportune modifiche chimiche e/o fisiche, rendere il materiale resistente all'adesione cellulare [27]. Per ciò che concerne le modifiche chimiche si può pensare a rivestimenti che siano in grado di rilasciare composti, come farmaci, sali di ammonio quaternario o ioni d'argento, ma anche superfici switterioniche che includono carbossibetaina, sulfobetaina e fosforilcolina, presentano ottime proprietà antiadesive. [28]. Invece, per esempio, la progettazione di topografie superficiali, come canali, pilastri, nervature e rughe gerarchiche, forniscono un'alternativa fisica per l'anti-incrostazione, influenzando le interazioni topografiche tra gli organismi di incrostazione e le superfici dei materiali. [26]

Ad esempio nello studio proposto da Shuiyan-Yin Lin è stato studiato come variassero le proprietà di antiadesione utilizzando polimeri switterionici come le fosfobetaine. In particolare, sono state investigate le proprietà di emobiocompatibilità e di adesione di una membrana realizzata in silicone se posta a contatto con il sangue. Per ottenere ciò, monomeri metacrilati (2-metacrilatoilossietil fosforilcolina (MPC)), sono stati innestati covalentemente sulle membrane di silicone utilizzando la tecnica di polimerizzazione innescata dal plasma. Dai campioni trattati, rispetto al caso di controllo non trattato, è stato notato come la presenza di polimeri switterionici evitava l'adesione non solo di proteine come il fibrinogeno, ma anche di conseguenza l'adesione di cellule come i fibroblasti. Pertanto da tale studio è stato dimostrato che la funzionalizzazione con le fosfobetaine garantiva ottime proprietà anti adesive.[29]

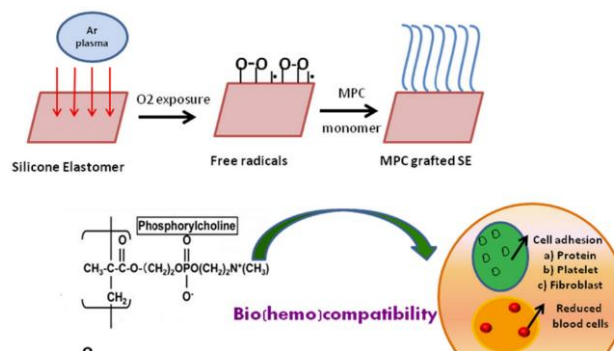


Figura 7: Schema per l'ancoraggio di polimero MPC sulla superficie dell'elastomero di silicone.[29]

Se da un lato una superficie anti adesiva risulta essere ottimale per evitare formazione di capsula fibrotica, dall'altro lato una totale mancanza di adesione e di interazione con l'ambiente biologico potrebbe portare a delle problematiche. Se ci poniamo in ambito biomedico, con l'innesto di un dispositivo, sappiamo che nonostante sia necessario che sulla superficie non vengano a formarsi delle incrostazioni che possano compromettere il normale funzionamento dell'impianto, è comunque necessario che tale dispositivo possa interagire e ancorarsi ai tessuti circostanti. Per tale motivo nello studio presentato da Shyam Patelet è stata sperimentata una superficie con proprietà adesive modulabili. Il loro studio nasce dall'esigenza di realizzare delle chero-protesi, impiantabili a livello della sclera, che superassero i problemi riguardante sia lo scarso ancoraggio del dispositivo con l'ambiente circostante, sia allo stesso tempo la formazione di una membrana fibrosa opaca sulla superficie interna dell'impianto dovuta all'attacco dei fibroblasti. In particolare era stata realizzata una membrana di PMMA funzionalizzata, mediante tecnica di aminolisi o idrolisi, con molecole di di-amino-PEG. Successivamente solo in zone ristrette della superficie, il tripeptide di adesione RGD veniva legato covalentemente al PEG. Test effettuati ponendo a contatto le cellule con la superficie

funzionalizzata, hanno dimostrato come l'adesione cellulare risultava essere confinata solo ed esclusivamente nelle zone in cui era presente l'RGD; mentre vi erano ottime proprietà anti adesive nelle zone in cui era presente solo il PEG.[30]

Sulla base delle precedenti considerazioni, nasce l'esigenza quindi di utilizzare un materiale che abbia delle caratteristiche antiadesive , tali per cui, qualora si volesse impiantare la membrana realizzata, sia minimizzata la formazione di capsula fibrotica.

1.2.3 Siliconi medici: Silpuran

I siliconi sono una categoria generale di polimeri sintetici la cui struttura di base è costituita da legami ripetuti tra silicio e ossigeno. Oltre ai legami con l'ossigeno per formare la catena polimerica, gli atomi di silicio sono anche legati a gruppi organici, tipicamente gruppi metilici. Questa è la base del nome "siliconi", assegnato da Kipping nel 1904 sulla base della loro somiglianza con le chetoni, poiché nella maggior parte dei casi un atomo di silicio si trova legato a un atomo di ossigeno e a due metilici. Oggi, invece, per convenzione, la catena ripetitiva di base è diventata nota come "silossano" e il silicone più comune è il polidimetilsilossano, abbreviato come PDMS.

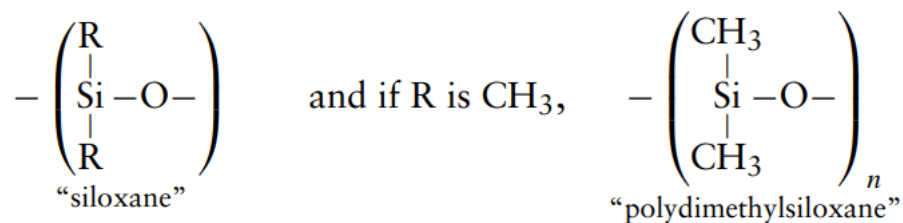


Figura 8: strutta chimica silicone.[31]

Per lo scopo di questa ricerca si è scelto di utilizzare un particolare tipo di silicone già in commercio chiamato SILPURAN, appartenente alle classe dei siliconi RTV (Room-Temperature Vulcanizing). I siliconi RTV sono polimeri siliconici che possono passare dalla fase liquida o viscosa a quella solida tramite il processo di vulcanizzazione. Questo processo avviene a temperatura ambiente o leggermente elevata, a differenza dei tradizionali siliconi che richiedono temperature più elevate per la vulcanizzazione. Questa caratteristica li rende particolarmente adatti per applicazioni in cui la vulcanizzazione a temperature elevate non è praticabile o desiderabile.[31]

Le gomme siliconiche, prima della reazione di vulcanizzazione, contengono generalmente sostanze aggiuntive come reticolanti, fillers, additivi e coloranti[32]:

- **Reticolanti:** Un reticolante è necessario per convertire la gomma non vulcanizzata in un prodotto vulcanizzato meccanicamente stabile;
- **Fillers:** tali riempitivi sono necessari per rinforzare la rete elastica di silicone;
- **Additivi:** Rispetto ad altri elastomeri, la gomma siliconica richiede pochi additivi poiché le proprietà essenziali sono determinate dal polisilossano stesso;
- **Coloranti:** La gomma siliconica è in genere trasparente o opaca, ma può essere colorata secondo il tipo di applicazione.

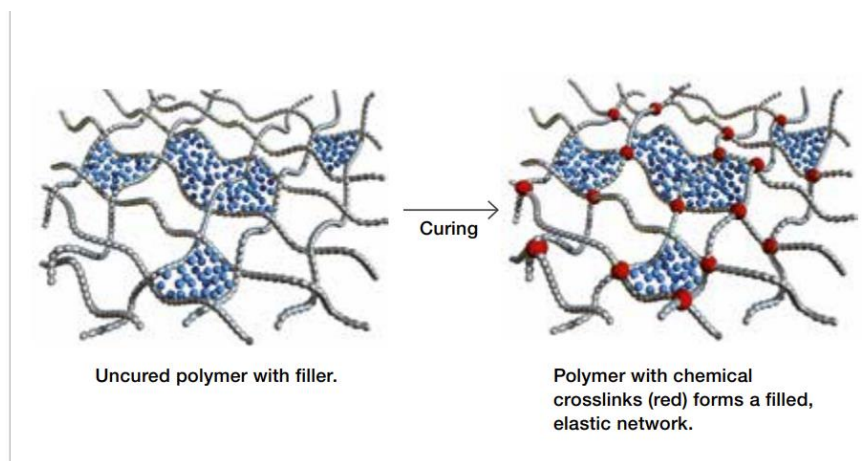


Figura 9 : reticolazione di gomma siliconica per vulcanizzazione.[32]

La gomma siliconica non vulcanizzata viene convertita in elastomero tramite vulcanizzazione. A seconda del metodo di vulcanizzazione, della viscosità del polimero di base e della temperatura di vulcanizzazione, i siliconi vengono classificati come segue [33]:

- Gomma siliconica vulcanizzante a temperatura ambiente a una parte (**RTV-1**): Le formulazioni di gomma siliconica RTV-1 sono sistemi monocomponente pronti all'uso. Si compongono di polisilossano, agente di vulcanizzazione, riempitivo e additivi. Subito dopo l'applicazione, il materiale inizia la reticolazione a contatto con l'umidità presente nell'aria. I sottoprodotti vengono rilasciati durante la vulcanizzazione;
- Gomma siliconica vulcanizzante a temperatura ambiente a due parti (**RTV-2**): Le formulazioni di gomma siliconica RTV-2 sono composti a due parti componenti che si vulcanizzano dopo la miscelazione. Di solito si vulcanizzano a temperatura ambiente e formano un materiale altamente elastico. La reticolazione può avvenire per condensazione per cui si richiede un catalizzatore di organostagno e rilascia sempre sottoprodotti; mentre quella per addizione richiede un catalizzatore al platino e non genera alcun sottoprodotto. Si vedrà

in dettaglio in seguito come il Silpuran appartiene a questa classe di gomme siliconiche e la reazione di vulcanizzazione risulta essere una reazione per addizione;

- **Gomma siliconica vulcanizzante ad alta temperatura (HTV):** La gomma siliconica HTV contiene lunghe catene polimeriche con un elevato peso molecolare, il che le conferisce una consistenza solida. La gomma siliconica HTV si vulcanizza mediante perossidi organici o un catalizzatore al platino a temperatura elevata. Tale classe risulta essere la più prestante da un punto di vista di proprietà meccaniche;
- **Gomma siliconica liquida (LSR):** Le gomme siliconiche liquide sono siliconi che si vulcanizzano ad alta temperatura. La loro consistenza e il meccanismo di vulcanizzazione per addizione offrono loro vantaggi di lavorazione unici. La gomma siliconica liquida ha una viscosità più bassa rispetto alla gomma siliconica solida (HTV). La LSR è una gomma siliconica che si vulcanizza per addizione, senza rilasciare sottoprodotti.

In generale i siliconi RTV presentano delle proprietà che li contraddistinguono da tutti gli altri siliconi. Questo è dovuto alla particolare struttura chimica, in quanto sono caratterizzati da una lunga catena completamente saturata di atomi di silicio e ossigeno. I legami Si-O presentano un'energia di legame eccezionalmente elevata di 451 kJ/mol (confrontata all'energia di legame C-C, pari a 352 kJ/mol) e un'elevata mobilità della catena Si-O. Tutto ciò si rispecchia in eccellente resistenza ad alta temperatura combinata con flessibilità a bassa temperatura, elevata resistenza a sostanze chimiche e influenze ambientali, eccellente resistenza ai raggi UV e alla radiazione e infine presenta una superficie idrorepellente.[34]

I parametri essenziali delle gomme siliconiche che devono essere definiti per garantire una corretta applicazione sono[32]:

- **Proprietà reologiche:** la viscosità è uno dei parametri più importanti che deve essere definito inizialmente per poi scegliere il corretto metodo di lavorazione. Più alta è la viscosità, meno versabile o più rigida è la miscela. La viscosità delle miscele di gomma siliconica RTV è solitamente compresa tra 500 e 2.000.000 mPa·s;
- **Reattività:** in particolare sarà necessario indicare parametri come “potlife” e “curing time”. La reattività delle formulazioni di gomma siliconica RTV-2 può essere modificata dalla scelta del catalizzatore, dal rapporto di miscelazione e dalla temperatura, mentre la vulcanizzazione delle qualità RTV-1 può essere accelerata aumentando l'umidità relativa fino all'80%;
- **Proprietà meccaniche:** La durezza viene misurata tramite indentazione ed è solitamente indicata sulla scala Shore A: maggiore è il valore Shore A, più dura è la gomma vulcanizzata;

- **Resistenza al calore:** La resistenza al calore dei siliconi è molto superiore a quella della maggior parte degli elastomeri organici. La gomma siliconica RTV correttamente vulcanizzata resiste facilmente a temperature elevate continue fino a 180 °C, mantenendo stabili le proprietà meccaniche.

Grazie alla sua eccezionale biocompatibilità e inerzia fisiologica, il Silpuran, prodotto dalla Wacker, è stato scelto come potenziale materiale per questa ricerca. È un silicone prodotto mediante reazione di addizione a partire da due componenti (A e B), di cui uno contiene polimero e reticolante, l'altro contiene polimero e il catalizzatore al platino. Quando i due componenti vengono miscelati, si vulcanizzano per formare l'elastomero prodotto. Il rapporto di miscelazione dei componenti di gomma siliconica RTV-2 che si vulcanizzano per addizione è tipicamente di 1:1, 9:1 o 10:1 in peso, a seconda del prodotto scelto. La reazione di vulcanizzazione segue una chimica ben precisa. In particolare quando i due componenti vengono miscelati, il polimero, il catalizzatore al platino e l'agente di vulcanizzazione entrano in contatto tra loro. Durante questa reazione, le catene polimeriche si reticolano attraverso l'idrossilazione dei gruppi vinilici mediante il reticolante contenente idrogeno.

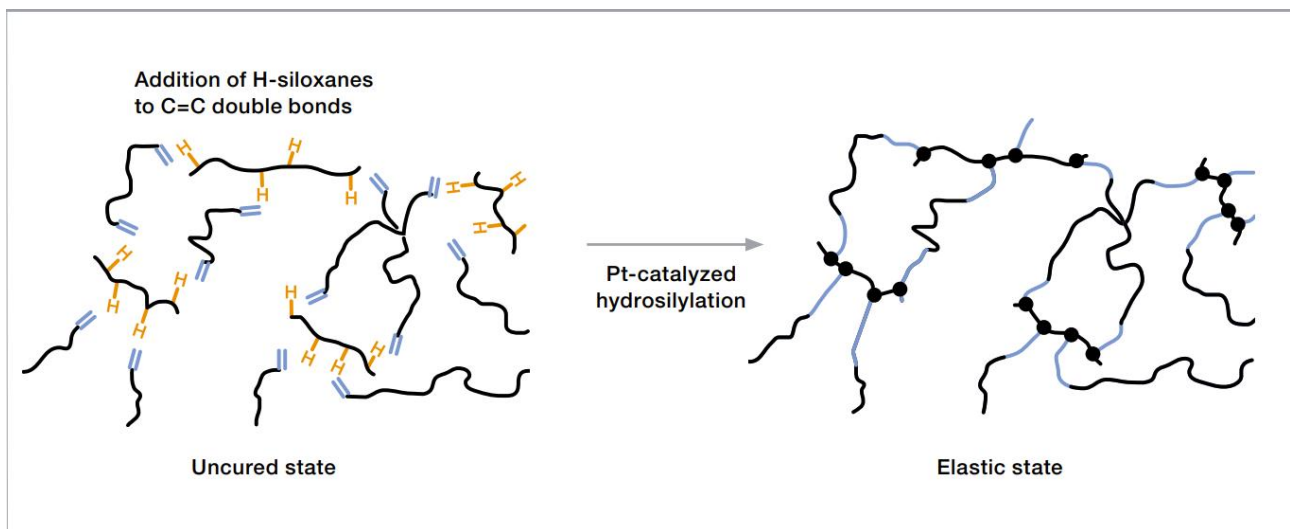


Figura 10: Reazione di addizione del Silpuran.[32]

Il Silpuran, così come tutti gli altri elastomeri RTV, è definito mediante due parametri: “potlife” and “curing time” [35]. Il primo indica di solito il periodo di tempo massimo durante il quale la miscela catalizzata di A e B può essere lavorata; il secondo, invece, rappresenta il tempo necessario per la vulcanizzazione, ovvero il tempo che intercorre dalla miscelazione dei due componenti, fase liquida e viscosa, fino a quando l’elastomero diventa non appiccicoso, fase solida. La scheda tecnica rilasciata dall’azienda produttrice, riporta una “potlife” di circa 54 min a una temperatura di 23 gradi e un “curing time” di circa 10 min a una temperatura di 100 gradi[36]. Naturalmente la temperatura gioca

un ruolo essenziale nella definizione di questi parametri, in quanto una variazione di temperatura comporta una variazione sia della “potlife” che del “curing time”. Come regola generale, una variazione di temperatura di circa 10 °C dimezza o raddoppia tali parametri.

1.2.4 Polivinildene-fluoruro (PVDF)

Il polivinildene-fluoruro è un polimero appartenente alla famiglia dei fluoropolimeri, caratterizzato da eccellenti proprietà piezoelettriche, stabilità termica e resistenza meccanica. È facilmente lavorabile e possiede una resistenza chimica a diversi materiali come acidi, basi, solventi organici, oli e grassi. È noto anche come poli(1,1-difluoroetilene) con (CH₂-CF₂) come unità ripetitiva.

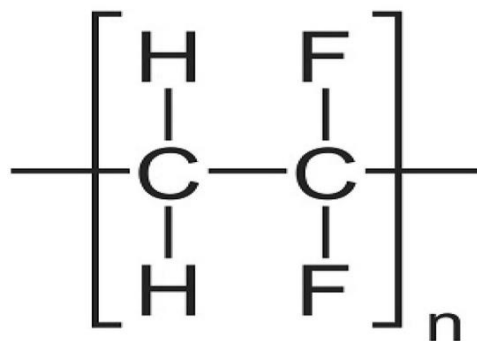


Figura 11: struttura chimica del PVDF.[37]

Il PVDF è un fluoropolimero termoplastico altamente reattivo, di colore bianco e a differenza degli altri fluoropolimeri ha una bassa densità di 1,78 g/cm³. Il PVDF esiste in vari stati conformazionali, le sue macromolecole possono trovarsi nello stato disordinato amorfo e nello stato cristallino ordinato. Essendo un termoplastico semicristallino, il PVDF mostra proprietà chimiche, termiche e meccaniche in un ampio intervallo di temperature. Il peso molecolare del PVDF supera i 100.000 g/mol, il punto di fusione è compreso tra 171 e 180 °C, la temperatura di cristallizzazione è compresa tra 141 e 151 °C e la temperatura di transizione vetrosa è di -40 °C. L'interesse per il PVDF è emerso più di un decennio fa. Le proprietà piezoelettriche del PVDF sono state introdotte dai fratelli Curie nel 1880 quando hanno scoperto il cambiamento di dimensioni del quarzo sottoposto a un campo elettrico esterno e la capacità di generare una carica elettrica propria quando deformato meccanicamente. Il PVDF è stato scoperto come parte della ricerca sui fluoropolimeri della DuPont; l'azienda ha sviluppato il polivinilidene fluoruro (PVDF) nel 1961 e lo ha introdotto commercialmente nel 1965. In ambito medico invece, le prime applicazioni sono state per dispositivi per misurare il flusso d'aria respiratoria e lo sforzo respiratorio. In particolare nei dispositivi di pletismografia dell'induttanza respiratoria (RIP), film di PVDF sono stati introdotti come cinture che possono

produrre segnali senza bisogno di una fonte di alimentazione esterna costante. Il PVDF è in grado di generare una carica propria quando sottoposto a forza o accelerazione, consentendo una maggiore durata della batteria e una maggiore affidabilità. [38]

Lo studio di Eisenmenger ha riportato che il PVDF possiede cinque forme cristalline, ovvero α , β , γ , δ ed ϵ , definite in base alla struttura conformazionale delle catene e dall'impacchettamento delle macromolecole. Le diverse conformazioni delle catene sono designate come tutte trans (TTT) a zigzag planare per la fase β , TGTG0 (trans-gauche-trans-gauche) per le fasi α e δ e T3GT3G0 per le fasi γ ed ϵ . Come mostrato in Figura 18, in cui sono rappresentate le fasi del PVDF più studiate, la posizione degli atomi di fluoro nella catena molecolare determina la fase del polimero. L'alta elettronegatività degli atomi di fluoro genera un forte momento dipolare elettrico dell'unità monomerica. Le fasi β e γ hanno il momento dipolare più elevato per unità di cella e sono quindi conosciute per possedere piezoelettricità, mentre le altre tre fasi (α , δ ed ϵ) sono apolari a causa dell'impacchettamento antiparallelo dei dipoli all'interno della cella unitaria. Tuttavia, la fase α del PVDF può essere trasformata nella fase β e quindi nella fase elettroattiva mediante l'applicazione di un trattamento aggiuntivo come lo stretching, l'alta pressione o la polarizzazione. D'altra parte, la cristallizzazione per fusione può riportare alla formazione della fase α apolare.[39]

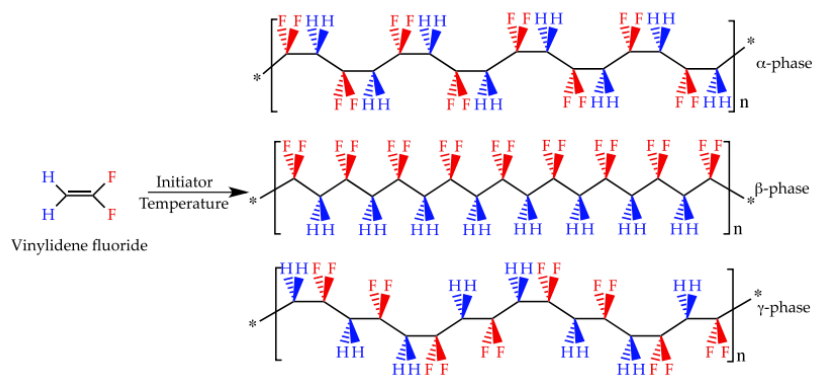


Figura 12 : Polimerizzazione vinilica a radicale libero del monomero di vinile per ottenere PVDF. Diverse conformazioni delle catene del polimero che comportano fasi cristalline differenti. [39]

A causa delle proprietà elettroattive, i materiali che comprendono le fasi β e γ del PVDF sono i più richiesti per applicazioni avanzate. Più è alta la risposta piezoelettrica, meglio è per molte applicazioni, quindi sono state ampiamente applicate strategie per migliorarla. Uno degli approcci

prevede lo sviluppo di copolimeri di PVDF. Nonostante le strutture delle unità di copolimero siano meno polari rispetto a quelle del PVDF puro, alcuni copolimeri mostrano una maggiore cristallinità, con conseguente risposta piezoelettrica più elevata. Altre proprietà, come la temperatura di transizione vetrosa, il punto di fusione, la stabilità, la permeabilità, l'elasticità e la reattività chimica, possono anche essere modificate a seguito della copolimerizzazione. [40]

Al giorno d'oggi, il PVDF trova numerose applicazioni in ambito medico per le sue ottime proprietà chimico-fisico e meccaniche ma anche per il suo basso costo. La semplicità nella struttura chimica rende il PVDF sia resistente che robusto, con ottima resistenza alla trazione e tenacità all'impatto. Il PVDF mostra un'eccellente resistenza all'abrasione, una resistenza superiore alla deformazione sotto carico e un'eccezionale resistenza alla flessione o alla fatica ripetuta. In sezioni sottili, come film, filamenti e tubi, il componente PVDF mostra un comportamento flessibile e diventa trasparente.

L'immersione in soluzioni alcaline però può compromettere l'integrità del materiale, comportando una diminuzione della resistenza alla trazione, del modulo di Young e dell'allungamento alla rottura. In condizioni severe, il PVDF può diventare fragile e perdere la sua integrità meccanica. Questo può rappresentare un problema in applicazioni che richiedono una resistenza meccanica elevata sotto stress o deformazione. [41]

Il PVDF ha una bassa solubilità e si dissolve solo in alcuni solventi organici polarizzati come dimetilformammide (DMF), dimetilsolfossido (DMSO), N-metilpirrolidone (NMP) o dimetilacetammide (DMAc). È insolubile in solventi alifatici, composti aromatici, soluzioni di cloro, alcoli, acidi forti, basi forti e soluzioni alcaline. Inoltre, è incompatibile con alcali forti, esteri e molti chetoni. Quando il PVDF viene immerso in una soluzione alcalina per diverse ore, si verifica la decolorazione del PVDF, come riportato in letteratura. Il colore varia dal bianco al marrone col passare del tempo e infine diventa nero, a seconda dell'estensione del processo di deidrofluorinazione del campione polimerico. [42]

La progettazione di strutture basate su PVDF svolge un ruolo chiave nel determinare l'adeguatezza dei materiali per diverse applicazioni e nell'adattare le loro proprietà agli scopi desiderati. Di conseguenza, sono disponibili diverse metodologie per produrre materiali con diverse strutture e morfologie al fine di soddisfare le specifiche esigenze delle applicazioni, che possono variare dalla consegna di farmaci, all'ingegneria dei tessuti, ai sensori e attuatori, all'equipaggiamento per dispositivi medici, ai sistemi microfluidici, alle membrane per la filtrazione, all'ingegneria ambientale e al recupero dell'energia. Pertanto, a seconda del metodo di elaborazione, i materiali basati su PVDF nella fase β elettroattiva possono essere ottenuti sotto forma di film, film porosi, fibre e microsferi.

Le tecniche di lavorazione del PVDF risultano essere diverse, per esempio è possibile realizzare film mediante tecnica dello spin coating o mediante la separazione di fase indotta termicamente; oppure, qualora si volessero ottenere film porosi si può adoperare la tecnica del salt leaching e del freeze extraction. [43]. Per questo scopo di ricerca, poiché il fine ultimo è la realizzazione di una membrana con porosità controllata che sia in grado di garantire il filtraggio dell'umor acqueo, la tecnica di lavorazione più ottimale risulta essere l'electrospinning, processo che consente di ottenere fibre casuali e allineate in modo efficace utilizzando un solvente sufficientemente conduttivo e un collettore statico o rotante, rispettivamente, con diametri che vanno da centinaia di nanometri a dozzine di micrometri. Il processo di cristallizzazione del PVDF avviene prevalentemente nella fase β utilizzando tensioni elevate o un alto rapporto di stiramento dei getti. Inoltre, le condizioni di elaborazione e il solvente utilizzato influenzano altre caratteristiche come il diametro medio delle fibre, l'area superficiale specifica, la tensione superficiale e le proprietà meccaniche. [44]

Morphology	Method
Films	Doctor blade
	Spin coating
	Printing
	Non-solvent induced phase separation (NIPS)
Porous films	Temperature induced phase separation (TIPS)
	Salt leaching
	Nylon template
	Freeze extraction
Fibres	Replica moulding
	Electrospinning
Microspheres	Electrospray
	Gelation

Tabella 3: Tecniche di lavorazione del PVDF per ottenere differenti morfologie. [44]

1.3 Tecniche di produzione dei dispositivi MIGS

Ad oggi, sono state utilizzate differenti strategie e tecniche di fabbricazione con il fine di realizzare dei dispositivi che fossero in grado di far defluire l'umor acqueo così da garantire un ritorno della IOP a valori fisiologici. Naturalmente le tecniche variano a seconda della natura del materiale selezionato. L'utilizzo di un materiale metallico, quale per esempio il titanio o il nitinol, prevede tecniche come **taglio laser o l'elettroerosione a filo**. La prima tecnica prevede l'utilizzo di un laser ad elevata energia con il fine di rimuovere materiale metallico, creando tagli precisi e puliti. Si parte da una sorgente che sia in grado di generare il fascio e successivamente, mediante l'uso di lenti o specchi, il laser viene fatto convogliare in un punto preciso del materiale, detto "punto focale", in cui avviene il taglio effettivo. L'energia generata dal fascio sarà così assorbita dal metallo che provocherà un aumento rapido della temperatura, determinando la rimozione di materiale. Il movimento del raggio laser permette di ottenere delle geometrie ben precise. La tecnica in generale comporta alto

grado di precisione, consentendo la creazione di tagli molto dettagliati e forme complesse; poiché il processo non richiede il contatto diretto con il materiale, c'è minima possibilità di contaminazione da parte degli strumenti di taglio (ottimale se pensiamo che il titanio presenta elevate reattività superficiale); inoltre, avendo il laser un raggio di azione molto ristretto, la zona termicamente influenzata è generalmente ridotta, comportando bassi rischi di distorsione termica. [45]

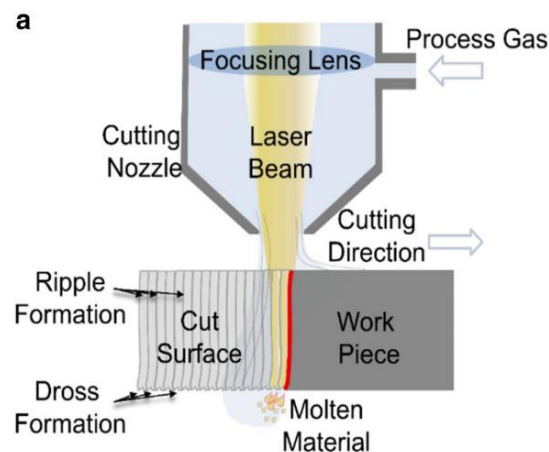


Figura 13 : Rappresentazione schematica del processo di taglio laser. [46]

Allo stesso tempo la tecnica di taglio laser comporta limitazioni quali elevato costo di produzione e manutenzione dei macchinari, scelta limitata nell'utilizzo dei materiali e infine il taglio laser può incontrare limiti di spessore di materiale che può essere lavorato in modo efficace[47]. I dispositivi MIGS di natura metallica, oltre ad essere prodotti con la tecnica del taglio laser, sono realizzati anche mediante tecnica dell'elettroerosione a filo, con l'intento di superare i limiti della tecnica precedente. Il materiale di partenza, generalmente conduttivo, viene posizionato all'interno di un fluido dielettrico. Un filo conduttivo viene posizionato vicino al pezzo di lavoro e viene fornita una scarica elettrica ad alta intensità. L'arco elettrico che si viene a creare tra i due genera una grande quantità di calore ed energia concentrata su un piccolo punto della superficie del metallo, causando erosione del materiale che viene poi portato via dal fluido dielettrico. Se da un lato si riescono a superare delle limitazioni quali la possibilità di utilizzare una gamma di materiali più ampia, le limitazioni inerenti allo spessore lavorabile e al costo di produzione e mantenimento macchinari rimangono ugualmente. [48]

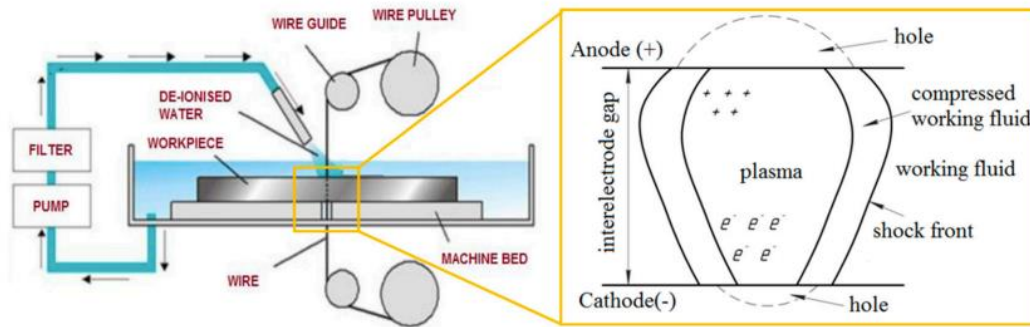


Figura 14 : Rappresentazione schematica del processo dell'elettroerosione a filo[48]

Naturalmente, qualora si dovesse parlare di impianti a base di polimeri, le tecniche analizzate in precedenza non possono essere utilizzate, e sono necessarie tecniche più appropriate come lo **stampaggio a compressione o l'estrusione**. Per esempio per la realizzazione del "InnFocus MicroShun"t, un dispositivo a base di poli(stirene-blocco-isobutilene-blocco-stirene), o SIBS[25] , è stata adoperata la tecnica di estrusione. Rappresenta essere un processo largamente utilizzato nella lavorazione di polimeri sintetici che coinvolge la fusione e la formatura di un materiale plastico attraverso uno stampo. Il polimero, fornito sotto forma di pellet, viene inserito all'interno di un canale di estrusione. Mediante poi dei riscaldatori, si genera calore fino al raggiungimento di temperature al di sopra della temperatura di fusione del polimero, portando le particelle a coalescenza e ottenendo così un materiale fuso e viscoso. A questo punto il materiale viene spinto attraverso uno stampo, chiamato "dado" che determinerà la sezione trasversale della parte finale. Una volta estruso, il materiale inizia a raffreddarsi e solidificarsi. Questo può avvenire attraverso il contatto con superfici raffreddate o tramite l'utilizzo di aria o acqua. Infine, la parte estrusa viene tagliata alla lunghezza desiderata. La tecnica prevede vantaggi quali alta efficienza di processo, garantendo una buona produzione in serie; versatilità, poiché numerosi polimeri possono essere processati con questa tecnica; si possono ottenere delle geometrie complesse e infine si ottiene basso spreco di materiale. L'estrusione però presenta dei limiti che non rende sempre facile il suo utilizzo, in quanto le attrezzature e la loro manutenzione risultano costosi e soprattutto questo processo può incidere sulle proprietà meccaniche finali del materiale. Non sempre quindi tale tecnica risulta essere ottimale per la lavorazione dei polimeri, poiché per esempio non tutti i polimeri possono essere estrusi e in alcuni casi l'estrusione può generare degli sforzi di taglio sul materiale che ne influenzano le proprietà meccaniche[49].

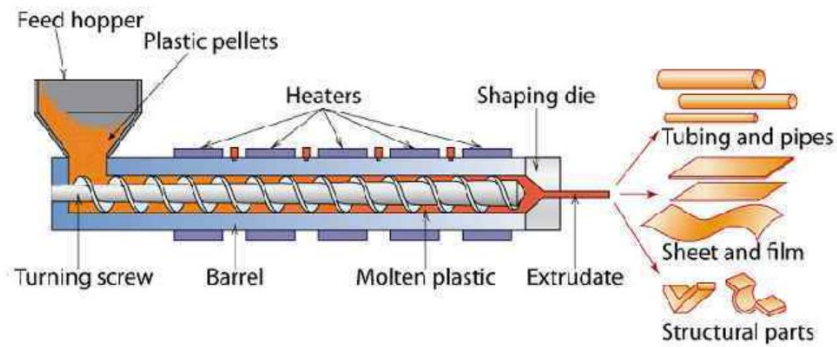


Figura 15: Rappresentazione schematica del processo dell'estrusione.[49]

Per tali ragioni un'altra tecnica utilizzata nella realizzazione di dispositivi MIGS è lo stampaggio a compressione. Rappresenta essere un tecnica di lavorazione in cui il materiale plastico viene compresso e riscaldato all'interno di uno stampo per ottenere una forma desiderata. Il polimero sintetico viene riscaldato per renderlo plastico e facilmente modellabile per poi essere posizionato all'interno di uno stampo a due parti. Lo stampo avrà la forma desiderata del componente finale. Il sistema viene poi riscaldato e chiuso esercitando una pressione sullo stampo. Una volta che le particelle sono andate a coalescenza e il pezzo si è formato, il sistema viene fatto raffreddare per far indurire il materiale e infine viene rimosso dallo stampo. Attraverso la tecnica dello stampaggio a compressione si possono lavorare polimeri termoindurenti per ottenere geometrie complesse, con un ottima rifinitura superficiale. Tale tecnica prevede però anche un elevato costo dovuto ai macchinari utilizzati e all'elevato spreco dei materiali.[50]

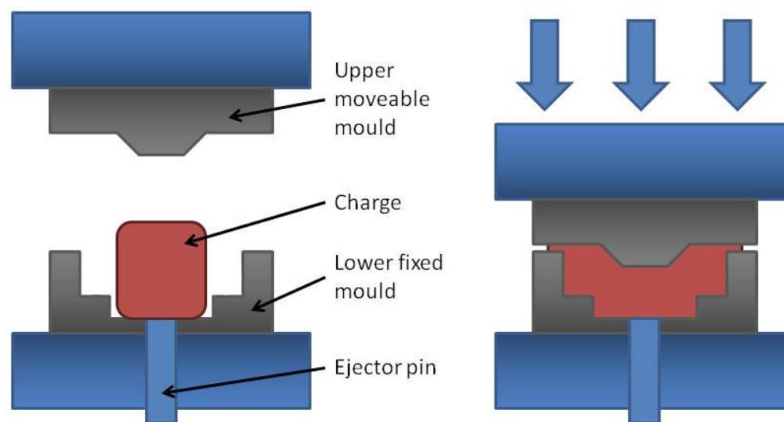


Figura 16: Rappresentazione schematica del processo dello stampaggio a compressione[50]

Lo scopo di questa ricerca prevede la realizzazione di una membrana che sia in grado di essere impiantata mediante tecnica MIGS, a livello della sclera, e che garantisca il filtraggio dell'umor acqueo ristabilendo un valore fisiologico di IOP.. Il metodo più promettente per la realizzazione di tale membrana risulta essere l'elettrospinning, poiché rappresenta essere una tecnica estremamente versatile, con la possibilità di ottenere delle strutture tridimensionali con un ottimo controllo sulla porosità.

1.3.1 Elettrospinning

L'elettrospinning è un sistema che sfrutta l'applicazione di forze elettrostatiche per la produzione di fibre sub-millimetriche (micro e nanometriche), a partire dall'estrusione di una soluzione o un fuso visco-elastico. La tecnica si basa su un getto di fluido viscoso caricato elettricamente che viene attratto tramite l'aria verso un collettore che ha un potenziale elettrico diverso. La tecnica, come già detto in precedenza, risulta essere molto versatile con la possibilità di processare una vasta gamma di materiali come polimeri (naturali e sintetici), compositi, ceramici e semiconduttori. Tuttavia la maggior parte dei lavori riporta l'uso di polimeri, per lo più sintetici e loro blend a causa della maggior semplicità di processo. La configurazione tipica per l'elettrospinning è costituita dai seguenti componenti[51]:

- **Emettitore (spinneret)**, ovvero la siringa che permette la fuoriuscita di materiale;
- **Generatore di corrente DC** ad alta tensione (5-50 kV), connesso all'emettitore;
- **Pompa volumetrica** per l'erogazione della soluzione polimerica ad un flusso costante controllato;
- **Collettore conduttore**, collegato a terra, che rappresenta essere la superficie sulla quale vengono depositate le fibre. Esistono collettori con forme geometriche differenti che determinano poi morfologie e strutture diverse. Il collettore può essere[52]:
 - **Piano**: risulta essere il set up più semplice in cui si riesce ad ottenere solo una maglia di fibre disordinate;
 - **Rotante**: permette di creare maglie di grandi dimensioni costituite da fibre fortemente allineate. Modulare la velocità di rotazione sarà fondamentale per controllare l'integrità e il diametro delle fibre;
 - **Mandrino rotante**: si ottengono fibre disordinate secondo una struttura tubulare;
 - **Mandrino rotante controllato da un paio di elettrodi paralleli**: a differenza del precedente, permette la deposizione di fibre ordinate secondo una struttura tubulare.

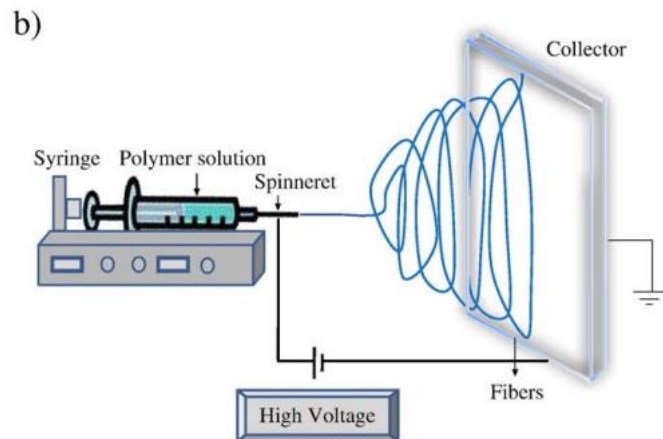


Figura 17: Rappresentazione schematica degli elementi costitutivi del sistema Electrospinning. [53]

In generale, la soluzione polimerica iniziale viene inserita all'interno di una siringa, dotata di ago metallico, posizionata ad una certa distanza da un collettore metallico, e attaccata ad una pompa volumetrica che spinge in maniera controllata lo stantuffo. Tra l'ago della siringa e il collettore viene impostata una differenza di potenziale elettrico. Il risultato è che l'ago tende ad assumere una carica positiva, che di conseguenza verrà assunta dalla soluzione in uscita dalla siringa. Pertanto le cariche positive esercitano tra di loro una repulsione elettrostatica, comportando la formazione del cosiddetto cono di Taylor. Quando la forza del campo elettrico è molto intensa e supera la tensione superficiale della soluzione polimerica, dalla punta del cono di Taylor parte il getto dell'electrospinning, determinando la deposizione di materiale sul collettore. Durante tale percorso, il solvente ha il tempo necessario per evaporare, garantendo la formazione di fibre [54]

Oltre alla configurazione base per il processo di elettrofilatura, intorno ai primi anni 2000, è stato introdotto l'electrospinning coassiale, permettendo di processare due o più tipi di soluzioni, anche prive di proprietà elettrospinnabili, contemporaneamente per ottenere delle fibre in cui è possibile distinguere un guscio esterno e un nucleo interno (fibre core-shell). Tuttavia, però, la presenza di una seconda soluzione durante il processo aumenta la complessità del sistema, a causa di un maggior numero di parametri da controllare, tra cui in particolare quelli legati alle proprietà interfacciali. La compatibilità delle soluzioni è molto importante nella elettrofilatura coassiale. Le due soluzioni dovrebbero essere immiscibili o semi immiscibili per formare un cono di Taylor stabile all'estremità del beccuccio. Se le soluzioni sono incompatibili, si verifica la precipitazione, la solidificazione e la miscelazione delle soluzioni quando entrano in contatto. Durante il processo, per ottenere delle fibre core-shell stabili, lo sforzo di taglio dovuto alla viscosità della soluzione del guscio deve essere superiore alla tensione superficiale presente all'interfaccia delle due soluzioni. Inoltre, il flusso della

soluzione del guscio deve essere maggiore per intrappolare completamente la soluzione del nucleo. Tuttavia, nei casi particolari in cui la soluzione del guscio non è elettrofilabile e la soluzione interna lo è, quest'ultima può anche guidare la elettrofilatura.

Uno dei principali vantaggi dell'elettrofilatura coassiale rispetto alla configurazione base dell'electrospinning, è il facile controllo che si può avere sulla struttura interna delle nanofibre, con la capacità di ottenere delle fibre cave, fibra in tubo, tubo in tubo e multicanale. In particolare, gli studi si sono maggiormente focalizzati sulle fibre core-shell, in quanto tra i numerosi vantaggi che possiedono, si ha la possibilità di isolare sostanze o incapsulare nanoparticelle al livello del nucleo interno, per garantire sia una maggiore protezione durante il processo di elettrospinning, poiché in qualche modo voltaggi elevati possono compromettere l'integrità di questi composti, sia perché si può avere un maggiore controllo sulle cinetiche di rilascio di farmaci. Per tali motivi, l'elettrofilatura coassiale è stata ampiamente utilizzata in applicazioni biomediche come impalcature cellulari nanofibrose per l'ingegneria tissutale o sistemi di rilascio di farmaci.[55]

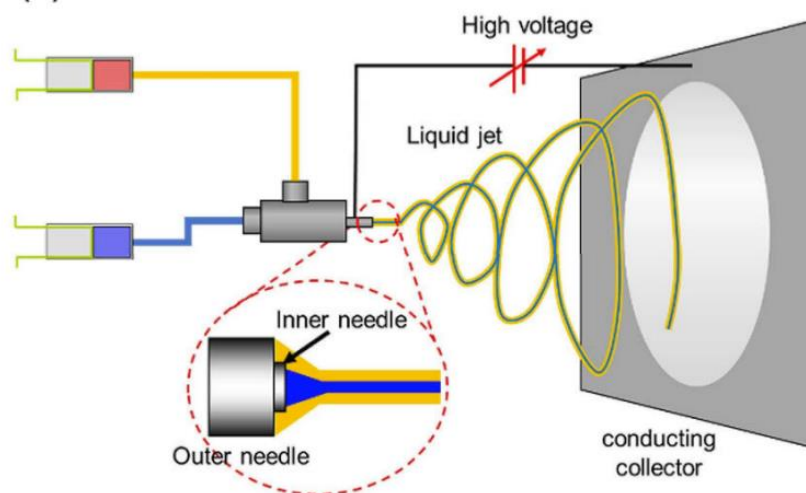


Figura 18: Rappresentazione schematica della configurazione dell'elettrospinning coassiale.[56]

Per la tecnica, in generale, dell'elettrofilatura, vi sono diversi fattori che possono incidere sull'esito positivo della procedura. Tra questi vi è l'obbligo di assicurarsi che la fibra prodotta sia completamente asciutta quando raggiunge il punto di raccolta, garantendo così la completa evaporazione del solvente. La selezione del solvente, la distanza tra ago e punto di raccolta e la temperatura devono quindi essere attentamente valutate. Ciò spiega il motivo per cui la maggior parte dei solventi utilizzati per dissolvere i polimeri da sottoporre a elettrofilatura sono solventi organici polari e facilmente volatili.

Per incrementare la velocità di evaporazione del materiale in lavorazione e favorire l'adeguata evaporazione del solvente durante la fase di deposito, spesso si ricorre a solventi nocivi e aggressivi. Tuttavia, questa pratica riduce la citocompatibilità finale delle strutture ottenute mediante elettrofilatura. In particolare, si è osservato che tali fattori ostacolano principalmente la lavorabilità dei polimeri di origine naturale. Di conseguenza, attualmente sono in corso diverse strategie che impiegano solventi meno dannosi e tossici, con l'obiettivo di conservare le proprietà fisico-chimiche di materiali più sensibili e nel contempo garantire una notevole citocompatibilità delle strutture ottenute. [52].

Il processo di electrospinning è governato da un alto numero di parametri, ciascuno dei quali influenza significativamente la morfologia delle fibre ottenute. Tali parametri sono classificati in:

- **Parametri legati alla soluzione polimerica.** Tra questi troviamo:[53]
 - **Concentrazione:** è necessario definire un range di lavoro ottimale, che non sia un valore troppo basso al di sotto del quale la struttura presenta dei difetti come la presenza di perle che influenzano le proprietà meccaniche finali; né un valore troppo alto poiché il flusso non risulterebbe stabile. All'interno del range ottimale, si ha un trend per cui all'aumentare della concentrazione il diametro delle fibre aumenta;
 - **Peso molecolare e viscosità:** hanno un effetto significativo sulle proprietà reologiche, sulla tensione superficiale, e sulla conduttività della soluzione. Se il peso molecolare del polimero viene aumentato, mantenendo la concentrazione costante, la viscosità della soluzione aumenta significativamente, riducendo la velocità di evaporazione del solvente. Le fibre raggiungeranno il collettore ancora relativamente umide, acquistando quindi una morfologia appiattita. Per bassi pesi molecolari al contrario la velocità di evaporazione del solvente aumenta;
 - **Tensione superficiale:** risulta essere molto dipendente dal tipo di solvente utilizzato. In generale l'utilizzo di tensioni minori comporta l'uso di campi elettrici inferiori e favorisce la formazione di fibre lisce. Una variazione di tale parametro comporta una variazione di area superficiale per unità di massa;
 - **Conduttività:** è correlata con altri parametri, per esempio tipo di polimero utilizzato, il solvente in cui viene disciolto e la presenza di sali in soluzione. In particolare ioni presenti in soluzione determinano la stabilità e la dimensione delle fibre. Alta conduttività elettrica favorisce la formazione di fibre piccole. Al contrario, una scarsa conducibilità della soluzione comporta scarsa forza elettrica e quindi fibre non uniformi;

- **Parametri di processo**, e quindi dipendenti dallo strumento utilizzato[57]:
 - **Voltaggio**: il getto viene creato a fronte di una tensione soglia in grado di polarizzare il fluido (normalmente $> 6kV$). Non si ha un'unanimità di pensiero su cosa comporti una variazione di voltaggio, probabilmente a causa della maggiore incidenza di altri parametri. In generale, maggiori tensioni sembrano indurre formazione di fibre di diametro inferiore, dovuto a un maggiore allungamento della fibra;
 - **Flusso di materiale**: determina quanta soluzione è disponibile per il processo di elettrofilatura nell'unità di tempo. Flussi di materiali minori, comportano un processo più lento, permettendo una migliore e sufficiente evaporazione del solvente prima che le fibre raggiungano il collettore; al contrario, un eccessivo flusso comporta la presenza di fibre granulose;
 - **Diametro interno dell'ago**: si prediligono diametri piccoli in quanto riducono la tendenza a formare goccioline lungo le fibre e consentono di ottenere fibre con diametri ridotti. È necessario fare attenzione però e non scegliere un diametro troppo piccolo, in quanto il materiale non riuscirebbe a uscire dall'ago;
 - **Distanza ago-collettore**: è necessario identificare quella distanza minima al di sopra del quale si ha la corretta evaporazione del solvente. Superata questa soglia, si è dimostrato che all'aumentare della distanza tra l'ago e il collettore, il diametro delle fibre aumenta.
- **Parametri ambientale** presenti all'interno della camera[58]:
 - **Umidità**: può comportare un cambiamento della morfologia delle fibre poiché agisce sia sulle proprietà meccaniche, correlate alla rigidità, e quindi avere una variazione nel diametro delle fibre, sia sull'evaporazione del solvente e quindi presenza di pori. In generale bisogna garantire che il valore di umidità sia all'interno di un range ottimale, poiché un ambiente troppo secco può causare fenomeni di essiccazione prematura del fluido e successiva ostruzione dell'ago; un ambiente troppo umido, invece, può portare alla formazione di piccoli pori superficiali che poi vanno incontro a coalescenza;
 - **Temperatura**: influenza in particolare la velocità di evaporazione del solvente e la viscosità della soluzione, comportando quindi una variazione del diametro delle fibre. Inoltre in base al polimero scelto, a volte è necessario impostare una temperatura specifica per il tipo di applicazione. Per esempio in alcuni casi è necessario impostare una temperatura tale per cui la soluzione rimanga allo stato liquido durante l'intero processo, o laddove si lavori con polimeri naturali, bisogna lavorare con temperatura non troppo elevate per non danneggiare il polimero.

1.3.1 Stampante 3D

La capacità di realizzare impianti specifici per pazienti incorporando farmaci bioattivi, cellule e proteine ha reso la tecnologia di stampa 3D rivoluzionaria nei settori medico e farmaceutico. Attualmente, una vasta varietà di biomateriali viene utilizzata nella stampa 3D medica, tra cui metalli, polimeri e compositi. Con la continua ricerca e progressi nei biomateriali utilizzati nella stampa 3D, si è registrata una rapida crescita nelle applicazioni della stampa 3D nella produzione di impianti personalizzati, protesi, dispositivi per la somministrazione di farmaci e strutture tridimensionali per l'ingegneria dei tessuti e la medicina rigenerativa.

La stampa 3D è un processo di costruzione di oggetti tridimensionali strato dopo strato, a partire da un file digitale. In questo processo, un oggetto digitale in 3D viene progettato utilizzando software di progettazione assistita al computer (CAD). Questi oggetti 3D vengono salvati in un formato di file leggibile dalla stampante 3D. I formati di file universali più comuni utilizzati per la stampa 3D sono STL (stereolitografia) e VRML (linguaggio di modellazione della realtà virtuale). [59]

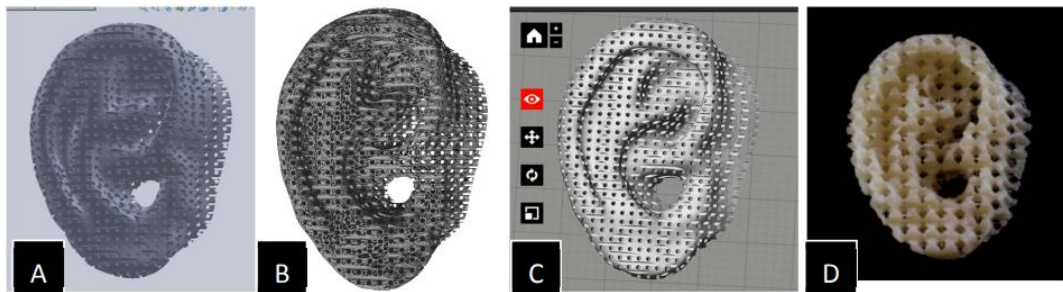


Figura 19: step sequenziali del processo di stampa 3D: (A) immagine CAD del modello da realizzare; (B) stereolitografia del modello; 3D printing software; (D) oggetto 3D stampato.[59]

1. **Pre-processing:** rappresenta essere la fase di pianificazione del processo. In prima istanza viene acquisita l'immagine mediante tecnica di imaging medico, successivamente viene creato il file CAD e infine la conversione in file STL;
2. **Processing:** che consiste nella scelta del materiale e della particolare tecnica che deve essere utilizzata per qual tipo di materiale;
3. **Post-processing:** consiste nella fase post stampa, in cui vengono attuati processi di rifinitura prima che il costruito sia pronto per l'utilizzo;

Quando si parla di materiale di stampa, vi è una grande differenza quando si parla biomaterials ink o di bioink. Nel primo caso sono materiali biocompatibili che vengono utilizzati nel processo di stampa senza la presenza di cellule; nel secondo caso, invece, vi è la possibilità di incorporare cellule all'interno del materiale prima di essere stampato, in modo tale da realizzare un dispositivo con all'interno già la presenza di cellule, evitando tutte quelle problematiche inerenti alla semina cellulare. [60]

Sebbene il termine "stampaggio 3D" venga utilizzato come sinonimo di fabbricazione additiva, ci sono diversi processi di fabbricazione coinvolti in questa tecnologia. Tra le più utilizzate per applicazioni mediche si riscontrano:

- **Modellazione a deposizione fusa (FDM):** risulta essere la tecnica più economica e più utilizzata oggi. Il processo prevede la deposizione di un filamento termoplastico, mediante testina riscaldata, su un piatto piano, strato dopo strato fino al raggiungimento dell'oggetto desiderato. Le stampanti FDM possono ospitare più di una testa di stampa e quindi possono stampare più tipi di materiali contemporaneamente. Di solito, tra queste stampanti multi-testa, una delle teste di stampa contiene un filamento di supporto che può essere facilmente rimosso o sciolto in acqua. [61]
- **Biostampa basata sull'estrusione:** In questo metodo, i materiali vengono estrusi attraverso una testa di stampa, sia mediante pressione pneumatica che mediante forza meccanica. Poiché questo processo non implica procedure di riscaldamento, è più comunemente utilizzato per la fabbricazione di strutture di ingegneria dei tessuti con la presenza di cellule. Questo processo di stampa 3D consente la deposizione precisa di piccole unità di cellule con danni minimi. Sono possibili processi di post stampa, quali reticolazione chimica o UV per migliorare le proprietà meccaniche. [62]
- **Stampaggio per iniezione:** un liquido di legatura viene depositato selettivamente sul letto di polvere per legare i materiali strato su strato. Acqua, acido fosforico, acido citrico, PVA, sono alcuni dei materiali di legatura comunemente utilizzati per questo tipo di stampa 3D. Gli oggetti stampati in 3D finiti vengono spesso sottoposti a post-elaborazione per migliorare le proprietà meccaniche. [63]
- **Stampa PolyJet:** Similmente al processo descritto precedentemente, strati di resina fotopolimerica vengono depositati sul piano di costruzione e contemporaneamente induriti utilizzando una fonte di luce UV. A differenza del processo di stampaggio per iniezione, è possibile stampare contemporaneamente e indurire numerose tipologie di materiali. Grazie a

queste capacità, il Polyjet è ampiamente utilizzato nel campo medico per fabbricare modelli anatomici per la pianificazione chirurgica e le simulazioni preoperatorie. Poiché la fonte UV è direttamente accanto all'ugello di stampa garantendo quindi un rapido indurimento della resina , non è necessaria una post-elaborazione della struttura. Questa tecnologia in generale prevede elevata precisione dimensionale. [64]

2 MATERIALI E METODI

Nel seguente capitolo verranno riportati i materiali utilizzati per la realizzazione delle membrane elettrofilate, i processi di produzione e le diverse caratterizzazioni effettuate sui campioni realizzati.

2.1 Preparazione delle soluzioni a base di silicone medico (Silpuran)

Le formulazioni a base di silicone medico Silpuran adatte all'elettrofilatura sono state preparate prendendo come riferimento un protocollo trovato in letteratura [65]. In questo lavoro di tesi è stato utilizzato un particolare tipo di silicone, ovvero il SILPURAN® 2420 A/B (WACKER srl) [36]. Il prodotto si distingue in una componente A data dal monomero del polimero e una componente B rappresentata dall'agente di reticolazione. È importante ricordare che appena i due componenti entrano in contatto, il processo di reticolazione ha inizio in maniera istantanea: risulta quindi un parametro chiave la velocità di preparazione della soluzione. Alla formulazione viene successivamente aggiunto acetone a diverse concentrazioni (0,4÷1,2 ml) per migliorare la processabilità del silicone tramite tecnica di elettrospinning. La soluzione risultante viene poi messa in agitazione a 4°C, in modo tale da preservare le caratteristiche viscoelastiche del polimero e ritardare la transizione sol/gel. La soluzione è stata successivamente centrifugata a 3000 rpm, ad una temperatura di 10 °C per circa 3 minuti.

In particolare, sono state preparate e testate 4 differenti formulazioni di silicone:

- **Silpuran 1.1_82%**: soluzione contenente una concentrazione in peso del soluto dell'82 wt% con un rapporto polimero/agente di reticolazione di 1,1:1;
- **Silpuran 1.1_93%** : soluzione contenente una concentrazione in peso del soluto del 93 wt% con un rapporto polimero/agente di reticolazione di 1.1:1;
- **Silpuran 10_74%**: soluzione contenente una concentrazione in peso del soluto del 74 wt% con un rapporto polimero/agente di reticolazione di 10:1;
- **Silpuran 1_90%**: soluzione contenente una concentrazione in peso del soluto del 90 wt% con un rapporto polimero/agente di reticolazione di 1:1.

2.2 Preparazione della soluzione a base di Polivinildene-fluoruro (PVDF)

Per la realizzazione della soluzione polimerica a base di PVDF destinata al processo di elettrofilatura, è stato seguito un protocollo precedentemente utilizzato e ottimizzato all'interno del gruppo di

ricerca. In dettaglio, il PVDF è stato solubilizzato ad una concentrazione in peso del 18 wt% in un solvente costituito dal 50% di dimetilsolfossido (DMSO) (Uvasol®, Merck KGaA) e 50% di acetone (Honeywell, Riedel-de Haën™). Il PVDF è stato opportunamente pesato e successivamente solubilizzato all'interno della soluzione contenente entrambi i solventi. La completa dissoluzione è stata ottenuta tramite l'uso di un agitatore magnetico, impostato a 200rpm per 3 ore. Vista l'elevata evaporazione del solvente, sono stati utilizzati dei contenitori chiusi con tappo e ricoperti di parafilm.

2.3 Preparazione nanoparticelle a base di acido poli(lattico-co-glicolico) (nPLGA)

Nanoparticelle a base di acido poli(lattico-co-glicolico) è stata condotta con il fine di realizzare un sistema a rilascio di farmaco. In particolare si osserverà in seguito prove di elettrofilatura il cui obiettivo era quello di cercare di inglobare proprio queste nanoparticelle a base di PLGA all'interno della membrana di PVDF. Le nanoparticelle, in generale, sono state preparate seguendo un protocollo precedentemente utilizzato e ottimizzato dal gruppo di ricerca. La soluzione di partenza è stata preparata a partire da 50 mg di PLGA (PLGA 50:50, Mw 25000; Sigma-Aldrich, Milan, Italy) disciolti in 1 ml di diclorometano (DCM) (DCM; Sigma-Aldrich, Milan, Italy), seguentemente posta in agitazione per circa 1.45h per garantire la corretta solubilizzazione del polimero. Successivamente, 25 mg di ibuprofene (Ibuprofen, Sigma-Aldrich, Milan, Italy) sono stati aggiunti e la soluzione è stata lasciata in agitazione per ulteriori 15 minuti. Per la formazione delle nanoparticelle contenenti ibuprofene, è stato utilizzato un sistema di emulsione "acqua in olio in acqua" (A/O/A). In un primo momento, alla fase oleosa composta da PLGA e ibuprofene, sono stati lentamente aggiunti 5 ml di Polivinil alcol (PVA) al 2%. La prima emulsione è stata creata sonicando, in ghiaccio, per un minuto e impostando una potenza di circa 40W. La seconda emulsione, invece, viene creata gocciolando la prima emulsione all'interno di 10 ml di PVA e poi sonicando il sistema per due minuti con gli stessi parametri utilizzati precedentemente. La soluzione è stata poi rovesciata in una piastra di petri e lasciata sotto cappa fino a completa evaporazione del solvente. Successivamente le particelle sono state risospese e lavate in acqua distillata utilizzando cicli consecutivi di centrifugazione a 8500rpm e ad una temperatura di 4°C. Alla fine del processo le particelle raccolte sono state risospese in 1ml di acqua distillata e successivamente conservate a -20°C.

2.4 Formulazioni ibride a base di PVDF e nPLGA

Per realizzare le soluzioni ibride a base di PVDF e nanoparticelle, si sono state investigate due strategie differenti: la prima strategia ha previsto di sospendere le nanoparticelle direttamente

all'interno della soluzione di PVDF, mentre la seconda ha previsto la realizzazione di due soluzioni differenti di PVDF e nPLGA per essere poi processate mediante tecnica di elettrospinning con configurazione coassiale. Nel primo caso, la sospensione di nPLGA è stata aggiunta gradualmente alla soluzione di PVDF al 18 w%, così come descritto nella sezione 2.2, raggiungendo 2 concentrazioni finali differenti: in un primo caso all'1% e nel secondo caso al 5%. Per la seconda strategia invece, che ha previsto un configurazione coassiale dell'elettrospinning, è stata ottenuta una soluzione di PVDF all'18%, così come descritto nella sezione 2.2, mentre separatamente, è stata realizzata una formulazione a base di nPLGA, utilizzando un protocollo già ottimizzato dal gruppo di ricerca di Basaran, in cui le nanoparticelle all'1% sono state sospese in un solvente costituito dal 75% di acqua, 20% di acido acetico e 5% di DMSO. Il sistema, prima di essere stato processato mediante tecnica dell'elettrospinning, è stato lasciato in agitazione per circa 30 minuti a 300rpm. [66]

2.5 Caratterizzazione reologica delle soluzioni di Silpuran

La reologia è una scienza che mira a studiare le proprietà visco-elastiche di un qualsiasi materiale, sia in forma solida che liquida e la loro variazione a seguito di diversi stimoli e sollecitazioni. Lo strumento che viene utilizzato per questo tipo di analisi prende il nome di reometro rotazionale e prevede l'applicazione dello sforzo e la registrazione della risposta del materiale tramite una geometria di misura collegata a motore e trasduttore. Considerando il tipo di materiale e l'analisi che si vuole effettuare, possono essere utilizzate differenti geometrie di misura:[52]

- **Reometro a cilindri concentrici:** costituiti da un recipiente esterno in cui viene posizionato il materiale, e da un cilindro che, messo in rotazione, imprime una certa sollecitazione sul materiale. Di conseguenza questo genererà una rotazione del recipiente esterno. Dalla misura della velocità angolare del recipiente è possibile determinare la viscosità in quanto proporzionali. Si utilizza per materiali il cui valore di viscosità è basso;
- **Reometro piatto-cono:** il materiale da studiare è disposto tra una superficie piana e un cono dal vertice troncato, assemblati su un asse di simmetria comune. Uno dei due viene messo in rotazione. Si adopera per materiali che raggiungono valori di viscosità elevati;
- **Reometro a piatti paralleli:** è la geometria da preferirsi nei casi in cui il piatto-cono non sia utilizzabile. Il gap (impostabile a scelta dell'operatore) può variare da 300 μm a 3 mm, permettendo il caricamento di campioni molto viscosi e l'analisi di sospensioni con grande particolato (fino a 300 μm). A differenza del cono, in questa geometria, lo sforzo di taglio non

rimane costante su tutto il campione. Nelle nostre analisi utilizzeremo questo tipo di geometria.

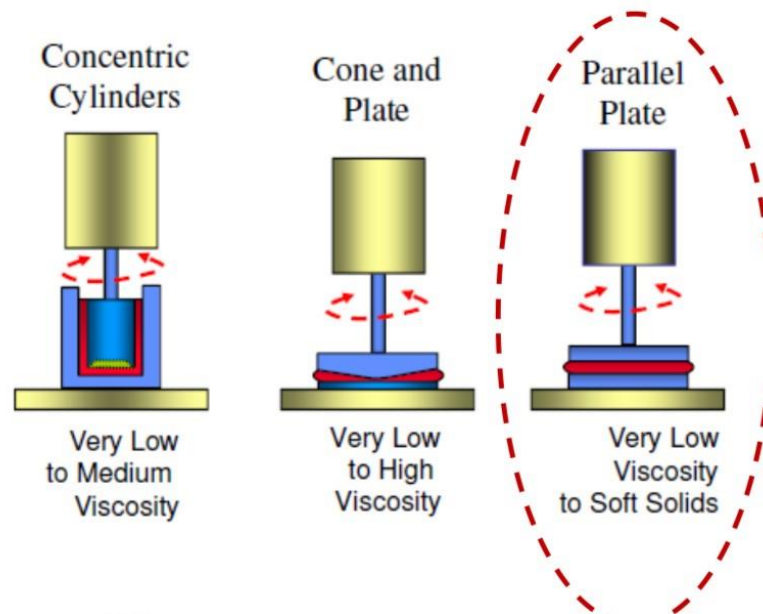


Figura 20: geometrie disponibili per l'utilizzo del reometro.[5]

E' possibile inoltre definire principalmente due tipologie di analisi differenti a seconda del parametro reologico che si vuole monitorare:: **test oscillatori** per la rilevazione del modulo complesso, e test di flusso per la misurazione della viscosità del sistema. I test in regime oscillatorio vengono normalmente eseguiti sia su fluidi che su campioni solidi per monitorare la variazione delle proprietà viscoelastiche del materiale a diverse condizioni di stress e temperature predefinite. In questo caso, la geometria applica uno stress oscillatorio dipendente dall'ampiezza e dalla frequenza selezionate per misurare le due componenti del modulo complesso G : la componente di conservazione (G' , Pa) e di perdita (G'' , Pa). In particolare per questo studio sono stati eseguiti test in regime oscillatorio per il monitoraggio della transizione sol-gel ("time sweep test") del materiale, che permette di studiare la variazione del modulo complesso G al variare del tempo, mantenendo una frequenza costante. In linea generale, qualora $G' > G''$ si può dire che la formulazione si sta comportando come un solido; viceversa, il sistema si comporta come un liquido. **I test di flusso**, invece, sono normalmente eseguiti su fluidi per investigare la variazione della viscosità del materiale modulando il movimento rotazionale della geometria alla temperatura desiderata. In questo ambito, sono state eseguite delle rampe di flusso che hanno permesso di studiare la variazione di viscosità al variare della velocità di taglio.

In dettaglio, per i nostri studi, i test sulle diverse formulazioni sono stati eseguiti utilizzando un reometro a sollecitazione controllata DHR-2 (TA Instruments, Waters) dotato di una geometria a piatti paralleli del diametro di 20 mm e di un sistema Peltier, per controllare costantemente la temperatura del sistema.

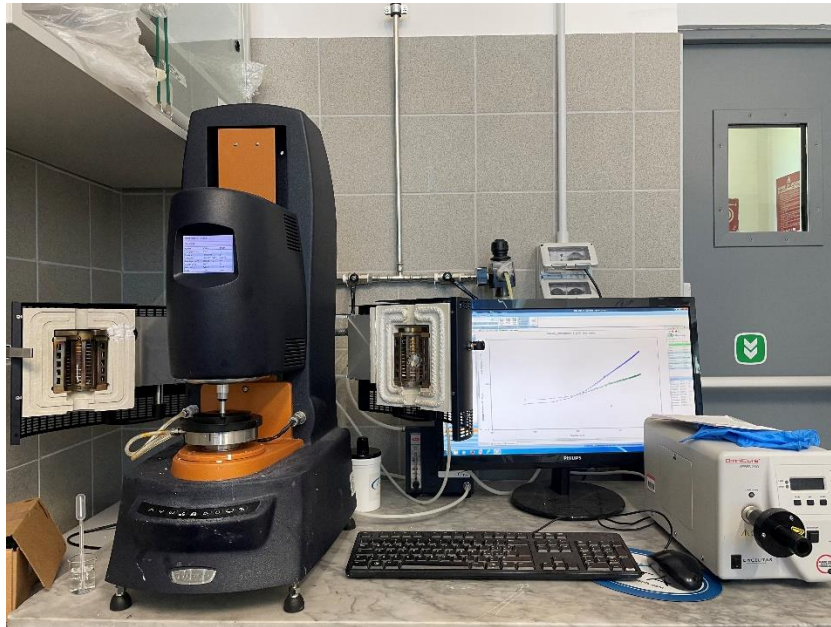


Figura 21: Reometro rotazionale DHR-2 utilizzato per le analisi.

2.5.1 Caratterizzazione reologica delle soluzioni a base di Silpuran per processo di elettrospinning

Le soluzioni precedentemente formulate, come descritto nella sezione 2.1, sono state caratterizzate reologicamente con il fine di ottimizzare i parametri della soluzione per il processo di elettrospinning. La variazione della viscosità delle sospensioni è stata misurata a diverse condizioni di taglio eseguendo test di flusso (“flow ramp”) a 23°C e impostando una distanza tra i due piatti variabile tra 500 μm e 900 μm in base al volume del campione caricato. Le analisi sono state eseguite a 23°C poiché si è ipotizzato che fosse la temperatura di processo durante l’elettrospinning e sono stati impostati valori di velocità di taglio che variavano in un range di 0,1 ÷ 100 1/s.

Inoltre sono stati anche indagati i moduli di conservazione (G') e di perdita (G'') mediante test oscillatori. In particolare, la transizione sol-gel delle formulazioni a 23°C è stata indagata mediante test di scansione temporale (“time sweep”) mantenendo una deformazione costante dell’0,1% e una frequenza di 1 Hz

Il sistema testato per ciascun esperimento è stato riassunto nella Tabella 4.

FLOW RAMP	TIME SWEEP
<ul style="list-style-type: none"> • T= 23 °C; • Tempo di immersione: 60s; • Velocità di taglio: 0,1 ÷ 100 1/s • Durata : 360s; • Punti per decade: 15. 	<ul style="list-style-type: none"> • T=23 °C; • Tempo di immersione: 0 s; • Durata: 3600s; • Oscillazione: 1 Hz; • Deformazione: 0.1%.

Tabella 4: analisi reologiche effettuate sulle formulazioni a base di Silpuran per ottimizzazione dei parametri per l'elettrospinning.

2.5.2 Caratterizzazione reologica delle soluzioni a base di Silpuran per il processo di stampa 3D

Per il processo di stampa 3D, invece, sono state effettuate le stesse analisi reologiche, ma a temperature differenti quali 4°C, 10°C e 65°C, poiché con il processo di stampa si aveva la possibilità di avere un maggiore controllo della temperatura. Le proprietà viscoelastiche dei diversi sistemi sono state studiate mediante test oscillatori a diverse condizioni di stress e temperatura. Le analisi sono state eseguite impostando sempre una distanza tra i due piatti di circa 500 µm e 900 µm. Le transizioni sol-gel sono state studiate mediante test di scansione temporale, mantenendo gli stessi parametri delle prove fatte a 23°C e variando solo la temperatura. Inoltre sono stati anche eseguiti test di mantenimento del picco del flusso ("flow peak hold") a 4°C per simulare il processo di stampa e studiare come il materiale si comportasse se sottoposto a una velocità di taglio costante di 0,1 1/s.

TIME SWEEP	FLOW PEAK HOLD
<ul style="list-style-type: none"> • T=4,10,65 °C; • Tempo di immersione: 0 s; • Durata: 3600s; • Oscillazione: 1 Hz; • Deformazione: 0.1%. 	<ul style="list-style-type: none"> • T= 4°C; • Tempo di immersione :0s; • Velocità di taglio: 0,1 1/s; • Durata: 3600 s; • Intervallo di campionamento : 5 s/pt;

Tabella 5: analisi reologiche effettuate sulle formulazioni a base di Silpuran per ottimizzazione dei parametri per la stampa 3D.

2.6 Test di elettrospinning

Le diverse formulazioni preparate e caratterizzate da un punto di vista reologico sono state successivamente processate tramite elettrospinning con il fine di determinare la formulazione più adeguata al processo ottenendo quindi una membrana nanofibrosa. Poiché lo scopo di questa ricerca consiste nella realizzazione di una membrana fibrosa e altamente porosa potenzialmente in grado di garantire il deflusso dell'umore acquoso e con proprietà antiadesive, l'elettrospinning è risultato essere lo strumento più adeguato alla realizzazione di una struttura simile.

L'elettrofilatura costituisce un sistema innovativo che sfrutta la generazione di forze elettrostatiche, ottenute attraverso l'applicazione di un campo elettrico, al fine di produrre fibre sub-millimetriche e sub-micrometriche mediante l'estrusione di soluzioni polimeriche. Durante il processo, il materiale viene normalmente estruso attraverso aghi metallici, regolando il flusso del materiale mediante pompe a siringa, e successivamente attratto verso un collettore costituito da materiale conduttore. Una volta che la carica superficiale supera la tensione superficiale del materiale, si forma un cono di Taylor e il getto polimerico è attratto verso il collettore. Le condizioni del processo determinano l'evaporazione del solvente e la deposizione di fibre asciutte, la cui dimensione è strettamente dipendente dai parametri impostati e dalle caratteristiche fisico-chimiche del materiale utilizzato. Inoltre vi è la possibilità di adoperare collettori diversi con il fine di ottenere una deposizione di fibre con differenti orientazioni. [54]

Per eseguire i test, nello specifico è stato utilizzato un elettrospinning commerciale modello Fluidnatek LE-50 (Bionicia) costituito dai seguenti componenti (Figura 27):

- **Generatore di tensione** regolabile da 0 kV a 30 kV per la polarizzazione dell'emettitore;
- **Pompa volumetrica a siringa** per un controllo accurato dell'estrusione delle soluzioni. La pompa a disposizione è in grado di essere impostata per raggiungere flussi minimi pari a 0,1 $\mu\text{L/h}$ fino al raggiungimento di 6000 mL/h, con una forza lineare pari a 100-200N;
- **Diverse tipologie di collettore:** 1) collettore piano con piastre in acciaio inossidabile di dimensioni 200 mm x 200 mm, con supporto orientabile verticalmente o orizzontalmente; 2) collettore cilindrico in alluminio anodizzato avente diametro di 100 mm e lunghezza di 200 mm che consente di raggiungere velocità di rotazione da 100 giri/min fino a 2000 giri/min;
- **Interfaccia touch screen** per un controllo immediato dello strumento per la regolazione dei parametri di processo e ambientali;

- **Sistema di controllo di temperatura e umidità** rilevate tramite appositi sensori posti all'interno della camera di filatura;
- **Telecamera analogica** collegata con obiettivo per consentire il monitoraggio ravvicinato del cono di Tylor e del getto, per una corretta ottimizzazione dei parametri di filatura;



Figura 22: Elettrospinning usato per la produzione delle membrane.

2.6.1 Test di elettrospinning per le soluzioni a base di Silpuran

Le diverse soluzioni a base di Silpuran, preparate così come descritto nella sezione 2.1, sono state inserite all'interno di una siringa da 12 mL, posizionata nell'apposito alloggiamento collegato alla pompa volumetrica, ed estruse attraverso un ago da 21 G (diametro interno pari 0.8 mm). Per ogni soluzione sono state eseguite prove preliminari di stabilizzazione del flusso, testando diversi parametri di processo. Nel dettaglio, tensione, flusso di materiale e distanza tra ago e collettore sono stati variati fino a raggiungimento di una condizione di stabilità del getto polimerico, garantendo un'ottimale deposizione di materiale sul collettore. In particolare, ciascun set di parametri è stato testato elettrofilando le soluzioni per 15 minuti su un collettore piano. Le membrane così ottenute sono state poi analizzate mediante microscopia elettronica al fine di definire le loro caratteristiche morfologiche in base ai parametri impostati.

TENSIONE	18÷22 kV
DISTANZA AGO-COLLETTORE	10÷18 cm
FLUSSO	100÷500 μ L/h

Tabella 6: Parametri di processo per l'elettrofilatura delle formulazioni a base di Silpuran.

2.6.2 Test di elettrospinning per le soluzioni a base di PVDF

Le diverse formulazioni a base di PVDF testate sono state preparate come descritto nella Sezione 2.2 e lasciate riposare a temperatura ambiente prima di essere caricate in siringhe da 12 mL.

I test di elettrofilatura sono stati condotti con una tensione e un flusso costanti con valori rispettivamente di 22 kV e di 200 μ L/h, mantenendo una temperatura costante di circa 25 °C e un'umidità del 45%. In particolare, la distanza siringa- collettore è stato l'unico parametro ad essere stato variato. Sono state provate distanze comprese in un intervallo di 10-18 cm, per capire come queste potessero influenzare il diametro delle fibre. Per ogni formulazione, il processo è stato eseguito per 30 minuti, testando diversi parametri del processo e osservando la formazione di un cono di Taylor stabile all'applicazione della tensione selezionata.

Le membrane elettrofilate risultanti sono state rimosse dal collettore e lasciate asciugare durante la notte a temperatura ambiente prima dell'analisi.

TENSIONE	22 kV
DISTANZA AGO-COLLETTORE	10÷18 cm
FLUSSO	200 μ L/h

Tabella 7: Parametri di processo per l'elettrofilatura della soluzione a base di PVDF.

Le prove di elettrospinning per le formulazioni ibride sono state eseguite seguendo due strategie differenti: la prima strategia ha previsto di elettrospinnare, sempre su un collettore piano, un'unica soluzione contenente PVDF e nPLGA, mantenendo gli stessi parametri impostati per le analisi eseguite con solo PVDF. Sono state testate due concentrazioni di nanoparticelle differenti, all'1% e al 5%. I parametri di processo sono riportati in tabella 5.

TENSIONE	22 kV
DISTANZA AGO-COLLETTORE	10÷18 cm
FLUSSO	300÷500 $\mu\text{L}/\text{h}$

Tabella 8: Parametri di processo per l'elettrofilatura della soluzione a base di PVDF con nPLGA.

La seconda strategia, invece, ha previsto di elettrospinnare due soluzioni differenti, con una configurazione coassiale, con il fine di ottenere delle fibre con un cuore interno e un guscio esterno (fibre “core/shell”).

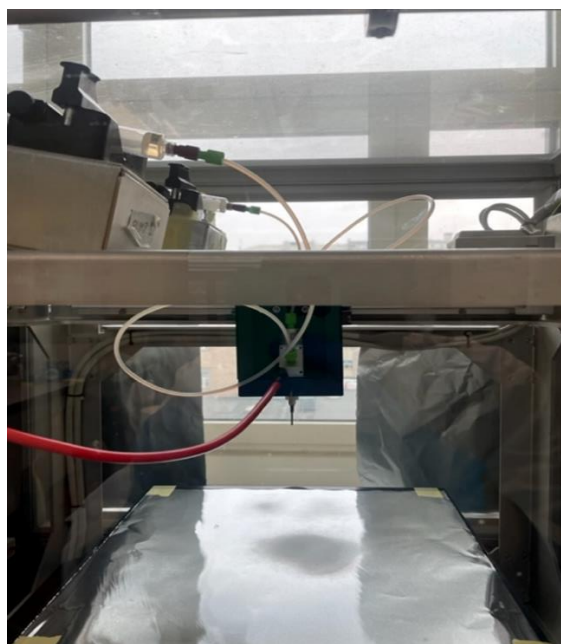


Figura 23: configurazione del processo di elettrospinning coassiale.

In particolare la configurazione era composta da un sistema di erogazione del materiale (figura 28) con la presenza di un ago coassiale, in grado di processare due materiali contemporaneamente: la formulazione a base di nPLGA è stata elettrospinnata all'interno, rappresentando il cuore finale della fibra, mentre la soluzione a base di PVDF è stata elettrospinnata all'esterno con il fine di ottenere il guscio finale della fibra. In questo caso è stato necessario ottimizzare i valori di due flussi differenti affinché si riuscisse a elettrospinnare entrambe le soluzioni. Sono state testate due condizioni

differenti: 1) flusso del cuore maggiore di quello del guscio; 2) flusso del cuore minore di quello del guscio. I parametri di processo utilizzati sono riportati in tabella 6.

TENSIONE	20 kV
DISTANZA AGO-COLLETORE	12÷15 cm
FLUSSO CUORE	1) 800 μ L/h, 2) 500 μ L/h
FLUSSO GUSCIO	1) 600 μ L/h, 2) 1000 μ L/h

Tabella 9: parametri di processo per elettrofilatura coassiale delle soluzioni a base di nPLGA (core) e di PVDF (shell) nelle due diverse condizioni: 1) flusso core maggiore di quello dello shell; 2) flusso core minore di quello dello shell

2.7 Processo di stampa 3D

Per questa ricerca è stata utilizzata il modello di biostampante BIOX di CELLINK, in particolare adoperando una testina ad estrusione pneumatica. La stampante è dotata di tre strumenti che consentono di utilizzare un massimo di tre teste contemporaneamente.



Figura 24: BIOX (Cellink) con montata la testina a temperatura controllata per l'estrusione del materiale.

Il materiale è stato estruso mediante una testa a temperatura controllata e sono stati impostati i seguenti parametri:

- **Pressione:** parametro che regola il flusso di materiale, impostato sulla base delle proprietà viscoelastiche del materiale e regolato in accordo alla velocità di movimento della testina. Durante i test sono state esaminate pressioni comprese tra 30 kPa e 200 kPa;
- Per ottenere filamenti della dimensione desiderata, rispetto al diametro interno dell'ago, è necessario regolare la **velocità del flusso di materiale**. L'intervallo scelto per il test risultava compreso tra 1 mm/s e 5 mm/s;
- **Il diametro dell'ago** influenza notevolmente le dimensioni del filamento stampato. Si consiglia di utilizzare diametri più piccoli per la stampa di strutture con risoluzioni elevate. È importante riconoscere che i diametri più piccoli sottopongono il materiale a livelli di stress e velocità di taglio più elevati. Nel cercare di ottimizzare il processo e determinare il diametro ottimale, sono stati utilizzati aghi metallici di diametri differenti: 0,150mm (30G), 0,200mm (27G), 0,250mm (25G) e 410mm (22G);
- **Riempimento dello strato (infill):** consiste nella percentuale di riempimento per ogni livello e consente di definire il percorso seguito dalla testa. La densità di riempimento delle strutture stampate variava dal 10% al 50%. Sono state valutate anche le condizioni estreme di 0% (stampa perimetrale);
- **Spessore dello strato (z-step):** cruciale per l'adesione tra gli strati successivi e decisivo per la fedeltà della stampa. In genere, viene utilizzato un valore del passo z compreso tra il 60 e il 70% del diametro interno dell'ago poiché determina una buona adesione;
- **Temperatura** (testa e piastra di deposizione): a seconda del materiale utilizzato è possibile scegliere tra valori compresi tra 0°C e 65°C. In particolare, la temperatura della testina di stampa è stata impostata a 4°C, mentre quella del piatto a 65°C.

PRESSIONE	150÷200 kPa
VELOCITA'	2÷4 mm/s
DIAMETRO AGO	25G (0,250mm)
INFILL	25%
Z STEP	70%
TEMPERATURA TESTINA	4°C
TEMPERATURA PIATTO	65°C

Tabella 10: parametri di stampa ottimizzati.

Le strutture sono state stampate sulla base di un modello 3D digitale di scaffold quadrato (10x10mm), con spessore variabile tra 0,3mm e 1mm. Il modello è stato selezionato dai file STL della libreria fornita dal produttore della biostampante. Lo schema interno a griglia è stato stampato con una densità di riempimento variabile tra il 10% e il 50%.

2.8 Analisi morfologiche tramite microscopia a scansione elettronica (SEM)

Il microscopio elettronico a scansione è uno strumento in grado di visualizzare dettagli molto piccoli nell'ordine della micro e nano scala. A differenza dei microscopi ottici tradizionali, che utilizzano luce visibile, il SEM utilizza un fascio di elettroni per creare immagini delle superfici dei campioni. Lo strumento presenta una sorgente ad alta energia, chiamata cannone elettronico, all'interno della quale è presente un filamento metallico (es. tungsteno) che portato ad alte temperature, per effetto termoionico, è in grado di emettere un fascio di elettroni. Quest'ultimi vengono prima accelerati mediante una differenza di potenziale e poi successivamente, attraverso un sistema di lenti elettromagnetiche, direzionati sulla superficie del campione. Quando gli elettroni colpiscono la superficie i fenomeni di diffusione del raggio incidente (scattering) possono avere una natura elastica e anelastica, portando alla formazione di diverse tipologie di segnali, che vengono rilevati da appositi rivelatori e utilizzati per creare l'immagine o ottenere informazioni circa la composizione del campione [67]:

- **Elettroni secondari:** generati a seguito dell'interazione anelastica tra il fascio e il campione. Tale interazione causa la perdita di parte dell'energia, pertanto soltanto gli elettroni secondari prodotti dall'incidenza degli elettroni primari sulla superficie sono in grado di emergere e raggiungere il rivelatore, fornendo informazioni topografiche;
- **Elettroni retrodiffusi:** sono elettroni provenienti dagli strati più interni del campione che mantengono l'energia ma vengono deviati dalla loro traiettoria originale;

- **Raggi X:** sono contraddistinti da un'energia caratteristica e permettono di identificare gli elementi che costituiscono il campione.

I segnali raccolti vengono convertiti in un'immagine visibile che può essere visualizzata su uno schermo di monitoraggio. L'operatore ha la possibilità di regolare la luminosità, il contrasto e altri parametri per ottenere un'immagine chiara e dettagliata.



Figura 25: Strumento del SEM usato per la caratterizzazione delle membrane

In particolare, per questa ricerca, è stato adoperato il microscopio elettronico a scansione Phenom XL (Phenom-World B.V., Paesi Bassi) acquisendo le immagini a diversi ingrandimenti (300x, 500x, 1000x, 2500x, 5000x).

La preparazione dei campioni per la caratterizzazione morfologica è stata effettuata prelevando dei campioni di dimensioni ridotte da ciascuna membrana (con annesso supporto in alluminio). I campioni così ottenuti sono stati fissati alla superficie dello stub tramite l'applicazione di un nastro biadesivo in carbonio, e in seguito metallizzati, creando un rivestimento in platino pari a 7 nm, usando una macchina Cressington Sputter Coater 180, per permettere un'ottimale visualizzazione delle immagini. A seguito della preparazione, i campioni sono stati inseriti nella camera porta campione del microscopio a scansione elettronica SEM Phenom XL per essere poi analizzati.

2.9 Spettroscopia infrarossa FTIR-ATR

Le tecniche spettroscopiche forniscono, in generale, informazioni chimiche dettagliate sul singolo materiale e sulle interazioni che intercorrono all'interno del materiale stesso. La spettroscopia infrarossa, così come dice il nome, in particolare risulta essere una tecnica spettroscopica di assorbimento che lavora all'interno del range delle radiazioni infrarosse (IR). L'IR principalmente che si utilizza per le nostre caratterizzazioni copre lunghezze d'onda comprese tra 4000 e 600 cm^{-1} . In generale, quando un fotone viene assorbito da una molecola, questa passa dal suo stato vibrazionale fondamentale ad uno stato vibrazionale eccitato. Ciò che lo strumento valuta è quanta luce incidente è stata assorbita dalla molecola al variare della lunghezza d'onda della radiazione. In un tipico spettro infrarosso, in ascissa si trova una scala di frequenze in numero d'onda e in ordinata la percentuale di trasmittanza (picchi verso il basso), o in assorbanza (picchi verso l'alto). Le transizioni vibrazionali che possono manifestarsi sono classificabili in due categorie: 1) **stretching**, dovute a fenomeni di stiramento ritmico che avvengono lungo l'asse di legame e, a seconda di come questo avviene, possono essere simmetriche o non simmetriche; 2) **bending**, dovute a variazioni nell'angolo di legame o a movimenti di un gruppo di atomi rispetto al resto della molecola [68]. Negli spettri infrarossi esiste una zona definita come impronta digitale (1500-500 cm^{-1}), che comprende un set di bande dell'IR uniche e specifiche per ogni componente. Risulterà essere semplice poi risalire al tipo di legame presente, poiché legami chimici differenti vanno incontro a vibrazioni differenti, caratterizzate da intensità differenti in funzione del numero d'onda. Nel caso della spettroscopia FTIR-ATR, le radiazioni IR non attraversano il campione, ma lo penetrano solo superficialmente per una profondità che varia tra 0.5 e 5 μm . nello specifico, si ha un raggio IR incidente originato da una sorgente e convogliato all'interno di un cristallo ad alto indice di rifrazione, all'interno del quale il raggio inizia ad essere rifratto più volte e, ogni volta che questo accade, esso può interagire con la superficie del campione manifestando eventuali fenomeni di assorbimento in accordo con la natura del campione. Dopo che sono avvenuti più fenomeni di rifrazione, il raggio IR esce dal cristallo e va verso il detector. È importante specificare che si ha bisogno di un cristallo che induca la rifrazione del raggio in modo che questo interagisca più volte con il campione, manifestando fenomeni di assorbimento tali da essere misurabili.

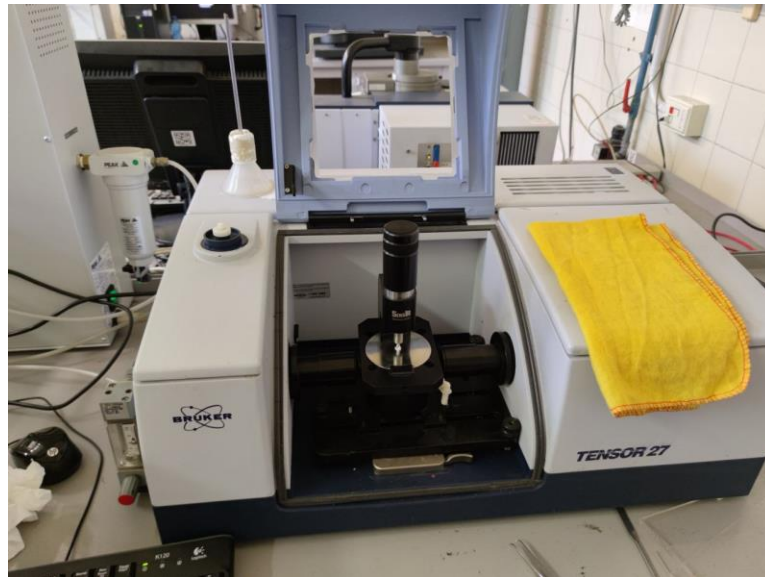


Figura 26: Strumento FTIR modello Bruker Tensor 27 utilizzato per la caratterizzazione delle membrane di PVDF.

In particolare, per le caratterizzazioni chimico/fisiche di questa ricerca, è stato utilizzato lo spettrometro Bruker Tensor 27. Lo strumento è stato utilizzato per analizzare le membrane in PVDF e indagare la presenza o meno di nPLGA all'interno, poiché non riscontrabili né con il SEM né con il FESEM. La caratterizzazione è stata effettuata sui campioni di membrana in PVDF e sulle membrane prodotte dalla combinazione del PVDF con nPLGA con le diverse strategie testate. I parametri di processo impostati sono riportati in tabella 8. Le analisi sono state fatte in triplicato, in modo tale da fare poi la media e graficare il risultato.

AVANZAMENTO	SPETTRO ATR
IMPOSTANZIONE APERTURA	1mm
RISOLUZIONE	2 cm ⁻¹
INTERVALLO IR	4000-6000 cm ⁻¹
NUMERO SCANSIONI	64

Tabella 11: parametri di processo impostati per l'analisi FTIR-ATR.

3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Nell'ambito dello sviluppo di dispositivi mirati al trattamento del glaucoma, questo lavoro di tesi mira alla realizzazione di una membrana fibrosa e altamente porosa potenzialmente in grado di garantire il deflusso dell'umore acqueo e con proprietà antiadesive, in modo da impedire l'adesione dei fibroblasti e quindi la conseguente formazione di capsula fibrotica sulla superficie del dispositivo. Tutte le prove condotte sono state fondamentali per lo sviluppo del materiale finale e per l'ottimizzazione del processo di produzione della membrana in modo da garantire caratteristiche adeguate alla potenziale futura applicazione come possibile dispositivo appartenente alla classe dei dispositivi per chirurgia mini-invasiva per il glaucoma MIGS. In particolare in questo capitolo sono stati presentati e discussi i risultati ottenuti per la realizzazione di una membrana fibrosa, altamente porosa e con proprietà antiadesive.

In dettaglio, il primo materiale investigato è stato un particolare tipo di silicone medico, ovvero il Silpuran. Rappresenta essere un biomateriale già utilizzato e studiato in ambito ortopedico, con ottime proprietà antiadesive. La formulazione a base di silicone si caratterizza per la presenza di due componenti, il monomero e l'agente reticolante, che, se posti a contatto, inducono il processo di reticolazione. Sulla base di queste considerazioni, quattro formulazioni di silicone sono state studiate, variando il rapporto monomero-agente reticolante e concentrazione di soluto all'interno della soluzione. Le quattro formulazioni sono state successivamente studiate da un punto di vista reologico, con il fine di ottimizzare i parametri per il processo di elettrospinning. In particolare sono state effettuate delle analisi in regime di flusso per ottimizzare i valori di viscosità delle soluzioni, e delle analisi in regime oscillatorio, per investigare le cinetiche di reticolazione. Valutate le proprietà viscoelastiche del materiale, le quattro soluzioni sono state elettrospinnate e successivamente i risultati ottenuti sono stati analizzati mediante analisi SEM.

Successivamente al processo di elettrospinning, è stato investigato il processo di stampa 3D come possibile metodo di lavorazione del silicone. Per l'ottimizzazione dei parametri del processo di stampa, analisi reologiche in regime oscillatorio sono state effettuate a diverse temperature, per investigare come queste potessero influenzare le cinetiche di reticolazione

In parallelo, è stato studiato il polivinilidene fluoruro (PVDF) come possibile materiale alternativo per la realizzazione di una membrana porosa mediante tecnica dell'elettrospinning. Il materiale è stato scelto proprio per le sue ottime proprietà di spinnabilità e per le sue proprietà antiadesive. In seguito a studi effettuati per l'ottimizzazione dei parametri della soluzione di PVDF, si è proceduto con il

processo di elettrospinning e la successiva valutazione, mediante analisi SEM, delle membrane ottenute. Infine, nella fase finale, è stata valutata la possibilità di realizzare delle formulazioni ibride, per la potenziale realizzazione di un sistema a rilascio di farmaco. In questo contesto, delle nanoparticelle a base di acido poli(lattico-co-glicolico) (nPLGA) sono state realizzate e successivamente caratterizzate da un punto di vista morfologico. Sulla base di queste considerazioni, due strategie differenti sono state investigate. Nel primo caso, si è deciso di sospendere le nanoparticelle direttamente all'interno della soluzione di PVDF ed elettrospinnare un'unica soluzione; la seconda strategia, invece, ha previsto la presenza di due soluzioni distinte, una in cui sono state sospese le nanoparticelle e un'altra a base di PVDF. Le due soluzioni sono state elettrospinnate attraverso una configurazione coassiale.

3.1 Sviluppo e caratterizzazione reologica delle soluzioni di Silpuran per il processo di elettrospinning

Il silicone rappresenta un'opzione versatile e affidabile come biomateriale per dispositivi medici, offrendo una serie di vantaggi unici che lo rendono particolarmente interessante in campo biomedico. In questo progetto di tesi, si è scelto di utilizzare un tipo specifico di silicone medico dotato di proprietà antiadesive. La scelta del silicone come biomateriale deriva dalla sua eccezionale biocompatibilità, che minimizza le reazioni avverse nel tessuto circostante e favorisce una migliore interazione con l'organismo umano. La sua struttura chimica inerte e la capacità di stabilizzarsi in varie condizioni ambientali lo rendono ideale per dispositivi medici, riducendo il rischio di deterioramento o reazioni indesiderate nel corpo. Inoltre, il silicone presenta delle proprietà antiadesive in grado di limitare l'adesione di cellule, batteri o altri agenti patogeni sulla sua superficie. Questa caratteristica è cruciale per ridurre il rischio di infezioni associate ai dispositivi medici e per mantenere le prestazioni nel tempo, minimizzando il bisogno di interventi ripetuti.

L'interesse nell'utilizzo del silicone medico con proprietà antiadesive deriva dalla necessità di sviluppare un dispositivo medico appartenente alla classe dei dispositivi della chirurgia mini invasiva del glaucoma (MIGS) in grado di evitare l'adesione dei fibroblasti con conseguente formazione di capsula fibrotica. Questo tipo di materiale rappresenta un contributo significativo nel migliorare l'affidabilità e la sicurezza dei dispositivi medici, riducendo le complicazioni per i pazienti e promuovendo una migliore qualità di vita.

Sulla base di queste considerazioni, Il Silpuran è stato inizialmente valutato come potenziale materiale per l'obiettivo di questa tesi, ovvero la realizzazione di una membrana antiadesiva, fibrosa

e porosa, come potenziale trattamento del glaucoma. Il Silpuran (Wacker) è una linea di siliconi medici, utilizzata già in ambito ortopedico, che sfrutta un processo di reticolazione per creare una rete tridimensionale. La reazione tra il monomero del silicone e l'agente di reticolazione genera dei legami chimici tra unità di monomero differenti, fino alla formazione di una struttura tridimensionale che conferisce al materiale la sua resistenza meccanica e le proprietà desiderate.

La variazione dei rapporti tra monomero e agente di reticolazione e la quantità di solvente utilizzata possono influenzare le cinetiche di reticolazione. Per tale motivo si è deciso di realizzare quattro formulazioni a base di Silpuran differenti, variando rapporti e concentrazioni delle soluzioni, per investigare come questi parametri potessero influenzare il processo di reticolazione. Sulla base di queste considerazioni, per la realizzazione delle formulazioni, sono stati presi in considerazione gli studi di Haerst e di Shanshan Bian. Nel primo caso, si è deciso di mantenere un rapporto monomero-agente di reticolazione di 1,1:1 e variare la concentrazione di solvente; Nel secondo caso, invece, è stato scelto un rapporto monomero-agente di reticolazione di 10:1. Sulla base di queste informazioni, le quattro formulazioni realizzate, così come descritto nella sezione 2.1, sono state caratterizzate reologicamente con il fine di ottimizzare i parametri della soluzione per il processo di elettrospinning.

Le proprietà reologiche di un materiale sono considerate importanti fattori fisico-chimici capaci di influenzare la sua processabilità tramite tecniche di elettrofilatura. In questo contesto, è necessaria una comprensione dei parametri reologici delle soluzioni utilizzate per la formazione di nanofibre. Le analisi reologiche permettono infatti di ottenere informazioni sul comportamento dei diversi sistemi in risposta all'applicazione di sollecitazioni e deformazioni, utili nella fase di impostazione del processo di fabbricazione specifico. La viscosità e il modulo complesso G^* sono stati i parametri investigati per determinare le proprietà viscoelastiche delle formulazioni. Nello specifico per questo lavoro sono state eseguite delle rampe di flusso ad una temperatura di 23°C (temperatura utilizzata durante il processo di elettrospinning) per studiare la variazione della viscosità al variare della velocità di taglio ($0,1 \div 100 \text{ s}^{-1}$). Le analisi in regime di flusso sono risultate ottimali per investigare la natura delle formulazioni e comprendere se la loro viscosità risultasse ottimale per il processo di elettrospinning. La figura 27 riporta le curve di flusso ottenute dalla media di due prove eseguite su ogni formulazione di silicone.

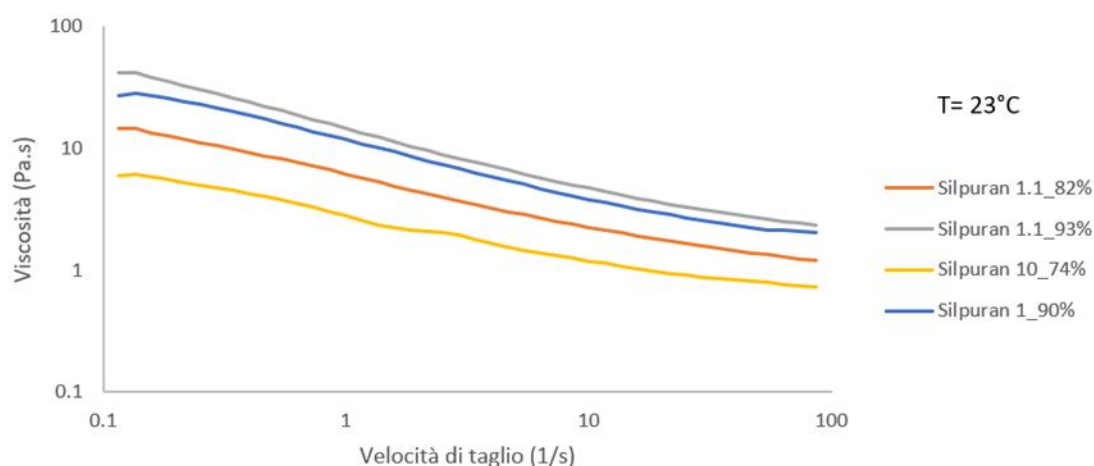


Figura 27: Rampe di flusso a confronto delle quattro formulazioni di Silpuran a 23°C.

Come mostrato nel grafico, tutte le soluzioni hanno mostrato un comportamento di pseudo-plasticità (shear thinning), evidenziando valori di viscosità decrescenti all'aumentare dei valori di velocità di taglio. È stato notato che il rapporto monomero-agente di reticolazione è il parametro che influenza di più il valore di viscosità. Una concentrazione di monomero più elevata rispetto all'agente reticolante comporta un valore di viscosità della formulazione inferiore. Per tale motivo, la formulazione "Silpuran 10_74%" presenta valori di viscosità inferiori rispetto alle altre tre formulazioni, poiché è l'unica con un rapporto monomero-agente di reticolazione di 10:1. A parità, invece, di rapporto monomero-agente di reticolazione, così come nel caso delle altre formulazioni di silicone, è la concentrazione di solvente a determinare una variazione della viscosità. In particolare, soluzioni contenenti maggior volume di solvente come la formulazione "Silpuran 1.1_82%", presentano valori di viscosità inferiori rispetto alle soluzioni "Silpuran 1.1_93%" e "Silpuran 1_90%" che invece presentano concentrazioni di solvente minori.

I valori di viscosità ottenuti, mostrati in tabella 12, risultano comunque essere in un range ottimale per la lavorazione tramite tecnica di electrospinning.

	VISCOSITA' (0,1 s ⁻¹)	VISCOSITA' (100 s ⁻¹)
SILPURAN 1.1_82%	14,4 Pa.s	1,2 Pa.s
SILPURAN 1.1_93%	41,2 Pa.s	2,3 Pa.s
SILPURAN 10_74%	5,9 Pa.s	0,7 Pa.s
SILPURAN 1_90%	26,9 Pa.s	2,0 Pa.s

Tabella 12: valori massimi e minimi di viscosità delle quattro formulazioni a 23°C.

La transizione sol/gel è stato un altro parametro investigato per determinare le proprietà viscoelastiche del materiale. In particolare le analisi in regime oscillatorio sono risultate fondamentali per investigare le cinetiche di reticolazione del silicone. Dal momento in cui il monomero (componente A) è stato posto a contatto con l'agente di reticolazione (componente B), il processo di reticolazione ha avuto inizio, comportando la transizione da un sistema fluido a bassa viscosità ad un gel ad alta viscosità, difficile poi da lavorare tramite elettrospinning. Pertanto delle analisi in regime oscillatorio sono state condotte, a una temperatura di 23°C, con frequenza costante di 1Hz e deformazione percentuale all'1%, con il fine di individuare le cinetiche di reticolazione del polimero, fondamentali per la sua processabilità mediante elettrospinning. In generale le curve che si ottengono riportano in ordinata la componente elastica G' e viscosa G'' del modulo complesso del materiale. Qualora $G'' > G'$ si può dire che la formulazione permane in una condizione di sistema liquido ("sol"), facile da processare; viceversa, il sistema si trova in una condizione di sistema con comportamento solido ("gel"), difficile da processare. La figura 28 riporta le curve ottenute in regime oscillatorio per ogni formulazione, ricavate dalla media di due grafici per ogni campione.

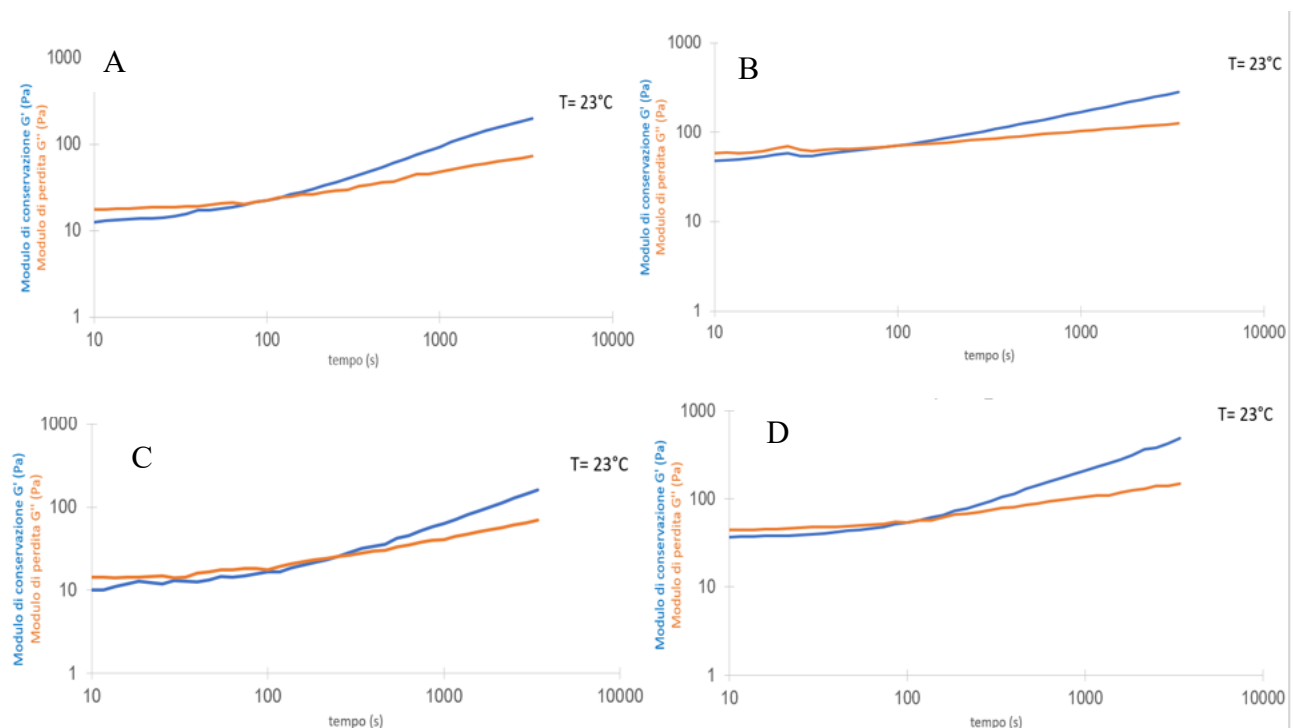


Figura 28: Analisi in regime oscillatorio delle quattro formulazioni di Silpuran a 23°C: (A) SILPURAN 1.1_82%, (B) SILPURAN 1.1_93%, (C) SILPURAN 10_74%, (D) SILPURAN 1_90%.

Dalle curve è stato possibile ricavare il tempo necessario a raggiungere il punto di intersezione delle curve di G' e G'' , determinando la transizione da sistema liquido a sistema viscoso. Dai grafici si evince che la cinetica di reticolazione del polimero è influenzata principalmente dal rapporto monomero-agente di reticolazione. In particolare, una minore concentrazione di agente di reticolazione, come nel caso della formulazione “Silpuran 10_74%”, in cui si ha un rapporto 10:1, comporta una cinetica più lenta rispetto alle altre formulazioni. A parità di agente reticolante, invece, è la concentrazione di solvente a influire maggiormente. Una soluzione più concentrata, come la formulazione “Silpuran 1.1_93%” o “Silpuran 1_90%”, presenta cinetiche di reticolazione più rapide rispetto invece a una soluzione più diluita, come nel caso della formulazione “Silpuran 1.1_82%”. Le tempistiche di reticolazione, con rispettivi valori di G' e G'' delle formulazioni al momento della transizione sol/gel, sono riportati in tabella 13.

	TEMPO TRANSIZIONE SOL/GEL (s)	MODULO DI CONSERVAZIONE G' (Pa)	MODULO DI PERDITA G'' (Pa)
SILPURAN 1.1_82%	215,4	33,8	28,5
SILPURAN 1.1_93%	184,7	68,5	76,9
SILPURAN 10_74%	341,9	33,1	28,3
SILPURAN 1_90%	184,3	72,4	66,4

Tabella 13 : tempistiche di transizione sol/gel e relativi moduli G' e G'' delle quattro formulazioni di silpuran a 23°C

Successivamente, studi per la conservazione delle formulazioni sono stati effettuati per comprendere meglio il processo di reticolazione del polimero a diverse temperature. Pertanto le quattro formulazioni sopra citate sono state realizzate e poi mantenute in frigo a 4°C per circa 4 ore. Successivamente, su tali soluzioni, sono state effettuate delle rampe di flusso per capire come fosse variata la viscosità nel tempo per ottenere informazioni sul processo di reticolazione e sulla conservazione della soluzione.

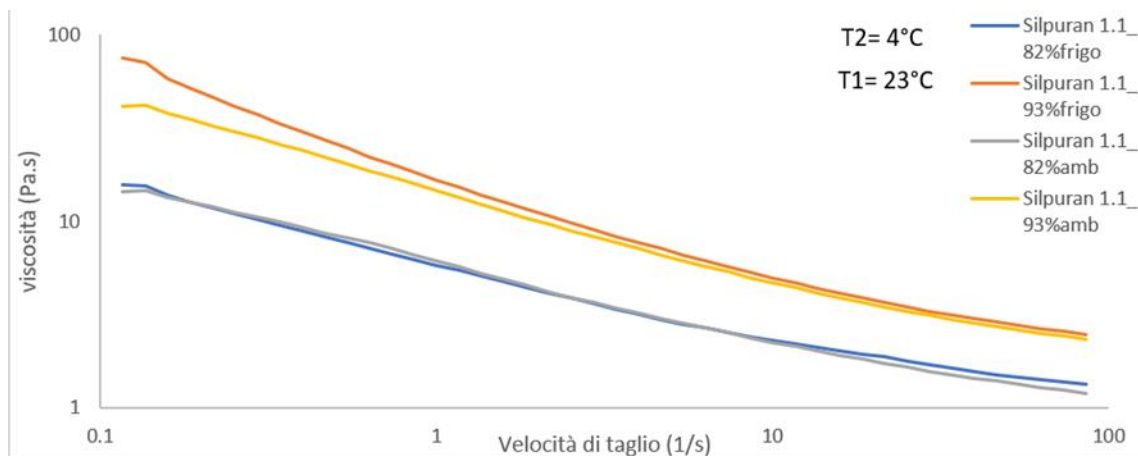


Figura 29: confronto rampe di flusso delle formulazioni “Silpuran 1.1_82%” e “Silpuran 1.1_93%” prima e dopo la loro permanenza in frigo a 4°C.

Come si può notare dal grafico in Figura 29, le basse temperature inibiscono il processo di reticolazione, rallentandone quindi le cinetiche. In entrambi i casi, i valori di viscosità tra le rispettive formulazioni appena preparate e conservate a 4 °C per circa 4 ore, risultano invariati. Da ciò si può desumere che agire sulla temperatura potrebbe essere un metodo valido per il mantenimento delle proprietà viscoelastiche del materiale, utili sia per la processabilità della soluzione che per la sua conservazione a lungo termine. In particolare la formulazione “Silpuran 1.1_93%”, essendo più concentrata, presenta valori di viscosità maggiori rispetto alla formulazione “Silpuran 1.1_82%”. I valori di viscosità delle analisi effettuate sono riportati in tabella 14.

	VISCOSITA' (0.1 s⁻¹)	VISCOSITA' (100 s⁻¹)
SILPURAN 1.1_82% 4 °C	15.7 Pa.s	1.3 Pa.s
SILPURAN 1.1_82% Tamb.	14.4 Pa.s	1.2 Pa.s
SILPURAN 1.1_93% 4 °C	75.2 Pa.s	2.4 Pa.s
SILPURAN 1.1_93% Tamb	52.4 Pa.s	2.3 Pa.s

Tabella 14: valori di viscosità a confronto delle due formulazioni di Silpuran a temperature ambiente e a temperatura di 4°C.

3.2 Sviluppo e caratterizzazione di membrane elettrofilate a base di Silpuran

Sulla base dei risultati ottenuti dalle prove reologiche, le quattro soluzioni precedentemente descritte sono state utilizzate per eseguire dei test tramite elettrospinning con l'obiettivo di ottimizzare i parametri di processo per ottenere delle membrane nanofibrose. L'elettrofilatura costituisce un sistema innovativo che sfrutta la generazione di forze elettrostatiche, ottenute attraverso

l'applicazione di un campo elettrico, al fine di produrre fibre sub-millimetriche e sub-micrometriche mediante l'estrusione di soluzioni polimeriche. Durante il processo, il materiale viene normalmente estruso attraverso aghi metallici e successivamente attratto verso un collettore costituito da materiale conduttore. Una volta che la carica superficiale supera la tensione superficiale del materiale, si forma un cono di Taylor e il getto polimerico è attratto verso il collettore. Le condizioni del processo determinano l'evaporazione del solvente e la deposizione di fibre asciutte, la cui dimensione è strettamente dipendente dai parametri impostati e dalle caratteristiche fisico-chimiche del materiale utilizzato. Accanto alla scelta del solvente e della sua concentrazione, le condizioni di processo che maggiormente hanno influito sulla morfologia e sulle caratteristiche finali della membrana risultano essere il flusso di materiale, la tensione e la distanza siringa/collettore. Durante i test preliminari di ottimizzazione del processo, ogni set di parametri è stato testato elettrofilando le differenti formulazioni a base di silicone per 15 minuti, utilizzando un collettore piano ricoperto con un foglio di alluminio come supporto.

Per ciascuna formulazione, sono stati impostati parametri differenti, per capire come questi potessero influenzare la morfologia delle fibre. Con elettrospinning commerciale modello Fluidnatek LE-50 (Bionicia) a disposizione non è stato possibile controllare i parametri in camera quali temperatura e umidità. Pertanto tutti i parametri di processo impostati sono stati variati anche in funzione delle condizioni in camera, con il fine di ottenere un getto stabile.

In particolare, durante le prove, i parametri sono stati impostati con l'obiettivo di stabilizzare il getto per diverse distanze ago-collettore e alle diverse temperature e umidità di esercizio:

- Flussi di materiale: 105÷500 $\mu\text{m}/\text{h}$;
- Distanze siringa-collettore : 8÷18 cm;
- Voltaggi: 17÷23 kV;
- Temperature in camera di 28÷35 °C;
- Umidità relative in camera di 36÷42 %.

Le membrane sono state poi raccolte e analizzate mediante microscopia a scansione elettronica (SEM) al fine di definire le loro caratteristiche morfologiche e rilevare quindi la potenziale formazione di fibre in base ai parametri impostati.

Dai primi risultati, non è stato possibile ottenere nessuna formazione di fibre. Come si evince dalla figura 30, che riporta una prova per ogni formulazione di silicone testata, il risultato è il medesimo, ovvero deposizione di materiale sul foglio di alluminio ma impossibilità di mantenere una struttura

fibrosa. Condizioni in camera differenti sono state testate, mantenendo invece i parametri di processo costanti, per capire se una temperatura e un'umidità elevata potessero influenzare la non riuscita del processo. Immagini SEM ottenute successivamente hanno mostrato comunque il medesimo risultato.

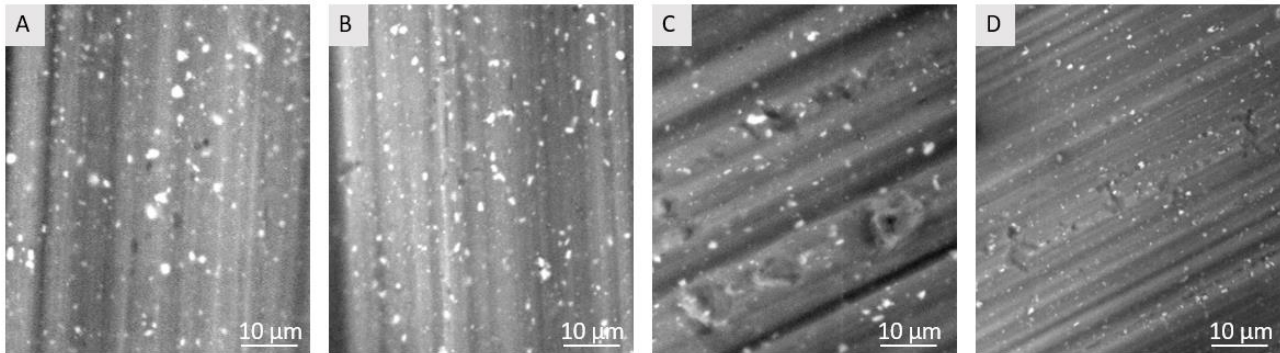


Figura 30: Immagini SEM delle 4 formulazioni di silicone: (A) Silpuran 1.1_ ; (B) Silpuran 1.1_ ; (C) Silpuran 10_ ; (D) Silpuran 1_

Durante il processo di elettrospinning, la deposizione di materiale è avvenuta con successo, poiché l'alone di materiale sul foglio di alluminio è stato evidente e facile da osservare. Immagini al SEM, però, non hanno portato a ottimi risultati, poiché non è stato possibile individuare la presenza di fibre. Ciò che può essere successo è che il silicone depositandosi, non abbia avuto quella fonte di calore immediata per garantire una corretta reticolazione del materiale e conseguente formazioni di una struttura fibrosa stabile e omogenea, bensì le fibre depositate si sono fuse tra di loro, collassando e determinando la formazione di un film sottile di materiale. Studi in letteratura hanno dimostrato che di per sé risulta essere complicato la formazione di fibre con soluzioni a base di silicone [69]. L'unico studio in letteratura che ha riportato una corretta formazione di fibre, prevedeva l'utilizzo di un collettore riscaldato [65]. Lo studio di Haerst, in particolare, ha dimostrato la possibilità di processare un silicone medico vulcanizzante a temperatura ambiente, con il fine di ottenere una matrice fibrosa, mediante un processo di elettrofilatura. L'obiettivo del suo studio è stato lo sviluppo di una nuova configurazione per l'elettrofilatura del silicone vulcanizzante a temperatura ambiente (RTV), che può essere reticolato direttamente durante il processo di elettrofilatura, grazie alla presenza di un collettore riscaldato a 100°C. Il focus del lavoro presentato è stato sulla fattibilità e sulle proprietà superficiali delle membrane filate ottenute e sull'adsorbimento proteico nelle applicazioni biologiche.

Questo ha fatto ipotizzare che il silicone necessiti di un'immediata fonte di calore per garantire una rapida reticolazione della soluzione, comportando così una buona morfologia e impedendo che le fibre che si depositano sul foglio di alluminio possano fondersi e collassare. In assenza di un collettore

riscaldato, la soluzione è stata elettrospinnata sul foglio di alluminio, con gli stessi parametri di processo impostati per le prove precedenti e successivamente posta in stufa a 80°C per un processo di post reticolazione, per una notte intera. A seguito del trattamento termico i campioni sono stati raccolti e analizzati. Le immagini SEM sono risultate analoghe a quelle presentate in Figura 30, suggerendo quindi che una fonte di calore, fornita al silicone in seguito al processo di elettrospinning, non sia stata sufficiente per garantire una corretta reticolazione del polimero ed evitare quindi la fusione delle fibre.

Inoltre, studi in letteratura hanno dimostrato che l'utilizzo del silicone nella tecnica dell'elettrospinning risulti promettente nella realizzazione di film sottili da utilizzare poi come rivestimento e non come membrane vere e proprie. Lo studio di Jeong Chan Lee , per esempio, ha portato alla realizzazione di una struttura multi strato a base di policaprolattone (PCL) rivestita superficialmente con un film a base di silicone medico. Caratterizzazioni effettuate successivamente su questo sistema, hanno permesso di dimostrare come effettivamente vi era una buona adesione tra fibre di PCL e film di silicone. La scelta di avere del silicone in superficie era dettata principalmente per le sue proprietà viscoelastiche, determinando delle proprietà fisico-meccaniche modulabili ma soprattutto per la sua ottima biocompatibilità e bio-inerzia a contatto con i fluidi biologici. [70]

Non riuscendo ad ottenere il mantenimento di una struttura fibrosa, metodi alternativi sono stati investigati per processare il silicone, con il fine di ottenere una membrana porosa e con proprietà antiadesive, in grado, potenzialmente, di far defluire l'umore acqueo, ristabilendo così valori fisiologici di pressioni intraoculare

3.3 Caratterizzazione reologica delle soluzioni a base di Silpuran per il processo di stampa 3D

Sulla base dei risultati ottenuti tramite elettrospinning, in una successiva fase dello studio si è investigato il potenziale sviluppo di strutture porose in silicone sfruttando la tecnica di stampa 3D ad estrusione. Nello specifico, sulla base delle proprietà fisico-chimiche del silicone si è pensato di impostare un processo che prevedesse l'uso di una testina ad estrusione pneumatica e controllata in temperatura per l'estrusione del materiale, e il riscaldamento del piatto di stampa per consentire una velocizzazione del processo di reticolazione del silicone.

Tre differenti temperature sono state investigate per ottimizzare il processo di stampa: basse temperature, quali 4 e 10 °C sono state studiate per comprendere se a basse temperature le proprietà

viscoelastiche del silicone fossero in grado di mantenersi per un tempo maggiore; elevate temperature, come 65°C, sono state studiate, invece, per capire se depositando il silicone sul piatto di stampa, precedentemente riscaldato, fosse in grado di reticolare istantaneamente, garantendo elevata fedeltà di stampa.

In particolare, è stato deciso di non procedere con la formulazione “Silpuran 10_74%” poiché dalle analisi reologiche effettuate a 23°C è stato notato che un rapporto polimero-agente di reticolazione di 10:1 non ha portato a differenze apprezzabili per quanto riguarda le cinetiche di reticolazione. Inoltre, la scheda tecnica del Silpuran, rilasciata dalla Wacker, riporta caratterizzazioni del materiale effettuate con un rapporto monomero-agente reticolante di 1:1 [36]. Pertanto, sulla base di queste considerazioni, si è preferito mantenere rapporti che non si discostassero in maniera significativa dalla scheda tecnica dell'azienda produttrice.

Analisi in regime oscillatorio sono state effettuate sulle restanti tre formulazioni di silicone, mantenendo costanti i parametri di oscillazione e deformazione percentuale, e variando solo la temperatura di processo.

L'andamento è risultato lineare per tutte le formulazioni. A temperature più basse, quali 4°C e 10°C, i grafici risultano traslati verso destra, dimostrando come le cinetiche di reticolazione alle basse temperature sono rallentate. Ciò è risultato fondamentale poiché ha confermato la possibilità di mantenere le proprietà viscoelastiche del silicone per un tempo maggiore; al contrario, per temperature più alte, quali 65 °C, i grafici sono traslati verso sinistra, assistendo a un'immediata reticolazione non appena la soluzione viene posizionata sul peltier riscaldato. Gli andamenti ottenuti sono risultati in linea con quello che ci aspettavamo e con i dati riportati in letteratura.

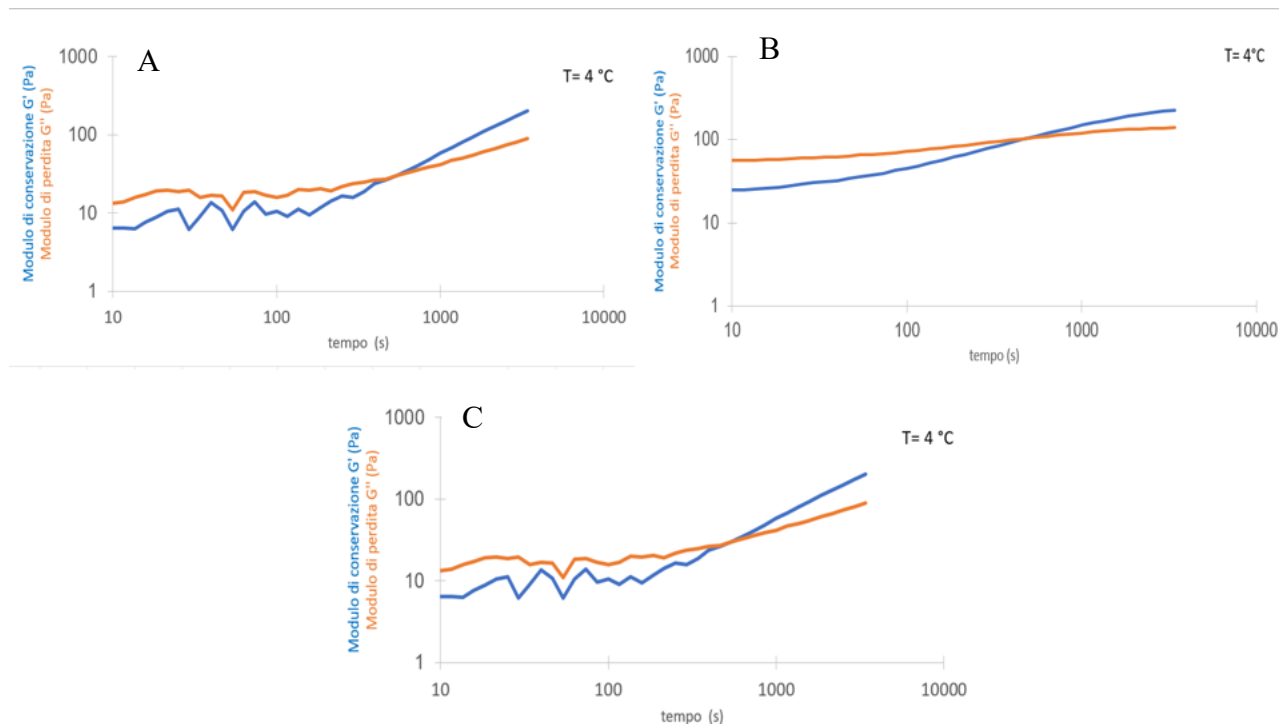


Figura 31: Analisi in regime oscillatorio delle tre formulazioni di Silpuran a 4°C: (A) SILPURAN 1.1_82%, (B) SILPURAN 1.1_93%, (C) SILPURAN 1_90%.

In figura 31 sono mostrati i grafici delle analisi effettuate a 4°C. Come è osservabile, la transizione sol/gel risulta maggiormente tralata verso destra, confermando il fatto che le basse temperature comportano cinetiche più lente. A differenza di come osservato nelle analisi reologiche a 23°C, in cui le cinetiche di reticolazione sono state influenzate da una diversa concentrazione di solvente, le analisi eseguite invece a 4°C riportano cinetiche più lente per tutte le formulazioni, indistintamente dalla concentrazione del solvente. Le formulazioni “Silpuran 1.1_82%” e “Silpuran 1.1_93%” presentano una transizione da sistema liquido a sistema viscoso a circa 735 secondi (circa 12 min).

Per la formulazione “Silpuran 1_90%”, invece, si è assistito a un comportamento anomalo. Nonostante la prova sia stata ripetuta tre volte sullo stesso campione, non si è assistito a nessuna transizione sol/gel e inoltre il grafico ha presentato un andamento per cui fin dall’inizio G' è risultato maggiore di G'' .

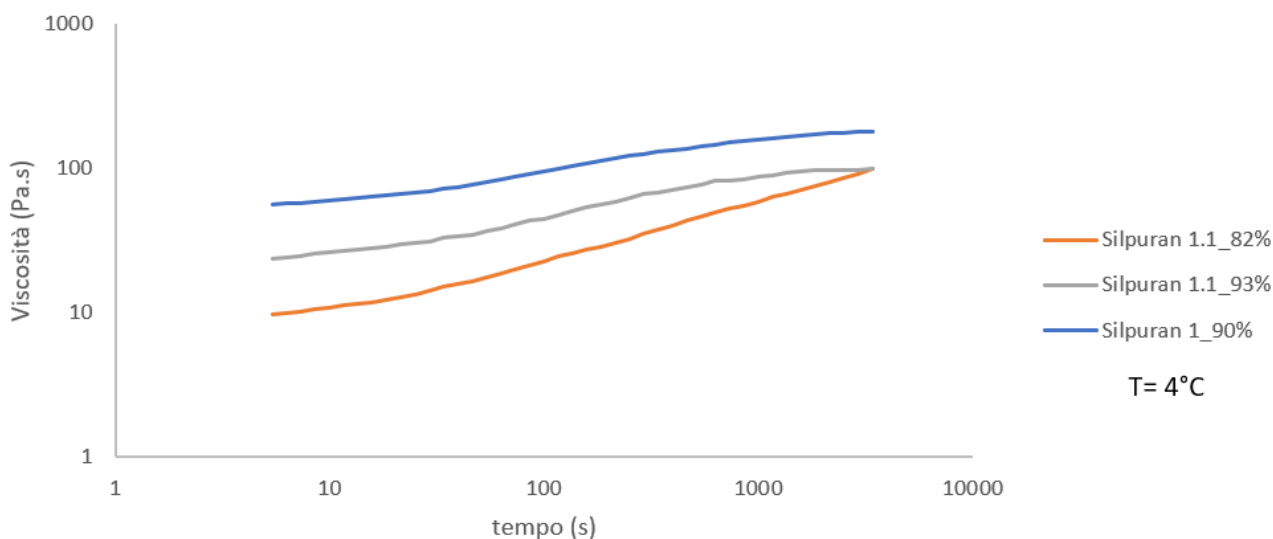


Figura 32: Test di mantenimento del picco del flusso delle formulazioni a base di Silpuran a 4°C.

Inoltre, sempre a 4°C, essendo una possibile temperatura per il processo di stampa 3D, è stato analizzato il comportamento viscoelastico di ogni formulazione nel tempo se sottoposto a un valore di velocità di taglio costante. Ciò è risultato interessante perché il test di mantenimento del picco del flusso al reometro fornisce informazioni importanti sul comportamento del materiale in situazioni di carico o deformazione costanti, comprendendo come il materiale potesse comportarsi in applicazioni reali. In particolare, è stata investigata la viscosità di ogni formulazione nel giro di 1h, se sottoposte a un valore di velocità di taglio costante di $0,1 \text{ s}^{-1}$. Le tre formulazioni, mostrate in figura 32, presentano un andamento comune, tale per cui il valore della viscosità aumenta all'aumentare del tempo. La formulazione “Silpuran 1.1_82%” presenta un incremento più marcato della viscosità, partendo da valori di circa 5 Pa.s fino a raggiungere valori di circa 100 Pa.s; la formulazione “Silpuran 1.1_93%” possiede un andamento intermedio tra le tre formulazioni, con valori iniziali di circa 25 Pa.s fino a raggiungere valori confrontabili con la prima formulazione di circa 100 Pa.s; mentre la formulazione “Silpuran 1_90%” è caratterizzata da valori maggiori di viscosità, con un massimo di circa 180 Pa.s. In generale, però, è possibile affermare che le tre formulazioni presentano valori di viscosità confrontabili.

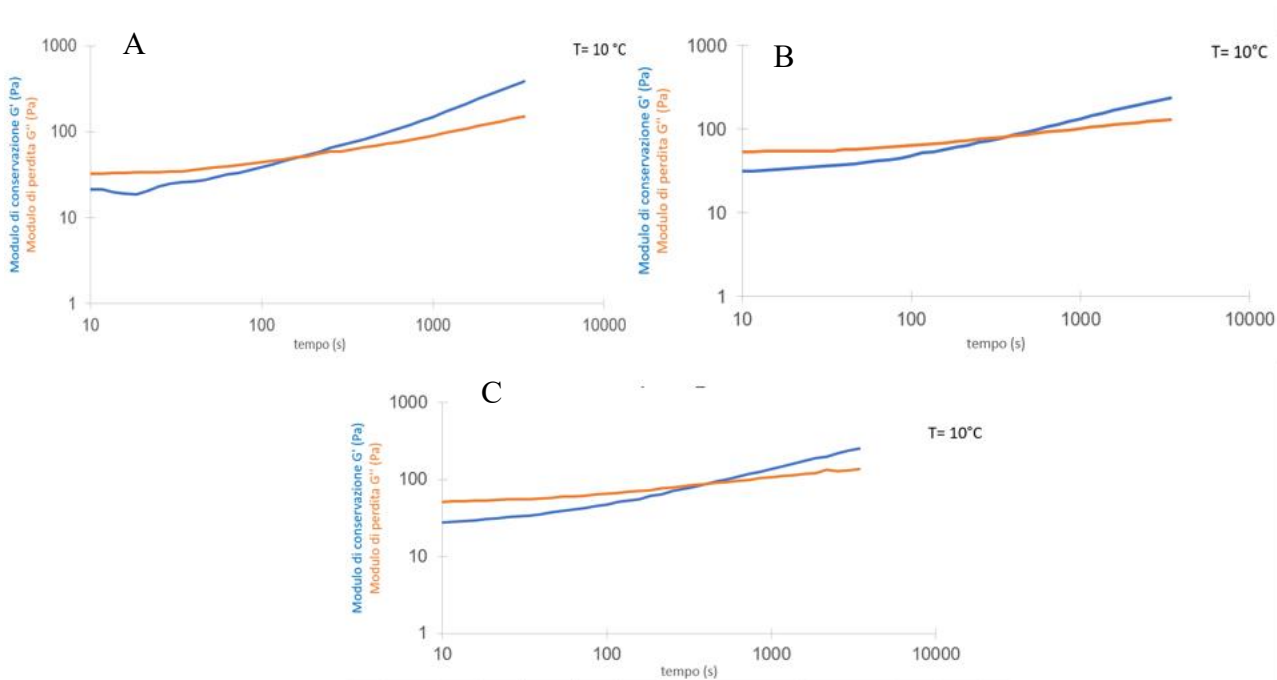


Figura 33: Analisi in regime oscillatorio delle tre formulazioni di Silpuran a 10°C: (A) SILPURAN 1.1_82%, (B) SILPURAN 1.1_93%, (C) SILPURAN 1_90%.

In figura 33 sono mostrati i grafici a 10°C. Come si può notare, le soluzioni presentano risultati intermedi tra le prove effettuate a 4°C e quelle a 65°C. In particolare, si assiste a un comportamento praticamente uguale per le formulazioni “Silpuran 1.1_93%” e “Silpuran 1_90%”, con un valore di transizione sol/gel di circa 541s (9 min); mentre per la “Silpuran 1.1_82%”, la transizione avviene circa a 251 s (circa 4 min).

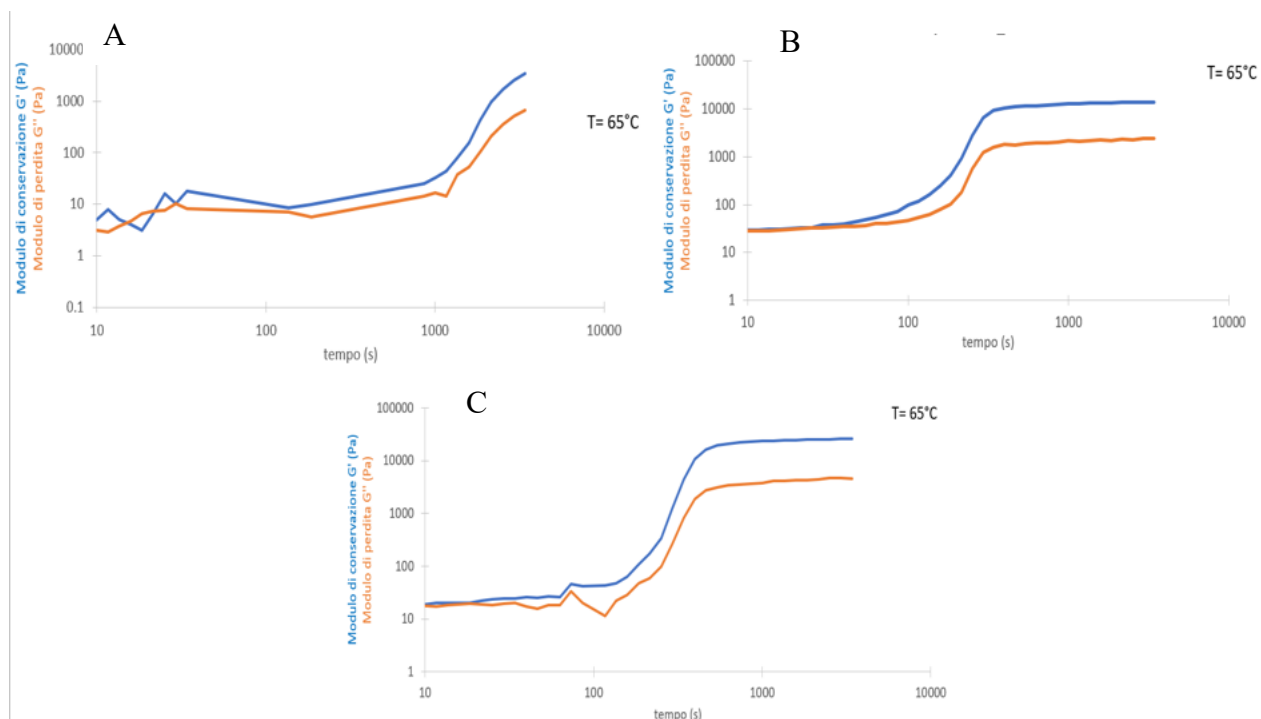


Figura 34: Analisi in regime oscillatorio delle tre formulazioni di Silpuran a 65°C: (A) SILPURAN 1.1_82%, (B) SILPURAN 1.1_93%, (C) SILPURAN 1_90%.

Infine, nella figura 34 sono mostrate le prove a 65°C. Le cinetiche di reticolazione risultano essere istantanee. Per tutte le tre formulazioni analizzate, si assiste allo stesso andamento, ovvero vi è un iniziale regione di instabilità, dovuto probabilmente al fatto che la soluzione è stata posizionata sul peltier già a 65°C, ma l'analisi è stata fatta partire solo dopo le giuste procedure prima di iniziare l'analisi, quali settaggio della distanza tra i due piatti e posizionamento della "trappola" per non far evaporare il solvente; per poi concludersi con il raggiungimento di una regione di stabilità, in cui i moduli G' e G'' risultano costanti fino alla fine della prova. Per le alte temperature, così come per le basse temperature come a 4°C, si assiste a uno stesso andamento per tutte le formulazioni, simbolo che a queste temperature i parametri della soluzione non influenzano la transizione sol/gel. In particolare, per tutte le tre formulazioni si assiste alla transizione sol/gel nei primi 20 secondi dall'inizio della prova.

	4°C			10°C			65°C		
	Tempo transizione sol/gel (s)	Modulo di conservazione G'(Pa)	Modulo di perdita G''(Pa)	Tempo transizione sol/gel (s)	Modulo di conservazione G'(Pa)	Modulo di perdita G''(Pa)	Tempo transizione sol/gel (s)	Modulo di conservazione G'(Pa)	Modulo di perdita G''(Pa)
Silpuran 1.1_82%	735,6	40,2	35,7	251,1	62,4	51,1	25,1	16,1	7,6
Silpuran 1.1_93%	735,6	128,4	113,7	541,1	98,3	89,4	11,6	29,4	28,1
Silpuran 1_90%	/	/	/	541,1	101,4	93,5	11,6	19,9	17,3

Tabella 15: tabella riassuntiva delle tempistiche di transizione sol/gel e relativi moduli G' e G'' delle 3 formulazioni di Silpuran a 4, 10 e 65 °C.

In tabella 15 sono riportati i valori complessivi delle analisi in regime oscillatorio di ogni singola formulazione alle tre differenti temperature: tempistiche delle transizioni sol/gel con i rispettivi valori dei moduli G' e G''.

3.4 Stampa 3D della formulazione a base di Silpuran

Sulla base dei risultati ottenuti dalle prove reologiche sulle 3 differenti formulazioni a base di Silpuran, la formulazione “Silpuran 1.1_93%” è risultata la più ottimale per il processo di stampa 3D. Con la formulazione “Silpuran 1_90%” non è stato possibile investigare le cinetiche di reticolazione a 4°C poiché non si è assistito a nessuna transizione sol/gel; mentre per formulazione “Silpuran 1.1_82%” la transizione sol/gel a 10°C è stata troppo rapida confrontata con le altre due

soluzioni. Pertanto, Sulla base di queste considerazioni, la concentrazione di soluto e il rapporto monomero-agente di reticolazione della formulazione “Silpuran 1.1_93%” sono risultati ottimali per il processo. In particolare, sono state eseguite delle prove di stampa con l’intento di verificare l’effettiva estrudibilità della soluzione e la seguente stabilità dello strato stampato. I test sono stati eseguiti mediante l’uso di una biostampante commerciale (BIOX, Cellink), sulla quale è stata montata una testina di stampa pneumatica a temperatura controllata per consentire l’estrusione del materiale, regolando la pressione dell’aria sulla cartuccia e mantenendo la temperatura costante a 10°C, al fine di preservare le proprietà viscoelastiche della miscela. Al tempo stesso è stata impostata una temperatura del piatto di stampa di 65°C per promuovere la reticolazione del silicone. Diversi test sono stati eseguiti con il fine di ottenere delle condizioni ideali per la stampa. In particolare, durante le prove, i parametri sono stati impostati con l’obiettivo di garantire l’estrusione del materiale e la deposizione omogena del filamento:

- Pressione in un range di 30÷200 kPa;
- Velocità di estrusione in un range di 2÷4 mm/s;
- Diametro ago variabile in un range di 0,150 mm ÷ 0,410 mm;
- Densità di riempimento: 5÷25%;
- Spostamento lungo z del 70% rispetto al diametro dell’ago;
- Temperatura della testina in un range di 4÷10 °C;
- Temperatura piatto di stampa di 65°C.

Il modello CAD iniziale scelto è stato un modello 3D digitale a base quadrata di dimensioni 10x10x1mm. In un primo momento è stato deciso di adoperare aghi da 30 G e il 27G, con il fine di depositare filamenti di piccolo diametro per avere una buona fedeltà di stampa. E’ stato dimostrato però, che per dimensioni di aghi inferiori al 27G (0,200mm) non è stato possibile estrarre filamenti di materiale a causa delle pressioni in gioco troppo alte, poiché superiori a quelli impostabili dalla testina di stampa in nostro possesso, ovvero superiori a 200kPa. Al contrario, aghi metallici con dimensioni superiori al 22G (0,410mm) hanno dimostrato una deposizione di materiale non omogena anche a pressioni relativamente basse, quali 30kPa, non garantendo fedeltà di stampa. Alla fine, il processo è risultato essere ottimale adoperando un ago metallico di dimensioni di 25G (0,250mm). A questo punto è stato necessario ottimizzare i parametri di pressione e velocità di estrusione con il fine di ottenere una struttura finale che fosse il più simile possibile al disegno CAD selezionato.

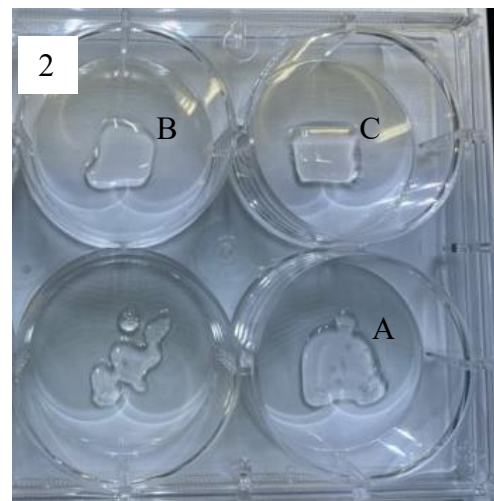
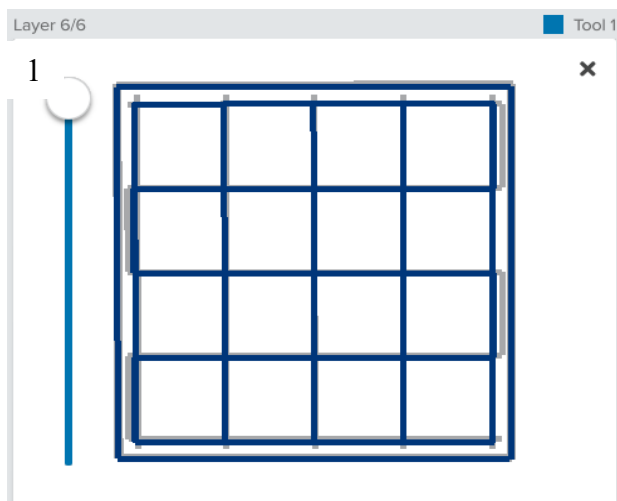


Figura 35: (1) modello CAD impostato nella stampante; (2) strutture ottenute a fine processo: (2A) struttura ottenuta con pressione di 150kPa e velocità di 2mm/s; (2B) struttura ottenuta con pressione di 180 e velocità di 3mm/s; (2C) struttura ottenuta con pressione di 200 e velocità di 4mm/s.

I test sono stati effettuati su un modello CAD di dimensioni 10x10x1mm, impostando come parametri iniziali una pressione di 30kPa, una velocità di estrusione di 2mm/s, una densità di riempimento del 25% e un'altezza layer di 0,17mm. Le analisi hanno dimostrato che non era possibile l'estrusione di materiale se non a una pressione maggiore o uguale a 150kPa. Come è ben visibile dalla figura 42.2A, nonostante il piatto di stampa era stato impostato a una temperatura di 65°C, il silicone non è stato in grado di reticolare istantaneamente, comportando uno spanciamento laterale che non ha permesso di ottenere la struttura desiderata (nella figura 35 a sinistra è mostrato il modello CAD che si sarebbe dovuto ottenere). Così come dimostrato in letteratura, si è pensato di aumentare la velocità per cercare di ottenere una deposizione di filamenti più sottili. I test, però, hanno dimostrato come l'aumento della velocità portasse ad ottenere filamenti discontinui probabilmente causati da uno scorretto bilanciamento tra velocità della testina e flusso di materiale. Pertanto sulla base di queste considerazioni, la pressione della testina di stampa è stata impostata a valori maggiori, con il fine di riuscire a stampare dei filamenti più sottili e continui. Si sono riusciti a ottenere campioni con una velocità di estrusione pari a 3mm/s con una pressione impostata pari a 180kPa (figura 35.2B), fino a un massimo di 4mm/s, poiché per ottenere questi campioni è stato necessario impostare una pressione di 200kPa, massimo valore raggiungibile dalla testina di stampa. È stato dimostrato come effettivamente un incremento della velocità di estrusione comportasse una deposizione di filamenti più sottili, e quindi strutture ottenute che risultassero essere più compatte e con un minor spanciamento laterale, però, al tempo stesso, è evidente come si è ben lontani dall'ottenere una struttura con una buona fedeltà di stampa simile al modello CAD originario.

Per osservare con miglior precisione la deposizione del filamento sono inoltre stati effettuati test andando a stampare un solo strato di materiale a base quadrata e dimensioni 10x10x0.3 mm. Inoltre, la pompa è stata impostata in modo tale da stampare solo il perimetro del modello e con una densità di riempimento del 5%, con il fine di avere una quantità minima di materiale ed essere in grado di quantificare, in maniera più precisa, lo spanciamiento laterale. Lo spessore finale ottenuto del filamento è stato quasi pari 1 cm, circa quattro volte maggiore dello spessore teorico desiderato, ovvero uguale al diametro interno dell'ago metallico (0,250mm).

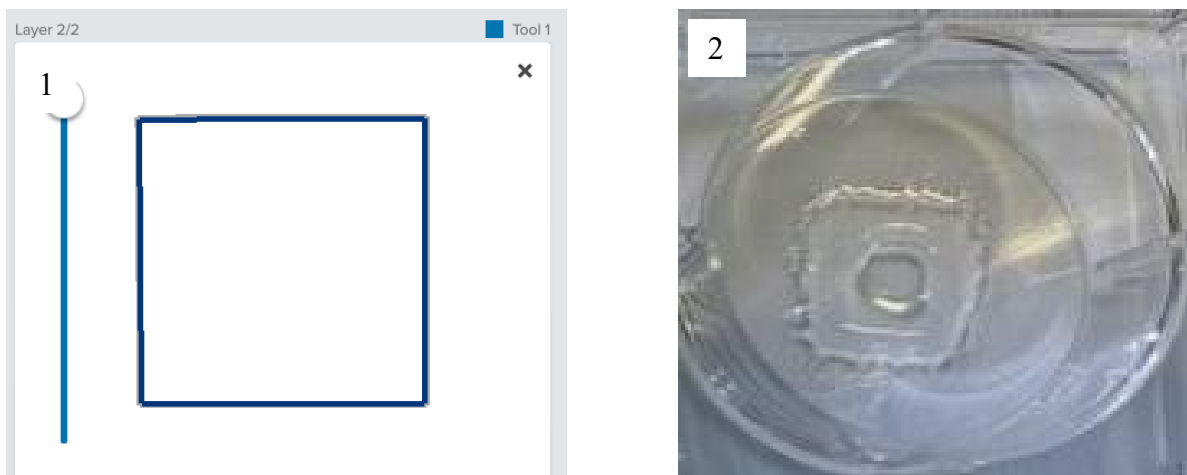


Figura 36: (1) modello CAD impostato nella stampante; (2) struttura del perimetro ottenuta a fine processo.

Da questi risultati si evince come il silicone non sia in grado di reticolare istantaneamente una volta depositato sul piatto, suggerendo quindi l'impostazione di temperature superiori a 65°C (temperatura massima a cui può essere impostato il piatto di stampa con questa stampante), per garantire una buona fedeltà di stampa. Pertanto, si può dire che le formulazioni realizzate risultano essere ottimali per il processo di stampa, poiché è stato possibile estrarre dei filamenti omogenei sul piatto di stampa. al tempo stesso però, non è stato possibile una reticolazione istantanea del silicone. Sulla base di queste considerazioni, sono necessari ulteriori studi sulla processabilità del silicone, investigando parametri della soluzione differenti o fornendo delle fonti di calore maggiori al silicone affinché sia in grado di reticolare istantaneamente, garantendo maggiore fedeltà di stampa.

3.5 Sviluppo e caratterizzazione di membrane elettrofilate a base di PVDF

In parallelo allo studio relativo allo sviluppo di formulazioni a base di silicone, e sulla base delle difficoltà riscontrate e riportate precedentemente, una strategia alternativa ha previsto di esplorare

l'utilizzo di formulazioni in poli-vinilidenfluoruro (PVDF) per ottenere membrane porose elettrofilate. In particolare, Il PVDF, un polimero termoplastico appartenente alla famiglia dei fluoropolimeri, è emerso come una scelta ottimale per la produzione di membrane porose mediante la tecnica dell'elettrofilatura, essendo proprio caratterizzato da ottime proprietà di elettrospinnabilità.

Sulla base di queste considerazioni, sono stati investigati differenti parametri della soluzione con il fine di ottenere una soluzione ottimale per la tecnica di elettrofilatura. Una concentrazione in peso del 18wt% di PVDF è stata valutata ideale per una corretta solubilizzazione in un solvente costituito al 50% da DMSO e al 50% da acetone. Per la preparazione della soluzione è stato seguito un protocollo già ottimizzato per un'altra ricerca di tesi.

Una volta ottimizzati i parametri per la soluzione, si è proceduti alla tecnica di elettrofilatura. Anche in questo caso, durante i test preliminari di ottimizzazione del processo, ogni set di parametri è stato testato elettrofilando la soluzione a base di PVDF, utilizzando un collettore piano ricoperto con un foglio di alluminio. Condizioni di processo diverse, quali tensione applicata, flusso di materiale, distanza tra l'emettitore e il collettore sono state variate per cercare di ottenere un flusso stabile e la deposizione di fibre omogenee. Per le prime prove si è cercato di mantenere tutti i parametri costanti e variare solo la distanza siringa/collettore, per capire come questa potesse influenzare la morfologia delle fibre. In particolare, con la stessa soluzione, sono state effettuate 4 prove differenti, ognuna di 30 minuti circa e variando progressivamente, con ordine crescente, la distanza siringa collettore.

PROVA	DISTANZA COLLETTORE	TENSIONE	FLUSSO	TEMPERATURA	UMIDITÀ RELATIVA
1	10 cm	22 kV	200 μ L/h	25 °C	45%
2	12 cm	22 kV	200 μ L/h	24,8 °C	50%
3	15 cm	22 kV	200 μ L/h	25 °C	49%
4	18 cm	22 kV	200 μ L/h	25 °C	45%

Tabella 16: Parametri ambientali e di processo impostati per l'elettrofilatura su collettore piano delle soluzioni a base di PVDF.

Come si può notare dalla tabella 16 le varie prove sono state effettuate a un voltaggio costante di 22kV e un flusso minimo di 200 μ L/h. La temperatura di circa 25°C è risultata ottimale per il processo, a differenza di un'umidità relativa superiore al 45% presente in camera durante le analisi (per un

processo ottimale si prediligono valori di umidità al di sotto del 40%). Questo ha portato a una leggera instabilità del flusso, ma la deposizione di materiale sul foglio di alluminio è andata comunque a buon fine. Campioni ottenuti dalle membrane elettrospinnate sono stati metallizzati e successivamente analizzati mediante analisi SEM.

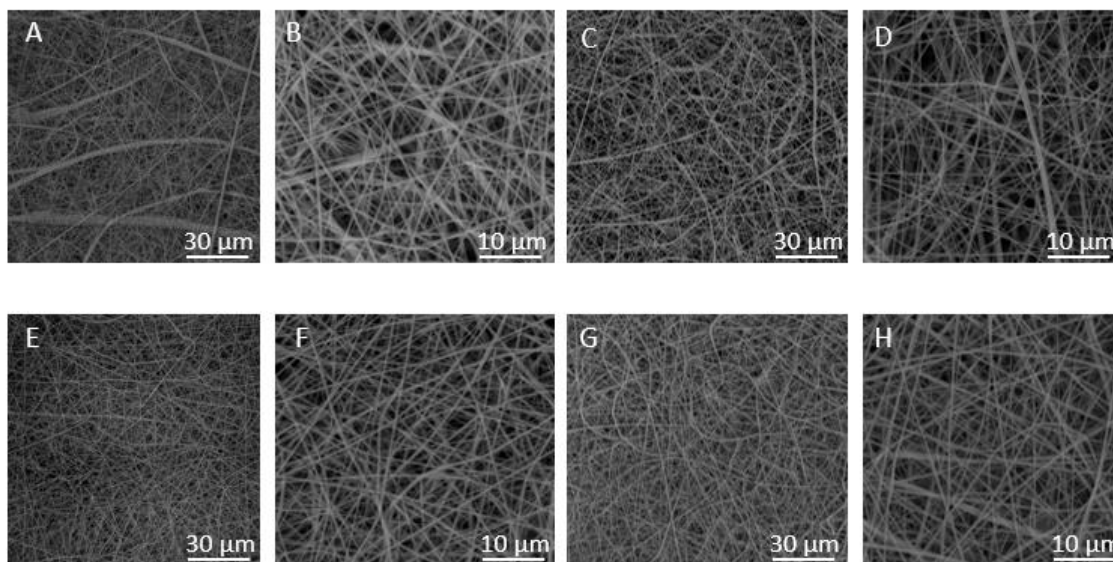


Figura 37: immagini SEM della formulazione a base di PVDF: (A), (B) distanza ago-collettore di 10 cm; (C), (D) distanza ago-collettore di 12 cm; (E), (F) distanza ago-collettore di 15 cm; (G), (H) distanza ago-collettore di 18 cm;

Il processo di elettrofilatura su collettore piano ha prodotto matrici fibrose orientate in modo casuale e interconnesse su scala nanometrica. Come mostrato nella figura 37, una concentrazione di PVDF pari al 18% ha portato alla formazione di matrici omogenee prive di difetti significativi, aventi fibre continue e dalle dimensioni nanometriche. In particolare, è stato notato come la configurazione di parametri scelti, come flusso e tensione, sono risultati ottimali per la deposizione di fibre. L'unico parametro ad essere stato variato è stato la distanza ago/collettore, che ha permesso di ottenere delle fibre con diametro variabile. In accordo con la letteratura, si è notato che distanze ago/collettore minori hanno permesso la formazione di fibre con diametri maggiori; distanze maggiori, invece, hanno determinato tempistiche di evaporazione del solvente più elevate, con conseguente formazione di fibre con diametro minore. In generale, dal processo, si sono ottenute delle fibre con un diametro nell'ordine dei nanometri: a partire da una dimensione di fibre di circa 600/700 nm per una distanza di 10 cm, fino a raggiungere valori di diametro fibre di circa 300/400 nm per una distanza di 18 cm;

Distanza ago/collettore [cm]	10	12	15	18
Diametro Fibre [nm]	600÷700	500÷600	400÷500	300÷400

Tabella 17: range diametro fibre di PVDF al variare della distanza ago/collettore

3.6 Sviluppo e caratterizzazione di formulazioni ibride

Sulla base dei risultati ottenuti dal processo di elettrospinning della sola soluzione di PVDF, è stato provato ad investigare la possibilità di realizzare un potenziale sistema a rilascio di farmaco a partire da formulazioni ibride, così come descritto nella sezione 2.4. In particolare il sistema ha previsto una prima realizzazione di nanoparticelle, a base di acido poli(lattico-co-glicolico) (nPLGA), mediante tecnica di doppia emulsione, così come descritto in sezione 2.3. Le nanoparticelle utilizzate e i dati ottenuti sono stati ricavati da un altro progetto di tesi in corso all'interno del gruppo di ricerca. Una volta che le nanoparticelle sono state prodotte, si è proceduto con la loro caratterizzazione.

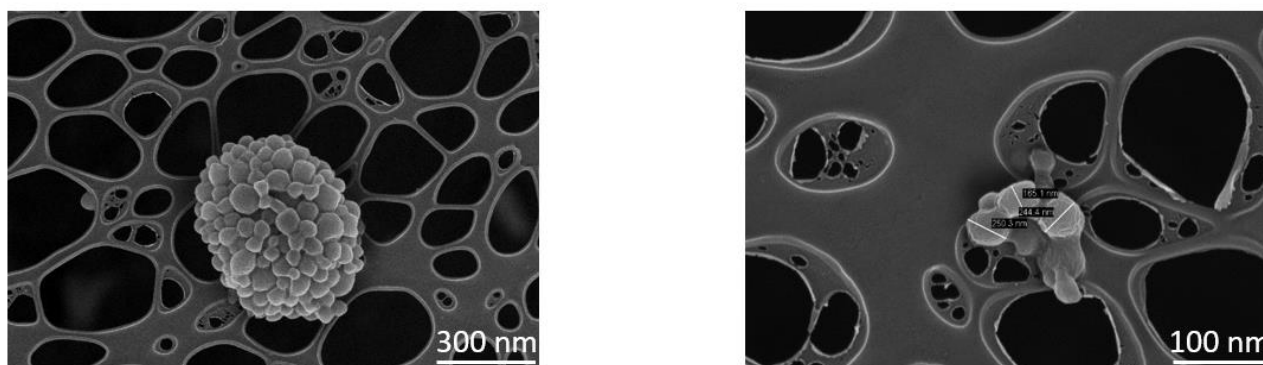


Figura 38: Immagini al FESEM delle nPLGA contenenti ibuprofene.

Così com'è possibile osservare dalle immagini sovrastanti, le analisi FESEM hanno confermato come il protocollo, descritto nella sezione 2.3, sia risultato ottimale per la produzione di nanoparticelle di forma sferica con un diametro di circa 100÷300 μm . Una volta dimostrata la riuscita del processo di produzione delle nPLGA, è stato delineato e studiato il profilo dell'ibuprofene contenuto all'interno delle nanoparticelle. Mediante analisi HPLC, è stato quantificato quanto ibuprofene fosse contenuto all'interno delle nanoparticelle, ottenendo un valore pari $5,56\% \pm 2,09\%$. Successivamente, una volta quantificato l'ibuprofene, è stato valutato il profilo di rilascio del farmaco, sospendendo le nPLGA in acqua distillata con tris allo 0,5M e preparando diversi campioni da analizzare a tempistiche differenti: 3h, 6h, 24h, 3 giorni e 7 giorni. Dai risultati ottenuti mediante HPLC, è stato riscontrato un

rilascio iniziale molto rapido di più dell'80% già a partire dal campione analizzato a 3h. Una volta caratterizzate le nanoparticelle, sono state investigate due strategie differenti per la realizzazioni di formulazioni ibride. In particolare, la prima strategia ha previsto la sospensione delle nanoparticelle direttamente all'interno della soluzione al 18wt% di PVDF in acetone al 50% e DMSO al 50%. Sulla base di queste considerazioni, test di stabilità sono stati effettuati per analizzare il comportamento delle nanoparticelle se sospese nello stesso solvente del PVDF. I campioni sono stati successivamente analizzati a 3,6 e 24h.

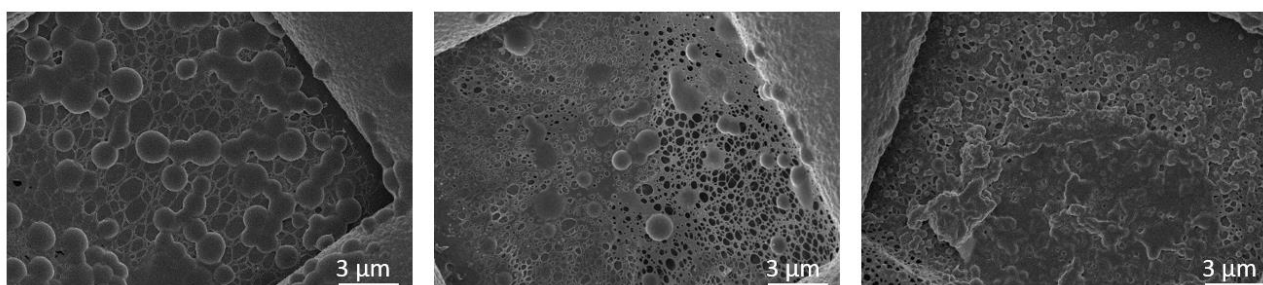


Figura 39: immagini al FESEM delle prove di stabilità delle nPLGA all'interno di acetone e DMSO a diversi step point: (A) 3h; (B) 6h; (C) 24h.

Dalle immagini si evince la tendenza da parte delle nanoparticelle a rigonfiare se poste a contatto con il solvente, fino a raggiungere un elevato livello di coalescenza. Questo risulta evidente, ma poco marcato, già a partire dalle 3h (A), in cui parte delle particelle si trovano fuse tra di loro, ma ancora facilmente distinguibili. Dopo le 24h (C) ciò che si riscontra non è altro che un aggregato di materiale, in cui non è più possibile distinguere le nPLGA. Nonostante si fosse ottenuto questo risultato, si è pensato ugualmente di provare ad elettrospinnare un'unica soluzione contenente nPLGA e PVDF, ipotizzando che la presenza del polimero potesse proteggere le nanoparticelle, garantendo quindi una certa stabilità durante il processo. Pertanto, la sospensione di nPLGA è stata aggiunta gradualmente alla soluzione di PVDF al 18 w%, così come descritto nella sezione 2.2, raggiungendo 2 concentrazioni finali differenti: in un primo caso all'1% e nel secondo caso al 5%. La configurazione dell'elettrospinning è rimasta la medesima rispetto alle prove effettuate precedentemente con il solo PVDF, ovvero è stata investigata la morfologia delle fibre depositate su un collettore piano al variare della distanza ago-collettore. La tensione è stata impostata sempre a 22kV, mentre è stato necessario aumentare il flusso a circa 500÷600μL/h, per garantire una corretta deposizione di materiale sul foglio di alluminio.

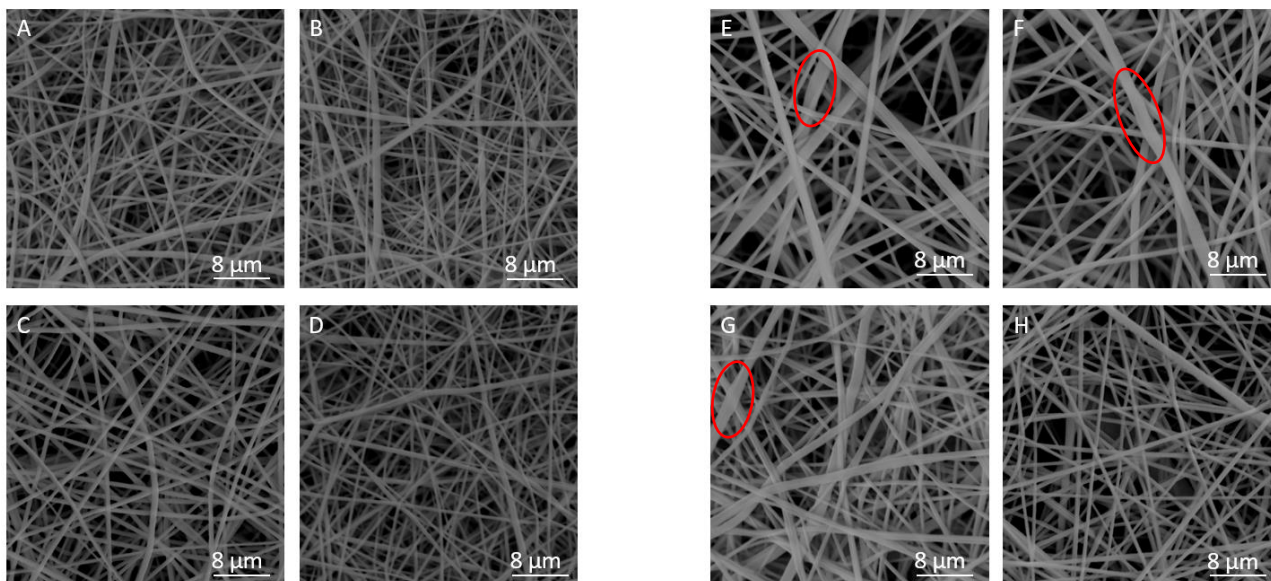


Figura 40: : immagini al SEM delle membrane di PVDF con nPLGA all'interno: (A), (B), (C), (D) membrane con nPLGA all'1% con distanza ago collettore rispettivamente di 10,12,15,18 cm; (E), (F), (G), (H) membrane con nPLGA al 5% con distanza ago collettore rispettivamente di 10,12,15,18 cm.

Il processo di elettrofilatura con una soluzione di PVDF con all'interno nPLGA ha ugualmente prodotto matrici fibrose orientate in modo casuale e interconnesse su scala nanometrica. In particolare, la presenza delle nPLGA ha comportato un cambiamento nella morfologia e nelle dimensioni delle fibre. Questo però è stato riscontrato maggiormente con una concentrazione più elevata di nanoparticelle. Per tale motivo, infatti, dalle immagini al SEM ottenute dalle membrane con una concentrazione delle nanoparticelle all'1%, non è stato possibile apprezzare nessun cambiamento significativo nella morfologia delle fibre (A, B, C, D). Una concentrazione di nPLGA al 5%, invece, ha comportato un incremento di circa $80\div 100$ nm del diametro delle fibre per ogni configurazione provata variando la distanza ago-collettore, e la presenza di rigonfiamenti di circa $1\ \mu\text{m}$ lungo alcune fibre (E, F, G, H). Da questo è stato possibile dedurre che un incremento della concentrazione delle nanoparticelle ha portato a un cambiamento effettivo nella morfologia della membrana. Nonostante ciò, dalle immagini SEM in nostro possesso, non è stato possibile affermare con certezza che all'interno delle fibre ci fossero delle nanoparticelle, anche perché, come spiegato in precedenza, le nPLGA non erano stabili in acetone e DMSO. Per avere maggiori informazioni sulla presenza delle nanoparticelle, sono state condotte analisi al FESEM poiché in grado di raggiungere ingrandimenti maggiori.

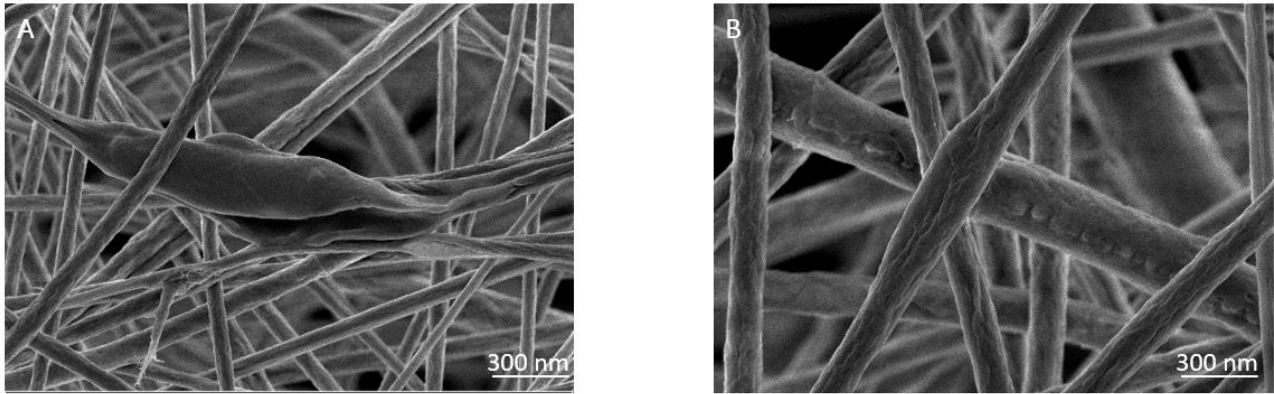


Figura 41: Immagini al FESEM della membrana di PVDF con nPLGA al 5%: (A) distanza ago collettore di 12 cm (B) distanza ago collettore di 15cm.

Le immagini al FESEM non hanno fatto altro che confermare i risultati già ottenuti al SEM, ovvero la presenza lungo le fibre di spancamenti di circa $1,2 \mu\text{m}$, da cui però non è possibile affermare con certezza la presenza di nPLGA all'interno della membrana. L'analisi FTIR è stato l'ultimo test effettuato su queste membrane per confermare o meno la presenza di PLGA all'interno delle fibre.

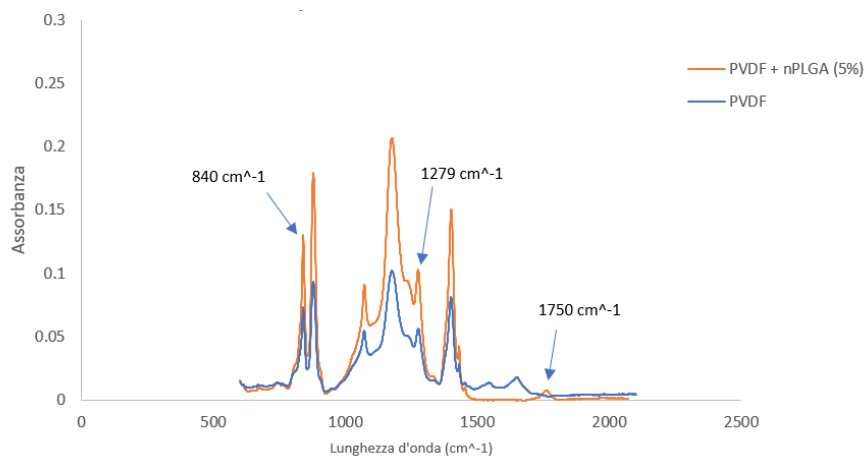


Figura 42: spettri FTIR a confronto: solo PVDF (blu) e PVDF + nPLGA(5%) in un'unica soluzione (arancione).

In figura 49 è mostrato il confronto tra i picchi di due grafici differenti: solo del PVDF in blu e PVDF + nPLGA al 5% in arancione. Lo scopo principale è stato quello di analizzare i picchi presenti nel grafico, ottenuto dall'analisi della membrana con le nanoparticelle, e comprendere se ci fossero delle differenze, rispetto al caso semplice della membrana di solo PVDF, che facessero capire la presenza o meno del PLGA. In prima istanza, sono stati individuati e investigati i picchi della membrana di solo PVDF. In letteratura è stato riscontrato che la fase β del PVDF presenta due

picchi principali: a 840 cm^{-1} e a 1279 cm^{-1} [71]. Il primo picco è associato alla deformazione torsionale del legame CH₂, all'allungamento scheletrico del legame C-C e infine all'allungamento del legame CF₂. Il secondo, invece, è associato al legame C-C. Nella fase beta, il legame C-C tra i gruppi metilenici (-CH₂-) è più rilevante, contribuendo a una maggiore intensità di questo picco. Successivamente è stato ottenuto il grafico FTIR per la membrana di PVDF con all'interno le nanoparticelle. Com'è mostrato in figura 42, i grafici risultano essere pressoché identici, con l'unica differenza di avere un picco molto basso a 1750 cm^{-1} . Questo picco è associato al legame C=O nella regione degli esteri all'interno della struttura del PLGA [72]. Pertanto dalle analisi FTIR è stato possibile comprendere come in qualche modo le nanoparticelle fossero state elettrospinnate, proprio per la presenza del picco caratteristico del PLGA, non riuscendo, però, a confermare con certezza l'integrità e stabilità delle nanoparticelle.

Sulla base dei dati ottenuti, poiché le nPLGA non sono risultate idonee e stabili ad essere sospese nello stesso solvente della soluzione di PVDF, una seconda strategia è stata investigata per la potenziale realizzazione di un sistema ibrido a rilascio di farmaco. È stato studiato l'utilizzo dell'elettrospinning con una configurazione coassiale, con il fine di elettrospinnare due soluzioni differenti, ottenendo delle fibre con un cuore interno e un guscio esterno (fibre "core/shell").

Prima del processo di elettrospinning, test di stabilità del solvente sono stati effettuati sospendendo le nPLGA all'interno di una soluzione costituita dal 75% di acqua, 20% acido acetico e 5% DMSO [73].

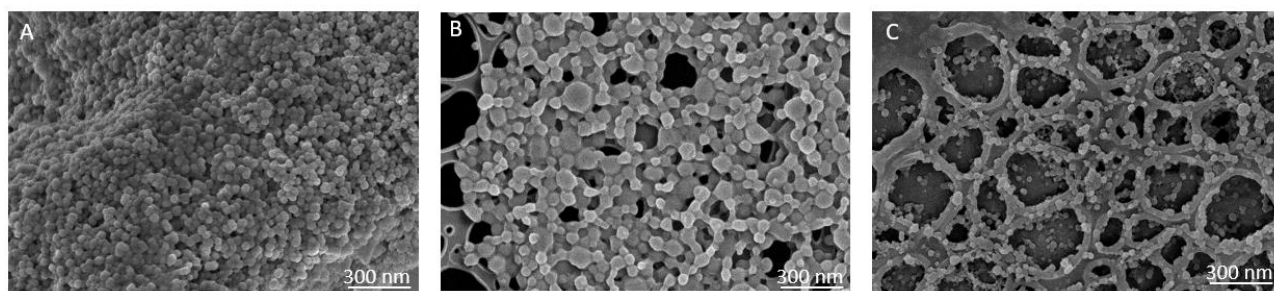


Figura 43: immagini al FESEM delle prove di stabilità delle nPLGA all'interno di acqua (75%), acido acetico (20%) e DMSO (5%) a diversi step point: (A) 3h; (B) 6h; (C) 24h.

A differenza delle prove di stabilità analizzate prima, le nPLGA risultano stabili in questo tipo di solvente. Com'è possibile osservare in figura 50, il fenomeno di coalescenza avviene sempre, ma in maniera decisamente minore, tale per cui le nanoparticelle risultano ancora ben visibili e facilmente distinguibili anche dopo 24h. sulla base di questi risultati, la configurazione coassiale

dell'eletrospinning è stata investigata attraverso due condizioni differenti: 1) flusso del cuore maggiore di quello del guscio; 2) flusso del cuore minore di quello del guscio.

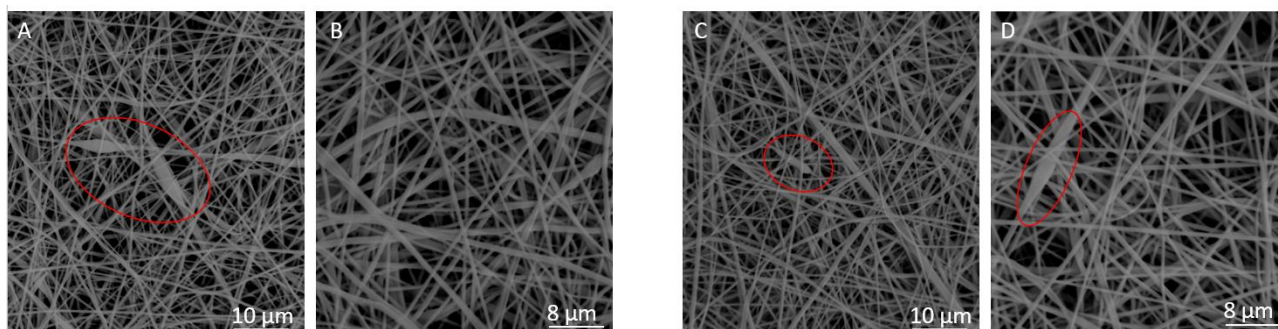


Figura 44: immagini SEM delle membrane con configurazione coassiale, in cui il flusso del core è maggiore di quello dello shell: (A), (B), distanza ago collettore 12 cm; (C), (D), distanza ago collettore 15 cm.

Con i parametri di processo impostati per questa prima configurazione, ovvero una tensione di 20kV, un flusso del cuore di 800 $\mu\text{L/h}$ e un flusso del guscio di 600 $\mu\text{L/h}$, non è stato possibile apprezzare un'ottimale formazione di fibre. Ciò che si ottiene dalle immagini SEM risulta molto simile al caso precedente in cui le nPLGA sono state sospese all'interno della soluzione di PVDF, ovvero formazione di fibre con un orientamento casuale e con un diametro dell'ordine di qualche centinaio di nanometri, e presenza di rigonfiamenti lungo le fibre.

Secondo studi approfonditi in letteratura, una formazione adeguata di fibra core/shell prevede un flusso del cuore minore rispetto a quello del guscio, poiché nella configurazione coassiale il materiale del cuore deve essere attratto verso l'esterno mentre il materiale del guscio lo circonda. Se il flusso del cuore fosse troppo elevato rispetto a quello del guscio, potrebbe dominare il processo e impedire al materiale del guscio di circondare in modo efficace il cuore, compromettendo la formazione di fibre core/shell. Sulla base di queste considerazioni, una seconda configurazione è stata testata, in cui il flusso del cuore è stato impostato maggiore rispetto a quello del guscio. La tensione e le distanze ago-collettore sono rimaste le medesime rispetto alla condizione precedente.

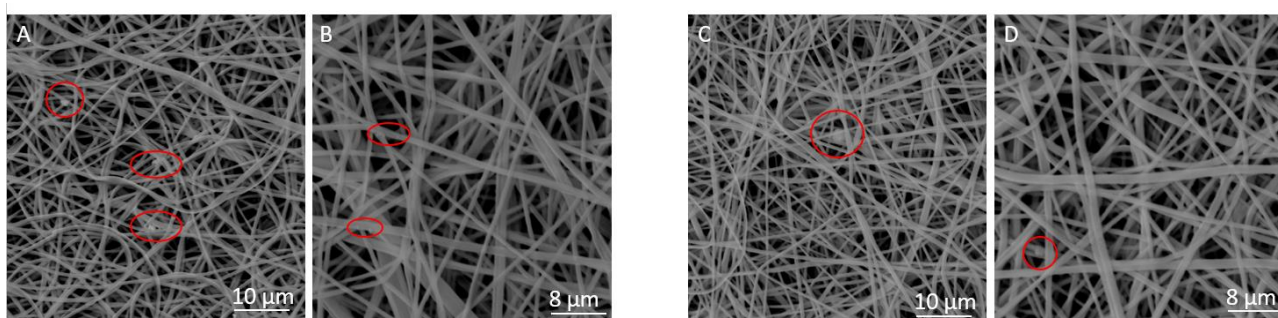


Figura 45: immagini SEM delle membrane con configurazione coassiale, in cui il flusso del core è minore di quello dello shell: (A), (B), distanza ago collettore 12 cm; (C), (D), distanza ago collettore 15 cm.

Le immagini in questione risultano decisamente migliori rispetto al caso precedente. Come si può osservare in figura 45, l'aver impostato un flusso del cuore minore rispetto a quello del guscio ha comportato l'assenza di rigonfiamenti lungo le fibre e la presenza di quello che potenzialmente potrebbero essere delle nanoparticelle lungo la parete delle fibre. Permane sempre l'impossibilità di determinare con esattezza la formazione di una fibra core/shell, però le immagini fanno presupporre che le nPLGA potrebbero essere integre a livello del core. Nel caso di una distanza ago-collettore di 12cm questa tendenza risulta essere maggiormente accentuata rispetto al caso di una distanza di 15cm. In generale, rispetto alla condizione precedente, non si assiste a una variazione nella dimensione delle fibre, che rimane in un range di circa 500÷600 nm per una distanza ago collettore di 12cm e circa di 400÷500 nm per una distanza di 15 cm.

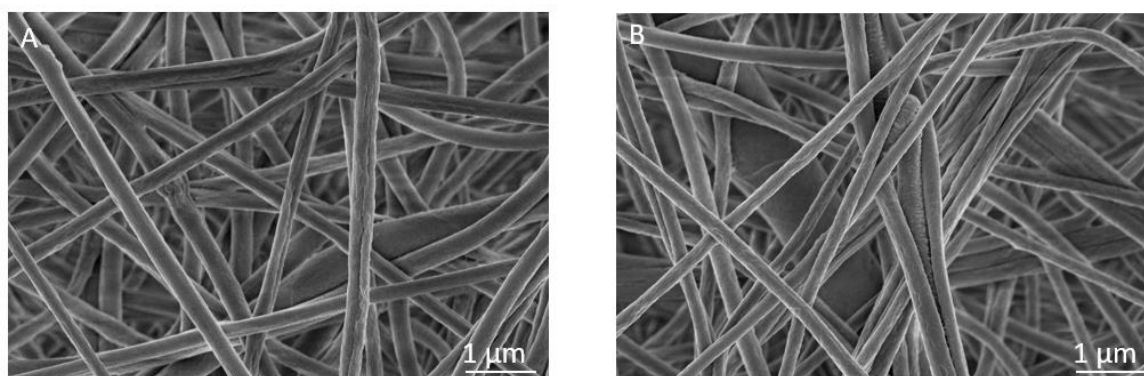


Figura 46: immagini FESEM delle membrane con configurazione coassiale, in cui il flusso del cuore è minore di quello dello shell: (A) distanza ago collettore di 12cm; (B) distanza ago collettore di 15cm.

Le immagini FESEM confermano ciò che è stato già analizzato mediante analisi SEM. Pertanto, per gli esperimenti effettuati, si può confermare che risulta più idoneo, per la formazione di fibre core-shell, una configurazione coassiale per cui il flusso del cuore sia minore rispetto a quello del guscio. Nonostante le immagini FESEM sembrano suggerire la possibile presenza di particelle all'interno delle fibre coassiali, questo dato dovrà essere verificato con ulteriori analisi che permettano di vedere le fibre in sezione, come ad esempio una analisi di microscopia elettronica a trasmissione (TEM).

Infine, un'analisi FTIR è stata condotta su questi campioni, per avere la conferma della presenza delle nanoparticelle all'interno della membrana e per eseguire un confronto tra i due casi di formulazioni ibride descritte in precedenza.

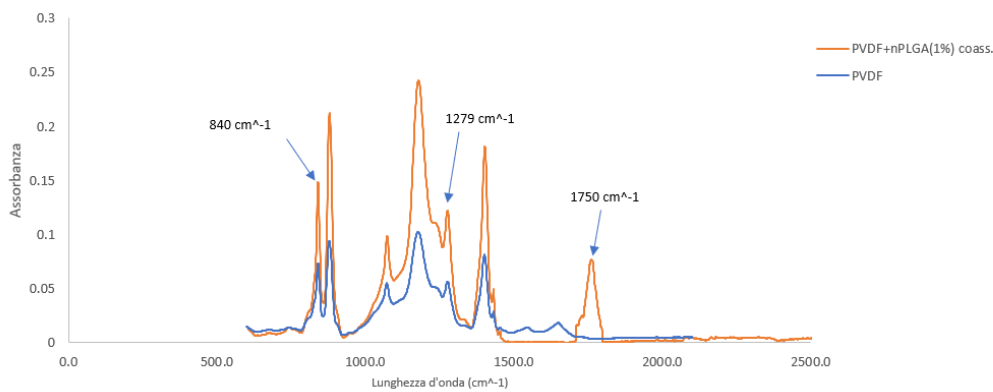


Figura 47: spettri FTIR a confronto: solo PVDF (blu) e PVDF + nPLGA(1%) con configurazione coassiale.

Il grafico riportato in figura non mostra particolari differenze rispetto al caso in cui le nPLGA sono state processate nello stesso solvente del PVDF (figura 42). Lo spettro FTIR ottenuto dalla formulazione ibrida elettrospinnata con configurazione coassiale presenta lo stesso andamento del caso precedente, con il medesimo picco a 1750 cm^{-1} del legame C=O, caratteristico del PLGA, ma in questo caso con un valore di assorbanza nettamente maggiore. Questo potrebbe simboleggiare una maggiore presenza di nPLGA rimaste integre all'interno delle fibre. Sono comunque necessari ulteriori studi di conferma sull'integrità delle nanoparticelle all'interno delle fibre.

4 CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, si stima che oltre 2 miliardi di individui nel mondo soffrano di disabilità visive, tra le quali il glaucoma si distingue come la principale causa di cecità irreversibile. Tale patologia è caratterizzata dalla compresenza di un aumento della pressione intraoculare, di un danno al nervo ottico e di un'alterazione del campo visivo. Oggi i trattamenti convenzionali utilizzati in un primo momento, quali terapia medica, parachirurgica e chirurgica presentano numerose limitazioni e problematiche post-operatorie che hanno portato a concepire i dispositivi di chirurgia mini-invasiva (MIGS) come possibile tecnica innovativa con il fine di superare le limitazioni dei trattamenti tradizionali. Se da un lato i dispositivi MIGS oggi in commercio risultano essere potenzialmente funzionali nel deflusso dell'umor acqueo e di conseguenza in grado di ristabilire valori di IOP fisiologici, presentano una problematica comune relativa alla formazione di una capsula fibrotica post impianto, rendendo pertanto ancora necessaria oggi la ricerca e l'ottimizzazione di nuovi dispositivi in grado di superare tali limitazioni.

In questo scenario si inserisce il presente lavoro di tesi, il cui obiettivo è la potenziale realizzazione, mediante tecnica dell'elettrospinning, di una membrana fibrosa e altamente porosa, in grado di garantire il deflusso dell'umor acqueo, e con proprietà antiadesive in modo da impedire l'adesione dei fibroblasti e quindi la conseguente formazione di capsula fibrotica. La scelta di tale tecnica per la realizzazione della membrana è dovuta ai numerosi vantaggi offerti dall'elettrofilatura, tra cui l'elevato controllo della porosità sulla struttura finale. Tuttavia, la lavorazione di diversi polimeri, tra cui i siliconi medici, con questa tecnica ha spesso dimostrato diversi punti critici e limitazioni dovuti alla difficoltà di formare delle fibre.

Tenendo in considerazione questi aspetti, il polimero selezionato inizialmente è stato il Silpuran, un silicone medico commerciale già usato in ambito ortopedico, caratterizzato da buone proprietà antiadesive. Inizialmente sono state formulate quattro soluzioni a base di Silpuran differenti, variando il volume del solvente e il rapporto monomero-agente di reticolazione, con il fine ottimizzare i parametri e determinare la soluzione più adeguata alla realizzazione della membrana. Pertanto, le proprietà reologiche delle quattro soluzioni, citate precedentemente, sono state studiate al fine di stabilire le opportune concentrazioni di ciascuno nel sistema finale. Dalle analisi in regime di flusso è stato dimostrato un comportamento pseudoplastico di tutte e quattro le formulazioni e dei valori di viscosità ottimali per il processo di elettrospinning; dalle analisi in regime oscillatorio, invece, è stato possibile investigare le cinetiche di reticolazione delle formulazioni e studiare come i parametri delle

soluzioni, come rapporto monomero-agente reticolante e concentrazione di solvente, potessero influenzare tali cinetiche di reticolazione. Tutte le prove eseguite hanno permesso di ottimizzare il protocollo di preparazione e sviluppare le formulazioni a base di Silpuran in modo tale che fossero processabili tramite elettrofilatura.

Sulla base dei risultati ottenuti dalle prove reologiche, le quattro soluzioni sono state utilizzate per eseguire dei test preliminari, con l'obiettivo di ottimizzare i parametri di processo di elettrofilatura e al fine di discriminare meglio il contributo di ciascun parametro nella realizzazione finale della membrana porosa. Immagini al SEM, delle membrane ottenute, hanno fatto notare che le soluzioni erano idonee al processo di elettrospinning poiché si poteva osservare del materiale depositato sul foglio di alluminio, ma vi era un'incapacità mantenere una struttura fibrosa, probabilmente dovuto a un merge delle fibre. Sono state testate differenti condizioni, tra cui valori di temperatura e umidità in camera differenti, pensando che queste potessero influenzare la riuscita del processo; ma anche trattamenti di post reticolazione in stufa a 80°C. Tutte le prove hanno comunque portato allo stesso risultato, ovvero deposizione ottimale di filamenti di materiale sul foglio di alluminio, ma impossibilità di visualizzare strutture fibrose. Sulla base di queste considerazioni, in futuro potrebbe essere utile investigare concentrazioni delle soluzioni differenti affinché si è in grado di ottenere una struttura fibrosa stabile; oppure si potrebbero investigare delle tecniche alternative di reticolazione del silicone, in modo da garantire una reticolazione immediata.

Tuttavia, poiché questi studi approfonditi non sono stati possibili in questo lavoro di tesi, è stata valutata la tecnica della stampante 3D, con il particolare utilizzo di una testina pneumatica con controllo di temperatura, come possibile metodo alternativo per processare il silicone. Questa tecnica ha rappresentato una potenziale alternativa poiché era possibile impostare una temperatura della testina a 4°C e riscaldare il piatto di stampa a 65°C, riuscendo a fornire quella fonte di calore necessaria al silicone. Le soluzioni a base di Silpuran, pertanto, sono state investigate reologicamente, dimostrando come il silicone fosse sensibile alle temperature. In particolare, le basse temperature hanno rallentato il processo di reticolazione, avendo tempi di transizione sol/gel maggiori; mentre le alte temperature hanno velocizzato il processo, rendendo la reticolazione quasi istantanea.

Sono state, pertanto, testate differenti condizioni di stampa, a partire dalla potenziale realizzazione di una membrana più complessa, con la deposizione di 6 strati, fino a provare la condizione più semplice, ovvero stampare solo il perimetro della membrana con una densità di riempimento che fosse il più bassa possibile. In entrambi i casi, confrontando la struttura ottenuta con il modello CAD impostato inizialmente, è stato dimostrato come vi era totale assenza di fedeltà di stampa. Anche in questo caso nonostante le elevate temperature del piatto di stampa, il silicone non è stato in grado di reticolare

istantaneamente, comportando un notevole spanciamento laterale. Pertanto, in futuro ci si potrebbe concentrare su un maggiore studio delle formulazioni, investigando il comportamento del silicone a temperature più elevate per esempio, o utilizzando delle tecniche di lavorazione del silicone che garantiscono un maggiore controllo sulla temperature.

In parallelo, è stato investigato il polivinilidenefluoruro (PVDF) come possibile materiale per la realizzazione di membrane porose mediante tecnica dell'elettrospinning. Si è pensato di utilizzare una soluzione al 18 wt% di PVDF disciolto in un solvente costituito al 50% da DMSO e al 50% da acetone. Una volta ottimizzati i parametri per la soluzione, si è proceduti alla tecnica di elettrofilatura. Le immagini SEM hanno riscontrato la formazione di matrici fibrose orientate in modo casuale e interconnesse su scala nanometrica. In particolare, sono state ottenute delle fibre di dimensione di circa 600÷700 nm per la distanza siringa-collettore minore, ovvero 10 cm; mentre per la distanza maggiore testata, ovvero 18 cm, sono stati raggiunti diametri anche di circa 300÷400 nm.

Successivamente, per investigare la potenziale realizzazione di un sistema a rilascio di farmaco, è stata studiata una formulazione ibrida combinando la soluzione di PVDF con delle nanoparticelle a base di acido Poli(lattico-co-glicolico) (nPLGA) contenenti ibuprofene. I dati inerenti alla caratterizzazione delle nanoparticelle, da un punto di vista morfologico e funzionale, sono stati ricavati da un altro progetto di tesi all'interno del gruppo di ricerca. Sono stati ricavati un diametro medio delle nanoparticelle di circa 100÷300 nm, un'efficacia di incapsulamento del farmaco di circa $5,56 \pm 2,09\%$, presentando però un rilascio di farmaco istantaneo di circa l'80% nelle prime tre ore del test effettuato in tris allo 0,5M. Per la realizzazione della membrana, sono state testate due condizioni differenti: 1) elettrospinning di un'unica formulazione di PVDF contenente nPLGA; 2) elettrospinning coassiale per la realizzazione di fibre con un cuore interno e un guscio esterno (fibre "core-shell") realizzando due soluzioni distinte di PVDF e di nPLGA. Nel primo caso, prove di stabilità in acetone e DMSO hanno dimostrato una scarsa stabilità delle nanoparticelle nel solvente e una loro tendenza ad aggregarsi. Il processo di elettrospinning è stato comunque testato, impostando i medesimi parametri delle prove precedenti. Dalle immagini SEM non è stato possibile affermare con certezza la presenza delle nanoparticelle all'interno, in quanto si è assistito solo a dei rigonfiamenti presenti lungo le fibre, di dimensioni di circa 1µm. È stato solo possibile confermare la presenza del PLGA mediante analisi FTIR, rintracciando un picco a circa 1750 cm^{-1} , assente nel grafico della sola membrana di PVDF analizzata, e simbolo della presenza del legame C=O (carbonio-ossigeno) nella regione degli esteri all'interno della struttura del PLGA[72]. Per tali motivazioni, pertanto, è stato provato a realizzare un sistema a rilascio di farmaco mediante una configurazione coassiale dell'elettrospinning, con il fine di determinare delle fibre con le nPLGA protette all'interno

(cuore), rivestite da un guscio esterno fatto di PVDF (guscio). In questo caso, prove di stabilità effettuate su una soluzione costituita dal 75% di acqua, 20% di acido acetico e 5% di DMSO hanno confermato la stabilità delle nanoparticelle a rimanere sospese in soluzione anche nel campione analizzato a 24h. Sulla base di queste considerazioni si sono testate due condizioni differenti: 1) flusso del cuore maggiore di quello del guscio, 2) flusso del cuore minore di quello del guscio. Nel primo caso, il risultato, analizzato mediante analisi SEM e FESEM, non ha portato a sostanziali differenze rispetto al caso in cui le nPLGA sono state processate all'interno della soluzione di PVDF, se non per la presenza di rigonfiamenti più grandi, di circa 1,6 μ m. Nel secondo caso, invece, si è notato la potenziale presenza delle nPLGA lungo le fibre, chiaramente osservabili già a partire da ingrandimenti di 6000x mediante analisi al SEM. Con questi risultati, è stato possibile affermare che la configurazione coassiale potrebbe risultare un metodo valido per la realizzazione di un sistema a rilascio di farmaco. Da qui ad affermare con certezza la validità di questo metodo, sono necessari numerosi studi futuri. Prima di tutto sarebbe necessario confermare la corretta formazione di fibre core/shell, poiché mediante tecnica SEM o FESEM non è possibile fare. Risulterebbe essere più opportuno un'analisi al TEM, o in alternativa provare a creare una sezione delle fibre, tagliando la membrana mediante criostato, da analizzare poi al FESEM. Una volta confermata l'eventuale presenza delle fibre core-shell, sarebbe necessario anche studiare le condizioni di queste nanoparticelle, e quindi dimostrare l'effettiva presenza e stabilità delle nPLGA. Inoltre, studi futuri potrebbero concentrarsi anche sulle cinetiche di rilascio, studiando come il profilo di rilascio del farmaco possa variare all'interno di una configurazione delle fibre core-shell.

BIBLIOGRAFIA

- [1] R. A. P. Guedes, 'Glaucoma, collective health and social impact', *Revista Brasileira de Oftalmologia*, vol. 80, no. 1, 2021, doi: 10.5935/0034-7280.20210001.
- [2] R. Varma, P. P. Lee, I. Goldberg, and S. Kotak, 'An Assessment of the Health and Economic Burdens of Glaucoma', *American Journal of Ophthalmology*, vol. 152, no. 4, pp. 515–522, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.ajo.2011.06.004.
- [3] K. Kalyani, 'Glaucoma: Causes, Symptoms And Treatment', netmeds.com. [Online]. Available: <https://www.netmeds.com/health-library/post/glaucoma-causes-symptoms-and-treatment>
- [4] V. Perrone, D. Formica, B. Piergentili, L. Rossetti, and L. Degli Esposti, 'Real-World Analysis on the Characteristics, Therapeutic Paths and Economic Burden for Patients Treated for Glaucoma in Italy', *Healthcare*, vol. 11, no. 5, p. 635, Feb. 2023, doi: 10.3390/healthcare11050635.
- [5] A. Malhotra, F. J. Minja, A. Crum, and D. Burrowes, 'Ocular Anatomy and Cross-Sectional Imaging of the Eye', *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, vol. 32, no. 1, pp. 2–13, Feb. 2011, doi: 10.1053/j.sult.2010.10.009.
- [6] B. D. Kels, A. Grzybowski, and J. M. Grant-Kels, 'Human ocular anatomy', *Clinics in Dermatology*, vol. 33, no. 2, pp. 140–146, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.10.006.
- [7] A. Llobet, X. Gasull, and A. Gual, 'Understanding Trabecular Meshwork Physiology: A Key to the Control of Intraocular Pressure?', *Physiology*, vol. 18, no. 5, pp. 205–209, Oct. 2003, doi: 10.1152/nips.01443.2003.
- [8] 'European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma_2021.pdf'.
- [9] M. V. Boland and H. A. Quigley, 'Risk Factors and Open-angle Glaucoma: Classification and Application', *Journal of Glaucoma*, vol. 16, no. 4, pp. 406–418, Jun. 2007, doi: 10.1097/IJG.0b013e31806540a1.
- [10] P. Sharma, P. A. Sample, L. M. Zangwill, and J. S. Schuman, 'Diagnostic Tools for Glaucoma Detection and Management', *Survey of Ophthalmology*, vol. 53, no. 6, pp. S17–S32, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.survophthal.2008.08.003.
- [11] R. F. Brubaker, 'Targeting Outflow Facility in Glaucoma Management', *Survey of Ophthalmology*, vol. 48, no. 2, pp. S17–S20, Apr. 2003, doi: 10.1016/S0039-6257(03)00003-1.
- [12] R. Nuzzi, P. Marolo, and A. Nuzzi, 'What Is New in Glaucoma: From Treatment to Biological Perspectives', *Journal of Ophthalmology*.
- [13] I. C. F. Pereira, R. Van De Wijdeven, H. M. Wyss, H. J. M. Beckers, and J. M. J. Den Toonder, 'Conventional glaucoma implants and the new MIGS devices: a comprehensive review of current options and future directions', *Eye*, vol. 35, no. 12, pp. 3202–3221, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41433-021-01595-x.
- [14] I. C. F. Pereira, R. Van De Wijdeven, H. M. Wyss, H. J. M. Beckers, and J. M. J. Den Toonder, 'Conventional glaucoma implants and the new MIGS devices: a comprehensive review of current options and future directions', *Eye*, vol. 35, no. 12, pp. 3202–3221, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41433-021-01595-x.
- [15] J. Kammer and K. Mundy, 'Suprachoroidal devices in glaucoma surgery', *Middle East Afr J Ophthalmol*, vol. 22, no. 1, p. 45, 2015, doi: 10.4103/0974-9233.148348.
- [16] W. Green, J. T. Lind, and A. Sheybani, 'Review of the Xen Gel Stent and InnFocus MicroShunt', *Current Opinion in Ophthalmology*, vol. 29, no. 2, pp. 162–170, Mar. 2018, doi: 10.1097/ICU.0000000000000462.
- [17] M. Kasahara and N. Shoji, 'Effectiveness and limitations of minimally invasive glaucoma surgery targeting Schlemm's canal', *Jpn J Ophthalmol*, vol. 65, no. 1, pp. 6–22, Jan. 2021, doi: 10.1007/s10384-020-00781-w.

- [18] H. Ehrlich, 'Biomaterials and Biological Materials, Common Definitions, History, and Classification', in *Biological Materials of Marine Origin*, vol. 1, in *Biologically-Inspired Systems*, vol. 1, Dordrecht: Springer Netherlands, 2010, pp. 3–22. doi: 10.1007/978-90-481-9130-7_1.
- [19] C.-H. Hong, A. Arosemena, D. Zurakowski, and R. S. Ayyala, 'Glaucoma drainage devices: a systematic literature review and current controversies', *Survey of Ophthalmology*, vol. 50, no. 1, pp. 48–60, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.survophthal.2004.10.006.
- [20] A. W. Lloyd, R. G. A. Faragher, and S. P. Denyer, 'Ocular biomaterials and implants', *Biomaterials*, vol. 22, no. 8, pp. 769–785, Apr. 2001, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00237-4.
- [21] O. J. Uwaezuoke, P. Kumar, V. Pillay, and Y. E. Choonara, 'Fouling in ocular devices: implications for drug delivery, bioactive surface immobilization, and biomaterial design', *Drug Deliv. and Transl. Res.*, vol. 11, no. 5, pp. 1903–1923, Oct. 2021, doi: 10.1007/s13346-020-00879-1.
- [22] A. J. T. Teo, A. Mishra, I. Park, Y.-J. Kim, W.-T. Park, and Y.-J. Yoon, 'Polymeric Biomaterials for Medical Implants and Devices', *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 2, no. 4, pp. 454–472, Apr. 2016, doi: 10.1021/acsbiomaterials.5b00429.
- [23] K. Kaushik, R. B. Sharma, and S. Agarwal, 'Natural Polymers and their Applications', no. 05.
- [24] M. F. Maitz, 'Applications of synthetic polymers in clinical medicine', *Biosurface and Biotribology*, vol. 1, no. 3, pp. 161–176, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.bsbt.2015.08.002.
- [25] L. Pinchuk *et al.*, 'The development of a micro-shunt made from poly(styrene- *block* - isobutylene- *block* -styrene) to treat glaucoma', *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 105, no. 1, pp. 211–221, Jan. 2017, doi: 10.1002/jbm.b.33525.
- [26] S. Krishnan, C. J. Weinman, and C. K. Ober, 'Advances in polymers for anti-biofouling surfaces', *J. Mater. Chem.*, vol. 18, no. 29, p. 3405, 2008, doi: 10.1039/b801491d.
- [27] M. Aghajani and F. Esmaeili, 'Anti-biofouling assembly strategies for protein & cell repellent surfaces: a mini-review', *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 32, no. 13, pp. 1770–1789, Sep. 2021, doi: 10.1080/09205063.2021.1932357.
- [28] S. Liu and W. Guo, 'Anti-Biofouling and Healable Materials: Preparation, Mechanisms, and Biomedical Applications', *Adv. Funct. Mater.*, vol. 28, no. 41, p. 1800596, Oct. 2018, doi: 10.1002/adfm.201800596.
- [29] S.-Y. Lin, V. R. Parasuraman, S. L. Mekuria, S. Peng, H.-C. Tsai, and G.-H. Hsiue, 'Plasma initiated graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on silicone elastomer surfaces to enhance bio(hemo)compatibility', *Surface and Coatings Technology*, vol. 315, pp. 342–349, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.surfcoat.2017.02.039.
- [30] S. Patel, R. G. Thakar, J. Wong, S. D. McLeod, and S. Li, 'Control of cell adhesion on poly(methyl methacrylate)', *Biomaterials*, vol. 27, no. 14, pp. 2890–2897, May 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.12.009.
- [31] A. Colas and J. Curtis, '2.3 SILICONE BIOMATERIALS: HISTORY AND CHEMISTRY'.
- [32] W. C. Ag, 'Room Temperature Vulcanizing RTV Silicones'.
- [33] 'lewis1962.pdf'.
- [34] F. Virlogeux, D. Bianchini, F. Delor-Jestin, M. Baba, and J. Lacoste, 'Evaluation of cross-linking after accelerated photo-ageing of silicone rubber', *Polym. Int.*, vol. 53, no. 2, pp. 163–168, Feb. 2004, doi: 10.1002/pi.1329.
- [35] S. Yilmaz-Bayraktar, K. Foremny, M. Kreienmeyer, A. Warnecke, and T. Doll, 'Medical-Grade Silicone Rubber–Hydrogel-Composites for Modiolar Hugging Cochlear Implants', *Polymers*, vol. 14, no. 9, p. 1766, Apr. 2022, doi: 10.3390/polym14091766.
- [36] 'SILPURAN-2420-AB-en-2021.09.15.pdf'.
- [37] G. Kang and Y. Cao, 'Application and modification of poly(vinylidene fluoride) (PVDF) membranes – A review', *Journal of Membrane Science*, vol. 463, pp. 145–165, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.memsci.2014.03.055.

- [38] P. Saxena and P. Shukla, 'A comprehensive review on fundamental properties and applications of poly(vinylidene fluoride) (PVDF)', *Adv Compos Hybrid Mater*, vol. 4, no. 1, pp. 8–26, Mar. 2021, doi: 10.1007/s42114-021-00217-0.
- [39] W. Eisenmenger, H. Schmidt, and B. Dehlen, 'Space Charge and Dipoles in Polyvinylidene fluoride', *Brazilian Journal of Physics*, vol. 29, no. 2, 1999.
- [40] P. Sajkiewicz, A. Wasiak, and Z. Goc, 'Phase transitions during stretching of poly(vinylidene fluoride)', *European Polymer Journal*, 1999.
- [41] R. Dallaev, T. Pisarenko, D. Sobola, F. Orudzhev, S. Ramazanov, and T. Trčka, 'Brief Review of PVDF Properties and Applications Potential', *Polymers*, vol. 14, no. 22, p. 4793, Nov. 2022, doi: 10.3390/polym14224793.
- [42] G. J. Ross, J. F. Watts, M. P. Hill, and P. Morrissey, 'Surface modification of poly(vinylidene fluoride) by alkaline treatment1. The degradation mechanism', *Polymer*, vol. 41, no. 5, pp. 1685–1696, Mar. 2000, doi: 10.1016/S0032-3861(99)00343-2.
- [43] V. Cardoso, D. Correia, C. Ribeiro, M. Fernandes, and S. Lanceros-Méndez, 'Fluorinated Polymers as Smart Materials for Advanced Biomedical Applications', *Polymers*, vol. 10, no. 2, p. 161, Feb. 2018, doi: 10.3390/polym10020161.
- [44] T. He *et al.*, 'Electrospinning polyvinylidene fluoride fibrous membranes containing anti-bacterial drugs used as wound dressing', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 130, pp. 278–286, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.04.026.
- [45] Naresh and P. Khatak, 'Laser cutting technique: A literature review', *Materials Today: Proceedings*, vol. 56, pp. 2484–2489, 2022, doi: 10.1016/j.matpr.2021.08.250.
- [46] H. Tercan, T. A. Khawli, U. Eppelt, C. Büscher, T. Meisen, and S. Jeschke, 'Improving the laser cutting process design by machine learning techniques', *Prod. Eng. Res. Dev.*, vol. 11, no. 2, pp. 195–203, Apr. 2017, doi: 10.1007/s11740-017-0718-7.
- [47] K. Wudy, L. Lanzl, and D. Drummer, 'Selective Laser Sintering of Filled Polymer Systems: Bulk Properties and Laser Beam Material Interaction', *Physics Procedia*, vol. 83, pp. 991–1002, 2016, doi: 10.1016/j.phpro.2016.08.104.
- [48] T. R. Ablyaz, E. S. Shlykov, K. R. Muratov, and S. S. Sidhu, 'Analysis of Wire-Cut Electro Discharge Machining of Polymer Composite Materials', *Micromachines*, vol. 12, no. 5, p. 571, May 2021, doi: 10.3390/mi12050571.
- [49] M. Hyvärinen, R. Jabeen, and T. Kärki, 'The Modelling of Extrusion Processes for Polymers—A Review', *Polymers*, vol. 12, no. 6, p. 1306, Jun. 2020, doi: 10.3390/polym12061306.
- [50] S. C. Chen, Y. C. Chen, and H. S. Peng, 'Simulation of injection-compression-molding process. II. Influence of process characteristics on part shrinkage', *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 75, no. 13, pp. 1640–1654, Mar. 2000, doi: 10.1002/(SICI)1097-4628(20000328)75:13<1640::AID-APP10>3.0.CO;2-L.
- [51] Y. Sun, S. Cheng, W. Lu, Y. Wang, P. Zhang, and Q. Yao, 'Electrospun fibers and their application in drug controlled release, biological dressings, tissue repair, and enzyme immobilization', *RSC Adv.*, vol. 9, no. 44, pp. 25712–25729, 2019, doi: 10.1039/C9RA05012D.
- [52] P. S. Melo, 'LABORATORIO INGEGNERIA DEI MATERIALI ANNO ACCADEMICO 2020-2021 TECNICHE DI BIOFABBRICAZIONE - ELECTROSPINNING'.
- [53] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, 'Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique', *Biotechnology Advances*, vol. 28, no. 3, pp. 325–347, May 2010, doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
- [54] A. Greiner and J. H. Wendorff, 'Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers', *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 46, no. 30, pp. 5670–5703, Jul. 2007, doi: 10.1002/anie.200604646.
- [55] J. Yoon, H. Yang, B. Lee, and W. Yu, 'Recent Progress in Coaxial Electrospinning: New Parameters, Various Structures, and Wide Applications', *Advanced Materials*, vol. 30, no. 42, p. 1704765, Oct. 2018, doi: 10.1002/adma.201704765.

- [56] D. Han and A. J. Steckl, 'Coaxial Electrospinning Formation of Complex Polymer Fibers and their Applications', *ChemPlusChem*, vol. 84, no. 10, pp. 1453–1497, Oct. 2019, doi: 10.1002/cplu.201900281.
- [57] B. Robb and B. Lennox, 'The electrospinning process, conditions and control', in *Electrospinning for Tissue Regeneration*, Elsevier, 2011, pp. 51–66. doi: 10.1533/9780857092915.1.51.
- [58] Z. Li and C. Wang, 'Effects of Working Parameters on Electrospinning', in *One-Dimensional nanostructures*, in SpringerBriefs in Materials. , Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 15–28. doi: 10.1007/978-3-642-36427-3_2.
- [59] H. W. Tan, Y. Y. C. Choong, C. N. Kuo, H. Y. Low, and C. K. Chua, '3D printed electronics: Processes, materials and future trends', *Progress in Materials Science*, vol. 127, p. 100945, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.pmatsci.2022.100945.
- [60] K. Tappa and U. Jammalamadaka, 'Novel Biomaterials Used in Medical 3D Printing Techniques', *JFB*, vol. 9, no. 1, p. 17, Feb. 2018, doi: 10.3390/jfb9010017.
- [61] R. B. Kristiawan, F. Imaduddin, D. Ariawan, Ubaidillah, and Z. Arifin, 'A review on the fused deposition modeling (FDM) 3D printing: Filament processing, materials, and printing parameters', *Open Engineering*, vol. 11, no. 1, pp. 639–649, Apr. 2021, doi: 10.1515/eng-2021-0063.
- [62] S. Ramesh *et al.*, 'Extrusion bioprinting: Recent progress, challenges, and future opportunities', *Bioprinting*, vol. 21, p. e00116, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.bprint.2020.e00116.
- [63] A. Moya, G. Gabriel, R. Villa, and F. Javier Del Campo, 'Inkjet-printed electrochemical sensors', *Current Opinion in Electrochemistry*, vol. 3, no. 1, pp. 29–39, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.coelec.2017.05.003.
- [64] P. Patpatiya, K. Chaudhary, A. Shastri, and S. Sharma, 'A review on polyjet 3D printing of polymers and multi-material structures', *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part C: Journal of Mechanical Engineering Science*, vol. 236, no. 14, pp. 7899–7926, Jul. 2022, doi: 10.1177/09544062221079506.
- [65] M. Haerst, V. Seitz, M. Ahrens, C. Boudot, and E. Wintermantel, 'Silicone Fiber Electrospinning for Medical Applications', in *6th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering*, vol. 45, I. Lacković and D. Vasic, Eds., in IFMBE Proceedings, vol. 45. , Cham: Springer International Publishing, 2015, pp. 537–540. doi: 10.1007/978-3-319-11128-5_134.
- [66] D. D. Akolpoğlu Başaran, U. Gündüz, A. Tezcaner, and D. Keskin, 'Topical delivery of heparin from PLGA nanoparticles entrapped in nanofibers of sericin/gelatin scaffolds for wound healing', *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 597, p. 120207, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120207.
- [67] S. Zaefferer, 'A critical review of orientation microscopy in SEM and TEM', *Cryst. Res. Technol.*, vol. 46, no. 6, pp. 607–628, Jun. 2011, doi: 10.1002/crat.201100125.
- [68] S. D. Sawant, A. A. Baravkar, and R. N. Kale, 'FT-IR SPECTROSCOPY: PRINCIPLE, TECHNIQUE AND MATHEMATICS'.
- [69] A. Nakano, N. Miki, K. Hishida, and A. Hotta, 'Solution parameters for the fabrication of thinner silicone fibers by electrospinning', *Phys. Rev. E*, vol. 86, no. 1, p. 011801, Jul. 2012, doi: 10.1103/PhysRevE.86.011801.
- [70] J. Chan Lee, S. Hwan In, C. Hee Park, and C. Sang Kim, 'Development of multi-layer membrane manufacturing technology for stent coating using electrospinning technology', *Materials Letters*, vol. 331, p. 133415, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.matlet.2022.133415.
- [71] D. Sengupta *et al.*, 'Characterization of single polyvinylidene fluoride (PVDF) nanofiber for flow sensing applications', *AIP Advances*, vol. 7, no. 10, p. 105205, Oct. 2017, doi: 10.1063/1.4994968.

- [72] T. Paragkumar N, D. Edith, and J.-L. Six, 'Surface characteristics of PLA and PLGA films', *Applied Surface Science*, vol. 253, no. 5, pp. 2758–2764, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.apsusc.2006.05.047.
- [73] D. D. Akolpoğlu Başaran, U. Gündüz, A. Tezcaner, and D. Keskin, 'Topical delivery of heparin from PLGA nanoparticles entrapped in nanofibers of sericin/gelatin scaffolds for wound healing', *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 597, p. 120207, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120207.